



Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Lekarski

Rozprawa doktorska

Claudia Musiał

Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17 β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolakoraka płuc, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Górską-Ponikowska, Prof. GUMed
Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej GUMed

Gdańsk 2023

Podziękowania

Pragnę złożyć podziękowania wszystkim osobom, dzięki którym powstanie niniejszej rozprawy doktorskiej było możliwe, która jest spełnieniem moich zawodowych marzeń i planów.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Promotor, dr hab. n med. Magdalenie Górskiej-Ponikowskiej, Profesor Uczelni, Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej GUMed, za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki, poświęcony czas przy realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej oraz nieustającą motywację do wielokierunkowego spojrzenia na podjętą problematykę badawczą.

Podziękowania składam Panu prof. dr hab. Jackowi M. Witkowskiemu, Dyrektorowi Pierwszej Szkoły Doktorskiej GUMed, za nieocenioną pomoc, współpracę naukową i nadzór nad przebiegiem kształcenia w Pierwszej Szkole Doktorskiej GUMed.

Składam podziękowania Pani dr n. med. Agnieszce Daca, za wszelką pomoc i pełną życzliwość współpracę naukową.

Podziękowania składam również Panu prof. dr hab. n. med. Tomaszowi Bączkowi oraz Pani dr hab. n. farm. Lucynie Koniecznej z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej za owocną współpracę naukową w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

Serdeczne podziękowania składam Pani prof. dr hab. Renacie Zaucha, Ordynator Oddziału Chemioterapii Diennej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego, za pomoc przy realizacji niniejszej pracy, cenne uwagi oraz pełną serdeczność współpracę naukową.

Podziękowania składam również Panu dr n. med. Narcyzowi Knap, za współpracę merytoryczną w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Słowa podziękowania, kieruję do moich Najbliższych, za nieustanną wiarę w moje możliwości, morze cierpliwości i wyrozumiałości. Wasze ogromne wsparcie pozwoliło mi na realizację mojego marzenia i było nieocenione w każdej chwili zwątpienia.

Rozprawę doktorską dedykuję moim Rodzicom.

SPIS TREŚCI

I. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	5
II. DOROBEK NAUKOWY W TRAKCIE KSZTAŁCENIA W PIERWSZEJ SZKOLE DOKTORSKIEJ GUMED	6
III. PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM DYSERTACJI	7
III. WSPARCIE PROJEKTU - FINANSOWANIE	8
IV. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	9
V. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	12
VI. WPROWADZENIE	15
VII. CEL PRACY	21
VIII. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	22
I. Publikacja 1.	22
II. Publikacja 2.	23
IX. METODY	25
9.1. Linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka płuca i hodowla w warunkach laboratoryjnych wraz z traktowaniem linii komórkowej A549.....	25
9.2. Metodyka przeprowadzonych badań.....	26
9.3. Test żywotności komórek (MTT/WST1)	26
9.4. Optymalizacja hodowli sferoidalnej trójwymiarowej linii komórkowej A549	28
9.5. 3-Bromopirogronian (3-BrPA) w połączeniu z 2-metoksyestradiolem na ludzkich komórkach gruczolakoraka płuca A549	30
9.6. Badanie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) za pomocą cytometrii przepływowej.....	30
9.7. Określenie żywotności komórkowej za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.....	31
9.8. Określenie identyfikacji reaktywnych form tlenu (ROS) za pomocą detekcji luminescencji i fluorescencji	32
9.9. Analiza poziomu hormonów steroidowych i stresu nitrooksydacyjnego w surowicy pacjentów z gruczolakorakiem płuca	32
9.9.1. Populacja badana	33
9.9.2. Kryteria włączenia i wyłączenia.....	34
9.9.3. Pobranie próbek surowicy krwi od uczestników badania oraz analiza estrogenów w surowicy krwi	34
9.9.4. Analiza statystyczna wyników badania klinicznego	35
9.10. Analiza śmierci komórkowej w kierunku ferroptozy i nekroptozy metodą barwienia fluorescencyjnego	36
9. 11. Analiza statystyczna otrzymanych wyników badań w warunkach laboratoryjnych <i>in vitro</i> ...	38
X. WYNIKI.....	39
10. 1. Ustalenie warunków i optymalizacja trójwymiarowej sferoidalnej hodowli komórkowej linii A549.....	39

10. 2. Wpływ wybranych metabolitów 17 β -estradiolu na żywotność komórek A549 niedrobnokomórkowego raka płuca w modelu dwuwymiarowym i trójwymiarowym sferoidalnym.....	42
10.3. Indukcja sygnału reaktywnych form tlenu w hodowli komórkowej A549 traktowanej 2-metoksyestradiolem.....	46
10.3.1. Odczyt sygnału reaktywnych form tlenu za pośrednictwem detekcji luminescencji	46
10.3.2. Odczyt sygnału reaktywnych form tlenu za pośrednictwem cytometrii przepływowej.....	48
10. 4. Śmierć komórkowa indukowana 2-metoksyestradiolem (nekroza i późna apoptoza) w modelu komórkowym raka płuca A549	50
10.5. Ilościowe oznaczenie zawartości DNA komórek A549 za pomocą cytometrii przepływowej .	51
10.6. Mikroskopia fluorescencyjna w czasie rzeczywistym	53
10.6.1. Kombinacja 2-metoksyestradiolu z 3-Bromopirogronianem na dwuwymiarowym modelu hodowli komórek A549	53
10.6.2. Ferroptoza indukowana przez 2-metoksyestradiol w hodowli sferoidalnych komórek linii A549	55
10.6.3. Nekroptoza indukowana przez 2-metoksyestradiol w hodowli sferoidalnych komórek wielokomórkowych A549.....	57
10.7. Progresja raka i poziomy pochodnych estrogenów w surowicy	60
XI. DYSKUSJA	66
XII. WNIOSKI	77
XIII. POZOSTAŁE PUBLIKACJE NAUKOWE ORAZ KSIĄŻKI AUTORSKIE.....	78
13.1. Książki autorskie	78
13.2. Pozostałe publikacje naukowe	78
XIV. WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE	82
14.1. Wystąpienia naukowe	82
14.2. Pozostałe wystąpienia konferencyjne.....	83
XV. CZŁONKOSTWO W STOWARZYSZENIACH NAUKOWYCH	85
XVI. UCZESTNICTWO W PROJEKTACH BADAWCZYCH.....	86
XVII. PIŚMIENNICTWO.....	87
XVIII. SPIS TABEL I RYCIN	95
18.1. Spis tabel	95
18.2. Spis schematów.....	95
18.3. Spis rycin.....	95
XIX. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD HYBRYDOWEJ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	97

I. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

2D – dwuwymiarowy

3D – trójwymiarowy

E1- estron

E2 - 17 β -estradiol

E3 – estriol

ER, ang. estrogen receptor – receptor estrogenowy

Fer-1. ang. *Ferostatin-1* – ferostatyna-1

N-1, ang. *Necrostatin-1* – nekrostatyna-1

2-ME - 2-metoksyestradiol

2-OHE1 - 2-hydroksyestron

3-BrPA, ang. 3-bromopyruvate - kwas 3-bromopirogronowy

16 α -OHE1 - 16- α -hydroksyestron

CYP1B1 – gen kodujący białko należący do rodziny enzymów cytochromu P450 (ang. *cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1*)

CYP1A2 - gen kodujący cytochrom P450 (ang. *cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2*)

SCLC, ang. *small-cell lung cancer* – drobnokomórkowy rak płuca

NSCLC, ang. *non-small lung cancer* – niedrobnokomórkowy rak płuca

DMSO, ang. *dimethyl sulfoxide* – dimetylosulfotlenek

ELISA, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay* – test immunoenzymatyczny

IC, ang. *inhibitory concentration* - stężenie hamujące

PI - ang. *propidium iodide* – jodek propidyny

ULA, ang. *ultra low attachment* – ultraniska powłoka przylegania

HIF-1 α , ang. *hypoxia-inducible factor 1* - czynnik indukowany hipoksją 1

HTZ – hormonalna terapia zastępcza

SLC7A11 - ang. *solute carrier family 7 member 11*

SOX2 - ang. *sex determining region Y*

II. DOROBEK NAUKOWY W TRAKCIE KSZTAŁCENIA W PIERWSZEJ SZKOLE DOKTORSKIEJ GUMED

Wskaźnik Impact Factor: 37,513

Sumaryczna punktacja MEiN: 905

Pełen wykaz dorobku naukowego wraz z wyszczególnioną punktacją MEiN i wskaźnikiem Impact Factor został przedstawiony na łamach niniejszej dysertacji doktorskiej w rozdziale III *Publikacje będące przedmiotem dysertacji* oraz w rozdziale XIII *Pozostałe publikacje naukowe i książki autorskie*.

III. PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM DYSERTACJI

Łączny wskaźnik **Impact Factor**: 16,014

Sumaryczna punktacja **MEiN**: 280

Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer

Musiał, C.; Zaucha, R.; Kuban-Jankowska, A.; Konieczna, L.; Belka, M.; Marino Gammazza, A.; Bączek, T.; Cappello, F.; Woźniak, M.; Górską-Ponikowska, M. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 648. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020648>

doi: 10.3390/ijerph18020648 PMID: 33466597 PMCID: PMC7828659

Impact Factor: **4.614**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **140,00**

Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer

Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górską-Ponikowska M. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395.

doi: 10.1016/j.redox.2022.102395 PMID: 35841627; PMCID: PMC9289866

Impact Factor: **11,400**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **140,00**

III. WSPARCIE PROJEKTU - FINANSOWANIE

Finansowanie niniejszych badań obejmuje: Projekt Badawczego dla Młodych Naukowców Programu IDUB MTN nr 71–1203 (Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska) oraz ST46 (Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska) oraz POWR.03.05.00-00-z082/18.

IV. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Rak płuc jest jednym z najczęstszych nowotworów wśród pacjentów onkologicznych i jest jednym z najwyższych wskaźników śmiertelności w tej dziedzinie. Rak płuca, ze względu na dużą chorobowość i wysoką śmiertelność wśród populacji, stanowi wyzwanie w zakresie terapii onkologicznych. Wiadomo, że rak płuca jest nowotworem heterogennym z komórkowego i histologicznego punktu widzenia. W tym zakresie priorytetem okazuje się wczesna diagnostyka raka płuca. Jak wskazują dane epidemiologiczne, istnieje związek pomiędzy występowaniem raka płuca u kobiet, co jednocześnie wskazuje na rolę hormonów steroidowych w etiopatogenezie gruczolaka płuca. Zależności epidemiologiczne opisano na łamach publikacji Musiał C. i wsp. *Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer* (Int J Environ Res Public Health, 2021).

W ramach niniejszej pracy, przeprowadzono badania poświęcone cytotoksyczności metabolitów estradiolu wobec komórek gruczolaka płuca (ang. *lung adenocarcinoma*), zarówno w modelu dwuwymiarowym i trójwymiarowym. Zaobserwowano, że 2-ME zmniejsza żywotność gruczolaka płuca w dwuwymiarowych (2D) i trójwymiarowych (3D) sferoidalnych modelach hodowli komórkowej A549. W badaniu wykorzystano sferoidalną hodowlę komórek 3D w celu naśladowania warunków i środowiska nowotworu *in vivo* raka płuca. Na łamach publikacji Musiał C. i wsp. (*Redox Biology*, 2022), według najlepszej wiedzy po raz pierwszy opisano wpływ 2-ME na śmierć linii komórkowej ludzkiego gruczolaka płuca A549 w sferoidalnym modelu trójwymiarowym.

Badania niniejszej dysertacji doktorskiej obejmują testy cytotoksyczności metabolitów 17 β -estradiolu, gdzie kolejno, ze względu na swoją wysoką skuteczność, jako główny metabolit w niniejszej rozprawie doktorskiej wybrano 2-metoksyestradiol (2-ME). Ponadto, przedstawiono wpływ 2-ME na model hodowli komórkowej wielokomórkowego sferoidalnego niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, ang. *non small lung cancer*). Dowiedziono również, że działanie 2-ME polega na indukcji stresu nitrooksydacyjnego. Potwierdzono również indukcję nekrozy oraz późnej apoptozy na skutek zastosowania 2-ME.

Wyniki wskazują, że w 2-ME, który jest potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym, w sferoidalnym modelu linii komórkowej A549 indukuje ferroptozę, która odgrywa kluczową rolę w terapii raka. Wyniki badań wskazują również, że połączenie interakcji 2-ME z 3-BrPA rzuca nowe światło na szlaki sygnalizacji śmierci komórek ludzkich komórek gruczolakoraka płuc. Zatem odkrycia sugerują również, że 2-ME w połączeniu z nekrostatyną-1 indukuje nekroptozę mitochondriów, co zwiększa potencjał przeciwnowotworowy 2-ME. Wyniki badań sugerują, że 2-ME, dzięki odkrytemu mechanizmowi śmierci komórkowej, jest potencjalnym adiuwantem terapeutycznym, który ma istotną wartość w zakresie przyszłych badań klinicznych w zakresie projektowania leków przeciwnowotworowych ukierunkowanych na NSCLC.

Co więcej, wskazuje się na zależność pomiędzy stosunkiem hormonów steroidowych u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, co może być nowym kierunkiem w diagnostyce profilaktycznej u kobiet, jak również klinicznym zastosowaniem w leczeniu raka płuca u kobiet.

Jak wykazano na łamach publikacji Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer (Redox Biology, 2022)* u pacjentów z NSCLC, stwierdza się znacznie niższy poziom 2-ME w surowicy niż u osób zdrowych, przy jednocześnie nieco niższym poziomie macierzystej cząsteczki katecholu, 2-hydroksyestradiolu (2OHE2). Wyniki niniejszego badania *in vivo* wskazano po raz pierwszy, zgodnie z najlepszą wiedzą, na możliwe zastosowanie estrogenów jako potencjalnych biomarkerów nowotworów NSCLC.

W niniejszym projekcie doktorskim udało się udowodnić ponad wszelką wątpliwość na modelach komórek nowotworowych A549, zarówno w postaci 2D jak i 3D, że 2-ME wykazuje silne i skuteczne działanie przeciwnowotworowe. Ponadto, wykazano również ogromny potencjał biomarkera gruczolakoraka płuca, w postaci 2-ME oraz innych pochodnych estrogenu w surowicy.

Współpraca w zakresie podstawowych nauk medycznych oraz nauk klinicznych o charakterze multidyscyplinarnym, pozwoliła na przeprowadzenie nie tylko badań laboratoryjnych *in vitro* z uwzględnieniem modeli hodowli komórkowej 2D oraz 3D, jak również *in vivo*. Otrzymane wyniki badań pozwalają na zrozumienie

interakcji pomiędzy metabolitami estradiolu na czele z 2-ME, a komórkami gruczolakoraka płuca.

W nawiązaniu do dostępnych danych, prawdopodobnie jest to pierwszy projekt badawczy dowodzący wpływ 2-ME na śmierć komórek A549 w modelu 3D. Jak wskazano w niniejszej rozprawie doktorskiej, badania w myśl medycyny translacyjnej z uwzględnieniem onkologii eksperymentalnej *in vitro*, mogą pomóc w przyszłości w opracowaniu spersonalizowanej opieki zdrowotnej, również w obszarze onkologii klinicznej.

Słowa kluczowe: gruczolakorak płuca, 2-metoksyestradiol, stres nitro–oksydacyjny, onkologia eksperymentalna, metabolity estrogeny, śmierć komórki, medycyna translacyjna

V. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Lung cancer is one of the most common cancers among cancer patients and has one of the highest mortality rates in the field. Lung cancer, due to high morbidity and high mortality among the population, is a challenge in the field of oncology therapies. Lung cancer is known to be heterogeneous from a cellular and histological point of view. In this regard, the early diagnosis of lung cancer turns out to be a priority. As indicated by epidemiological data, there is a relationship between the occurrence of lung cancer in women, which at the same time indicates the role of steroid hormones in the etiopathogenesis of lung adenocarcinoma. Epidemiological relationships are described in the publication by Musiał C. et al. *Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer* (Int J Environ Res Public Health, 2021).

As part of this work, studies on the cytotoxicity of estradiol metabolites against lung adenocarcinoma cells were carried out, both in two-dimensional and three-dimensional models. 2-ME has been observed to reduce lung adenocarcinoma viability in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) spheroidal A549 cell culture models. The study used a spheroidal 3D cell culture to mimic the tumor conditions and environment of *in vivo* lung cancer. In the publication of Musiał C. et al. (*Redox Biology*, 2022), to the best of our knowledge, the effect of 2-ME on the death of the human lung adenocarcinoma cell line A549 was described for the first time in a three-dimensional spheroidal model.

The research of this doctoral dissertation includes cytotoxicity tests of 17 β -estradiol metabolites, where, in turn, due to its high efficiency, 2-methoxyestradiol (2-ME) was chosen as the main metabolite in this doctoral dissertation. In addition, the effect of 2-ME has been shown on a cell culture model of multicellular spheroidal non-small cell lung cancer (NSCLC). It has also been proven that 2-ME works by inducing nitrooxidative stress. The induction of necrosis and late apoptosis was also confirmed due to the use of 2-ME.

The results indicate that in 2-ME, a potential anti-cancer drug, in a spherical model of the A549 cell line, it induces ferroptosis, which plays a key role in cancer therapy. Research results also indicate that the combination of interactions 2-ME with 3-BrPA sheds new light on the cell death signaling pathways of human lung

adenocarcinoma cells. Thus, the findings also suggest that 2-ME combined with necrostatin-1 induces mitochondrial necroptosis, which increases the anticancer potential of 2-ME. The study results suggest that 2-ME, due to the discovered mechanism of cell death, is a potential therapeutic adjuvant that has significant value in terms of future clinical trials for the design of anti-cancer drugs targeting NSCLC.

Moreover, there is a relationship between the ratio of steroid hormones in patients with non-small cell lung cancer, which may be a new direction in preventive diagnosis in women, as well as clinical use in the treatment of lung cancer in women.

As shown in the publication Musiał C. et al. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer* (Redox Biology, 2022) in patients with NSCLC, we have shown in patients with NSCLC, levels 2-ME in serum are significantly lower than in healthy individuals, with slightly lower levels of the parent catechol molecule, 2-hydroxyestradiol (2OHE2). The results of this *in vivo* study indicate for the first time, to the best of knowledge, the possible use of estrogens as potential biomarkers of NSCLC tumors.

In this doctoral research project, it was possible to prove beyond any doubt on A549 cancer cell models, both in 2D and 3D, that 2-ME has a strong and effective anticancer effect. In addition, the great potential of a lung adenocarcinoma biomarker in the form of 2-ME and other serum estrogen derivatives has also been demonstrated.

Cooperation in the field of basic medical sciences and multidisciplinary clinical sciences allowed for conducting not only *in vitro* laboratory tests, including 2D and 3D cell culture models, as well as *in vivo*. The obtained results allow us to understand the interactions between estradiol metabolites, including 2-ME, and lung adenocarcinoma cells. According to the available data, this is probably the first research project to prove the effect of 2-ME on A549 cell death in a 3D model. As indicated in this doctoral dissertation, research based on translational medicine, including *in vitro* experimental oncology, may help in the future in the development of personalized healthcare, also in the field of clinical oncology.

Key words: lung adenocarcinoma, 2-methoxyestradiol, nitro-oxidative stress, experimental oncology, estrogen metabolites, cell death, translational medicine

VI. WPROWADZENIE

Niniejsza rozprawa doktorska została przedstawiona w formie hybrydowej. Oznacza to, że złożona jest z prac opublikowanych w formie publikacji naukowych, jak również dodatkowych wyników uzupełniających.

Rak płuca ze względu na wysoką śmiertelność stanowi jedno z największych wyzwań w leczeniu onkologicznym. Rak płuca dzieli się zwykle na drobnokomórkowego raka płuca (SCLC, ang. *small-cell lung cancer*) i niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, ang. *non-small lung cancer*), które kolejno można podzielić na gruczolakoraka, raka wielkomórkowego oraz raka płaskonabłonkowego [1].

W ciągu ostatniej dekady coraz częściej wykazano znaczące różnice w częstości występowania raka płuca między kobietami i mężczyznami. Przyjmuje się, że obok czynników ekspozycyjnych, genetycznych i epigenetycznych niezwykle istotne wydają się czynniki związane z hormonami płciowymi [1].

Epidemiologicznie, jak również pod względem obrazu molekularnego, różnice te odnotowuje się również w niedrobnokomórkowym raku płuca. Gruczolakorak płuca jest jednym z głównych nowotworów niedrobnokomórkowych. Należy szczególnie podkreślić, że jest to najczęściej występujący podtyp NSCLC u pacjentów nigdy nie palących tytoniu [1].

Jak wskazują dostępne dane, występowanie NSCLC u kobiet jest trzykrotnie większe, aniżeli u mężczyzn. Zwiększona częstość występowania u kobiet wedle statystyk dotyczących raka płuca sugeruje, że hormony płciowe mogą przyczyniać się do etiopatogenezy i / lub progresji gruczolakoraka płuca [1].

Dowody i mechanizmy potwierdzające zależność między hormonami steroidowymi, takimi jak 17β -estradiol, a ryzykiem zachorowania na raka płuca dotychczas nie były spójne, jednak wiadome jest, że istnieje związek pomiędzy hormonami płciowymi, a podatnością na rozwój procesu kancerogenezy w płucach [1,2]. W tym zakresie warto zaznaczyć, że płuca aktywnie metabolizują zarówno androgeny, jak i estrogeny, jak również mogą syntetyzować 17β -estradiol i estron *in situ*. Estrogeny metabolizowane są przez enzym CYP1B1 do wysoce reaktywnych estrogenów, takich jak 2-; 4-; 16- -hydroksy (OH) estradiol i 2-; 4-; 16-

hydroksy (OH) estron. Kolejno, ulegają metoksylacji przy udziale katecholo-O-metylotransferazy do metoksyestrogenów [1,2].

Wiadomym jest, że estradiol jest pro-kancerogeny. Zwiększona produkcja 17β -estradiolu wspomaga proliferację komórek niedrobnokomórkowych guzów płuca i w sposób niekorzystny proces ten wpływa na rokowanie u pacjentów z gruczolakorakiem płuca [1,2].

Warto również zauważyć, że estron wykazuje potencjał pro-kancerogeny. Uważa się również, że katecholoestrogeny, a w szczególności 4-OH-estradiol, posiadają silne działanie genotoksyczne, a stąd pro-kancerogenne [1,2]. Natomiast, synteza metoksyestrogenów wydaje się niwelować pro-kancerogenne działanie estradiolu oraz katecholoestrogenów [1-4]. Jednym z najbardziej znanych metoksyestrogenów jest 2-metoksyestradiol (2-ME). 2-metoksyestradiol jest pochodną 17β -estradiolu, która cechuje się działaniem antynowotworowym, które zostało potwierdzone badaniami *in vitro* i *in vivo* [3-5].

2-metoksyestradiol jest głównym metabolitem 17β -estradiolu (E2) [1,2]. Jak wskazano w publikacjach autorstwa promotora niniejszej rozprawy doktorskiej dr hab. n. med. Magdaleny Górskiej Ponikowskiej, Profesor Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej GUMed, 2-ME może być potencjalnie stosowany jako skuteczny środek przeciwnowotworowy w terapii kostniakomięsaka, nerwiaka niedojrzałego i prawdopodobnie innych guzów łitych [5-12]. Skuteczność terapeutyczna 2-ME (znanego pod nazwą handlową Panzem®), została udokumentowana w badaniach klinicznych fazy I i II w leczeniu zaawansowanego raka nerki, prostaty, jajnika [2,13-16,].

Dotychczas, badania *in vitro* potwierdziły potencjał przeciwnowotworowy 2-ME w leczeniu raka piersi, okrężnicy i płuca. Należy jednak podkreślić, że 2-ME nie wszedł do badań klinicznych fazy III ze względu na niską biodostępność po podaniu doustnym [2,13-16]. Dlatego nowe pochodne i preparaty leków 2-ME są opracowywane w licznych badaniach na świecie w nurcie nauki translacyjnej [2].

Jak wskazano w publikacji Musial C. i wsp. (2021), rola receptorów estrogenowych (ER, ang. *estrogen receptor*) w etiopatogenezie, progresji i rokowaniu chorych na

NSCLC jest przedmiotem dyskusji i dalsze pogłębione badania są nadal potrzebne [1]. Co ważne, niektóre badania wskazują, że wysoka ekspresja receptorów estrogenowych alfa (ER α), jak również receptorów estrogenowych beta (ER β) jest cennymi markerami prognostycznymi dla chorych na raka płuca. Procesy komórkowe, do których zalicza się indukcja proliferacji komórek NSCLC, a także apoptoza, migracja i inwazja komórek nowotworowych, mogą odbywać się za pośrednictwem ER [1,2].

Co więcej, dostępne dane wskazują, że kobiety chorujące na NSCLC mają znacznie bardziej obiecujące wyniki w zakresie przebiegu chemioterapii aniżeli mężczyźni z porównywalnym stopniem zaawansowania choroby. Obserwacja ta sugeruje, że odpowiedź nowotworu na leczenie, a co za tym idzie rokowanie, może być zależna od profilu hormonalnego [2,29].

NSCLC powszechnie określany jako choroba heterogenna ze względu na znacznie większą częstość występowania tego nowotworu u kobiet. Badania pokazują, że kobiety przed menopauzą mają znacznie bardziej rozległy przebieg choroby niż kobiety po menopauzie. Analogicznie, istnieje zależność między częstością występowania gruczolakoraka płuca u pacjentów stosujących (nawet w przeszłości) hormonalną terapię zastępczą (HTZ) [2,29,30].

Wpływ estrogenu i jego metabolitów jest przedmiotem ciągłych badań w zakresie profilaktyki, diagnostyki i leczenia raka płuca. Biorąc pod uwagę powyższe, postawiono hipotezę, że 17 β -estradiol i jego metabolity, mogą odkrywać istotną rolę fizjologicznych regulatorów śmierci i przeżywalności komórek gruczolakoraka płuca [2].

Na podstawie zarówno badań *in vitro*, jak i analiz klinicznych sugeruje się, że O-metylacja 2-hydroksykatecholestenogenów wydaje się być fizjologicznym mechanizmem ochrony przeciwnowotworowej, a 2-ME należy rozważyć jako potencjalny biomarker kliniczny lub w przyszłości - środek terapeutyczny u pacjentów cierpiących na NSCLC [2]. Stąd też, jak wskazują wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy, oznaczanie metabolitów estradiolu we krwi lub moczu pacjentów, zwłaszcza 2-ME może stanowić potencjalne badanie przesiewowe w kierunku progresji choroby, profilaktyki i diagnostyki w postaci markera raka płuca [2].

Powszechnie wiadomo, że w przypadku raka piersi estrogeny mogą działać jako inicjatory rozwoju guza nowotworowego [1]. O ryzyku zachorowania na raka piersi zdaniem może decydować określenie stosunku metabolitów estrogenu w zakresie C-2 i C-4, gdzie obserwuje się zwiększoną hydroksylację w porównaniu z estronem i estradiolem. Odnotowano zależność wzrostu ryzyka zachorowania na raka piersi w zakresie stosunku szlaku C-4 do szlaku C-16a, a także szlaku 2 do szlaku 16 [2].

Teoria ta określa na przykład stosunek między 2-hydroksyestronem (2-OHE1) a 16- α -hydroksyestronem (16 α -OHE1), podczas gdy szlak 2 wykazuje ochronne, a szlak 16 bierze udział w mechanizmach hiperprolifracji [19-23]. Podobnie zależność metabolitów estrogenu od indukcji rozwoju nowotworu u kobiet mieści się w zakresie szlaku C-4 lub stosunku metabolitów, w tym 4-hydroksyestradiolu (4-OH-E2). Z biochemicznego punktu widzenia należy szczególnie wziąć pod uwagę fakt, że 4-OH-E2 utlenia się do estradiolo-3,4-chinonu, który ma właściwości elektrofilowe [19-23]. W dalszej kolejności może wpływać na indukcję uszkodzeń poszczególnych genów biorących udział w procesie kancerogenezy. Stąd też, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że to właśnie stosunek metabolitów odgrywa wiodącą rolę w zdrowiu kobiet.

Z holistycznego punktu widzenia płeć pacjenta może być decydująca w wielu przypadkach, ponieważ wielokrotnie opisywano wzrost zachorowalności na raka płuca wśród kobiet. Pod tym względem wiodącą rolę odgrywają hormony steroidowe, czyli endogenne estrogeny, do których zalicza się estron (E1), 17 β -estradiol (E2) oraz estriol (E3) [1,2]. Niezmiennie wiadomo, że niektóre estrogeny mogą powodować karcynogenezę. Przede wszystkim zależność ta jest zauważana w dziedzinie nowotworów kobiecych, takich jak rak piersi. Co ważne, dostępne dane wskazują, że mechanizm działania w szlaku estrogenowym raka płuca może być podobny do mechanizmu działania raka piersi [1,2].

Biorąc pod uwagę powyższe, endogenny metabolit 17 β -estradiol (E2), hydroksylacja i metylacja w drugiej pozycji daje 2-metoksyestradiol (2-ME, (17 β)-2-metoksyestra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol) [1,2]. Jak wskazują dostępne dane, 2-ME wykazuje skuteczne działanie antyangiogenne i przeciwnowotworowe. Skuteczność 2-ME została również potwierdzona w badaniach klinicznych w postaci związku farmaceutycznego Panzem® [1,2].

Ponadto wykazano, że 2-ME ma działanie apoptotyczne, co oznacza programowaną śmierć komórki [1,2]. Niemniej efekt ten został również potwierdzony w badaniach *in vitro* w zakresie dwuwymiarowej hodowli komórkowej oraz trójwymiarowej (3D) sferoidalnej linii komórkowej A549 [2]. Ponadto badania zostały rozszerzone o badania kliniczne na grupie chorych na gruczolakoraka płuca. Badania te wykazały potencjalne zastosowanie 2-ME jako biomarkera prognostycznego oraz monitorowania choroby u chorych na gruczolakoraka płuca, histologicznie najczęstszego podtypu NSCLC [2].

Jak pokazują wyniki badań laboratoryjnych, mechanizm działania 2-ME opiera się przede wszystkim na indukcji stresu nitrooksydacyjnego [2,6,7]. Z drugiej strony S-palmitoilacja jest również potencjalnym mechanizmem działania [2,23]. Traktowanie komórek A549 wybranym zakresem stężeń 2-ME za pomocą jodku propidyny spowodowało wysoki poziom nekrozy i późnej apoptozy. Niemniej jednak zrozumienie skomplikowanych zależności molekularnych między rozwojem a progresją nowotworu może okazać się przełomowe w dziedzinie terapii onkologicznych. Według najnowszych doniesień naukowych jednym z kluczowych punktów w zakresie supresji nowotworu jest ferroptoza [24].

Z definicji ferroptoza to wewnątrzkomórkowa śmierć komórki zależna od żelaza. Powstaje w wyniku gromadzenia się reaktywnych form tlenu, a także w odpowiedzi na zaburzenia metabolizmu żelaza [25]. Jak wskazali Tabnak i in. system X-c, który działa jak heterodimer błonowy, bierze udział w ferroptozie poprzez stres oksydacyjny [25]. Ponadto wiodącą rolę w tym zakresie mogą odgrywać nowotworowe komórki macierzyste, w tym komórki macierzyste raka płuca w zakresie rejestracji poziomów czynników transkrypcyjnych, na które składają się SLC7A11 (ang. *Solute Carrier Family 7 Member 11*), jak również SOX2 (znany również jako SRY, ang. *sex determining region Y*) [26]. W odniesieniu do wspomnianych wcześniej czynników ekspozycyjnych, zwanych czynnikami ekspozycji lub eksposomami, do czynników wywołujących ferroptozę w tkankach płuc zalicza się również czynniki środowiskowe, takie jak smog, który jest ściśle skorelowany z cząstkami PM_{2,5} [27]. Jak wskazują Asakawa i wsp., szczególną uwagę należy zwrócić na rolę ferroptozy oraz nowe, potencjalne strategie terapeutyczne w raku płuca [28].

Jak wskazują źródła, jedną z cech charakterystycznych nowotworów złośliwych jest niedotlenienie [2,25]. Jak wykazano w pracy Musial C., i wsp. (*Redox Biology*, 2022), reaktywne formy tlenu są szczególnie istotne z punktu widzenia niedotlenienia mikrośrodowiska guza. Jedną z opcji terapeutycznych w leczeniu raka płuca może być celowanie w inhibicję HIF-1a, czyli czynnik indukowany hipoksją 1. HIF-1a odgrywa pod tym względem niezwykle ważną rolę w zakresie indukcji ferroptozy [2,30,32].

Ponadto, wysoki poziom stresu oksydacyjnego jest zwykle skorelowany z ferroptozą. Jak wskazano w niniejszej pracy, produkcja RFT została znacznie zwiększona przez potraktowanie komórek A549 2-ME [2]. Stąd też, kolejnym krokiem było rozszerzenie badań z wykorzystaniem linii komórkowej A549 z zastosowaniem 2-ME i ferrostatyny-1 (Fer-1), która działa jako inhibitora ferroptozy. To pozwoliło na nowo zdefiniować mechanizm działania 2-ME wobec linii komórkowej A549. Niniejsze badanie kontynuuje realizację założonego celu w postaci zidentyfikowania potencjalnych mechanizmów śmierci komórkowej na skutek zastosowania 2-ME wobec linii komórkowej ludzkiego gruczolakoraka płuca.

Jak wskazują źródła, głównym szlakiem metabolicznym promowanym przez niedotlenienie jest zjawisko „efektu Warburga”, czyli glikolizy fermentacyjnej [33,34]. Zjawisko to oznacza, że komórki nowotworowe są bardziej uzależnione od glikolizy niż zdrowe komórki. W tym zakresie udowodniono również hamowanie glikolizy w komórkach nowotworowych, w której pośredniczy również kwas 3-bromopirogronowy (3-BrPA), co wiąże się również z nowym typem śmierci komórkowej, zwanym ferroptozą. Powyższy mechanizm skierowany jest na fosforylację oksydacyjną (OXPHOS) komórek nowotworowych, a przede wszystkim na proces glikolizy [33,34].

VII. CEL PRACY

Kluczowym celem pracy jest określenie roli wybranych metabolitów 17 β -estradiolu (t.j. katecholoestrogenów i metoksyestrogenów) w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek nowotworu płuca z wykorzystaniem dwuwymiarowych (2D) i trójwymiarowych (3D) komórkowych modeli gruczolaka płuca. Modele 3D naśladują warunki guzów nowotworowych *in vivo*, w warunkach laboratoryjnych *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem mikrośrodowiska sferodów. Przede wszystkim, praca określa rolę stresu nitro-oksydacyjnego w przeciwnowotworowym lub pro-nowotworowym mechanizmie działania wybranych metabolitów 17 β -estradiolu (t.j. katecholoestrogenów i metoksyestrogenów) w komórkowym modelu 2D i 3D gruczolaka płuc.

Podsumowując, przeprowadzone badania, wchodzące w skład niniejszej dysertacji, wykonane w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, miały na celu:

- 1) ustalenie biologicznych implikacji wybranych metabolitów 17 β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuc, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych
- 2) ocenę właściwości cytotoksycznych i cytostatycznych analizowanych związków, jak również ustalenie rodzaju i mechanizmów śmierci komórkowej w postaci wybranych metabolitów 17 β -estradiolu wobec linii ludzkich komórek nowotworowych gruczolaka płuca A549 2D oraz 3D sferoidalnej w warunkach hodowli laboratoryjnej *in vitro*;
- 3) ustalenie zależności w zakresie wybranych metabolitów 17 β -estradiolu w warunkach *in vivo*, u pacjentów z gruczolakorakiem płuca, na podstawie analizy surowicy krwi.

VIII. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

I. Publikacja 1.

Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer

Celem pierwszej publikacji było podsumowanie aktualnej wiedzy na roli estrogenów w etiopatogenezie raka płuca, a także biologicznych implikacji gruczolakoraka płuca, w szczególności u kobiet. W pierwszej kolejności przedstawiono główne czynniki wpływające na rozwój raka płuca, na czele czynnikami ekspozycyjnymi, na które składa się przede wszystkim palenie tytoniu, zanieczyszczenia środowiskowe, przewlekłe infekcje, uwarunkowania genetyczne czy hormony płciowe. Jako że rak płuca uważany jest za globalną epidemię, przeanalizowano także liczbę zachorowań w krajach Europejskich. Kolejno, kluczowym przedmiotem publikacji były różnice płciowe w raku płuca. Należy szczególnie podkreślić, że kobiety mogą być bardziej podatne na rakotwórcze działanie dymu tytoniowego niż mężczyźni. Co więcej, publikacja przeglądowa wskazuje znacznie częstszą mutację genu supresorowego nowotworu p53 u pacjentek z niedrobnokomórkowym rakiem płuca w porównaniu do mężczyzn. Dane epidemiologiczne wskazują na korelację między hormonalną terapią zastępczą (HTZ) lub doustnymi środkami antykoncepcyjnymi a zwiększoną śmiertelnością z powodu zwiększonej częstości występowania nowotworów złośliwych, w tym raka płuca. Publikacja obejmuje również krótki przegląd estrogenów, oraz rolę estrogenów w etiopatogenezie i terapii raka płuca. Ostatnie zagadnienie zawarte w publikacji obejmuje na dzień 20 grudnia 2020 r. zarejestrowane badania kliniczne dotyczące niedrobnego raka płuca i estrogenów ze statusem zakończonym z wynikami. W pracy podsumowano dotychczasową wiedzę na temat roli estrogenów w etiopatogenezie raka płuca.

II. Publikacja 2.

Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer

Celem drugiej pracy było przedstawienie wpływu wybranego endogennego metabolitu 17 β -estradiolu (E2), w postaci 2-metoksyestradiolu (2-ME) na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca w hodowli komórkowej *in vitro*. Wyniki przede wszystkim przedstawiają, że 2-ME zmniejsza żywotność gruczolakoraka płuca w dwuwymiarowych (2D) i trójwymiarowych (3D) sferoidalnych modelach hodowli komórkowej A549. Potwierdzono także śmierć komórkową indukowaną 2-ME (w postaci martwicy oraz późnej apoptozy) w modelu komórkowym raka płuca. Co więcej, dowiedziono, że mechanizm działania 2-ME polega na indukcji stresu nitrooksydacyjnego. Warto podkreślić, że na łamach publikacji zostały omówione również badania innych naukowców, których wyniki wyraźnie korelują z uzyskanymi wynikami badań, co ewidentnie potwierdza postawioną hipotezę. Jak powszechnie wiadomo, doniesienia naukowe na całym świecie wskazują na korelację między układem hormonalnym, głównie u kobiet, a wzrostem zachorowalności na raka płuca, zwłaszcza NSCLC. W związku z uzyskanymi wynikami badań w warunkach *in vitro*, postawiono hipotezę, jako celowanie w poziomy estrogenu u pacjentów z rakiem płuc jest obiecującym podejściem diagnostycznym, monitorującym i terapeutycznym. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że estrogeny, a konkretnie E1, E2, E3 oraz ich metabolity: 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE1, 4-OHE2, 2-OME1 i 2-OME2 znajdują się na znacznie wyższych poziomach w tkance nowotworowej płuca niż w tkance płucnej zdrowej kobiety w grupie kontrolnej. Po przeprowadzonej analizie badań, na łamach publikacji stwierdzono, 2-ME znacząco spada u chorych na raka płuca, co może być wykorzystane do przesiewowych badań diagnostycznych, jak również do monitorowania progresji choroby w trakcie terapii przeciwnowotworowej. Wyniki niniejszego badania wskazują po raz pierwszy, zgodnie z najlepszą wiedzą, na możliwe zastosowanie estrogenów zarówno hydroksylowanych, jak i metylowanych w pozycji 2, jako potencjalnych biomarkerów nowotworów NSCLC. Należy jednak szczególnie podkreślić, że potrzebne są bardziej złożone badania kliniczne obejmujące większe grupy

pacjentów, co pozwala na rozszerzenie niniejszych badań w przyszłości. Uzyskane wyniki otwierają ekscytujące nowe ścieżki badawcze, celem lepszego monitorowania pacjentów z rakiem płuca i zdrowych osób z grupy kontrolnej. Wybrane wyniki pochodzące z publikacji wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej oznaczono w sposób widoczny i czytelny.

IX. METODY

9.1. Linia komórkowa ludzkiego gruczolaka płuca i hodowla w warunkach laboratoryjnych wraz z traktowaniem linii komórkowej A549

Praca objęta wykorzystanie dwuwymiarowych (2D) oraz trójwymiarowych sferoidalnych (3D) modeli hodowli komórkowych gruczolaka płuca. Wykorzystanie hodowli 3D w postaci sferoidów miało na celu naśladowanie warunków *in vivo* wzrostu guza oraz jego przerzutowania [2]. Do badań została wykorzystana komercyjnie dostępna linia komórkowa gruczolaka płuca A549 (ATCC® CCL-185™). Komórki zostały traktowane: 17 β -estradiolem; estradiolem, estronem, 4-hydroksyestradiolem, 2-, 4-, metoksyestradiolem w różnym zakresie stężeń (fizjologicznym pM-nM, oraz wyższym farmakologicznym μ M) oraz w różnych punktach czasowych [2].

Przed rozpoczęciem procedur eksperymentalnych określono optymalną gęstość komórek przez sekwencyjne wysiewanie komórek w różnych stężeniach [2]. Kolejno, przeprowadzono analizę konfluencji komórkowej w mikroplatkach 96-dółkowych za pomocą aparatu CytoSMART® Omni (Omni, CytoSMART; Eindhoven, Holandia) umożliwiającego wizualizację każdego dołka [2].

Konfluencja komórek na początku każdego doświadczenia wynosiła ok. 70%, co gwarantuje dokładność i porównywalność uzyskanych wyników [2]. Należy szczególnie podkreślić, że hodowla komórkowa nigdy nie były wyjmowane z inkubatora w celu wyeliminowania potencjalnego efektu szoku termicznego w trakcie optymalizacji warunków hodowli komórkowej. Wszystkie próbki monitorowano w czasie rzeczywistym za pomocą serii pomiarów wykonywanych w wybranych punktach czasowych [2].

Pełną metodykę hodowli komórkowej linii ludzkiego gruczolaka płuca A549 opublikowano na łamach publikacji Musial C. i wsp. Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.

9.2. Metodyka przeprowadzonych badań

Na cały proces badawczy składa się szereg eksperymentów, przeprowadzonych w okresie między listopadem 2019 r. a majem 2023 r., które częściowo opisane zostały między innymi w publikacji [2] Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górską-Ponikowska M. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395.

Wybrane eksperymenty wydane w publikacji Musiał C. i wsp. (*Redox Biology*, 2022) wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej zostały oznaczone w odpowiedni sposób [2]. Rozprawa doktorska obejmuje także publikację przeglądową [1], celem opisanie zależności hormonalnych w etiopatogenezie oraz potencjalnych procesie leczniczym w gruczolakoraku płuca. Ponadto, praca została wzbogacona o eksperymenty uzupełniające.

9.3. Test żywności komórek (MTT/WST1)

Pierwszym z badań był test żywności komórek z wybranymi metabolitami 17- β -estradiolu [2]. Po 24-godzinnej inkubacji komórki traktowano niniejszymi metabolitami w różnych stężeniach. Kolejno, po 24-godzinnej inkubacji, do 96-studzienkowych płytek dodano roztwór 0,5 mg/ml bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-cylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT). Należy szczególnie podkreślić, że test MTT uwarunkowany jest od oddychania mitochondrialnego, dzięki czemu znajduje zastosowanie w zakresie oceny pojemności energetycznej komórki. Następnie płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 2–4 godziny i do każdej studzienki dodano 100 μ l sulfotlenku dimetylu (DMSO) i dokładnie wymieszano na wytrząsarce wahadłowej, aby rozpuścić ciemnoniebieskie kryształki, które są wyraźnie widoczne pod mikroskopem. Absorbancję odczytano stosując czytnik mikroplitek (ELISA) przy długości fali 540 nm. Eksperymenty przeprowadzono co najmniej trzykrotnie [2].

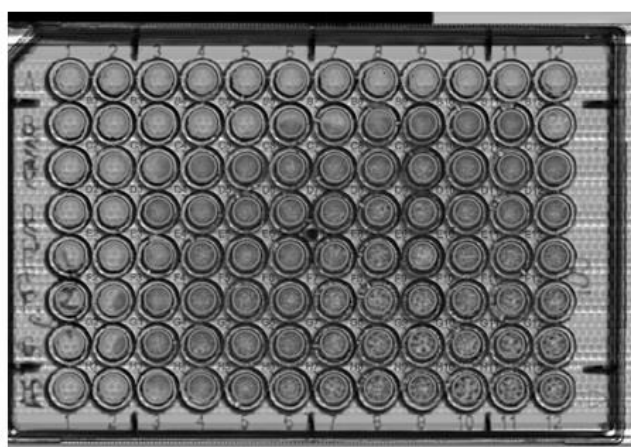
Trójwymiarowe sferoidy hodowano w podłożu DMEM/F-12 PLUS Basal Medium®), uzupełnionym 10% FBS, 100 ug/ml penicyliny/streptomycyny

i 2 mM l-glutaminy (GlutaMAX™) [2]. Przez całe badanie hodowle komórkowe były ujemne pod względem mykoplazmy i były hodowane sekwencyjnie. Hodowlę komórek A549 utrzymywano we właściwej temperaturze 37°C w inkubatorze z 5% CO₂. Gęstość hodowli komórkowej utrzymywano na poziomie maksymalnie 8000 komórek/cm² komórek na studzienkę. Maksymalny czas wzrostu pojedynczej sferoidy wynosił około czterech dni [2].

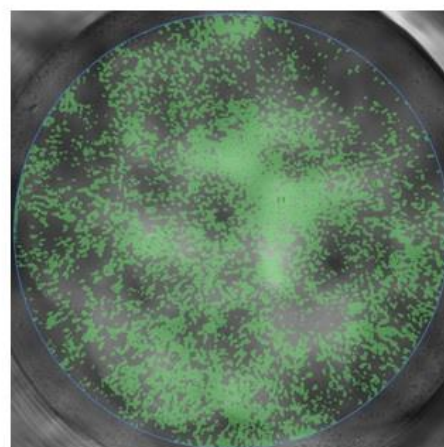
W badaniach zastosowano linię komórkową A549, która reprezentuje komórki ludzkiego raka nabłonka płuca typu dzikiego [2]. Zastosowano technologię komórek sferoidalnych 3D, którą uzyskano poprzez wysianie komórek przy średniej gęstości komórek 8000 komórek/cm² w 96-dółkowych mikroptyłkach z dnem w kształcie litery U [2]. Sferoidy utrzymywano w dedykowanej pożywce hodowlanej, jak wskazano powyżej. Upřednio komórki hodowano w analogicznych warunkach laboratoryjnych, w postaci standardowej, jednowarstwowej kultury dwuwymiarowej (2D), w celu wyhodowania linii komórkowej przeznaczonej do dalszych badań [2].

Celem systematyzacji optymalnych warunków hodowli komórkowej 2D przeprowadzono analizę kinetyczną przy zastosowaniu mikroskopu jasnego pola [2]. Optymalizację linii komórkowej A549 wykonano przy użyciu zautomatyzowanego mikroskopu do obserwacji techniką jasnego pola Cytosmart Omni z wnętrza inkubatora CO₂ z możliwością obserwacji w czasie rzeczywistym [2].

a)



b)



Ryc. 1. Optymalizacja hodowli komórkowej w modelu 2D. **A)** Wielostudzienkowa analiza proliferacji i konfluencji w celu monitorowania żywotności komórek A549, wizualizacji zmian morfologicznych oraz komórek apoptotycznych. **B)** Obrazowanie procesów komórkowych linii A549 w czasie rzeczywistym.

9.4. Optymalizacja hodowli sferoidalnej trójwymiarowej linii komórkowej A549

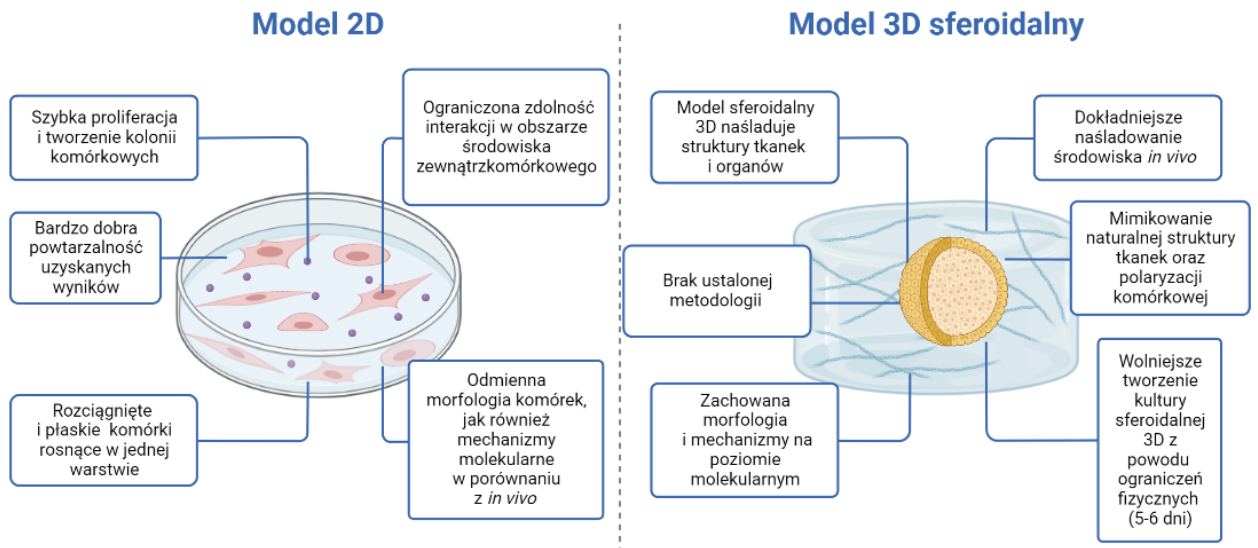
Przed przystąpieniem do procedur eksperymentalnych, w ramach niniejszego badania laboratoryjnego określono optymalną objętość sferoidalnych komórek 3D [2]. Analizę przeprowadzono przez przybliżenie dokładnej konfluencji komórek otrzymanych sferoidów w 96-studzienkowych mikroplatkach przy użyciu instrumentu CytoSMART® Omni FL (Omni FL, CytoSMART; Eindhoven, Holandia), umożliwiając wizualizację każdej studzienki [2]. Procedura ta pozwoliła na dokładność i porównywalność uzyskanych wyników [2].

Podczas trwania procedur eksperymentalnych płytki 96-dołkowe nie były wyjmowane z inkubatora, celem wyeliminowania potencjalnego efektu szoku termicznego, dzięki powyższej technologii [2]. Eksperymenty były monitorowane przez cały okres badania w czasie rzeczywistym za pomocą serii pomiarów wykonanych w wybranych punktach czasowych, analogicznie jak w przypadku wcześniej prowadzonych badań [2].

W ramach niniejszej pracy doktorskiej ustalono protokoły w zakresie badań eksperymentalnych z wykorzystaniem jednowarstwowych hodowli komórek sferoidalnych 2D i wielokomórkowych 3D. Dzięki nowoczesnej technologii i zastosowaniu w/w urządzeń, uzyskane wyniki badań stanowią rzetelne, powtarzalne źródło wiedzy [2].

Trójwymiarowe (3D) wielokomórkowe sferoidalne hodowle komórkowe znajdują szerokie zastosowanie w biologii onkologicznej. Sferoidy określane są jako modele przedkliniczne, ze względu na ich złożony ekosystem [2].

Hodowla komórkowa



Schemat 1. Kluczowe różnice między hodowlą komórkową w modelu 2D oraz modelu 3D sferoidalnym. W przypadku hodowli 2D występuje jednolita ekspozycja na cząsteczkę leku, gdzie w przypadku sferoidalnego modelu 3D występuje zwiększona reakcja komórka-komórka. Schemat zaprojektowano w biorender.com.

W porównaniu ze standardowymi jednowarstwowymi hodowlami komórkowymi 2D, 3D hodowla komórkowa sferoidalna składa się z komórek odpornościowych, komórek supresorowych pochodzących ze szpiku, a także fibroblastów związanych z nowotworem [2,35,36]. Ta złożoność wpływa na rozwój interakcji między środowiskiem komórkowym a komórkami tworzącymi model sferoidalny. Stąd też, z fizjologicznego punktu widzenia kultury te znacznie się od siebie różnią [2,35-37].

Morfologia komórek 3D sferoidalnych znacznie się różni w zależności od rodzaju linii komórkowej [2,35-37]. Wielkość niniejszych kultur komórkowych 3D sferoidalnych może się różnić w zależności od gęstości wysiewu komórek, czasu ich hodowli oraz linii komórkowej. Komórki gruczolakoraka płuc formują się w modele sferoidalne. W tym przypadku, jak wspomniano powyżej, zastosowano studzienki o bardzo niskiej przyczepności w zoptymalizowanym środowisku, jakim są sferoidy wolne od rusztowań. Płytki hodowlane zastosowane w niniejszym

badaniu pomogły odepchnąć komórki od dna, tworząc jedną sferoidę na studzienkę [2,35-37]

9.5. 3-Bromopirogronian (3-BrPA) w połączeniu z 2-metoksyestradiolem na ludzkich komórkach gruczolaka płuca A549

Badaniami objęto również 3-bromopirogronian (3-BrPA), analog pirogronianu. Wiadomo, że 3-BrPA jest potencjalnym lekiem o działaniu przeciwnowotworowym [38]. W niniejszym badaniu, skuteczność ukierunkowania 10 μM 3-BrPA [39] wyłącznie w połączeniu ze 100 μM 2-ME, które określono w dwuwymiarowych modelach hodowli komórkowej linii A549. Komórki linii A549 przygotowano do powyższych doświadczeń w analogiczny sposób, jak w przypadku wcześniejszych eksperymentów. Do wizualizacji i odczytu wyników fluorescencji użyto jodku propidyny (ang. *propidium iodide*, PI). Barwienie fluorescencyjne modeli sferoidalnych było możliwe przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego CytoSmart Omni FL. Eksperymenty przeprowadzono co najmniej trzykrotnie.

9.6. Badanie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) za pomocą cytometrii przepływowej

Do uzupełniającej oceny poziomu pomiaru generacji ROS i apoptozy zastosowano technikę cytometrii przepływowej. Celem wykonania eksperymentu, komórki A549 wysiano na 6-cio studziennkowych płytkach przy zachowanej odpowiedniej gęstości 300 000 komórek na każdą studzienkę. Po upływie 24 godzin komórki potraktowano wybranymi metabolitami w zakresie stężeń odpowiadającym stężeniom fizjologicznym oraz farmakologicznym. Po wykonanej trypsynizacji, komórki A549 zebrano poprzez odwirowanie w wirówce przy odpowiednich parametrach 1200 x g przez okres 7 minut. Kolejno, zgodnie z protokołem, komórki przepłukano trzykrotnie bardzo zimnym roztworem soli buforowanej fosforanami (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl i 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). Całą procedurę przygotowania hodowli komórkowej do cytometrii przepływowej wykonano na lodzie, z wyjątkiem inkubacji z PI i DCF (dioctanem

2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny). Badania wykonano z wykorzystaniem cytometru przepływowego BD FACSVersé (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) z pomocą oprogramowania FlowJo, wersja 10.6.1 (FlowJo LCC, Becton Dickinson, Ashland, OR, USA), celem wykonania odpowiedniej analizy, we współpracy z Zakładem Patologii i Reumatologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Katedrą Zakładem Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Badania przeprowadzono za pomocą techniki cytometrii przepływowej dzięki współpracy z prof. dr hab. Jackiem M. Witkowskim z Katedry i Zakładu Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr n. med. Agnieszką Dacą z Zakładu Patologii i Reumatologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

9.7. Określenie żywotności komórkowej za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego

Jak wskazano w publikacji Musiał C. i wsp., wydanej w *Redox Biology* w 2022 r., cytotoksyczność 2-ME została określona za pomocą testu MTT w przypadku hodowli komórkowych 2D, oraz z zastosowaniem testu WST1 w przypadku hodowli komórkowych 3D [2]. Kolejno, do dalszych badań zostały wybrane najbardziej optymalne stężenia związków oraz punkty czasowe. Kolejno, wykonano ocenę żywotności komórek A549 po potraktowaniu 2-ME. Amplifikacja fluorescencji jest bezpośrednio spowodowana interkalacją jodku propidyny z dwuniciowym DNA. Obrazy mikroskopowe uzyskano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego CytoSMART Lux3 (Lux 3, CytoSMART, Eindhoven, Holandia) [2].

Pełną metodykę niniejszego badania opublikowano na łamach publikacji Musiał C. i wsp. Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.

9.8. Określenie identyfikacji reaktywnych form tlenu (ROS) za pomocą detekcji luminescencji i fluorescencji

Proces eksperymentalny założył również określenie identyfikacji sygnału reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) w komórkach A549 traktowanych 2-ME [2]. Wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu oceniano za pomocą testu fluorescencyjnego. Test ROS-Glo™ H₂O₂ firmy Promega (Mannheim, Niemcy) przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Luminescencję rejestrowano za pomocą luminometru Promega GloMax® Discover (Mannheim, Niemcy). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą GraphPad w wersji 9 przy użyciu funkcji TTEST (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) [2].

W nawiązaniu do powyższych eksperymentów, dane przedstawiono jako wartości średnie (\pm SE) z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano przeprowadzając jednokierunkową ANOVA połączoną z testem wielokrotnego porównania Dunnetta. Zastosowano również oprogramowanie GraphPad Prism 9.0.

Pełną metodykę niniejszego badania opublikowano na łamach publikacji Musiał C. i wsp. Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.

9.9. Analiza poziomu hormonów steroidowych i stresu nitrooksydacyjnego w surowicy pacjentów z gruczolakorakiem płuca

Badanie obejmowało analizę poziomu hormonów steroidowych oraz poziomu stresu nitrooksydacyjnego w surowicy i moczu pacjentów z grupy badanej z gruczolakorakiem płuca oraz z grupy kontrolnej [2]. Badanie to uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym z numerem zgody 666 [2]. Badanie

to wykonano w kooperacji z Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z Kliniką Onkologii Klinicznej i Radioterapii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Wszystkie osoby włączone w przebieg badania, zarówno z grupy badanej, jak również grupy kontrolnej zostały poinformowane o celach, założeniach i pełnym przebiegu badania, jak również świadoma zgoda na udział w projekcie badawczym została podpisana przez każdego uczestnika badania [2].

Pełną metodykę niniejszego badania (z uwzględnieniem poniższych podrozdziałów) opublikowano na łamach publikacji Musial C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.*

9.9.1. Populacja badana

Populacja badana składała się z pacjentów ze świeżo rozpoznany gruczolakorakiem płuca. Grupa badana wraz z grupą kontrolną, którą stanowili zdrowi ochotnicy, wyrazili pełną świadomą zgodę na udział w tym badaniu [2]. Jak wskazano w publikacji Musial C. i wsp. (*Redox Biology*, 2022), świadoma wiadoma zgoda została udzielona przez grupę kontrolną i grupę badaną przed wszelkimi procedurami, które zostały uwzględnione w tym badaniu. Kwalifikacja pacjentów i grupy kontrolnej została wcześniej opisana w pierwszej części opublikowanego badania. Badanie polegało na analizie poziomu stresu nitrooksydacyjnego oraz poziomu hormonów steroidowych w grupie badanej pacjentów oraz grupie kontrolnej na podstawie pobranych próbek surowicy krwi i moczu [2].

Grupę badaną stanowiło 10 chorych w średnim wieku 66 lat (zakres od 42 do 86 lat), jak wspomniano wcześniej, ze świeżo rozpoznany, nieoperacyjnym gruczolakorakiem płuca [2]. Dokładne rozpoznanie wskazanych pacjentów zostało wcześniej określone, podobnie jak przygotowanie do badania (wraz z wywiadem) czy badania wykonywane w szpitalu [2].

9.9.2. Kryteria włączenia i wyłączenia

Kluczowym kryterium włączenia pacjentów do grupy badanej była potwierdzona diagnoza wcześniej nieleczonego NSCLC (wszystkie etapy; klasyfikacja TNM) [2]. Istotnie, do kryterium zaliczono również świadomą zgodę pacjenta na udział w projekcie oraz ukończenie 18 roku życia. Należy jednak podkreślić, że jednorodna histologicznie grupa gruczolakoraka pozwoli jedynie na obiektywną ocenę potencjalnej korelacji między zebranymi danymi, a wynikami klinicznymi [2].

W zakres kryterium wyłączenia, wchodzi przede wszystkim wcześniejsze leczenie przeciwnowotworowe, do którego zalicza się chemioterapię, radioterapię, czy terapię celowaną molekularnie [2]. Kryterium to zostało przyjęte celem ograniczenia ryzyka błędnych wyników spowodowanych nieprzewidzianym efektem wcześniejszej terapii lub powikłań leczenia onkologicznego. Ponadto, kryterium wyłączenia obejmuje również historię innych nowotworów złośliwych (z wyłączeniem wczesnego raka szyjki macicy i wczesnego raka skóry, które leczone są miejscowo), a także chorób współistniejących, lub stanów znacząco wpływających na czynność płuc oraz układu hormonalnego, ze szczególnym uwzględnieniem hormonalnej terapii zastępczej, antykoncepcji hormonalnej, chorób autoimmunologicznych, alergii, astmy, chorób autoimmunologicznych, niewydolności serca, niewydolności nerek oraz przewlekłego stosowania steroidów [2].

9.9.3. Pobranie próbek surowicy krwi od uczestników badania oraz analiza estrogenów w surowicy krwi

Próbki krwi pełnej pobrano do probówki zawierającej aktywator w Klinice Onkologii Klinicznej i Radioterapii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku [2]. W Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego próbki krwi pacjentów wirowano przez 10 min przy 2000–3000 obr./min. Kolejno, otrzymaną surowicę (supernatant) przenoszono do nowych probówek [2]. Podczas procesu wirowania usunięto skrzepy krwi. Probówki, których nie można było natychmiast przeanalizować, zamrożono

w temperaturze -80°C zgodnie ze standardowym protokołem. Ilość surowicy uzyskanej z krwi pełnej pacjentów zależała od indywidualnego stanu nawodnienia oraz ilości krwi pobranej w poradni. Próbkę pacjentów opracowano metodą techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową detekcją masy (LC-MS/MS) we współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Estrogeny i ich pochodne w surowicy grupy badanej oraz grupy kontrolnej, oznaczano techniką LC-MS/MS z wykorzystaniem modelu LC-MS-8050 firmy Shimadzu (Japonia). Spektrometr masowy był wyposażony w źródło jonów do elektrorozpylania (ESI) i potrójny kwadrupolowy analizator MS/MS. Estrogeny rozdzielono na kolumnie rdzeniowo-powłokowej C18 o nazwie Poroshell 120, o wymiarach 100 x 3,0 mm; 2,7 μm , odwrócona faza (RP). Jak wskazano w publikacji, lipofilność metabolitów estradiolu oceniono przy użyciu MarvinSketch 20.21 firmy ChemAxon [2].

Badania w zakresie estrogenów w surowicy krwi uczestników badania przeprowadzono dzięki współpracy z prof. dr hab. n. farm. Tomaszem Bączkiem, dr hab. n. farm. Lucyną Konieczną i dr n. farm. Mariuszem Belką z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

9.9.4. Analiza statystyczna wyników badania klinicznego

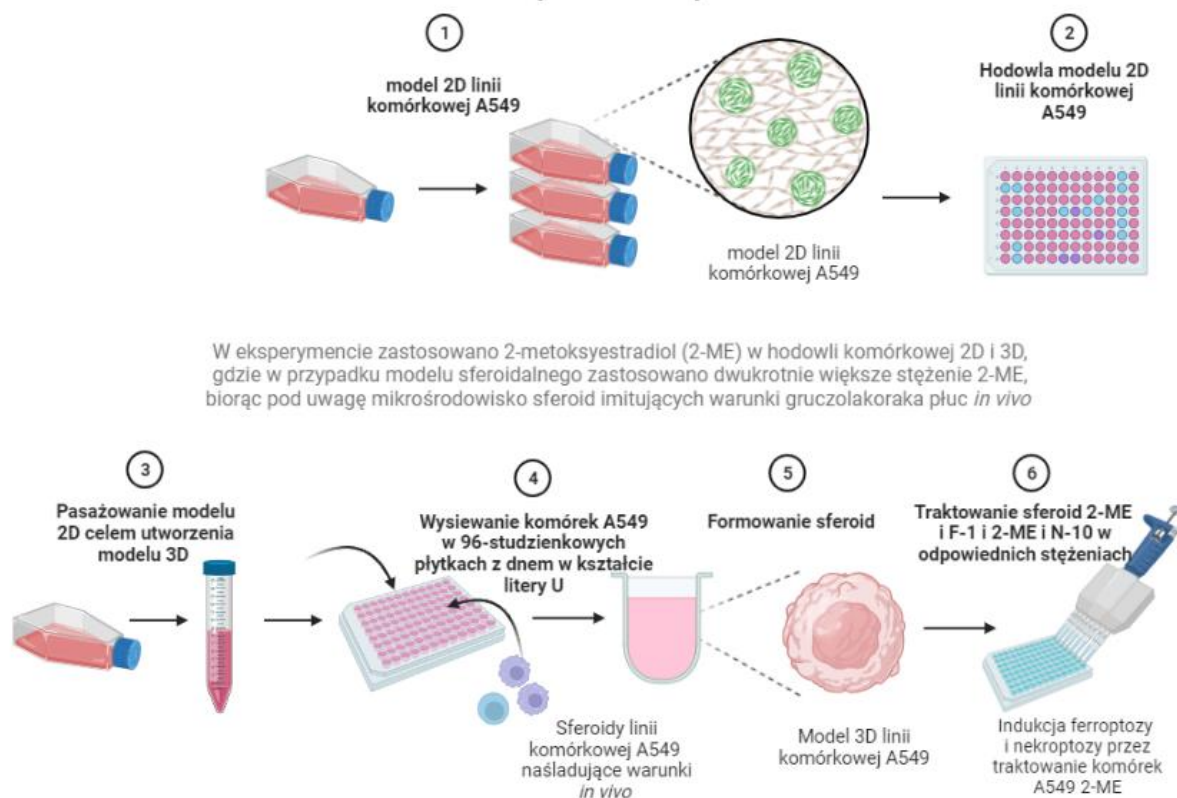
Analizę statystyczną badań w zakresie analizy estrogenów w surowicy krwi pacjentów oraz grupy kontrolnej, przeprowadzono przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics 25 [2]. Analizę przeprowadzono testem Kruskala-Wallisa, który znalazł zastosowanie w zakresie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami osób. W przypadku różnic istotnych statystycznie zastosowano test post-hoc Gamesa-Howella [2]. Test U Manna-Whitneya znalazł zastosowanie w przypadku porównania dwóch grup badanych osób. Zależność istotna statystycznie między analizowanymi zmiennymi została określona za pomocą analizy korelacji Spearmana [2].

9.10. Analiza śmierci komórkowej w kierunku ferroptozy i nekroptozy metodą barwienia fluorescencyjnego

Niezależnie od powyższej publikacji, przeprowadzono eksperymenty ukierunkowane na ferroptozę i nekroptozę, w postaci analizy śmierci komórek metodą barwienia fluorescencyjnego. Hodowlę komórek sferoidalnych A549 przeprowadzono jak opisano we wcześniejszych eksperymentach. Komórki A549 wysiano w stężeniu 8000 komórek/cm² w 96-studzienkowych płytkach Ula z pożywką Dulbecco zmodyfikowaną pożywką Eagle'a/mieszaniną składników odżywczych F-12. Komórki inkubowano przez 72 godziny w 37°C i 5% CO₂. Powstałe sferoidy zostały wstępnie oznaczone w wybranych stężeniach. Następnie, po co najmniej dwóch godzinach, sferoidy traktowano Ferrostatyną-1 w stężeniu 1 μmol/L, działającą jako inhibitor ferroptozy. Stężenie to zostało wybrane na podstawie dostępnych danych naukowych oraz przeprowadzonych badań wstępnych. W drugim analogicznym badaniu zastosowano nekrostatynę-1 w stężeniu 10 μmol/L.

W zakresie odczytu i wizualizacji wyniku fluorescencyjnego, w każdym dołku stosowano jodek propidyny (PI) w celu odróżnienia komórek podczas śmierci komórkowej od komórek żywych. Barwienie fluorescencyjne zastosowano do uzyskania obrazów mikroskopowych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego CytoSmart Omni FL (Omni FL, Cytosmart, Eindhoven, Holandia). W celu optymalizacji wyników i uzyskania pełnej skali porównawczej przeprowadzono analogiczny eksperyment wysyłania z 2-ME i wyłącznie z użyciem ferrostatyny-1.

Projekt eksperymentalny linii komórkowej A549 Nekroptoza i ferroptoza



Schemat 2. Projekt eksperymentalny z zastosowaniem komórek A549 w modelu 3D sferoidalnym w odniesieniu do określenia potencjalnej śmierci komórki w postaci ferroptozy i nekroptozy na skutek traktowania 2-ME. Schemat utworzono w biorender.com.

Eksperymenty przeprowadzono co najmniej trzykrotnie. Analogicznie, dane uzyskane z powyższych eksperymentów przedstawiono jako wartości średnie (\pm SE) z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Dlatego dane uzyskane podczas wszystkich eksperymentów analizowano, wykonując jednokierunkową ANOVA połączoną z testem wielokrotnych porównań Dunnetta; istotnie różne przy $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą. Reprezentatywny eksperyment z trzech przeprowadzonych eksperymentów opracowano z oprogramowaniem GraphPad Prism 9.0.

9. 11. Analiza statystyczna otrzymanych wyników badań w warunkach laboratoryjnych *in vitro*

Wyniki przedstawione w niniejszej dysertacji przedstawiają średnią \pm SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów *in vitro*. Otrzymane dane analizowano przeprowadzając jednokierunkową ANOVA (analizy wariancji) połączoną z testem post hoc wielokrotnego porównania Dunnetta. Zastosowano również oprogramowanie GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., wersja 9, USA).

X. WYNIKI

10. 1. Ustalenie warunków i optymalizacja trójwymiarowej sferoidalnej hodowli komórkowej linii A549

Część przeprowadzonych eksperymentów niniejszej dysertacji, została wykonana z zastosowaniem sferoidalnych modeli kultur komórkowych 3D. Celem otrzymania 3D kultur komórkowych sferoidalnych zastosowano odpowiednie płytki, z uwzględnieniem studzienek o niskiej adhezji okrągłodennych z ultraniską powłoką przylegania komórek (ULA, ang. *ultra low attachment*) [2]. W przypadku niniejszej techniki, odpowiednio dobrane płytki hodowlane zapewniają właściwe formowanie się regularnych kultur sferoidalnych. Wybrane wyniki zostały opublikowane w pracy Musiał C. i wsp. w *Redox Biology* w 2022 roku.

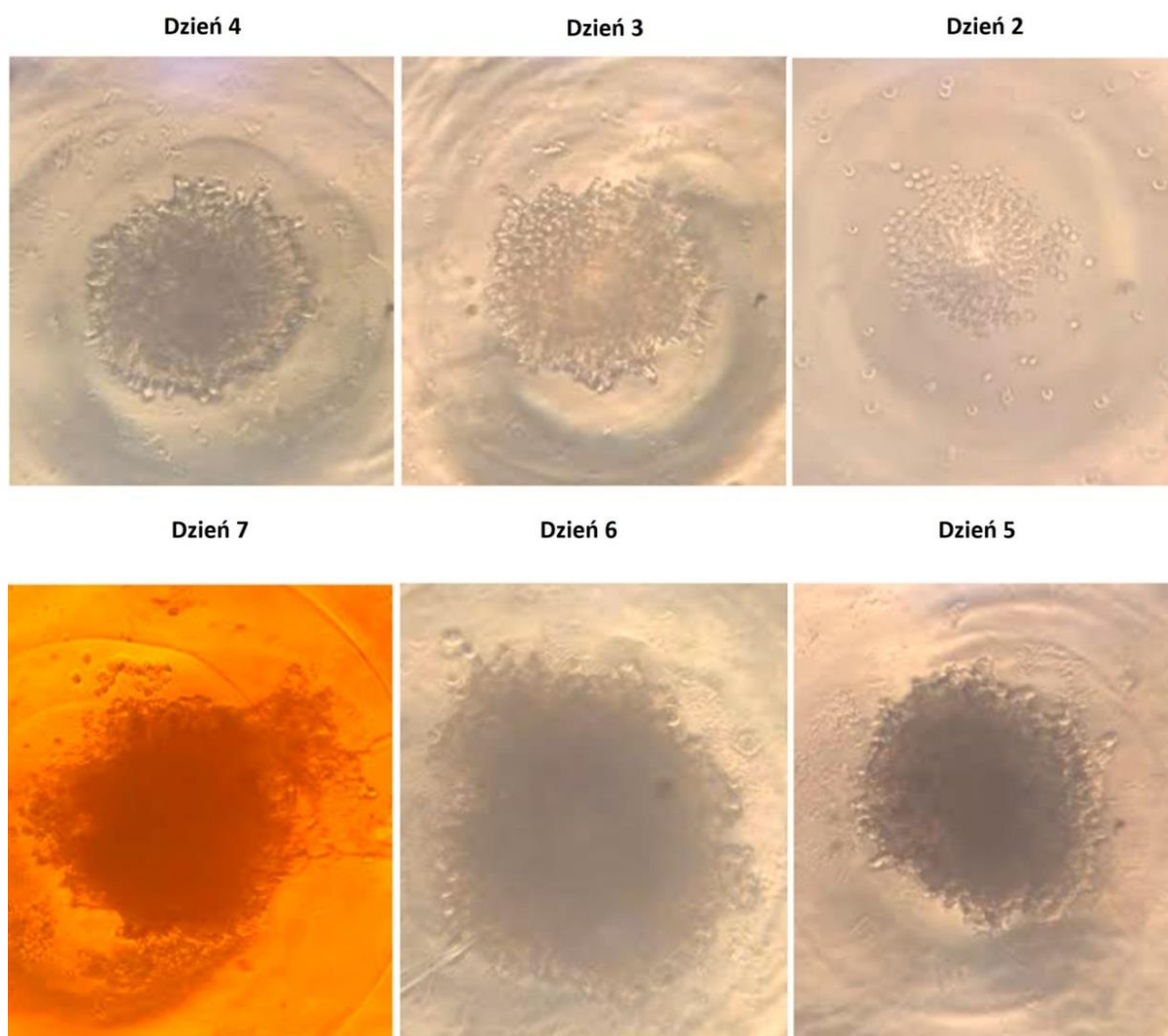
Przeprowadzanie badań z wykorzystaniem trójwymiarowych kultur komórkowych wymaga odpowiedniego doboru warunków hodowli komórkowych i ich właściwej optymalizacji. Hodowla komórek A549 wymagała doboru odpowiedniej techniki pracy, z uwagi na brak ogólnie ustalonego protokołu i metodologii na chwilę rozpoczęcia niniejszych badań. Jednym z ograniczeń hodowli komórkowej 3D jest duża czasochłonność. Z powodu ograniczeń fizycznych, następuje wolniejsze tworzenie kultury 3D, w przeciwieństwie do hodowli komórek rosnących w komórek 2D.

Jednym z kluczowych celów badań laboratoryjnych w dziedzinie onkologii eksperymentalnej, jest zrozumienie powstawania komórek nowotworowych [2]. Sferoidy 3D wykazują znaczną przewagę w badaniach *in vitro* nad standardową hodowlą komórkową 2D.

Hodowla sferoidalna pozwala na wizualizację zmian fizjologicznych, dzięki czemu mimikują guzy lite, w uwzględnieniu naśladowania mikrośrodowiska guzów nowotworowych. Wielokomórkowe modele sferoidalne pozwalają na wizualizację interakcji międzykomórkowych, dzięki czemu stanowią przyszłość badań przesiewowych nowych chemioterapeutyków [2,34-37]. Składają się z pola komórek proliferujących (jest to najbardziej powierzchowna warstwa sferoidy), kolejno pola senescencyjnego, oraz pola nekrotycznego wynikającego

ze zjawiska hipoksji. Stąd też, część eksperymentów niniejszej dysertacji została wykonana z wykorzystaniem 3D modeli sferoidalnych linii komórkowej A549, uwzględniającą również wizualizację w czasie rzeczywistym, celem zrozumienia zachodzących zmian na poziomie komórkowym. Modele 3D sferoidalne przedstawiają odpowiednią reprezentację mikrośrodowiska warunków *in vivo*. Co jest szczególnie istotne, na potrzeby niniejszej pracy zostały ustalone warunki hodowli komórkowej 3D sferoidalnej dla linii komórkowej ludzkiego gruczolaka płuca A549 [2,34-37].

Poniższa figura przedstawia pojedynczej sferoidalnej linii komórkowej A549, która przedstawiona została w postaci pliku uzupełniającego w publikacji [2] stanowiącej część dysertacji doktorskiej Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395.

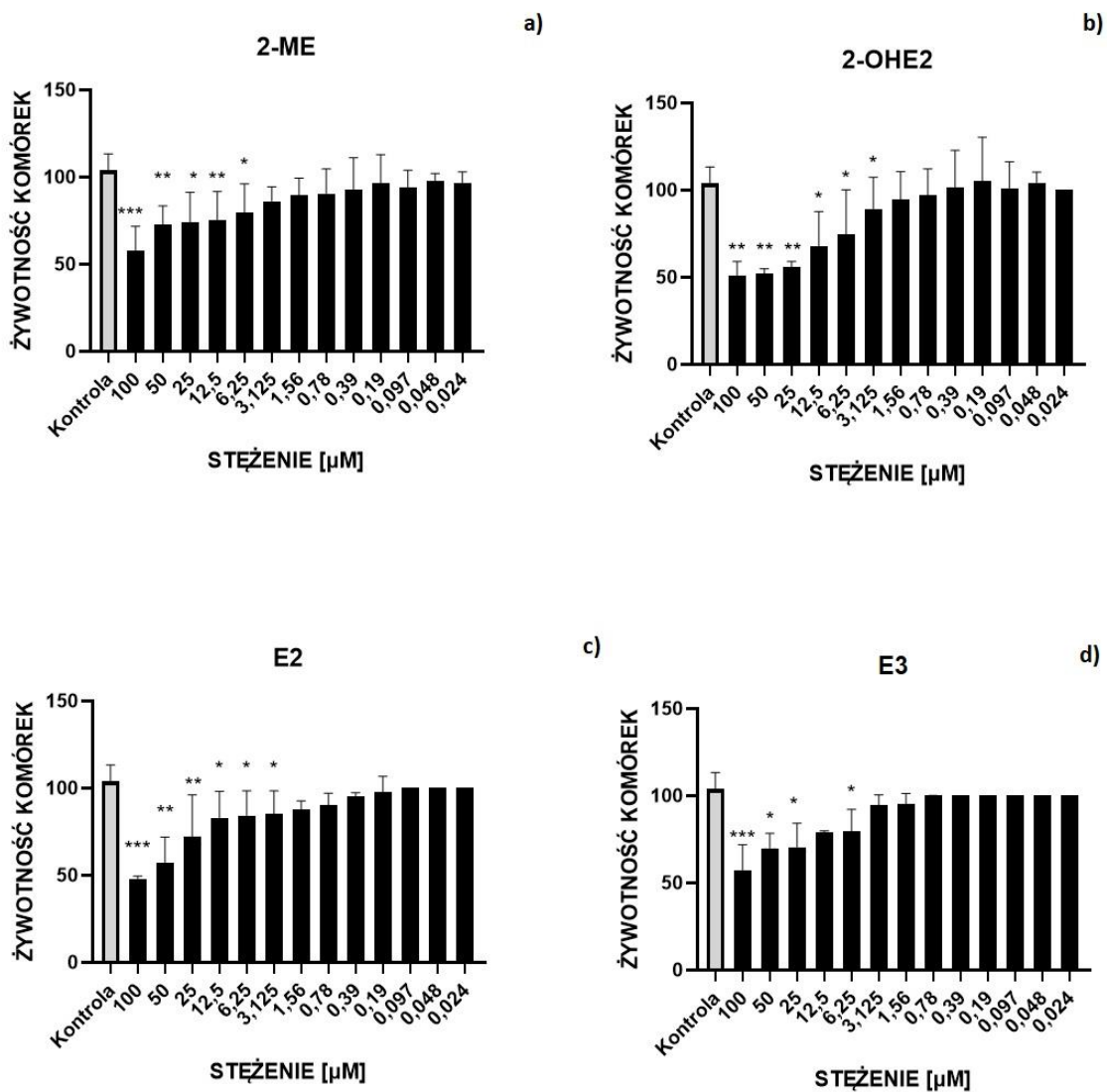


Ryc. 2. Pojedyncza 3D sferoidalna linia komórkowa A549, powstała na skutek odpowiednich warunków hodowli komórkowej z uwzględnieniem zastosowania uwzględnieniem studzienek o niskiej adhezji okrągłodennych z ultraniską powłoką przylegania komórek. Rycina została opublikowana jako plik uzupełniający w publikacji badawczej Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górską-Ponikowska M. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395 [2]. Rycina została opublikowana w formie dokumentów uzupełniających w publikacji Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395 [2].

Powyższą część wyników opublikowano na łamach publikacji Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.*

10. 2. Wpływ wybranych metabolitów 17β -estradiolu na żywotność komórek A549 niedrobnokomórkowego raka płuca w modelu dwuwymiarowym i trójwymiarowym sferoidalnym

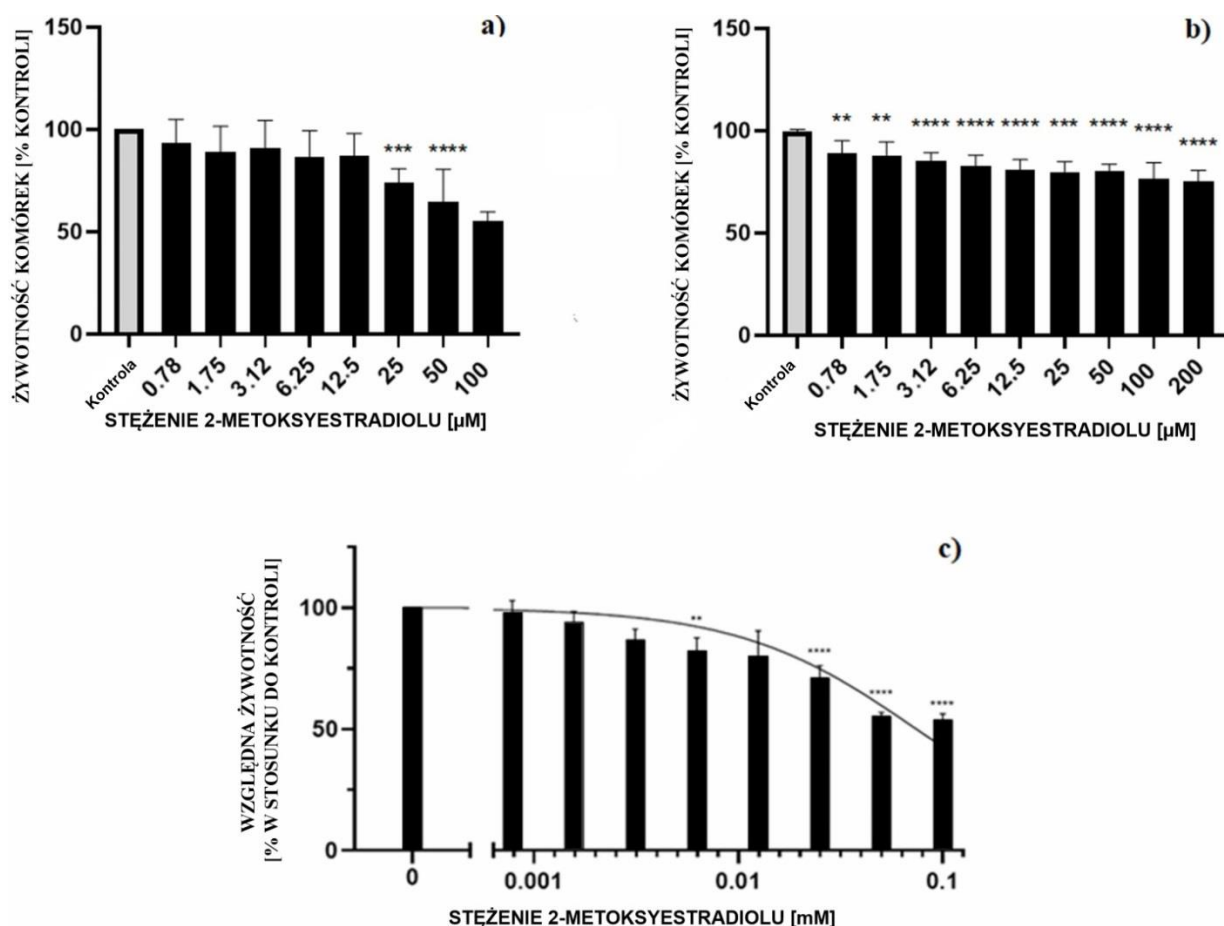
Wraz z rozpoczęciem eksperymentów, określono wpływ wybranych 17β -estradiolu na żywotność modeli linii komórkowej A549 niedrobnokomórkowego raka płuca 2D i 3D [2]. W tym celu wybrano 2-metoksyestradiol (2-ME), 2-hydroksyestradiol (2-OHE2), estradiol (E2) oraz estriol (E3). Żywotność komórek określono za pomocą testu MTT. Test ilościowy określa redukcję składnika tetrazolowego do nierozpuszczalnego produktu formazanu poprzez mitochondria komórek żywych.



Ryc. 3. Wybrane metabolity 17β-estradiolu w żywotności komórek A549. Wybrane metabolity 17β-estradiolu w sposób znaczący wpływają na żywotność linii komórkowej ludzkiego gruczolaka płuca A549. Żywotność linii komórkowej A549 2D zależna jest od dawki zastosowanego związku, w tym przypadku równych 100 μM lub mniejszych. Komórki A549 traktowano seryjnymi rozcieńczeniami 2-ME w zakresie stężeń od 100 μM do 0,0024 μM przez 24 godziny. **A)** Żywotność linii komórkowej A549 po upływie 24 godzin spadła do poziomu o średniej wynoszącej 57,63%. Kolejno, wraz ze zmniejszeniem stosowanego stężenia, aktywność cytotoksyczności uległa zmniejszeniu, co przedstawiono na wykresie słupkowym. **B)** Żywotność komórek 2D linii A549 określono również na skutek traktowania związkiem 2-OHE2. Po upływie 24 godzin, odnotowano spadek żywotności komórek do poziomu 51,18%, co świadczy o skuteczności stosowanego związku. **C)** Analogicznie, przeprowadzono eksperyment z zastosowaniem związku w postaci E2. Po upływie doby, żywotność linii komórkowej A549 spadła do poziomu 48,12% na skutek zastosowania 100

μM stężenia E2. Kolejno, żywotność linii komórkowej rosta wraz z obniżeniem poziomu stężenia badanego związku. **D)** Kolejno, żywotność linii komórkowej określono na skutek traktowania związkiem w postaci E3. Po upływie 24 godzin odnotowano spadek żywotności komórek A549 do poziomu 57,01% na skutek zastosowania stężenia 100 μM E3. * Żywotność komórek powyższych eksperymentów określono za pomocą testu MTT. Przedstawione wartości są średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Analizę statystyczną stabilności za pomocą funkcji GraphPad TTEST (GraphPad Prism 9 wersja 9.0.0.).

Na skutek zastosowania metabolitów 17-estradiolu o stężeniu równym 100 μM , odnotowano zbliżone wyniki, które wskazywać mogą na porównywalną aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej A549. Bazując na dokonaniach Promotor niniejszej pracy doktorskiej [5-12], dr hab. n. med. Magdalenę Górską-Ponikowską, Profesor Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej GUMed, postanowiono kontynuować działo celem określenia skuteczności wybranego metabolitu w postaci 2-ME wobec ludzkich komórek gruczołakoraka płuca A549. Niniejszym, celem potwierdzenia uzyskanych wyników z zastosowaniem 2-ME wobec linii komórkowej A549, powtórzono (wraz z ponownym uwzględnieniem trzykrotnego powtórzenia) wykonanie eksperymentu na modelu 2D, jak również na modelu 3D sferoidalnym, których rezultat przedstawiono na poniższych wykresach.



Ryc. 4. Żywotność komórek A549 w modelu 2D i 3D na skutek traktowania 2-ME. **(A)** 2-ME znacząco zmniejsza żywotność komórek A549 w sposób zależny od dawki w modelu hodowli 2D przy stężeniach mniejszych lub równych 100 μM. Komórki A549 traktowano seryjnymi rozcieńczeniami 2-ME w zakresie stężeń od 100 μM do 0, 43 μM przez 24 godziny. Żywotność komórek określono za pomocą testu MTT. Przedstawione wartości są średnią ± SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. **(B)** 2-ME zmniejsza żywotność komórek modeli sferoidalnych A549 3D w sposób zależny od dawki przy nakładach bliskich 200 μM. Komórki A549 eksponowano na seryjne rozcieńczenia 2-ME w zakresie stężeń 200 μM – 0, 78 μM przez 48 godzin. Żywotność komórek określono za pomocą testu WST-1. Przedstawione wartości są średnią ± SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. **(C)** Miara aktywności cytotoksycznej badanego związku stanowi wartość stężenia IC50 (ang. *inhibitory concentration*). Wartości IC50 dla linii komórkowej A549 traktowanej 2-ME wynosiły >100 μM. Wartości te obliczono, analizując zależność między stężeniami

a procentem (%) hamowania przy użyciu GraphPad Prism w wersji 9.0 dla Windows, GraphPad Software, CA [2]. Rycina została opublikowana jako figura 1 w publikacji Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395 [2].

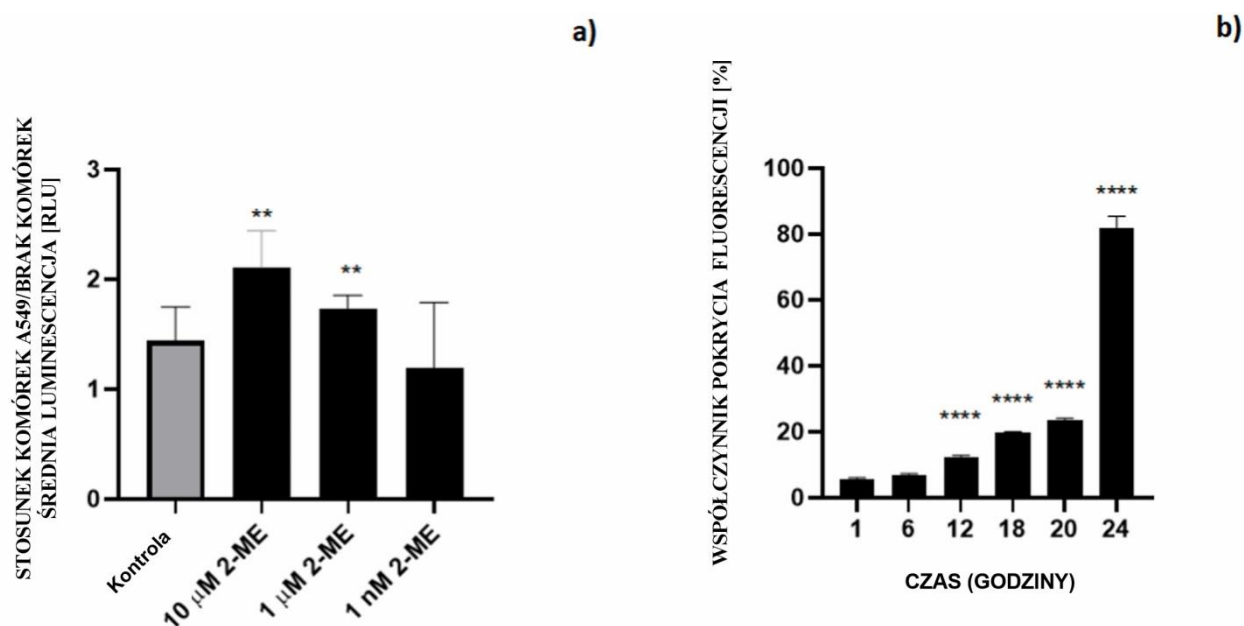
Wyniki badań dotyczących wpływu 2-ME (tj. test MTT modelu 2D i 3D) na żywotność linii komórkowej A549 w modelu 2D i 3D opublikowano w pracy Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górska-Ponikowska M. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.

10.3. Indukcja sygnału reaktywnych form tlenu w hodowli komórkowej A549 traktowanej 2-metoksyestradiolem

10.3.1. Odczyt sygnału reaktywnych form tlenu za pośrednictwem detekcji luminescencji

Kolejnym eksperymentem było określenie poziomu wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego w komórkach A549 traktowanych 2-ME [2]. Badanie polegało na zmierzeniu poziomu nadtlenu wodoru w komórkach A549 traktowanych 2-ME [2]. Komórki A549 traktowano 2-ME w stężeniach fizjologicznych (10 nM) i farmakologicznych (100 nM, 1 µM) zgodnie z projektem eksperymentu. Komórki A549 traktowano 2-ME w stężeniach fizjologicznych (10 nM) i farmakologicznych (100 nM, 1 µM) zgodnie z projektem eksperymentu. Jak wskazują wyniki przeprowadzonych badań, poziom stresu oksydacyjnego mierzony stężeniem nadtlenu wodoru okazał się znacznie wyższy w komórkach A549 traktowanych

2-ME w porównaniu z komórkami nietraktowanymi lub pożywką hodowlaną bez komórek [2].



Ryc. 5. ROS i śmierć komórkowa linii A549 indykowana 2-ME. **(A)** Komórki A549, jak również pożywkę hodowlaną pozbawioną komórek traktowano 2-ME w przewodach odpowiednio 10 μ M, 1 μ M i 10 nM. Komórki A549 2-ME generowały wyższe poziomy nadtlenu prostego w mleku z nietraktowanymi kontrolnymi komórkami A549 inkubowanymi z inną pożywką Mixture Nutrient Mixture F-12 Ham. Uzyskany wynik wynikający z indukcji ROS w dołkach bez komórek iw dołkach z komórkami A549 faktyczny na skutek uzyskania RFT przez rzeczy nowotworowe. Luminescencja zmiany za pomoc luminometru Glo-Max® firmy Promega (Mannheim, Niemcy). Analizę statystyczną stabilności za pomocą funkcji GraphPad TTEST (GraphPad Prism 9 wersja 9.0.0.). Celem dokonania analizy należy wziąć pod uwagę luminescencję (RLU), jak i od standardu. **(B)** Zależna od czasu wzrostu komórek A549 traktowanych 2-ME. Komórki A549 prowadzące do 2-ME 10 μ M do 24 godzin. Analizę uzyskanych wyników ocenianą metodą barwienia jodku propidyny (PI) działania z użyciem systemu CytoSMART Analysis System (Lux 3, CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości podane jako wzorce \pm SE z trzech różnych

eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w normie z komórkami kontrolnymi [2]. Rycina została opublikowana jako figura 2 w publikacji Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395 [2].

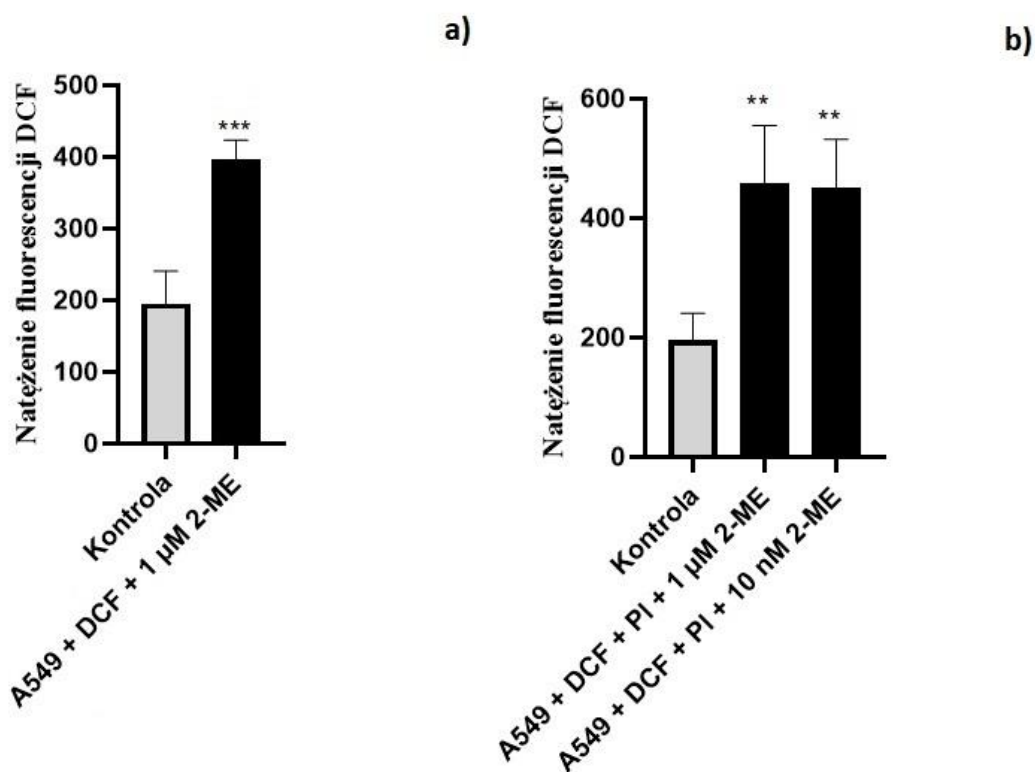
Wyniki niniejszych badań opublikowano w pracy Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górską-Ponikowska M. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.

10.3.2. Odczyt sygnału reaktywnych form tlenu za pośrednictwem cytometrii przepływowej

Jednym z potencjalnych mechanizmów na poziomie cytotoksycznym oraz cytostatycznym działania 2-ME jest indukcja stresu oksydacyjnego w traktowanych komórkach. Biorąc pod uwagę uprzednio uzyskane wyniki, zarówno w zakresie cytotoksyczności, jak i z zastosowaniem techniki luminescencji, kolejny etap badań obejmował pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu ROS wykonano za pomocą techniki cytometrii przepływowej z wykorzystaniem fluorescencji DCF-DA. Niniejsza analiza przedstawia informacje na temat intensywności wyprodukowanych wolnych rodników.

Niniejsze wyniki przedstawiające poziom stresu oksydacyjnego, otrzymane przy zastosowaniu techniki cytometrii przepływowej został określony za pomocą

pomiaru intensywności fluorescencji 2,7-dichlorofluoresceiny (DCF, ang. *dichlorofluorescein*).



Ryc. 6. Odczyt sygnału ROS za pośrednictwem cytometrii przepływowej. Niniejsze badanie wykazało wzrost intensywności świecenia wolnych rodników (co jest równoznaczne z ilością wyprodukowanych wolnych rodników) przez komórki A549 za pośrednictwem traktowania linii komórkowej reprezentatywnymi stężeniami 2-ME, przy jednoczesnym zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego w postaci DCF. **A)** W odniesieniu do kontroli (gdzie średnia wynosi 481.25), odnotowano wzrost fluorescencji DCF w stężeniu reprezentatywnym 1 µM 2-ME na poziomie średniej wynoszącej 505. Wyniki te potwierdzają postawioną tezę odnośnie indukcji stresu oksydacyjnego na skutek zastosowania 2-ME w linii komórkowej A549. **B)** W odniesieniu do natężenia fluorescencji DCF, wykazano wzrost w próbkach badanych potraktowanych 1 A549 + DCF + PI + 1 µM 2-ME 2-ME na poziomie 843.5 w odniesieniu do próbek kontrolnych (481.25). Kolejno, w przypadku 10nM

2-ME odnotowano natężenie fluorescencji na poziomie 712. W niniejszym badaniu zastosowano zarówno DCF jak i PI. Komórki A549 wyprodukowały wolne rodniki, jak również jednocześnie odnotowano efekt cytotoksyczny. Powyższe wartości stanowią średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. Analizę danych przeprowadzono przy zastosowaniu oprogramowania GraphPad Prism Software wersja 9.0, wykonując analizę t- test * p <0,1, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001 względem kontroli.

Badania przeprowadzono za pomocą techniki cytometrii przepływowej przeprowadzono dzięki współpracy z prof. dr hab. Jackiem M. Witkowskim z Katedry i Zakładu Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr n. med. Agnieszką Dacą z Zakładu Patologii i Reumatologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

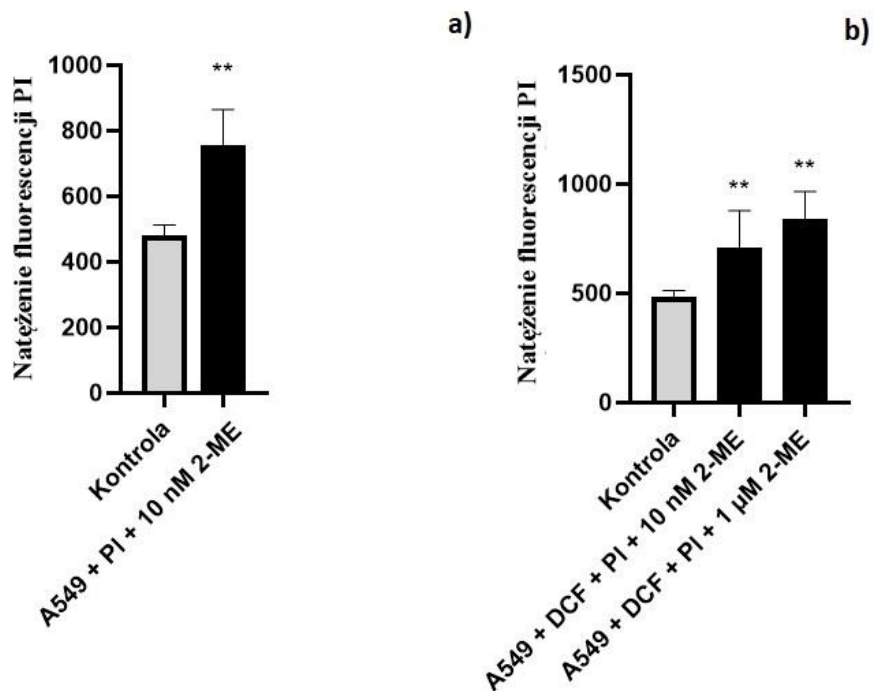
10. 4. Śmierć komórkowa indukowana 2-metoksyestradiolem (nekroza i późna apoptoza) w modelu komórkowym raka płuca A549

Kolejno wykryto poziom późnej apoptozy i nekrotycznej śmierci komórek A549 traktowanych 2-ME przy użyciu techniki znakowania jodkiem propidyny (PI) [2]. Komórki A549 traktowano 2-ME w stężeniu 10 μ M przez 24 godziny. Wzrost współczynników pokrycia fluorescencji odnotowano po 20 godzinach od rozpoczęcia doświadczenia na poziomie fluorescencji do 23,25%. W związku z konfluencją komórek, docelowy zasięg fluorescencji spadł do 22, 90% po upływie 24 godzin. Analogicznie, po 24 godzinach od momentu rozpoczęcia eksperymentu 2-ME odnotowano wzrost fluorescencji do 85,17%, co w niniejszym eksperymencie było najwyższym poziomem śmierci komórek [2]. Wynik przedstawiono na rycinie 5 B).

Wyniki niniejszych badań opublikowano w pracy Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górska-Ponikowska M. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.*

10.5. Ilościowe oznaczenie zawartości DNA komórek A549 za pomocą cytometrii przepływowej

Ilościowe oznaczenie zawartości DNA w komórkach jest jednym z zastosowań cytometrii przepływowej. W tym zakresie zastosowanie barwników i barwników DNA, zastosowanie właściwości stechiometrycznych. Barwniki uzyskane DNA zawierają między innymi jodek propidyny (PI). Barwienie za pomocą PI jest metodą oceny skuteczności komórek. Jednocześnie pozwala na analizę informacji w zakresie zawartości DNA, czy w ramach cyklu komórkowego. W ramach zestawienia wyników, potwierdzono efekt cytotoksyczności 2-ME. PI może przenikać przez błony komórkowe martwych komórek.



Ryc. 7. Ilościowe oznaczenie zawartości DNA komórek A549 za pomocą cytometrii przepływowej. Niniejsze wyniki badań przedstawiają wzrost fluorescencji komórek A549 za pośrednictwem traktowania 2-ME w stężeniach reprezentatywnych. **A)** W badanych próbkach odnotowano wzrost natężenia fluorescencji PI na poziomie średniej wynoszącej 651,33 w przypadku zastosowania stężenia reprezentatywnego 10nM 2-ME w odniesieniu do próbek kontrolnych. **B)** Zastosowanie reprezentatywnego stężenia w postaci 1 μM 2-ME wpłynęło na wzrost fluorescencji PI na poziomie 757, w odniesieniu do średniej uzyskanej w próbkach kontrolnych oraz w stężeniu 10 nM 2-ME. W niniejszym badaniu zastosowano DCF wraz z PI celem potwierdzenia produkcji wolne rodniki oraz jednoczesnego efektu cytotoksyczności badanego związku. Analizę danych przeprowadzono przy zastosowaniu oprogramowania GraphPad Prism Software wersja 9.0, wykonując analizę t- test * p <0,1, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001 względem kontroli.

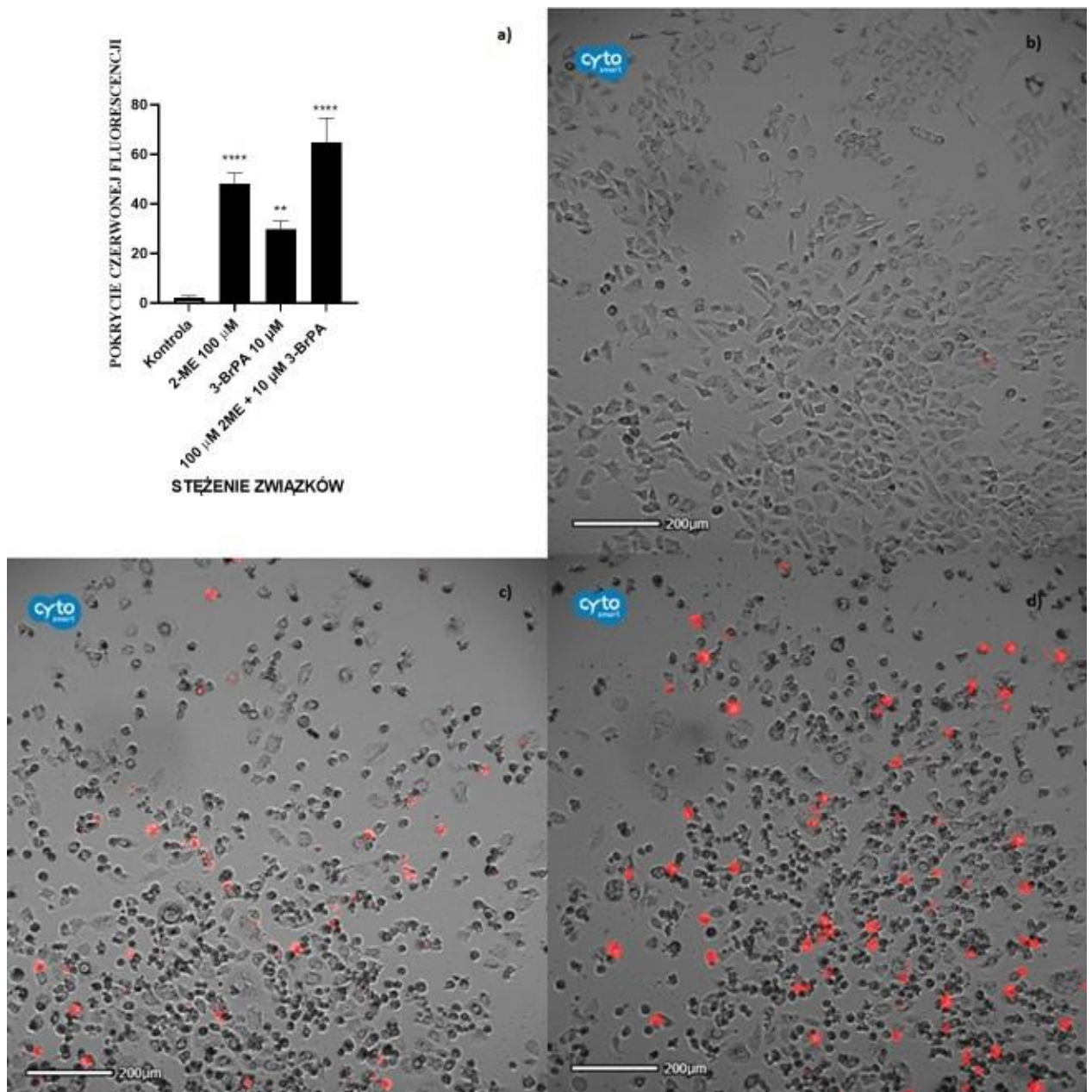
Badania przeprowadzono za pomocą techniki cytometrii przepływowej przeprowadzono dzięki współpracy z prof. dr hab. Jackiem M. Witkowskim z Katedry i Zakładu Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr n. med. Agnieszka Dąca z Zakładu Patologii i Reumatologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

10.6. Mikroskopia fluorescencyjna w czasie rzeczywistym

Uzyskane w trakcie badań obrazy fluorescencyjne uzyskano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego CytoSMART® Omni FL umieszczonego w inkubatorze CO₂, co pozwoliło na uzyskanie optymalnych warunków badań w odpowiednim środowisku [2].

10.6.1. Kombinacja 2-metoksyestradiolu z 3-Bromopirogronianem na dwuwymiarowym modelu hodowli komórek A549

Dostępne dane wskazują, że 3-BrPA wpływa na uwalnianie mleczanu w ludzkich komórkach gruczolaka płuca A549. Komórki A549 traktowano 10 mM 3-BrPA przez 24 godziny w 37°C jako wstępną inkubację. Następnie, po upływie 4 godzin, komórki traktowano 2-ME. Jako kontrola, część komórek nie była traktowana żadnym związkiem, a część tylko 3-BrPA lub 2-ME. Kolejno, każdą studzienkę z 96-studzienkowych płytek traktowano objętością 0,01 mg/ml. Po 24 godzinach zmierzono czerwoną fluorescencję na jednowarstwowych komórkach 2D A549 przy użyciu urządzenia CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Jak wskazują wyniki badań przedstawione na poniższej rycinie, współaplikacja 3-BrPA wraz z 2-ME wykazała najwyższą skuteczność wobec ludzkich komórek gruczolaka płuca.



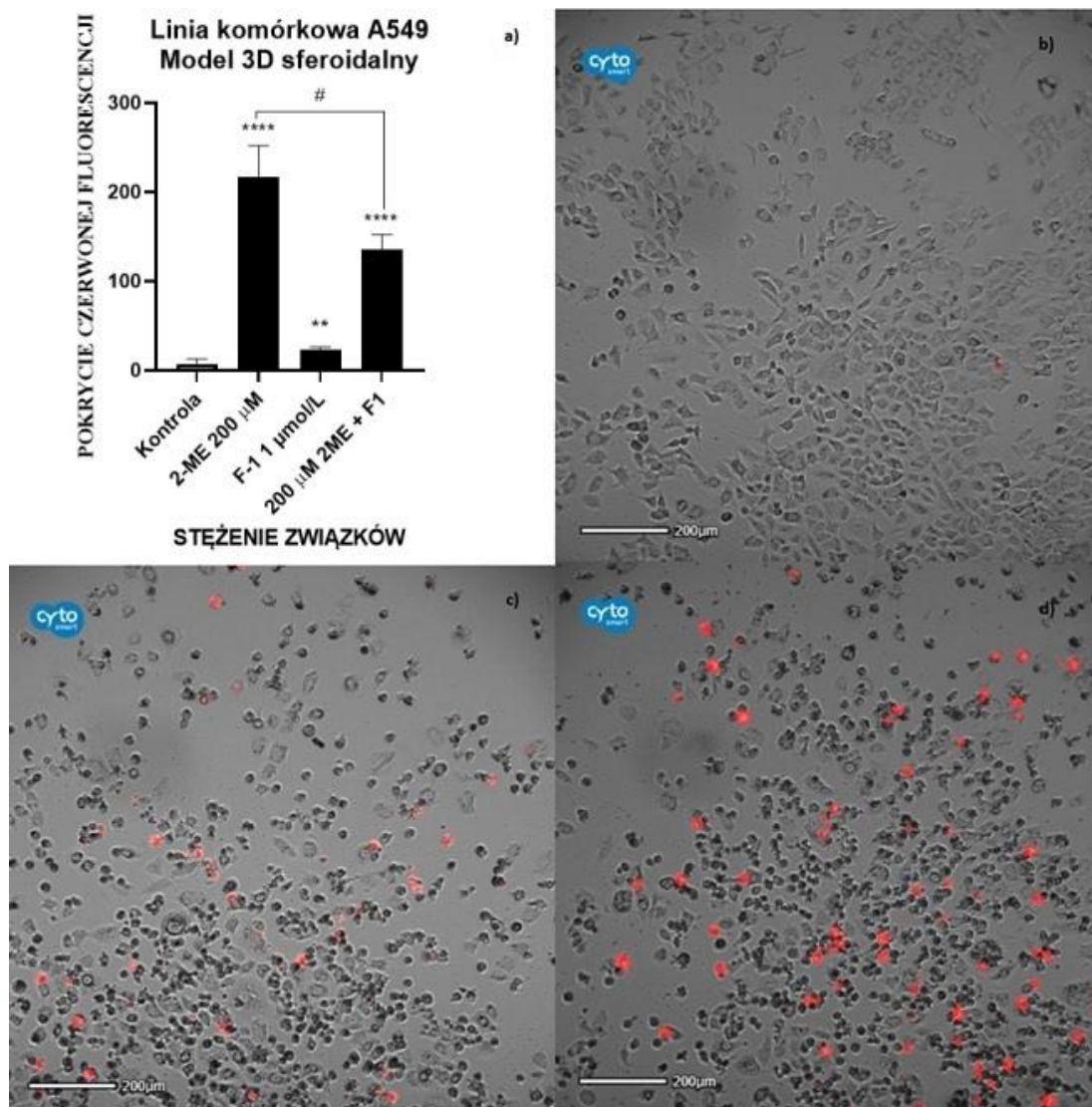
Ryc. 8. Kombinacja 2-ME z 3-BrPA na dwuwymiarowym modelu hodowli komórek A549. **A)** Komórki A549 ludzkiego płuca traktowano 2-ME (100 μM) z 3-BrPA (10 μM) przez okres 24 godzin. Dla porównania pokazano również komórki A549 traktowane tylko 2-ME (100 μM) lub 3-BrPA (10 μM). Następnie zastosowano PI (0,01 mg/ml). Następnie, po upływie najmniej 2 do 4 godzin, zmierzono poziom czerwonej fluorescencji przy użyciu systemu analizy CytoSMART (Omni FL, CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią ± SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Komórki kontrolne traktowane samym rozpuszczalnikiem nie wykazywały fluorescencji po 24 godzinach. **B)** Jednowarstwowa kultura 2D komórek A549 bez rozpuszczalnika po 24

godzinach. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). **C)** Hodowla jednowarstwowa 2D komórek A549 traktowanych 2-ME (100 μ M) bez zastosowania związku 3-BrPA po 24 godzinach. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). **D)** Jednowarstwowa kultura 2D komórek A549 po traktowaniu 2-ME (100 μ M) razem z 3-BrPA (10 μ M) po upływie 24 godzin. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia).

10.6.2. Ferroptoza indukowana przez 2-metoksyestradiol w hodowli sferoidalnych komórek linii A549

Kolejno, określono potencjalną indukcję ferroptozy w komórkach A549 sferoidalnych 3D traktowanych 2-ME. Komórki A549 traktowano 2-ME w stężeniach 200 μ M zgodnie z projektem eksperymentu. Następnie na podstawie przeprowadzonych badań oraz wcześniejszych badań cytotoksyczności 2-ME przeprowadzonych na sferoidalnych modelach hodowli komórkowej A549 wybrano reprezentatywne stężenie 200 μ M (Musial C. i wsp. *Redox Biology* (2022)). Eksperyment zakładał określenie śmierci komórkowej w komórkach traktowanych tylko 200 μ M, 1 μ mol/L samego F-1 oraz w połączeniu z 2-ME razem z F-1 w ciągu 48 godzin.

W rezultacie stwierdzono, że poziom czerwonej fluorescencji był najwyższy, gdy komórki A549 traktowano tylko 2-ME w reprezentatywnym stężeniu. Następnie, gdy potraktowano samym F-1, wychwyty fluorescencji okazał się nieistotny. Jak wskazują uzyskane wyniki, ferostatyna będąca inhibitorem ferroptozy skutecznie hamuje śmierć komórki. Analizę uzyskanych wyników oceniono metodą barwienia jodkiem propidyny (PI).



Ryc. 9. Ferroptoza indukowana przez 2-ME w hodowli sferoidalnych komórek wielokomórkowych A549. **A)** Komórki ludzkiego płuca A549 traktowano 2-ME (200 μ M) z inhibitorem śmierci komórkowej F-1 (ferrostatyna-1, 1 μ mol/l) lub bez dla wybranego reprezentatywnego, najsilniejszego stężenia 2-ME (200 μ M). Wstępną analizę uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu systemu analitycznego CytoSMART (Omni FL, CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. * p <0,01, ** p <0,001, *** p <0,0001, **** p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Komórki kontrolne nie wykazywały fluorescencji po upływie 48 godzin. **B)** Hodowla wielokomórkowych sferoidalnych komórek 3D A549 po traktowaniu 2-ME w reprezentatywnym stężeniu 200 μ M po 48 godz. Sferoidy hodowli komórkowej A549 wykazywały najsilniejszą czerwoną fluorescencję w wyniku działania 2-ME i zaczęła się rozpadać w polu nekrotycznym (ang. *necrotic zone*), zwiększając swoją objętość, co świadczy o śmierci komórki. Fluorescencję mikroskopową

i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

C) Hodowla sferoidalnych hodowli komórkowych 3D A549 po traktowaniu F-1 1 μ mol/l w reprezentatywnym stężeniu 200 μ M po 48 godz. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

D) Hodowla wielokomórkowych sferoidalnych komórek 3D A549 po traktowaniu 2-ME μ M w reprezentatywnym stężeniu 200 i inhibitorem ferroptozy F-1 μ mol/l w stężeniu 48 godzin. Wychwył czerwonej fluorescencji jest również wizualnie znacznie niższy niż w przypadku potraktowania sferoidów wyłącznie 2-ME. Ponadto, nie nastąpiła dezintegracja sferoidy i nie odnotowano pola nekrotycznego. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

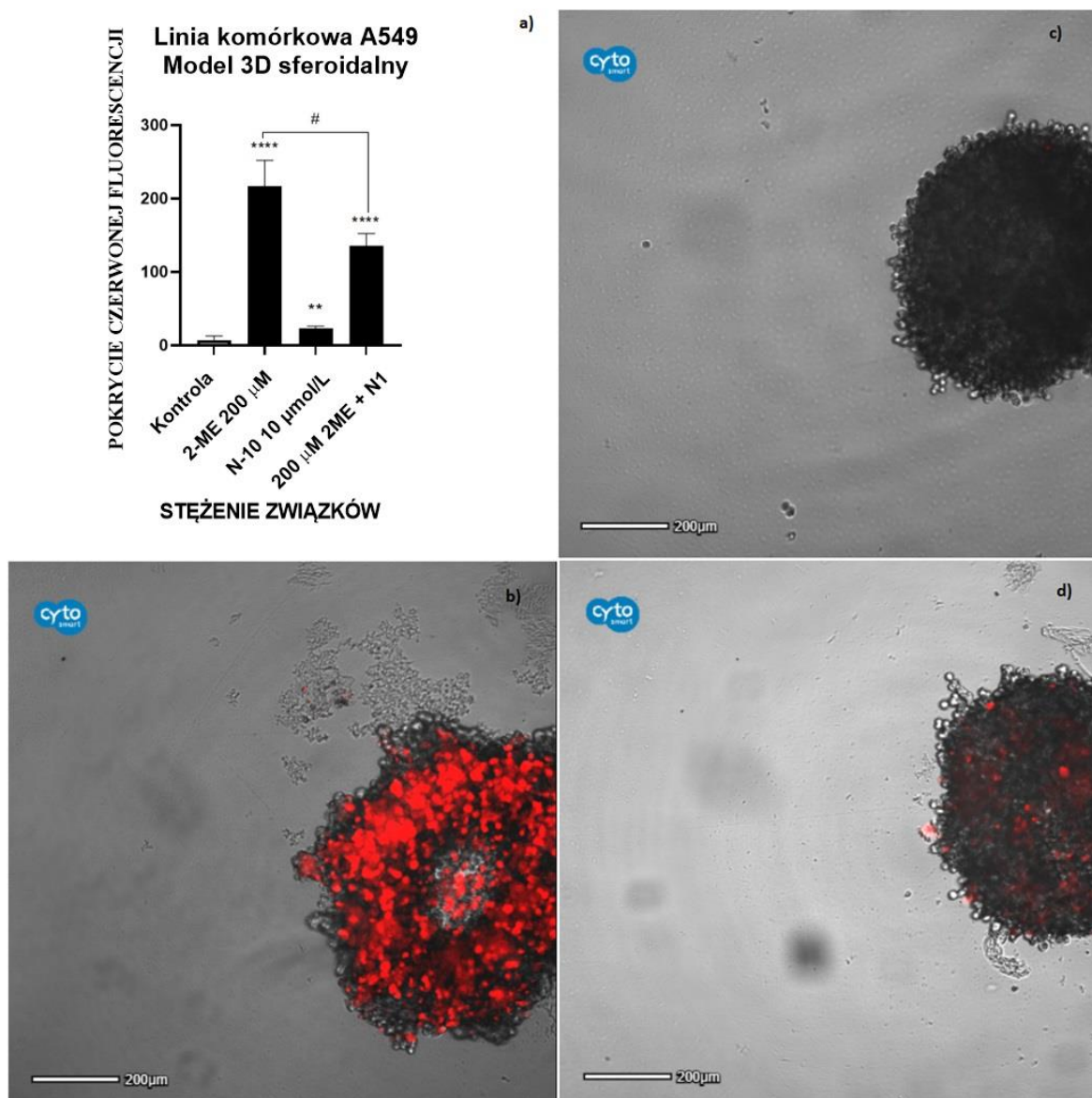
10.6.3. Nekroptoza indukowana przez 2-metoksyestradiol w hodowli sferoidalnych komórek wielokomórkowych A549

W związku z powyższym eksperymentem, w ramach niniejszej dysertacji postanowiono określić indukcję nekroptozy w komórkach sferoidalnych 3D A549 traktowanych 2-ME w analogiczny sposób. Szereg dowodów wskazuje, że nekroptoza może odgrywać kluczową rolę w rozwoju nowotworów złośliwych.

Jak powyżej, A549 traktowano 2-ME w stężeniach 200 μ M. Eksperyment miał na celu określenie śmierci komórek w komórkach traktowanych samym 200 μ M, samym 10 μ mol/L N-1 oraz w połączeniu z 2ME razem z N-1 w ciągu 48 godzin. Stężenia dobrano na podstawie przeglądu piśmiennictwa i przeprowadzenia badań wstępnych.

Projekt poprzedniego eksperymentu został powtórzony, wskazując najwyższą fluorescencję dla 2-ME w stężeniu 200 μ M. Gdy komórki traktowano samym N-1, nie wykazano fluorescencji, co wskazuje na brak śmierci komórek. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że 2-ME indukuje również nekroptozę

w ludzkich komórkach raka płuca A549. Analizę uzyskanych wyników oceniano poprzez barwienie jodkiem propidyny (PI) w stężeniu 0,01 mg/ml.



Ryc. 10. Nekroptoza indukowana przez 2-ME w hodowli sferoidalnych komórek wielokomórkowych A549. **A)** Komórki ludzkiego płuca A549 traktowano 2-ME (200 μ M) z inhibitorem śmierci komórkowej N-1 (nekrostatyna-1, 10 μ mol/l) lub bez dla wybranego reprezentatywnego, najsilniejszego stężenia 2-ME (200 μ mol/l) μ M). Wstępną analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą systemu analitycznego CytoSMART (Omni FL, CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$

w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Komórki kontrolne traktowane samym rozpuszczalnikiem nie wykazywały fluorescencji po 48 godzinach. **B)** Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawia strefę nekrotyczną w wielokomórkowej sferoidalnej hodowli komórkowej 3D A549, która jest bardzo wyraźnie widoczna dzięki traktowaniu 2-ME w reprezentatywnym stężeniu 200 μM po upływie 48 godzin. Podział w obszarze strefy nekrotycznej jest spowodowany niedotlenieniem i ograniczoną dostępnością składników odżywczych. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. **C)** Hodowla wielokomórkowych sferoidalnych komórek 3D A549 po potraktowaniu N-1 10 $\mu\text{mol/l}$ po 48 godz. Nie wykazano śmierci komórek A549. Stąd też, sferoidy również zachowały swój pierwotny okrągły kształt. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. **D)** Hodowla wielokomórkowych sferoidalnych komórek 3D A549 po traktowaniu 2-ME μM w reprezentatywnym stężeniu 200 i inhibitorem ferroptozy N-1 10 $\mu\text{mol/l}$ w stężeniu przez okres czasu 48 godzin. Analogicznie, w tym przypadku czerwona fluorescencja jest wizualnie znacznie niższa, aniżeli po upływie tego samego okresu czasu z uwzględnieniem traktowania komórek A549 związkiem 2-ME niż samym 2-ME bez użycia inhibitora nekroptozy. Ponadto nie nastąpiła dezintegracja sferoidy, przy czym nie zostało zwizualizowane pole nekrotyczne. Fluorescencję mikroskopową i analizę przeprowadzono przy użyciu CytoSMART Omni FL (CytoSMART, Eindhoven, Holandia). Wartości przedstawiono jako średnią \pm SE z trzech niezależnych eksperymentów. *p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001, ****p <0,00001 w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

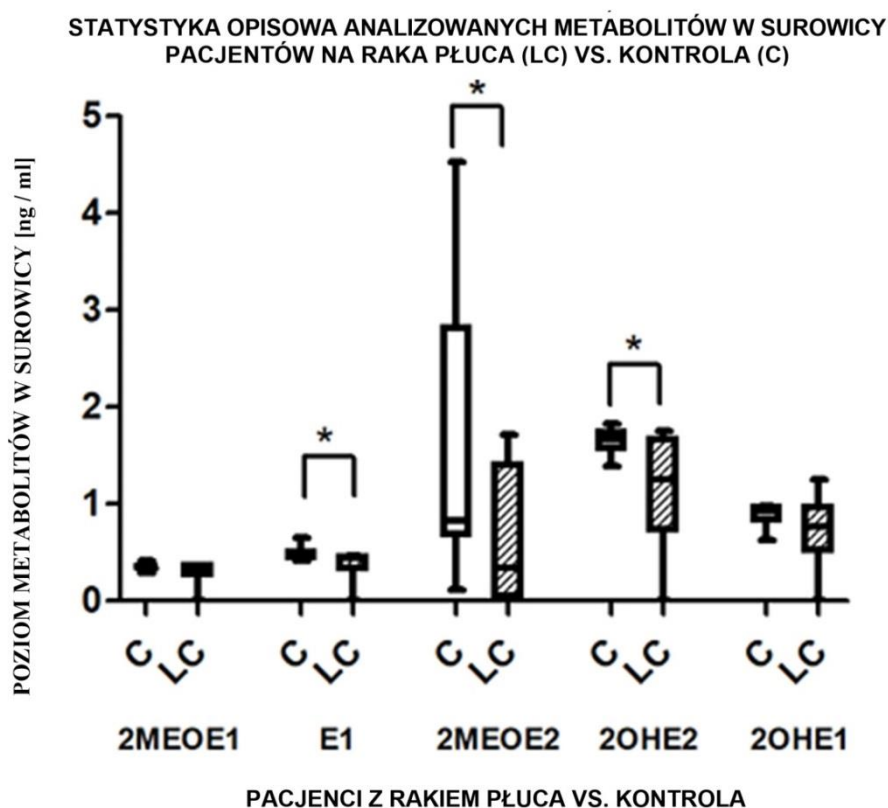
10.7. Progresa raka i poziomy pochodnych estrogenów w surowicy

Celem nadania niniejszemu badaniu wartość translacyjną, zweryfikowano poziomy estrogenów w surowicy u chorych na NSCLC [2]. W szczególności zweryfikowano poziomy estrogenów, o których wiadomo, że są wykorzystywane do fizjologicznej syntezy 2-ME (2-MEOE2), a mianowicie estronu (E1), 17 β -estradiolu (E2), 2-hydroksyestradiolu (2-OHE2), 2-hydroksyestron (2OHE1) i 2-metoksyestron (2-MEOE1) [2]. Jak ustalono na podstawie analiz klinicznych, zaobserwowano znacząco obniżone poziomy 2-ME w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną [2]. Zaobserwowano kilka statystycznie istotnych różnic w stosunku do krytycznych metabolitów estrogenu, z których szczególnie godne uwagi są niższe stężenia 2MEOE2 (2-ME) i 2OHE2 w surowicy wykryte u pacjentów z rakiem płuca w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej [2].

Zmienna	M		Me		SD		Min		Max		Q1		Q3		Wynik testu statystycznego *
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
4MEOE1	0,05	0,07	0,06	0,07	0,03	0,01	0	0,05	0,07	0,09	0,03	0,06	0,37	0,08	U = 27,5; p = 0,1; $\eta^2 = 0,14$
16OHE1	0,24	0,25	0,3	0,29	0,13	0,06	0	0,13	0,31	0,29	0,22	0,24	0,3	0,29	U = 22; p = 0,02; $\eta^2 = 0,26$
E2	0,29	0,49	0,35	0,4	0,15	0,18	0	0,35	0,39	0,83	0,26	0,36	0,37	0,72	U = 13; p = 0,003; $\eta^2 = 0,42$
ALFA E2	0,39	0,47	0,48	0,47	0,23	0,02	0	0,44	0,62	0,51	0,24	0,46	0,5	0,49	U = 39,5; p = 0,45; $\eta^2 = 0,03$
4OHE1	2,53	3,67	2,77	3,75	1,4	0,25	0	3,21	3,77	3,9	2,03	3,51	3,67	3,87	U = 15; p = 0,008; $\eta^2 = 0,35$
4MEE2	0,03	0,12	0,04	0,05	0,02	0,12	0	0,03	0,05	0,32	0,03	0,03	0,04	0,26	U = 18,5; p = 0,06; $\eta^2 = 0,2$

Tabela 1. Zestawienie statystyk opisowych wyników analizowanych metabolitów w grupie chorych na gruczolakoraka płuca oraz grupie kontrolnej. Powyższe wyniki w formie tabeli opublikowano w publikacji Musiał C. i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395, której wybrane wyniki wchodzą w skład niniejszej rozprawy doktorskiej [2].

* Test U Manna-Whitneya; 1 - chorzy na raka płuca, 2 - grupa kontrolna.



Ryc. 11. Progresja raka i poziomy pochodnych estrogenów w surowicy. Stężenia krytycznych metabolitów estrogenu w surowicy analizowane u pacjentów z rakiem płuca (LC) w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (C) przedstawiono jako medianę oraz kwartył 1 i 3, z wartościami minimalnymi i maksymalnym. Różnice istotne statystycznie zaznaczono gwiazdką * i odnoszą się do wartości $p < 0,05$. Warto zauważyć, że stężenie 2-ME w surowicy jest istotnie niższe u chorych na raka płuca w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki niniejszych badań opublikowano w tabeli na łamach publikacji wchodzącej w skład

niniejszej dysertacji doktorskiej Musiał C., i wsp. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395 (fig. 3 C) w [2]).

Powyższe wyniki wchodzące w skład rozprawy doktorskiej opublikowano w pracy Musiał C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Górska-Ponikowska M. *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*. *Redox Biol.* 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki badań, kolejno określono stosunek wybranych metabolitów z 2-ME, które, jak wskazano, mogą służyć jako potencjalny biomarker raka płuca.

Zważywszy na stosunek niniejszych metabolitów, zależność stwierdzono odnośnie stosunku 2ME do 4MEOE1, gdzie stosunek ten jest o ponad połowę niższy u pacjentów chorych na raka płuca aniżeli w grupie kontrolnej. Podobna sytuacja dotyczy stosunku 2ME do 16OHE1, a także 2ME do 4MEE2, co jednoznacznie wskazuje na zależność między stosunkiem powyższych metabolitów w przypadku prawdopodobnie hormonozależnego gruczolakoraka płuca. Stosunek metabolitów 4OHE1 do 16OHE1 oraz 4MEE2 do 16OHE1 również wykazuje istotną różnicę, przy czym stosunek liczb jest dwudziestodwukrotnie niższy u pacjentów z gruczolakorakiem płuca w porównaniu z grupą kontrolną.

To odkrycie wyraźnie wskazuje na zależność w stosunku wybranych metabolitów hormonów steroidowych u pacjentów z gruczolakorakiem płuca, co może mieć dużą kliniczną wartość prognostyczną.

Stosunek metabolitów	R pacjenci	R kontrola
2ME : 4MEOE1	5,66	11,85
2ME : 16OHE1	1,13	2,86
2ME : 4OHE1	0,12	0,22
2ME : 4MEE2	8,5	16,6
E2 : 4MEOE1	5,83	5,71
E2 : 16OHE1	1,16	1,38
E2 : 4OHE1	0,13	0,10
ALFA E2 : 4MEO1	8,00	6,71
ALFA E2 : 4MEE2	12,00	0,12
ALFA E2 : 4OHE1	0,17	0,12
4MEOE1 : 16OHE1	0,20	0,24
4OHE1 : 16OHE1	9,23	12,93
4MEE2 : 16OHE1	0,13	2,86

Tabela 2. Zestawienie wyników stosunku wybranych metabolitów na podstawie analizy statystycznej wyników surowicy krwi pacjentów z gruczolakorakiem płuca i grupy kontrolnej. Współczynnik (R) jest zaprezentowany z dokładnością do około dwóch miejsc po przecinku. $R=a/p$. W kolorze czerwonym zaznaczono istotne statystycznie różnice w stosunku wybranych metabolitów estradiolu u pacjentów z rakiem płuca oraz grupy kontrolnej.

Stosunek powyższych wyników uzyskano jako iloraz odniesienia pierwszej wartości do drugiej wartości, w standardowy sposób matematyczny. Celem współczynnika jest określenie względnej różnicy wskazanych względnych liczb.

To odkrycie wyraźnie wskazuje na zależność w stosunku wybranych metabolitów hormonów steroidowych u pacjentów z gruczolakorakiem płuca, co może mieć dużą kliniczną wartość prognostyczną.

Podziękowania uzupełniające – część badawcza

W ramach niniejszej dysertacji doktorskiej składam podziękowania firmie CytoSMART (CytoSMART, Eindhoven, Holandia) za udostępnienie urządzenia do obrazowania żywych komórek fluorescencyjnych CytoSMART Omni FL, automatycznego mikroskopu jasnego pola CytoSMART Omni, kompaktowego zautomatyzowanego systemu CytoSMART Lux2 oraz systemu obrazowania Cytosmart LUX3 składającego się z dwóch mikroskopów fluorescencyjnych do niniejszego projektu badawczego, a także producentowi Promega (Mannheim, Niemcy) za udostępnienie czytnika płytek GloMax® Discover Microplate Reader, który wzbogacił wartość niniejszych badań.

XI. DYSKUSJA

Według najlepszej wiedzy, niniejsze badanie autorstwa Musiał C. i wsp. opublikowane na łamach *Redox Biology* w 2022 roku jest pierwszym, opisującym wpływ 2-ME na śmierć komórek ludzkiego gruczolakoraka płuca linii komórkowej A549 w sferoidalnym modelu 3D [2]. Jak uprzednio wspomniano, niniejsza dysertacja doktorska ma charakter pracy hybrydowej, łączącą prace opublikowane wraz z wynikami uzupełniającymi.

Jak wspomniano, rak płuca, w tym gruczolakorak płuca, jest jedną z wiodących, najczęściej występujących chorób nowotworowych o niezwykle wysokiej śmiertelności wśród pacjentów [1,2].

Rezultat wieloletnich badań prowadzonych przez promotor niniejszej rozprawy doktorskiej, dr hab. n. med. Magdalenę Górską-Ponikowską, Profesor Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Pani Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej GUMed, wskazuje skuteczność i efektywność przeciwnowotworową 2-ME w komórkach kostniakomięsaka 143B, ludzkiej linii nerwiaka zarodkowego SHSY-5Y, czy w unieśmiertelnionej linii hipokampa HT22 [5-12].

Jak wykazały badania wchodzące w skład niniejszej dysertacji z wykorzystaniem komórek A549 rosnących na płaskiej powierzchni i wielokomórkowych sferoidach, 2-ME jest potencjalnym środkiem chemioterapeutycznym w warunkach laboratoryjnych *in vitro* [2]. Projekt zakładał dwukrotnie wyższe stężenie 2-ME w 3D sferoidalnym modelu komórkowym A549, ze względu na złożoną strukturę guzów sferoidalnych naśladujących guz NSCLC *in vivo*, w oparciu o doświadczenia i eksperymenty (a także stężenia 2-ME stosowane w niniejszym dokumencie) opublikowane w Musiał C. i wsp. *Redox Biology* [2].

Ponadto metabolity 17- β -estradiolu, w tym 2-ME, mogą pełnić rolę biomarkerów raka płuca [2]. Stąd też wskazuje się, że w komórkach A549, mechanizmem działania 2-ME jest regulacja stresu nitro-oksydacyjnego w zakresie reaktywnych form tlenu [2].

Niedotlenienie, czyli tak zwane zjawisko hipoksji, jest szczególnie istotne w przypadku reaktywnych form tlenu w obszarze mikrośrodowiska guza nowotworowego [2,40]. Co istotne, to właśnie niedotlenienie może wywierać

kluczowy wpływ na przerzutowanie z pierwotnych guzów nowotworowych [2,40]. Zgodnie z najlepszą wiedzą, na łamach publikacji Musial C. i wsp. w *Redox Biology* (2022) po raz pierwszy opublikowano wyniki wskazujące wzrost poziomu stresu oksydacyjnego wywołanego przez 2-ME przy wybranych stężeniach referencyjnych w komórkach ludzkiego gruczolakoraka płuca A549 [2].

3-BrPA wpływa na nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach nowotworowych [33,34]. Wyniki eksperymentów wskazują, że 3-BrPA indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych. Zastosowanie nekrostatyny-1 skutecznie wpływa na nekroptozę w przypadku komórek traktowanych 3-BrPA [33,34]. Jak wskazują wyniki badań Musial C. i wsp. *Redox Biology* (2022), komórki A549 zwiększają produkcję reaktywnych form tlenu na skutek traktowania 2-ME [2]. Ponadto 2-ME wpływa na indukcję nekrozy i późnej apoptozy w ludzkich komórkach gruczolakoraka płuca. Wykazano, że 3-BrPA, który pełni funkcję inhibitora glikolizy, indukuje ferroptozę i nekroptozę w ludzkich komórkach nowotworowych [33,34].

Dostępne dane wskazują również, że 3-BrPA może mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu raka piersi [41,42]. Zatem niniejsze badania wskazują na połączony efekt 3-BrPA i 2-ME w hodowli 2D komórek A549. Interakcja 2-ME z 3-BrPA rzuca nowe światło na szlaki sygnalizacji śmierci komórkowej ludzkich komórek gruczolakoraka płuca

Po wnikliwym przeglądzie literatury stwierdza się, że 3-BrPA indukuje szereg form śmierci w komórkach nowotworowych, za pośrednictwem mechanizmu wyczerpania energii, jednocześnie wywołując stres wewnątrzkomórkowy [33-34,41-42]. Uzyskane wyniki, jak również analiza danych literaturowych wskazują, że 3-BrPA jest niewątpliwie obiecującym środkiem o działaniu przeciwnowotworowym, co wskazuje na wysoki potencjał na przejście do badań klinicznych, w nurcie medycyny translacyjnej. Stąd też, skuteczność 3-BrPA wskazuje na potencjalną przydatność terapeutyczną w leczeniu onkologicznym, analogicznie jak 2-ME.

W związku z tym kolejnym krokiem zostało określenie mechanizmów śmierci komórek w tym obszarze, co pełni niezwykle istotną wartość w potencjalnym zastosowaniu klinicznym i opracowywaniu leków w przyszłości. Stąd też, przyjrano się bliżej mechanizmom śmierci komórki.

Pierwszą z nich była ferroptoza, czyli nowa forma śmierci komórki, która jak wiadomo zależna jest od żelaza [43]. Z biochemicznego punktu widzenia ferroptoza stanowi śmierć komórki charakteryzująca się akumulacją lipidowych reaktywnych form tlenu (ROS) [43]. Jak już uprzednio wskazano, 2-ME indukuje sygnał ROS w ludzkich komórkach raka płuca A549 (Musiał C. i wsp. *Redox Biology*, 2022). Źródła wskazują, że ferroptoza stała się nowym potencjalnym celem w zakresie strategicznej opcji leczenia onkologicznego raka płuca [25].

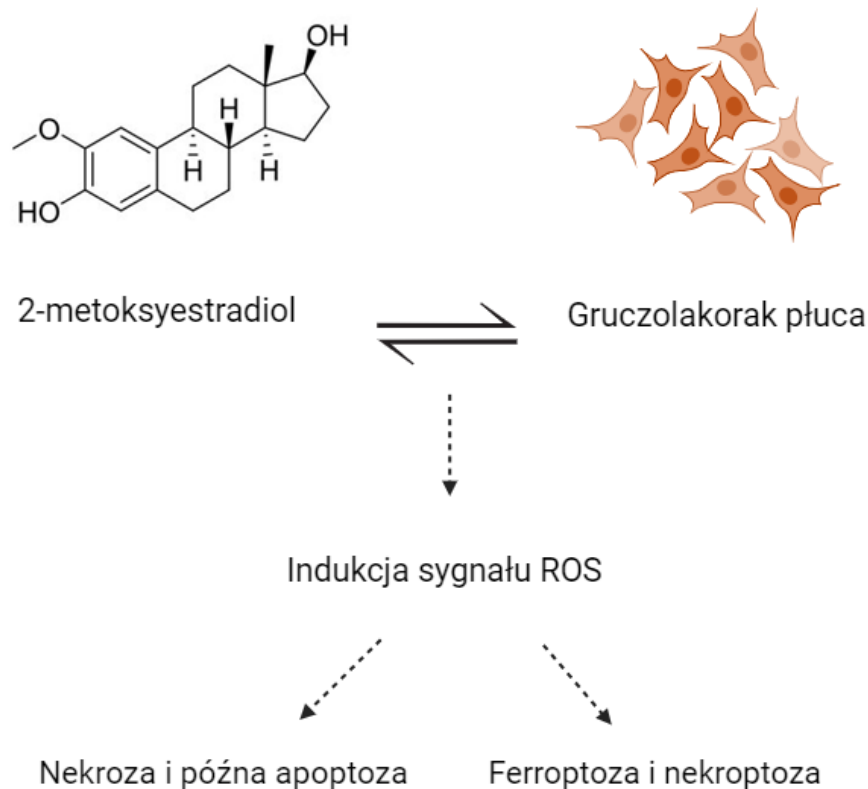
Jak wskazano powyżej, jednym z potencjalnych mechanizmów ferroptozy może być gromadzenie się reaktywnych form tlenu w komórkach [43]. Inne obejmują utratę glutationu, która jest również związana z peroksydazą glutationową 4 i wymiennikiem cystyna: glutaminian xCT [43]. Niemniej jednak, w odniesieniu do raka płuca, mechanizm ferroptozy jest nadal całkowicie nieznan. Jednak może rzeczywiście być zależny od ROS poprzez reakcję Fentona [43].

Dlatego też, opierając się na doniesieniach naukowych i wcześniejszych badaniach dotyczących raka płuca (Musiał C. i wsp., *Redox Biology*, 2022), wykorzystano inhibitor ferroptozy ferrostatynę-1 do określenia jego potencjalnej roli w przypadku śmierci komórkowej ludzkich komórek raka płuca w wyniku leczenia 2-ME [2,25,43].

Uzyskane wyniki wskazują, że ferroptoza może stanowić potencjalny cel terapeutyczny wobec gruczolakoraka płuca. Jednocześnie, niniejszym potwierdzono skuteczność 2-ME w hodowli komórek sferoidalnych imitującej naturalne środowisko guza nowotworowego [2]. Na chwilę obecną doniesienia naukowe w tej dziedzinie są bardzo ograniczone. Niemniej, opracowywane są nanocząstkowe induktory ferroptozy raka płuca, w tym nanocząstki żelaza o zerowej wartościowości [44], erastyna [45], a także nanopęcherzyki podobne do egzosomów [30].

Dlatego doniesienia o kierowaniu ferroptozy za pośrednictwem 2-ME w raku płuca mogą mieć ogromne znaczenie. W celu omówienia indukcji ferroptozy w komórkach nowotworowych przez zastosowanie 2-metoksyestradiolu przeszukano bazę publikacji naukowych PubMed, ograniczając się do wpisów „ferroptoza” i „2-metoksyestradiol” lub „2-ME”, ale na chwilę obecną, w momencie pisania niniejszej dysertacji, odnotowano brak

zbieżnych wyników [48]. Sugeruje się zatem, że jest to niezwykle ciekawy kierunek badawczy.



Schemat 3. Proponowany mechanizm działania 2-ME wobec komórek A549 w warunkach laboratoryjnych. Schemat zaprojektowano w biorender.com.

Grupa estrogenów i ich pochodnych ma niezwykle istotny wpływ na rozwój i ekspansję nowotworów, takich jak rak płuca [2], rak piersi [49], rak prostaty [50] i wiele innych. Pomimo wielu funkcji fizjologicznych związanych m.in. z reprodukcją, wiadomo, że długotrwała ekspozycja na estrogeny pochodzenia zewnętrznego jest istotnym czynnikiem ryzyka kancerogenezy [51], poprzez wiązanie estrogenów z receptorami ER α , stymulując w ten sposób komórki do podziałów i znacznie hamując ich zdolność do apoptozy [51].

Estradiol, a dokładniej 17- β -estradiol, to najsilniejszy związek z grupy estrogenów, który ma potwierdzone działanie karcynogenne. Zauważono, że podawanie estrogenów kobietom po menopauzie w celu terapii hormonalnej związkami takimi jak progesteron zwiększa u nich ryzyko wystąpienia raka piersi [52], co zostało również potwierdzone na modelu zwierzęcym – w tym przypadku stres oksydacyjny jest również podejrzewany o ogromną rolę w indukcji procesu karcynogenezy [53]. W przypadku raka płuca dużą analogię można dostrzec w tym, jak estrogeny determinują rozwój raka [2].

Co ciekawe, zauważono, że u otyłych kobiet po menopauzie stężenie estrogenów jest wyższe, co wynika z faktu, że tkanka tłuszczowa jest zastępczym źródłem estrogenów, ale dodatkowo prawdopodobnie determinuje zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów – u kobiet po menopauzie, znaczny wzrost estradiolu i estronu wiąże się ze wzrostem wskaźnika masy ciała – BMI oraz spadkami występującymi u kobiet wykonujących różne rodzaje aktywności fizycznej [54].

W przypadku raka płuca powszechnie wiadomo, że głównym czynnikiem ryzyka jest palenie papierosów – co ciekawe, dym papierosowy zawiera związki stymulujące transkrypcję genów CYP1B1 i CYP1A2, które są genami cytochromu P450, i wiadomo, że jest to związane z hydroksylacją estradiolu do 2-hydroksyestradiolu (2-OHE2) lub 4-hydroksyestradiolu (4-OHE2) [55]. Ogólna uwaga badaczy skupiona została na mechanizmie związanym z sygnalizacją za pomocą receptorów ER, a niezwykle ważne rakotwórcze i onkoprotekcyjne działanie pochodnych estrogenów zostało zepchnięte na dalszy plan, co okazuje się być brakującym elementem układanki w zrozumieniu wpływu estrogenów na indukcji rozwoju procesu karcynogenezy.

W płucach obecne są estrogeny i enzymy biorące udział w ich metabolizmie [56]. Co ciekawe, w badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że u zdrowych osobników profil estrogenowy obejmuje: estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) i ich pochodne 2-hydroksyestron (2-OHE1), 4-hydroksyestron (4-OHE1), 4-OHE2, 2-metoksyestron (2-MEE1) i 2-metoksyestradiol (2-ME), gdzie najwyższe stężenie stwierdzono w pochodnych 4-hydroksyestrogenu – związki te mogą uczestniczyć w szlakach sygnałowych związanych z ER i bez nich, prowadząc do uszkodzenia DNA [56].

Zupełne przeciwieństwo stanowią pochodne 2-metoksyestrogenów, które nie wiążą się z ER, a ponadto hamują zdolność podziału i angiogenezy komórek – stąd też 2-MEE1, a przede wszystkim 2-ME, utożsamiane są z ochronną rolą w patogenezie nowotworów [57].

W przypadku wpływu dymu tytoniowego okazuje się, że zmieniają się proporcje poszczególnych stężeń i następuje znaczny wzrost stężenia pochodnych 4-hydroksyestrogenu. Również w prawidłowym płucu 4-OHE1 ma najwyższe stężenie i jak się okazuje, to on najsilniej indukuje zmiany w DNA i najsukuteoczniej indukuje transformację nowotworową komórek w hodowli [58].

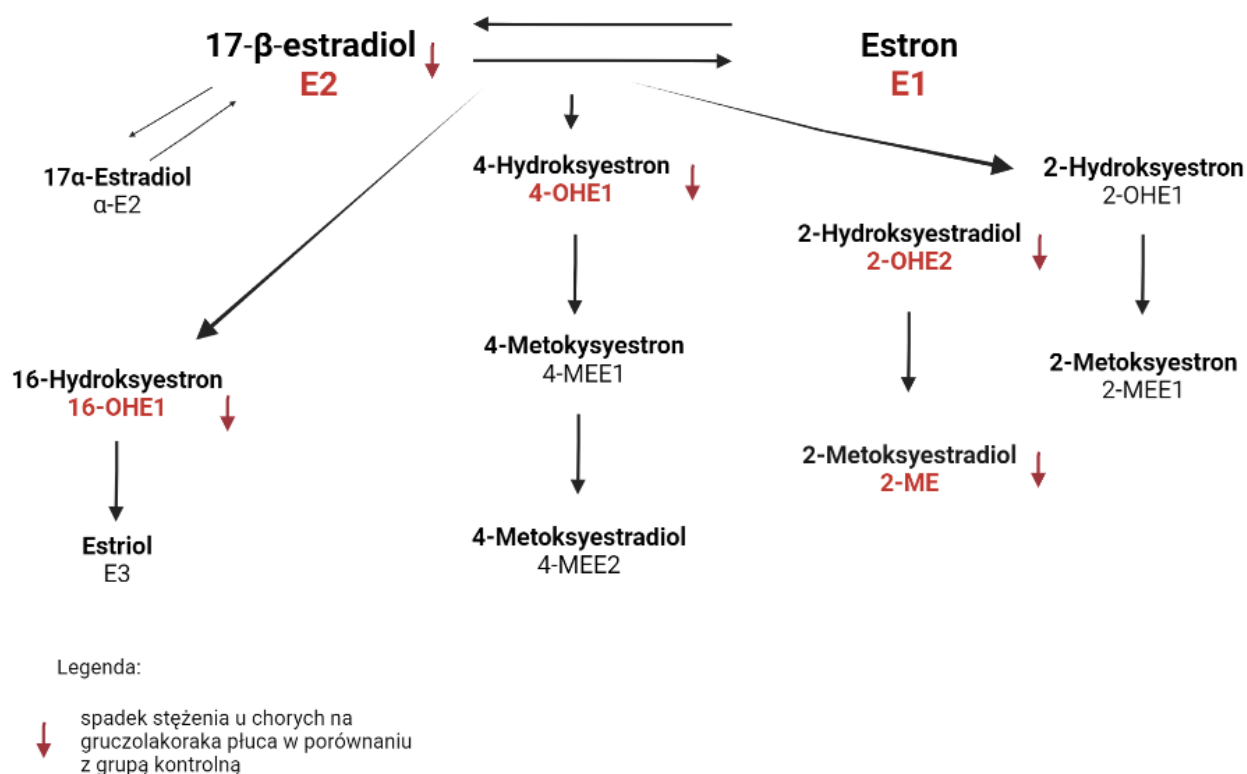
Kolejno, biorąc pod lupę cytochrom P450 okazuje się, że w szlaku syntezy pochodnych estrogenów różne ich typy muszą być obecne na różnych etapach. Cyp1b1 bierze udział w produkcji 4-OHE1 i 4-OHE2, których nadmierna ilość skutkuje rozwojem nowotworów – u myszy z delecją fragmentu tego genu cytochromu zanotowano znaczny spadek 4-OHE, oraz wzrost 2-ME – związku onkoochronnego [19]. Potwierdza to również terapeutyczny pogląd na hamowanie CYP1B1 [56].

Zawartość estrogenów i ich pochodnych w tkance nowotworowej jest podwyższona w porównaniu ze zdrową tkanką płuca [56]. Ponadto, większy wzrost zaobserwowano u kobiet niż u mężczyzn [56]. Stężenie 4-OHE2 w tkankach było co ciekawe wyższe u kobiet palących w porównaniu z osobami nigdy niepalącymi [56] – wszystkie tendencje wzrostowe obserwowano w moczu [56].

Te hydroksylowane pochodne estrogenów dodatkowo stymulują stres oksydacyjny w komórkach, dodatkowo warunkując mutacje w DNA, prowadząc również do onkogenezy [57]. Pochodne 2-hydroksyestrogenów (2-OHE) są znacznie mniej reaktywne na zmiany w DNA w porównaniu z 4-OHE2, co wskazuje na wyższą rolę 4-OHE w procesie onkogenezy [58].

Na podstawie badań klinicznych można stwierdzić, że podwyższony poziom 4-OHE2 oraz obniżony poziom 2-OHE i 2-ME znacznie zwiększają ryzyko rozwoju raka płuca – co znajduje odzwierciedlenie w wynikach badania analizującego stężenia tych związków u pacjentów z rakiem płuca. W przypadku 16-hydroksyestronu (16-OHE1) nie odnotowano jego obecności w tkance

nowotworowej raka płuca, stąd też wyklucza się jego rolę w onkogenezie [58], co stanowi interesującą rozbieżność z wynikami uzyskanymi w badaniu, gdzie obserwuje się obniżone stężenie 16-OHE1 u chorych na raka płuca w porównaniu z grupą kontrolną (schemat 3). Wyniki badań wskazują jednak na przesunięcie metabolizmu w kierunku hydroksylacji estradiolu w pozycji C4 [57].



Schemat 4. Szlak metabolizmu estrogenów i zmiany stężeń poszczególnych metabolitów estrogenów u chorych na raka płuca. Wyniki pomiarów metabolitów estrogenów wskazują na występowanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy chorymi na raka płuca a grupą kontrolną. Pacjenci z rakiem płuca mają niższe stężenia E2, 16-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 i 2-ME w porównaniu z grupą kontrolną.

U kobiet po menopauzie z zaawansowanym rakiem piersi wykazano obniżone stężenia w moczu poszczególnych metabolitów estrogenu (2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2, 4-MEE1 i 16-OHE1) w porównaniu z grupą kontrolną. [51], co częściowo pokrywa się z wynikami niniejszego badania i znajduje analogię między rakiem

piersi a rakiem płuca. Wskazuje to na niezwykle skomplikowany mechanizm przemian metabolitów estrogenów, który występuje w nowotworach związanych z tymi związkami [58-62]. Analogicznie, badania moczu u pacjentek z rakiem endometrium również wskazują na wzrost stężenia 4-OHE2 i spadek stężenia 2-MEE1 i 2-ME, ale nie stwierdzono zmian w stężeniu innych metabolitów estrogenów [63].

Niniejszym, przedstawiono badanie naukowe dotyczące szczegółowego mechanizmu śmierci komórek w przeciwnowotworowym zastosowaniu 2-ME. Niniejszym wykazano wysoce znaczącą interakcję i zwiększone działanie przeciwko ludzkim komórkom gruczolakoraka płuca A549 poprzez traktowanie 2-ME w połączeniu z 3-BrPA. To odkrycie przyczynia się do lepszego zrozumienia szlaków sygnałowych NSCLC.

Za pomocą eksperymentalnego modelu niedrobnokomórkowego raka płuca, potwierdzono, że 2-ME hamuje żywotność komórek nowotworowych, jednocześnie wykazując śmierć komórki w postaci ferroptozy i nekroptozy. Zgodnie z najlepszą wiedzą jest to pierwsze i jedyne badanie mające na celu określenie tego związku z potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym 2-ME w ludzkich komórkach gruczolakoraka płuca A549.

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych *in vitro*, z wykorzystaniem trójwymiarowych modeli komórek sferoidalnych, które naśladują zarówno stan *in vivo* guza nowotworowego, jak i jego złożone mikrośrodowisko. Przegląd dostępnych publikacji naukowych z tego zakresu potwierdził przekonanie, że obrano właściwy kierunek badań.

Opracowana metodologia niniejszej pracy mocno wspiera postawioną tezę o silnym potencjale przeciwnowotworowym 2-ME w raku płuca, co jest nowym odkryciem molekularnym, które w przyszłości może mieć praktyczne znaczenie w sferze klinicznej w nurcie medycyny translacyjnej.

Ponadto, niniejsza praca przedstawia istotę i różnice w pracy laboratoryjnej między jednowarstwowymi komórkami 2D, a wielokomórkowymi sferoidalnymi komórkami 3D, które kształtują przyszłość odkrywania nowych, potencjalnych leków. Modele 3D stanowią nową perspektywę przestrzeni terapeutycznej wobec leczenia onkologicznego [2].

Jak wskazują źródła, istnieje duże prawdopodobieństwo, że gruczolakorak płuca u kobiet jest skorelowany z hormonami steroidowymi [1]. Opierając się na tezach o zależności między stosunkiem hormonów steroidowych w raku piersi, w ramach niniejszego projektu doktorskiego, postanowiono określić tę zależność u chorych na gruczolakoraka płuca [2,65]. W związku z tym określone stosunki zostały określone dla szeregu metabolitów estradiolu. Jak wskazują uzyskane wyniki badań, istnieje silna zależność w zakresie stosunku metabolitów estrogenów. Ustalono, że prognostyczny może okazać się stosunek w zakresie 2ME do 16OHE1, 2ME do 4MEE2, 4OHE1 do 16OHE1 oraz 4MEE2 do 16OHE1, ale przede wszystkim w zakresie ALFA E2 do 4MEE2, gdzie u chorych na raka było sto razy wyższe niż w grupie kontrolnej. Wskazuje to na możliwie nową ścieżkę diagnostyczną, która może okazać się nową szansą w profilaktyce i terapii gruczolakoraka płuca u kobiet [2].

Ograniczenia związane z badaniem naukowym

Jednym z ograniczeń niniejszego badania stanowiła sytuacja epidemiczna związana z wirusem SARS-CoV-2 w trakcie jego trwania, co wpływa na niewielki rozmiar badania *in vivo*, co może wpływać na ograniczenie możliwości uogólnienia uzyskanych wyników. Jednak niniejsze wyniki stanowią obiecującą podstawę do przyszłych badań mających na celu zrozumienie w sposób rozszerzony procesów molekularnych związanych z metabolitami estradiolu w etiopatogenezie gruczolakoraka płuca.

Niemniej, w zakresie przyszłych kierunków badań, zaleca się rozszerzenie grupy badanej oraz grupy kontrolnej, co pozwoli na dokonanie znacznie bardziej zaawansowanych obliczeń statystycznych. Rozszerzenie niniejszych badań na poziomie współpracy laboratoryjno-klinicznej, w przyszłości mogłoby stworzyć możliwość opracowania programów profilaktycznych dla osób w grupie ryzyka w zakresie zachorowania na raka płuca, w tym gruczolakoraka płuca.

Niniejszy projekt doktorski został zrealizowany w nurcie nauki translacyjnej, od badań laboratoryjnych *in vitro*, przez współpracę z klinicystami w myśl koncepcji *od stołu laboratoryjnego do łóżka chorego* (ang. *from bench to bedside*), co w przyszłości może stanowić nowy kierunek badań klinicznych. Otrzymane wyniki

badań pozwalają na zrozumienie interakcji pomiędzy metabolitami estradiolu, na czczele z 2-ME, a komórkami gruczolakoraka płuca, czy rozwojem raka płuca u pacjentów.

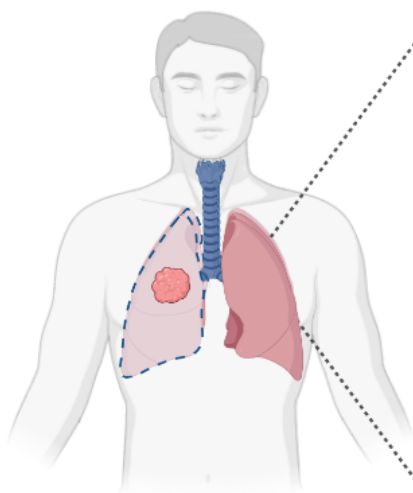
Implikacje kliniczne – przyszły kierunek diagnostyki pacjentów onkologicznych z gruczolakorakiem płuca

Niniejsza praca łączy w sobie badania laboratoryjne *in vitro* z wykorzystaniem modeli hodowli komórkowej 2D oraz 3D, jak również *in vivo*, dzięki współpracy o charakterze interdyscyplinarnym [2]. To właśnie badania w myśl medycyny translacyjnej w dziedzinie onkologii eksperymentalnej *in vitro*, mogą pomóc w przyszłości w opracowaniu spersonalizowanej opieki zdrowotnej, również w obszarze onkologii klinicznej.

W ciągu minionej dekady nastąpił ogromny postęp w zakresie spersonalizowanej onkologii klinicznej. Rewolucja ta nastąpiła dzięki multidyscyplinarnej współpracy w zakresie medycyny translacyjnej na całym świecie. Stąd też, postęp wynika ze współpracy specjalistów z dziedziny podstawowych nauk medycznych oraz nauk klinicznych.

Prawdopodobnie, pozwoli to na znaczny rozwój w ciągu najbliższej dekady, w zakresie leczenia chorób nowotworowych, w tym raka płuca, jak również w obszarze diagnostycznym [1,2,65]. Potencjalny rozwój obszaru diagnostycznego, celem prewencji w zakresie chorób onkologicznych, czy monitorowania rokowania w trakcie leczenia, może być możliwy dzięki zastosowaniu nowych biomarkerów, jak wskazano na łamach niniejszej dysertacji doktorskiej. Z tego powodu, stale potrzebny jest rozwój tej dziedziny nauki. W postaci schematu 5 podsumowano najważniejsze doniesienia oraz osiągnięcia wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej.

Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolakoraka płuc, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych



- > Dane epidemiologiczne wskazują, że istnieje związek pomiędzy występowaniem raka płuca u kobiet, co jednocześnie wskazuje na rolę hormonów steroidowych w etiopatogenezie gruczolakoraka płuca (NSCLC);
- > 2-ME zmniejsza żywotność gruczolakoraka płuc w dwuwymiarowych (2D) i trójwymiarowych (3D) sferoidalnych modelach hodowli komórkowej A549;
- > Dowiedziono, że działanie 2-ME polega na indukcji stresu nitrooksydacyjnego;
- > 2-ME, który jest potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym, w sferoidalnym modelu linii komórkowej A549 indukuje ferroptozę, która odgrywa kluczową rolę w terapii raka;
- > 2-ME w połączeniu z nekrostatyną-1 indukuje śmierć komórki w postaci nekroptozy, co zwiększa potencjał przeciwnowotworowy 2-ME;
- > Połączenie 2-ME z 3-BrPA rzuca nowe światło na szlaki sygnalizacji śmierci komórek ludzkich komórek gruczolakoraka płuc;
- > Wskazano zależność pomiędzy stosunkiem hormonów steroidowych u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, co może być nowym kierunkiem w diagnostyce profilaktycznej u kobiet;
- > Wykazano zastosowanie estrogenów jako potencjalnego biomarkera NSCLC;
- > W nawiązaniu do dostępnych danych, prawdopodobnie jest to pierwszy projekt badawczy dowodzący wpływ 2-ME na śmierć komórek A549 w modelu 3D.

Schemat 5. Syntetyczne podsumowanie najważniejszych wniosków wynikających z niniejszej rozprawy doktorskiej. Schemat zaprojektowano w biorender.com.

XII. WNIOSKI

W wyniku analizy przeprowadzonych badań, wysunięto następujące wnioski:

specyficzne działanie wybranego metabolitu 17β -estradiolu w postaci 2-ME na model 2D i 3D ludzkiego gruczolaka płuca, polega na:

- działaniu cytotoksycznym i zmniejszeniu żywotności komórek A549, również w modelu 3D sferoidalnym, mimikującym warunki *in vivo* [2];
- mechanizmie polegającym na indukcji stresu nitro – oksydacyjnego [2];
- mechanizmie śmierci komórkowej polegającym na aktywacji ferroptozy, oraz nekroptozy;
- potencjalnej korzyści klinicznej dzięki działaniu przeciwnowotworowemu.

Co więcej, dowiedziono także zastosowanie estrogenów jako potencjalnych markerów gruczolaka płuca. W związku z czym określono biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuca, co zostało określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych, jak również określono poziomy metabolitów estrogenów w surowicy u pacjentów z rakiem płuca [2].

XIII. POZOSTAŁE PUBLIKACJE NAUKOWE ORAZ KSIĄŻKI AUTORSKIE

13.1. Książki autorskie

Trychologia Kosmetologiczna i Lekarska

Musiał C., 2022, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, XXII, [1], 245, [1] s., ISBN 978-83-200-6598-5.

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **80,00**

Rola komórek macierzystych we współczesnej medycynie estetycznej i kosmetologii

Musiał C., 2023, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 211, [1] s., ISBN 978-83-01-22659-6.
doi: 10.53271/2022.101

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **80,00**

13.2. Pozostałe publikacje naukowe

Medical progress: Stem cells as a new therapeutic strategy for COVID-19

Musiał C, Górską-Ponikowską M. *Stem Cell Res.* 2021 Apr;52:102239.

doi: 10.1016/j.scr.2021.102239 PMID: 33601098; PMCID: PMC7877901

Impact Factor: **1.587**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **70,00**

Modulation of autophagy in cancer cells by dietary polyphenols

Musiał C, Siedlecka-Kroplewska K, Kmiec Z, Górską-Ponikowska M. *Antioxidants* (Basel). 2021 Jan 16;10(1):123.

doi: 10.3390/antiox10010123. PMID: 33467015; PMCID: PMC7830598.

Impact Factor: **7.675**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **100,00**

Beneficial Properties of Green Tea Catechins

Musiał C, Kuban-Jankowska A, Górską-Ponikowska M. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 4;21(5):1744.

doi: 10.3390/ijms21051744. PMID: 32143309; PMCID: PMC7084675.

Impact Factor: **6.208**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **140,00**

Green Tea Catechins Induce Inhibition of PTP1B Phosphatase in Breast Cancer Cells with Potent Anti-Cancer Properties: In Vitro Assay, Molecular Docking, and Dynamics Studies

Kuban-Jankowska A, Kostrzewa T, **Musiał C**, Barone G, Lo Bosco G, Lo Celso F, Górską-Ponikowska M. *Antioxidants* (Basel). 2020 Nov 30;9(12):1208.

doi: 10.3390/antiox9121208. PMID: 33266280; PMCID: PMC7761018.

Impact Factor: **7.675**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **100,00**

Role and application of glycosaminoglycans in trichology and cosmetology

Musiał C. *Aesth Cosmetol Med.* 2021;10(1):33-37.

doi: 10.52336/acm.2021.10.1.05

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

Probiotics in acne skin care. A review of the latest scientific reports

Kurkowska N, **Musiał C.** *Aesth Cosmetol Med.* 2021;10(2):91-98.

doi: 10.52336/acm.2021.10.2.09

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

Biologia i chemia nowotworu płuca

Musiał C., Zaucha R., Kuban-Jankowska A., Kamm A., Górską-Ponikowska M., *Wiadomości chemiczne*, 2019, 73, 7-8, 505-522, PL ISSN 0043-5104

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

Witamina C w medycynie i kosmetologii

Musiał C., Sawczuk W., Gawdzik B., Kuban-Jankowska A., Przychodzeń P., Górską-Ponikowska M., *Wiadomości Chemiczne*, 2019, 73, 9-10, 3-19, PL ISSN0043-5104.

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

Nowotwory kości – nowe możliwości terapeutyczne

Wyszkowska R., Dreżdżon J., **Musiał C.**, Górską-Ponikowska M., *Wiadomości Chemiczne*, 2019, 73, 9-10, PL ISSN 0043-5104.

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

Metody niwelowania hiperpigmentacji skóry w świetle nowych doniesień naukowych

Engler-Jastrzębska M., **Musiał C.**, Kamm A.. *Kosmetologia Estetyczna*, 2019, vol. 8(5): 553-60.

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

Najczęstsze problemy pacjenta trychologicznego – choroby skóry głowy

Bednarek M., **Musiał C.**, *Kosmetologia Estetyczna*, 2019, vol. 8(3): 393-96.

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **5,00**

XIV. WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

14.1. Wystąpienia naukowe

Hydroxy- and methoxy-estrogens as potent physiological modulators of cancer cell death

Musiał C., Zaucha R., Bastian P., Barone G., Lo Bosco G., Lo Celso F., Kuban-Jankowska A., Konieczna L., Belka M., Bączek T., Cappello F., Marino Gammazza A., Nussberger S., Górską-Ponikowska M., The Structural Microenvironment : breaking down the walls of cancer, virtual event, worldwide, 22-23 February 2022.

Steroid hormones as potential cytotoxic agents in the treatment of lung cancer and skin cancer

Musiał C., Górską-Ponikowska M., Akademickie aspekty medycyny estetycznej i rekonstrukcyjnej : toksyna botulinowa : by Shameless Gdańsk, 23.04.22.

2-Methoxyestradiol induces cancer and neuronal cell death by regulation of heat shock proteins

Bastian P., Kamm A., **Musiał C.**, Kuban-Jankowska A., Marino Gammazza A., Cappello F., Daca A., Żmijewski M.A., Woźniak M., Górską-Ponikowska M., Akademickie aspekty medycyny estetycznej i rekonstrukcyjnej : toksyna botulinowa : by Shameless Gdańsk, 23.04.22.

Anticancer efficacy of selected green tea polyphenols

Kostrzewa T., **Musiał C.**, Kuban-Jankowska A., Górską-Ponikowska M., Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2019, Gdańsk 14 grudnia 2019 r.

14.2. Pozostałe wystąpienia konferencyjne

Innowacyjny nurt Biotech beauty – rola i zastosowanie komórek macierzystych w trychologii

Musiał C., I Międzynarodowa Konferencja Naukowa, Wyższa Szkoła Zdrowia w Gdańsku, 24 marca 2023.

Zrównoważone piękno, Biotech Beauty

Musiał C., Hupało J., Jakubczyk-Słabicka A., Konferencja Naukowa Nauka dla Urody Uroda Science, 15.10.2022.

Trychologia przyszłości – komórki macierzyste jako innowacja biotechnologiczna

Musiał C., XIV Ogólnopolska Konferencja Trychologiczna, 15-16 kwietnia 2023, Kraków.

Kosmetologia przyszłości: komórki macierzyste w praktyce

Musiał C., 44 Kongres i Targi LNE, 22-23 kwietnia 2023, Kraków.

Rola czynnika zapalnego w łysieniu androgenowym

Musiał C., XIII Ogólnopolska Konferencja Trychologiczna, 25-26 września 2022., Warszawa.

Onkotrychologia

Musiał C., XIII Ogólnopolska Konferencja Trychologiczna, 25-26 września 2022, Warszawa.

Tajemnice mikrobiomu owłosionej skóry głowy

Musiał C., 43 Kongres i Targi LNE, 8-9 października 2022, Kraków.

Trychologia Kosmetologiczna i Lekarska

Musiał C., XII Ogólnopolska Konferencja Trychologiczna, 23-24 kwietnia 2022, Gdańsk.

Nowa era trychologii - od biologii komórki po metawersum

Musiał C., VIII Niezależny Kongres: Trychologia w kosmetologii, medycynie i fryzjerstwie, online, czerwiec 2023.

Mikrobiom owłosionej skóry głowy

Musiał C., VII Kongres: Trychologia w kosmetologii, medycynie i fryzjerstwie, Warszawa, 12 czerwca 2022.

Holistyczna Kosmetologia – patomechanizmy dermatoz i pielęgnacja skóry

Musiał C., IV Kongres Terapii i Pielęgnacji Skóry Problematicznej, online, styczeń 2023.

Egzosomy – rewolucja w regeneracji skóry

Musiał C., Kongres i Targi Beauty Forum, 09.09.2023.

XV. CZŁONKOSTWO W STOWARZYSZENIACH NAUKOWYCH

1. Pełnoprawna Członkini (*Full membership*) Towarzystwa Badań Naukowych Sigma Xi (*Sigma Xi, The Scientific Research Honor Society*) – od 08.2023r;
2. Członkini International Trichoscopy Society – od 04.2023r;
3. Członkini Polskiego Stowarzyszenia Trychologicznego – od 01.2022r.

XVI. UCZESTNICTWO W PROJEKTACH BADAWCZYCH

1. *Biologiczne implikacje metabolitów 17 β -estradiolu w patogenezie i progresji ludzkiego gruczolaka płuca – Gdański Uniwersytet Medyczny, 12/2019r.*
2. *Ocena mikrobiomu jelitowego, jamy ustnej oraz skóry u pacjentów z niewydolnością serca, z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory serca i pacjentów po przeszczepie serca – Gdański Uniwersytet Medyczny, 12/2022r.*
3. *Wpływ stresu oksydacyjnego oraz metabolitów 17 β -estradiolu na mikrobiom skóry, jamy ustnej oraz jelit w etiopatogenezie atopowego zapalenia skóry – Gdański Uniwersytet Medyczny, 03/2023.*

XVII. PIŚMIENICTWO

1. Musial C, Zaucha R, Kuban-Jankowska A, Konieczna L, Belka M, Marino Gammazza A, Baczek T, Cappello F, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jan 14;18(2):648. doi: 10.3390/ijerph18020648.
2. Musial C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Gorska-Ponikowska M. Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. *Redox Biol*. 2022 Jul 8;55:102395. doi: 10.1016/j.redox.2022.102395.
3. Kulke MH, Chan JA, Meyerhardt JA, Zhu AX, Abrams TA, Blaszkowsky LS, Regan E, Sidor C, Fuchs CS. A prospective phase II study of 2-methoxyestradiol administered in combination with bevacizumab in patients with metastatic carcinoid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Aug;68(2):293-300. doi: 10.1007/s00280-010-1478-7.
4. Bruce JY, Eickhoff J, Pili R, Logan T, Carducci M, Arnott J, Treston A, Wilding G, Liu G. A phase II study of 2-methoxyestradiol nanocrystal colloidal dispersion alone and in combination with sunitinib malate in patients with metastatic renal cell carcinoma progressing on sunitinib malate. *Invest New Drugs*. 2012 Apr;30(2):794-802. doi: 10.1007/s10637-010-9618-9.
5. Gorska-Ponikowska M, Kuban-Jankowska A, Daca A, Nussberger S. 2-Methoxyestradiol Reverses the Pro-Carcinogenic Effect of L-Lactate in Osteosarcoma 143B Cells. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017 Nov-Dec;14(6):483-493. doi: 10.21873/cgp.20058.
6. Gorska-Ponikowska M, Ploska A, Jacewicz D, Szkatula M, Barone G, Lo Bosco G, Lo Celso F, Dabrowska AM, Kuban-Jankowska A, Gorzynik-Debicka M, Knap N, Chmurzynski L, Dobrucki LW, Kalinowski L, Wozniak M. Modification of DNA structure by reactive nitrogen species as a result of 2-methoxyestradiol-induced neuronal nitric oxide synthase uncoupling in

- metastatic osteosarcoma cells. *Redox Biol.* 2020 May;32:101522. doi: 10.1016/j.redox.2020.101522.
7. Gorska M, Kuban-Jankowska A, Milczarek R, Wozniak M. Nitro-oxidative Stress Is Involved in Anticancer Activity of 17 β -Estradiol Derivative in Neuroblastoma Cells. *Anticancer Res.* 2016 Apr;36(4):1693-8. PMID: 27069147.
 8. Gorska-Ponikowska M, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Daca A, Wierzbicka JM, Zmijewski MA, Luu HH, Wozniak M, Cappello F. The Major Heat Shock Proteins, Hsp70 and Hsp90, in 2-Methoxyestradiol-Mediated Osteosarcoma Cell Death Model. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 17;21(2):616. doi: 10.3390/ijms21020616.
 9. Gorska-Ponikowska M, Perricone U, Kuban-Jankowska A, Lo Bosco G, Barone G. 2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor. *J Cell Physiol.* 2017 Nov;232(11):3030-3049. doi: 10.1002/jcp.25888.
 10. Gorska M, Kuban-Jankowska A, Zmijewski M, Marino Gammazza A, Cappello F, Wnuk M, Gorzynik M, Rzesutek I, Daca A, Lewinska A, Wozniak M. DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol. *Oncotarget.* 2015 Jun 20;6(17):15449-63. doi: 10.18632/oncotarget.3913.
 11. Gorska M, Zmijewski MA, Kuban-Jankowska A, Wnuk M, Rzesutek I, Wozniak M. Neuronal Nitric Oxide Synthase-Mediated Genotoxicity of 2-Methoxyestradiol in Hippocampal HT22 Cell Line. *Mol Neurobiol.* 2016 Sep;53(7):5030-40. doi: 10.1007/s12035-015-9434-5.
 12. Gorska M, Wyszowska RM, Kuban-Jankowska A, Wozniak M. Impact of Apparent Antagonism of Estrogen Receptor β by Fulvestrant on Anticancer Activity of 2-Methoxyestradiol. *Anticancer Res.* 2016 May;36(5):2217-26. PMID: 27127126.
 13. 2-Methoxyestradiol in Treating Patients with Advanced Solid Tumors (2021), dostęp online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00028821?cond=panzem&draw=2&rank=8>

14. A Combination Study to Determine the Safety and Efficacy of Panzem NCD with Avastin in Metastatic Carcinoid Tumors (2021), dostęp online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00328497?cond=panzem&draw=2&rank=4>
15. Efficacy and Pharmacodynamic Study of Panzem® NCD in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer (2021), dostęp online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00394810?term=panzem&draw=2&rank=6>
16. Phase 2 Study of Panzem Nanocrystal Colloidal Dispersion (NCD) in Combination With Fixed-Dose Temozolomide to Patients With Recurrent Glioblastoma Multiforme (GBM) (2021), dostęp online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00481455?term=panzem&draw=2&rank=5>
17. Heineman DJ, Daniels JM, Schreurs WH. Clinical staging of NSCLC: current evidence and implications for adjuvant chemotherapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2017 Sep;9(9):599-609. doi: 10.1177/1758834017722746.
18. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosén LA. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*. 2005 Oct 6;24(44):6605-16. doi: 10.1038/sj.onc.1208807.
19. Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Hankinson SE. Circulating 2-hydroxy- and 16alpha-hydroxy estrone levels and risk of breast cancer among postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(8):2029-2035.
20. Zeleniuch-Jacquotte A, Shore RE, Afanasyeva Y, et al. Postmenopausal circulating levels of 2- and 16a-hydroxyestrone and risk of endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1458-1464.
21. Obi N, Vrieling A, Heinz J, Chang-Claude J. Estrogen metabolite ratio: Is the 2-hydroxyestrone to 16a-hydroxyestrone ratio predictive for breast cancer? *Int J Womens Health*. 2011;3:37-51.
22. Patel S, Hawkey LC, Cacioppo JT, Masi CM. Dietary fiber and serum 16a-hydroxyestrone, an estrogen metabolite associated with lower systolic blood pressure. *Nutrition*. 2011;27(7-8):778-781.

23. Fröhlich M, Dejanovic B, Kashkar H, Schwarz G, Nussberger S. S-palmitoylation represents a novel mechanism regulating the mitochondrial targeting of BAX and initiation of apoptosis. *Cell Death Dis.* 2014 Feb 13;5(2):e1057. doi: 10.1038/cddis.2014.17.
24. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Oct 7;8:590226.
25. Tabnak P, HajiEsmailPoor Z, Soraneh S. Ferroptosis in Lung Cancer: From Molecular Mechanisms to Prognostic and Therapeutic Opportunities. *Front Oncol.* 2021 Dec 2;11:792827.
26. Wang X, Chen Y, Wang X, Tian H, Wang Y, Jin J, Shan Z, Liu Y, Cai Z, Tong X, Luan Y, Tan X, Luan B, Ge X, Ji H, Jiang X, Wang P. Stem Cell Factor SOX2 Confers Ferroptosis Resistance in Lung Cancer via Upregulation of SLC7A11. *Cancer Res.* 2021 Oct 15;81(20):5217-5229.
27. Guo L, Bai S, Ding S, Zhao L, Xu S, Wang X. PM2.5 Exposure Induces Lung Injury and Fibrosis by Regulating Ferroptosis via TGF- β Signaling. *Dis Markers.* 2022 Sep 27;2022:7098463.
28. Asakawa A, Kawade G, Kurata M, Fukuda S, Onishi I, Kinowaki Y, Ishibashi S, Ikeda M, Watabe S, Kobayashi M, Ishibashi H, Okubo K, Kitagawa M, Yamamoto K. Stratification of lung squamous cell carcinoma based on ferroptosis regulators: Potential for new therapeutic strategies involving ferroptosis induction. *Lung Cancer.* 2022 Jan 24;165:82-90.
29. Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, Nedaeinia R, Haghjooy Javanmard S, Taherian M, Ahmadi M, Salehi R, Sadeghi B, Manian M. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.* 2021 Jan 20;21(1):62.
30. Li, W., Xiang, Z., Xing, Y. et al. Mitochondria bridge HIF signaling and ferroptosis blockage in acute kidney injury. *Cell Death Dis* 13, 308 (2022).
31. Lin Z, Song J, Gao Y, Huang S, Dou R, Zhong P, Huang G, Han L, Zheng J, Zhang X, Wang S, Xiong B. Hypoxia-induced HIF-1 α /lncRNA-PMAN inhibits ferroptosis by promoting the cytoplasmic translocation of ELAVL1 in peritoneal dissemination from gastric cancer. *Redox Biol.* 2022 Jun;52:102312.

32. Yu Y, Yan Y, Niu F, Wang Y, Chen X, Su G, Liu Y, Zhao X, Qian L, Liu P, Xiong Y. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases. *Cell Death Discov.* 2021 Jul 26;7(1):193.
33. Pinto B, Henriques AC, Silva PMA, Bousbaa H. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics.* 2020 Dec 6;12(12):1186.
34. Bhattacharya S, Calar K, de la Puente P. Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional in vitro models. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 May 1;39(1):75.
35. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Gagliano N, Limonta P. Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 16;21(18):6806. doi: 10.3390/ijms21186806.
36. Huang BW, Gao JQ. Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. *J Control Release.* 2018 Jan 28;270:246-259. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.12.005.
37. Raghavan S, Mehta P, Horst EN, Ward MR, Rowley KR, Mehta G. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget.* 2016 Mar 29;7(13):16948-61. doi: 10.18632/oncotarget.7659.
38. Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers (Basel).* 2019 Mar 6;11(3):317. doi: 10.3390/cancers11030317.
39. Vanderheyden N., Wong J., Docampo R.: A pyruvate-proton symport and an H⁺-ATPase regulate the intracellular pH of *Trypanosoma brucei* at different stages of its life cycle. *Biochem. J.*, 2000; 346: 53-62
40. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, Fini M, Russo MA. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3907147. doi: 10.1155/2016/3907147.
41. Siegfried JM, Stabile LP. Estrongenetic steroid hormones in lung cancer. *Semin Oncol.* 2014 Feb;41(1):5-16.

42. Zhang Q, Zhang Y, Zhang P, Chao Z, Xia F, Jiang C, Zhang X, Jiang Z, Liu H. Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes Cancer*. 2014 Mar;5(3-4):100-12. doi: 10.18632/genesandcancer.9.
43. Gai C, Liu C, Wu X, et al. MT1DP loaded by folate-modified liposomes sensitizes erastin-induced ferroptosis via regulating miR-365a-3p/NRF2 axis in non-small cell lung cancer cells. *Cell Death Dis*. 2020;11(9):751.
44. Hsieh CH, Hsieh HC, Shih FS, et al. An innovative NRF2 nano-modulator induces lung cancer ferroptosis and elicits an immunostimulatory tumor microenvironment. *Theranostics*. 2021;11(14):7072–7091.
45. Hsieh CH, Hsieh HC, Shih FS, et al. An innovative NRF2 nano-modulator induces lung cancer ferroptosis and elicits an immunostimulatory tumor microenvironment. *Theranostics*. 2021;11(14):7072–7091.
46. Gai C, Liu C, Wu X, et al. MT1DP loaded by folate-modified liposomes sensitizes erastin-induced ferroptosis via regulating miR-365a-3p/NRF2 axis in non-small cell lung cancer cells. *Cell Death Dis*. 2020;11(9):751.
47. Hu S, Ma J, Su C, et al. Engineered exosome-like nanovesicles suppress tumor growth by reprogramming tumor microenvironment and promoting tumor ferroptosis. *Acta Biomater*. 2021;135:567–581.
48. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=2-methoxyestradiol+ferroptosis>
data dostępu: 10/08/2023r.
49. Santen RJ, Stuenkel CA, Yue W. Mechanistic Effects of Estrogens on Breast Cancer. *Cancer J*. 2022 May-Jun 01;28(3):224-240.
50. Dobbs RW, Malhotra NR, Greenwald DT, Wang AY, Prins GS, Abern MR. Estrogens and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2019 May;22(2):185-194.
51. Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:225-40. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183708.
52. Auchus ML, Auchus RJ. Human steroid biosynthesis for the oncologist. *J Investig Med*. 2012 Feb;60(2):495-503.
53. Shull JD, Dennison KL, Chack AC, Trentham-Dietz A. Rat models of 17 β -estradiol-induced mammary cancer reveal novel insights into breast cancer etiology and prevention. *Physiol Genomics*. 2018 Mar 1;50(3):215-234.

54. Cleary MP, Grossmann ME. Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2537-42.
55. Marom-Haham L, Shulman A. Cigarette smoking and hormones. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016 Aug;28(4):230-5.
56. Peng J, Xu X, Mace BE, Vanderveer LA, Workman LR, Slifker MJ, Sullivan PM, Veenstra TD, Clapper ML. Estrogen metabolism within the lung and its modulation by tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 2013 Apr;34(4):909-15.
57. Verenich S, Gerk PM. Therapeutic promises of 2-methoxyestradiol and its drug disposition challenges. *Mol Pharm*. 2010 Dec 6;7(6):2030-9.
58. Yagi E, Barrett JC, Tsutsui T. The ability of four catechol estrogens of 17beta-estradiol and estrone to induce DNA adducts in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1505-10.
59. Peng J, Meireles SI, Xu X, Smith WE, Slifker MJ, Riel SL, Zhai S, Zhang G, Ma X, Kurzer MS, Ma GX, Clapper ML. Estrogen metabolism in the human lung: impact of tumorigenesis, smoke, sex and race/ethnicity. *Oncotarget*. 2017 Nov 1;8(63):106778-106789.
60. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*. 1994 Mar 17;368(6468):237-9.
61. Cavalieri EL, Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Jul;125(3-5):169-80.
62. Li X, Fang L, Li H, Yang X. Urinary estrogen metabolites and breast cancer risk in Chinese population. *Endocr Connect*. 2021 Dec 14;10(12):1615-1622.
63. Zhao H, Jiang Y, Liu Y, Yun C, Li L. Endogenous estrogen metabolites as biomarkers for endometrial cancer via a novel method of liquid chromatography-mass spectrometry with hollow fiber liquid-phase microextraction. *Horm Metab Res*. 2015 Feb;47(2):158-64.
64. Titan AL, He H, Lui N, Liou D, Berry M, Shrager JB, et al. The influence of hormone replacement therapy on lung cancer incidence and mortality. *J Thorac Cardiovasc Surg*. (2020) 159:1546–56.e4.

65. Musiał C., Zaucha R., Kuban-Jankowska A., Kamm A., Górską-Ponikowska M., „Biologia i chemia nowotworu płuca”, *Wiadomości chemiczne*, 2019, 73, 7-8, 505-522, PL ISSN 0043-5104.

XVIII. SPIS TABEL I RYCIN

18.1. Spis tabel

Tabela 1. Zestawienie statystyk opisowych wyników analizowanych metabolitów w grupie chorych na gruczolaka płuca oraz grupie kontrolnej.

Tabela 2. Zestawienie wyników stosunku wybranych metabolitów na podstawie analizy statystycznej wyników surowicy krwi pacjentów z gruczolakiem płuc i grupy kontrolnej.

18.2. Spis schematów

Schemat 1. Kluczowe różnice między hodowlą komórkową w modelu 2D oraz modelu 3D sferoidalnym.

Schemat 2. Projekt eksperymentalny z zastosowaniem linii komórkowej A549 w modelu 3D sferoidalnym w odniesieniu do określenia potencjalnej śmierci komórki w postaci ferroptozy i nekroptozy na skutek traktowania 2-ME.

Schemat 3. Proponowany mechanizm działania 2-ME wobec linii komórkowej A549 w warunkach laboratoryjnych.

Schemat 4. Szlak metabolizmu estrogenów i zmiany stężeń poszczególnych metabolitów estrogenów u chorych na raka płuca.

Schemat 5. Syntetyczne podsumowanie najważniejszych wniosków wynikających z niniejszej rozprawy doktorskiej.

18.3. Spis rycin

Ryc. 1. Optymalizacja hodowli komórkowej w modelu 2D.

Ryc. 2. Pojedyncza 3D sferoidalna linia komórkowa A549, powstała na skutek odpowiednich warunków hodowli komórkowej z uwzględnieniem

zastosowania uwzględnieniem studzienek o niskiej adhezji okrągłodennych z ultraniską powłoką przylegania komórek.

Ryc. 3. Wybrane metabolity 17β -estradiolu w żywotności komórek A549.

Ryc. 4. Żywotność komórek A549 w modelu 2D i 3D na skutek traktowania 2-ME.

Ryc. 5. ROS i śmierć komórkowa linii A549 indykowana 2-ME.

Ryc. 6. Odczyt sygnału ROS za pośrednictwem cytometrii przepływowej.

Ryc. 7. Ilościowe oznaczenie zawartości DNA komórek A549 za pomocą cytometrii przepływowej.

Ryc. 8. Kombinacja 2-ME z 3-BrPA na dwuwymiarowym modelu hodowli linii komórkowej A549.

Ryc. 9. Ferroptoza indukowana przez 2-ME w hodowli sferoidalnych komórek wielokomórkowych A549.

Ryc. 10. Nekroptoza indukowana przez 2-ME w hodowli sferoidalnych komórek wielokomórkowych A549.

Ryc. 11. Progresja raka i poziomy pochodnych estrogenów w surowicy.

**XIX. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD
HYBRYDOWEJ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**



Review

Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer

Claudia Musial, Renata Zaucha, Alicja Kuban-Jankowska, Lucyna Konieczna, Mariusz Belka, Antonella Marino Gammazza, Tomasz Baczek, Francesco Cappello, Michal Wozniak and Magdalena Gorska-Ponikowska

Special Issue

Women's Health: Molecular and Morphological Perspectives

Edited by

Dr. Sara Bernardi and Prof. Dr. Serena Bianchi



<https://doi.org/10.3390/ijerph18020648>



Review

Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer

Claudia Musial ¹, Renata Zaucha ², Alicja Kuban-Jankowska ¹, Lucyna Konieczna ³, Mariusz Belka ³, Antonella Marino Gammazza ⁴, Tomasz Baczek ³, Francesco Cappello ⁴, Michal Wozniak ¹ and Magdalena Gorska-Ponikowska ^{1,*}

- ¹ Department of Medical Chemistry, Medical University of Gdansk, 80-211 Gdansk, Poland; claudia.musial@gumed.edu.pl (C.M.); alicjakuban@gumed.edu.pl (A.K.-J.); mwozniak@gumed.edu.pl (M.W.)
- ² Department of Clinical Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdansk, 80-214 Gdansk, Poland; rzaucha@gumed.edu.pl
- ³ Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdansk, 80-416 Gdansk, Poland; lucyna.konieczna@gumed.edu.pl (L.K.); mariusz.belka@gumed.edu.pl (M.B.); tomasz.baczek@gumed.edu.pl (T.B.)
- ⁴ Department of Biomedicine, Neurosciences and Advanced Diagnostics (BiND), University of Palermo, 90127 Palermo, Italy; antonella.marino@hotmail.it (A.M.G.); francesco.cappello@unipa.it (F.C.)
- * Correspondence: magdalena.gorska-ponikowska@gumed.edu.pl

Abstract: Malignant neoplasms are among the most common diseases and are responsible for the majority of deaths in the developed world. In contrast to men, available data show a clear upward trend in the incidence of lung cancer in women, making it almost as prevalent as breast cancer. Women might be more susceptible to the carcinogenic effect of tobacco smoke than men. Furthermore, available data indicate a much more frequent mutation of the tumor suppressor gene *p53* in non-small cell lung cancer (NSCLC) female patients compared to males. Another important factor, however, might lie in the female sex hormones, whose mitogenic or carcinogenic effect is well known. Epidemiologic data show a correlation between hormone replacement therapy (HRT) or oral contraceptives (OCs), and increased mortality rates due to the increased incidence of malignant tumors, including lung cancer. Interestingly, two types of estrogen receptors have been detected in lung cancer cells: ER α and ER β . The presence of ER α has been detected in tissues and non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines. In contrast, overexpression of ER β is a prognostic marker in NSCLC. Herein, we summarize the current knowledge on the role of estrogens in the etiopathogenesis of lung cancer, as well as biological, hormonal and genetic sex-related differences in this neoplasm.

Keywords: estrogens; lung cancer; sex hormones; lung adenocarcinoma; estrogen receptor; 17 β -estradiol; *p53*; A549; non-small cell lung cancer; NSCLC



Citation: Musial, C.; Zaucha, R.; Kuban-Jankowska, A.; Konieczna, L.; Belka, M.; Marino Gammazza, A.; Baczek, T.; Cappello, F.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 648. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020648>

Received: 30 November 2020

Accepted: 8 January 2021

Published: 14 January 2021

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



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

1. Introduction

In the developed countries, lung cancer is the most frequent malignancy and is responsible for about 1 million deaths annually. The overall survival rate involving this tumor is about 10%. The decisive trigger is long-term smoking. Available data indicate that only 20% of lung cancer cases develop in non-smokers [1,2]. Other environmental factors include pollution, exhaust fumes, ionizing radiation, mycotoxins, second hand smoke, occupational exposure to chemicals such as chromium, nickel, asbestos, polycyclic aromatic hydrocarbons, arsenic, vinyl chloride and radioactive gas—radon [1–5]. Susceptibility to the disease is also genetically determined [6,7]. The WHO classification distinguishes two main types of lung cancer: small cell carcinoma (SCLC) and non-small cell carcinoma (NSCLC) [6]. The latter is divided into subtypes including squamous cell carcinoma and adenocarcinoma [6].

2. Lung Cancer—Short Review

Lung cancer is the leading cause of mortality in women and men worldwide, and is considered to be a major global epidemic [7].

In Europe, lung cancer ranks second in terms of incidence. According to the data, as many as 23% of lung cancer cases worldwide occur in Europe [8]. In 2018, an estimated 1.8 million people developed lung cancer [8]. Figure 1 shows a graph showing the number of lung cancer cases (statistics for 2018) [8]. In Austria, lung cancer is the second most common cancer among men—2940 cases, and the third most common cancer among women—2202 cases [8]. In Belgium, 9400 people were diagnosed with lung cancer in 2018 [8]. Similarly to the Austrian population, lung cancer is the second most common cancer among Belgian men [8]—15% of all cases, and the third most common cancer among Belgian women—8% [8]. Moreover, it is the most common cause of cancer deaths among both women (15%) and men (30%). In France, lung cancer is the second most common cancer in both women and men [8]. In Germany, more than 66,000 cases of lung cancer were diagnosed in 2018—more than 27,000 women and over 39,600 men [8]. According to the data, in Poland, lung cancer has been diagnosed twice as often among men than among women [8]. In the United Kingdom, lung cancer is diagnosed in 1 in 17 women and 1 in 13 men [8]. Statistical analysis shows that in Sweden, lung cancer causes the highest mortality in both women and men [8]. The data presented in Figure 2 indicate that in 2018, Hungary had the highest rate of lung cancer [9].

LUNG CANCER IN EUROPE NUMBER OF DIAGNOSED LUNG CANCER

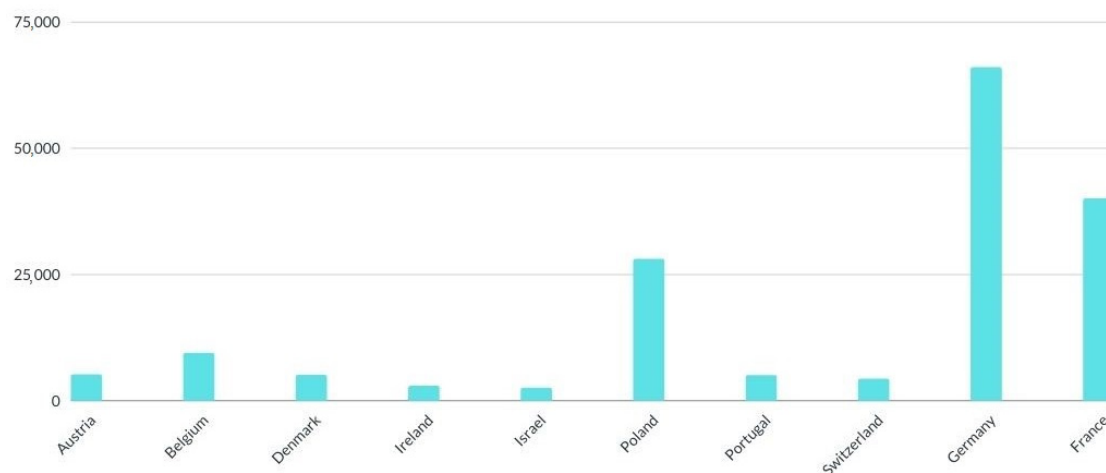


Figure 1. The graph presents number of persons with diagnosed lung cancer.

The vast majority of lung cancer cases are caused by smoking tobacco, with smoking being a documented factor in the development of lung cancer [1–3]. Free radical oxygen is the main component of tobacco smoke. The substance may cause oxidation of guanine DNA nucleobases to form 8-oxoguanine (OGG1). Published data suggest that there is an increased risk of lung cancer in smokers with low OGG1 activity [8]. Tobacco smoke contains over 60 carcinogens, including aromatic hydrocarbons such as nitrosamines and benzopyrene, carbon monoxide (chad), tar, phenol, cresol, formaldehyde and hydrogen cyanide [10–12]. Polycyclic aromatic hydrocarbons activated by cytochrome P450 enzymes can bind to DNA [10–12]. Enzymes that catalyze the glutathione-S reaction protect against a DNA reaction that causes the formation of DNA adducts [10–12]. Chronic and too frequent adduct formation might cause gene mutations that could lead to the development of lung cancer. Nicotine inhibits apoptosis and promotes tumor cell growth in lung epithelial cells. Available studies indicate that non-smokers are more likely to survive than smokers, regardless of other prognostic factors. Quitting smoking has a direct impact on reducing

lung cancer risk [13–15]. Exposure to tobacco smoke in the environment increases the risk of lung cancer by as much as 10% to 15% [15–19].

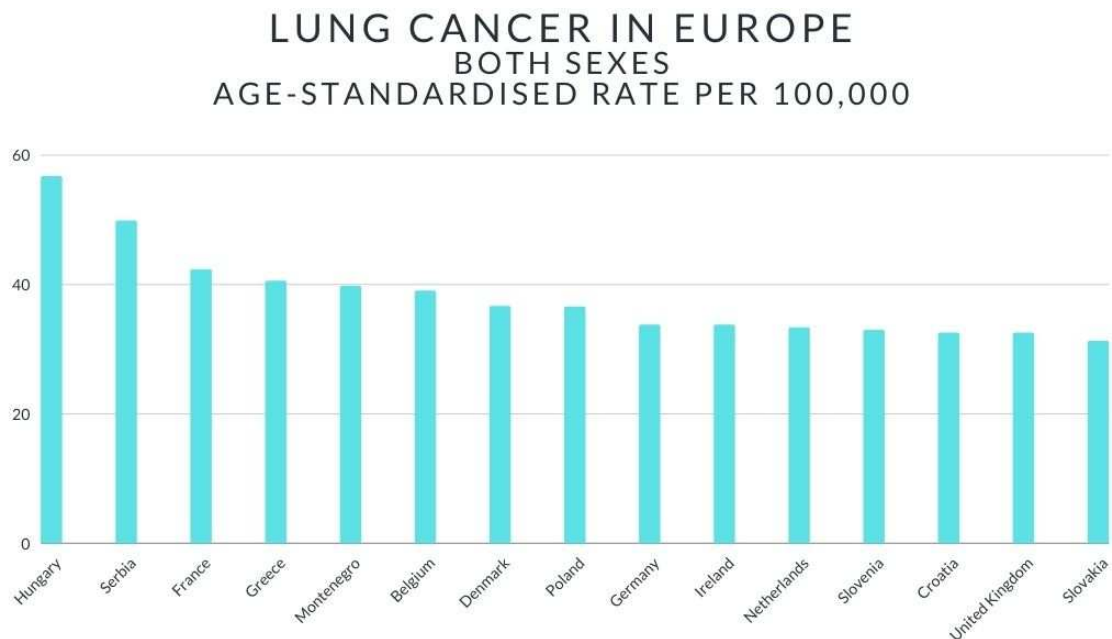


Figure 2. The graph shows a ranking of both sexes age-standardised rate per 100,000.

Other factors that contribute to the development of lung cancer include exposure to air pollution, chronic infections, asbestos, radon gas, viruses (JC virus, simian virus 40, BK virus, cytomegalovirus and human papillomavirus) and sex hormones [1–3].

Susceptibility to the disease is also genetically determined [11–20]. Gene mutations, which result in changes of protein expression, such as Bax, *p53* or Bcl-2 [21,22], have a significant impact on the prognosis of lung cancer patients [13]. The disease onset is very insidious without any early symptoms. In more advanced stages, the main symptoms at diagnosis include: chronic cough, chest pain, shortness of breath, recurrent pneumonia and hemoptysis [23,24]. Lung cancer spreads easily to the bones causing pathological fractures and bone pain, to the liver causing significant weight loss, jaundice, nausea and abdominal pain, to the adrenal glands—which is symptomless or leads to endocrine alterations—or to the brain causing seizures, paresis, balance disorders, sensory disturbances, convulsions and headache [23,24].

There are two main histological classes of neoplasms derived from respiratory epithelial cells: small cell lung cancer (SCLC) in 15% of cases and non-small cell lung cancer (NSCLC) further divided into adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma in the other 85% of all cases [3,22–25]. The most aggressive is SCLC, which rapidly spreads to the regional lymph nodes and parenchymal organs vessels. Another characteristic includes extreme predilection to the brain and other parenchymal organs. One of the first cell lines to analyze molecular biology of lung cancer was established in the 1960s, while the SCLC cell line was established in the 1970s. Lung cancer treatment, depending on the type and stage of cancer, includes surgery, chemotherapy, targeted therapy and radiation therapy [25–28]. Cisplatin is the backbone of the most efficient chemotherapy regimens, usually combined with either gemcitabine, vinorelbine, etoposide or taxanes [29–32].

Nowadays, in locally advanced NSCLC, which is not amenable towards radical surgery, the best treatment results are obtained by using upfront concomitant chemoradiotherapy followed by a maintenance immune checkpoint inhibitor. The results of phase III prospective randomized clinical trial PACIFIC showed that durvalumab—an anti-PDL-1 monoclonal IgG1 kappa antibody—significantly prolonged overall survival, as compared

with placebo (stratified hazard ratio for death, 0.68; 99.73% CI, 0.47 to 0.997; $p = 0.0025$) [33]. Interestingly, a meta-analysis evaluating the effectiveness of anti-PD1 inhibitors and standard chemotherapy in female patients did not show a clear benefit from immune checkpoint inhibitors. In contrast, male patients had a 24% reduction in the risk of progression [34]. These results raise the question about the gender-related mechanisms and the value of sex as an independent prognostic factor for anti-PD1 or anti-PD-L1 blockade. Female patients may have more potent immune systems or develop immune-resistant lung tumors [34].

Patients diagnosed with adenocarcinoma harboring druggable mutations are currently offered molecularly targeted medications directed against EGFR, ALK, ROS, Her2 new, MET, TRK or any other even less frequent alterations. In SCLC, the treatment progress is less evident than in NSCLC, but immunotherapy impacting the CTLA4 or PD signaling can be added to standard chemotherapy and combined with radiation [27–29].

Better treatment results in lung cancer female patients have been noticed in several clinical trials. Pinto et al. retrospectively reviewed available data to explore differences in gender outcomes in NSCLC. The meta-analysis showed a 27% reduction in the risk of death in female patients. In six trials evaluating EGFR TKI (tyrosine kinase inhibitors) in adenocarcinoma of the lung, there was a 10% reduction in the risk of progression in women compared to men (HR = 0.44 vs. 0.34 for men and women, respectively). However, it is essential to mention that important prognostic factors such as ethnicity or smoking status have not been included. Another meta-analysis by Pujol et al. did not show any differences in benefit from cetuximab (an anti-EGFR antibody) between genders in the subgroup analysis [35].

Regarding another biological compound—anti-angiogenic bevacizumab—the results of clinical trials are inconclusive. A meta-analysis by Soria et al. showed no correlation between gender and the treatment effect [36]. Female patients with lung adenocarcinoma harboring ALK that was rearranged and treated with ALK inhibitors such as crizotinib or ceritinib obtain similar benefits as men [37].

3. Sex Differences in Lung Cancer

In contrast to men, available epidemiological data indicate an upward trend in the incidence of lung cancer in women, despite a 50 percent reduction of women smokers [33–37]. The decisive role is attributed to female sex hormones, mainly estrogen, which is a steroid. The main hormone referred to as the reproductive hormone is 17- β -Estradiol-E2, which is synthesized in the ovaries under the influence of the luteinizing and follicular hormones [33–37].

There are two types of estrogen receptors (ER): ER alpha (ER α , also known as ESR1) and ER beta (ER β , ESR2). Many studies have shown a correlation between hormone replacement therapy and the risk of cancer mortality in women [38–40]. The ER β receptor has been demonstrated as essential in healthy lung tissues, where it is necessary to maintain the extracellular matrix. The ER β estrogen receptor is characterized by genomic and non-genomic activity. The non-genomic effect concerns vasodilatation [41–46]. It becomes apparent 5 to 20 min after exposure to estrogen, and does not require changes in gene expression. In contrast, the genomic effect of estrogens involves protection against atherosclerosis and inhibition of the response to injury. In addition, high ER β expression is associated with a poor prognosis of advanced NSCLC [41,46]. mRNA analyses were performed, comparing lung tumors with low and high levels of ER β receptors. Tumors exhibiting high ER β expression have been characterized as signalers via fibroblast growth factors, which are the autocrine signaling loop and contribute to the progression of lung cancer and pluripotency of human embryonic stem cells. Moreover, cancer stem cells (CSCs) are responsible for both primary tumor growth and metastasis. Wnt pathway, Notch pathway and Hh pathway routes are responsible for differentiation and pluripotency of CSCs [47]. In vitro studies indicate that in the lung, ER estrogen receptors may interact with the epidermal growth factor receptor (EGFR) during carcinogenesis. A clinical study of 180 women showed an increased risk of developing adenocarcinoma in patients

receiving hormone replacement therapy (HRT) [48]. It was also noticed that women taking HRT for extended time periods are more susceptible to the harmful effects of tobacco smoke [39–41]. Genetic factors are another important determinant of developing lung cancer, which is independent of the smoking status [42,49]. Notably, available data indicate that it is the reason why women bear a generally higher risk than men [50,51]. One of the main well-studied factors is the role of CYP1A1 (cytochrome P450) gene expression [52]. The CYP1A1 gene codes for the phase I enzyme, which is involved in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), contained in tobacco smoke as well as other types of smoke produced by burning different products. This mechanism prevents the pre-carcinogen from turning carcinogenic. Circulating female steroid hormones are believed to influence the modulation of PAH enzyme expression due to interaction with receptors in the patients' lungs. In addition, it has been shown that the expression of steroid receptors is much more common in women than in men [52]. Available clinical studies indicate that overexpression of the CYP1A1 gene has a clear effect on the increased risk of lung cancer in women. It is also known that due to impaired DNA repair mechanisms, platinum-based chemotherapy has a better therapeutic effect. The antitumor activity of platinum drugs is mainly based on the mechanism of deformation of the DNA structure, thanks to the formation of stable DNA adducts [51–54].

4. Estrogens Short Review

Steroid hormones are endogenous estrogens that include estrone (E1), estriol (E3) and 17 β -estradiol (E2) (Figure 3). These structural and biogenic hormones are derived from cholesterol C17. LDL-cholesterol is the major reactant necessary for the synthesis of steroid hormones, which is called steroidogenesis [52–54].

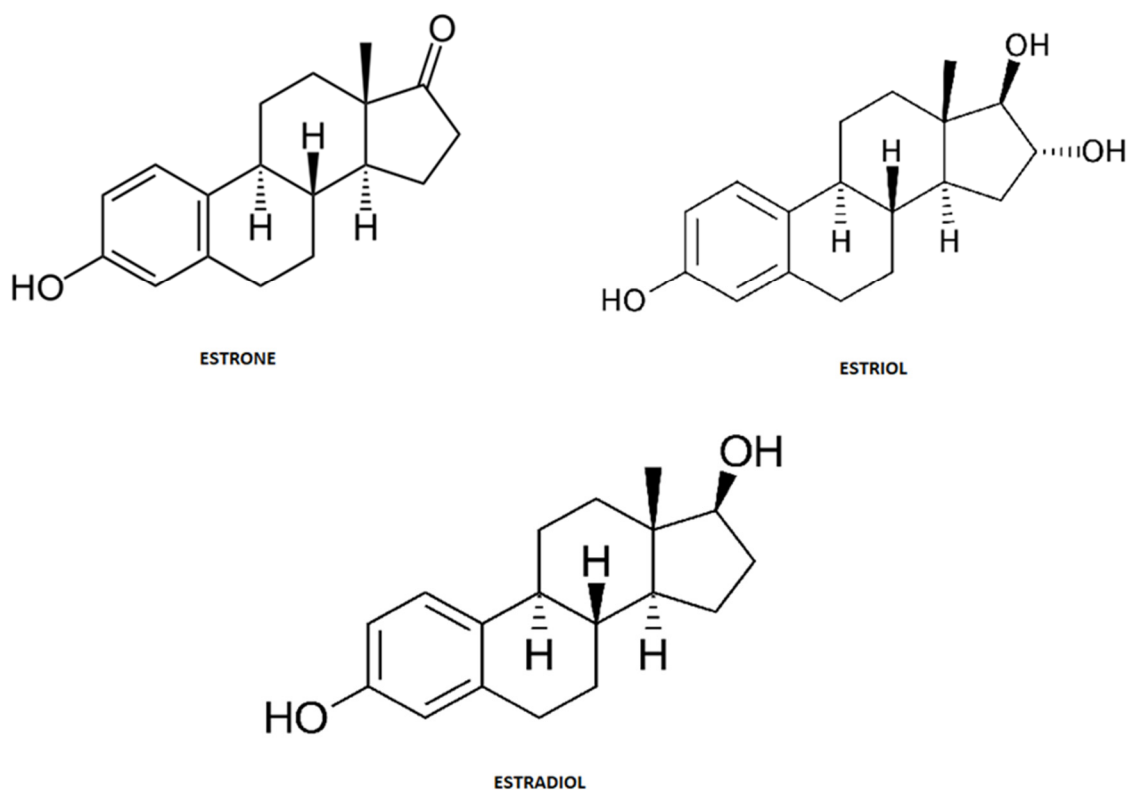


Figure 3. Chemical structure of steroid hormones.

Cholesterol is metabolized in a number of enzymatic pathways [55,56]. The process of their creation depends on the aromatization of androgens [55,56]. In addition, they have the ability to bind to the protein receptor (ER) as well as to diffuse through the cell

membrane. Direct penetration through the cell membrane into the cytosol occurs due to the properties of the lipophilic structure. In addition, estrogens are included in the group of pleiotropic hormones [55,56].

The two main estrogens also named “parent” estrogens—estrone, and estradiol—are low-molecular steroids of lipophilic nature acting as agonists of estrogen receptors ER α and ER β [56]. However, estrogen-like activity should be also attributed (with varying extent) to a range of estrogen metabolites, usually referred to as EM [57,58]. The parent estrogens are irreversibly oxidized in the cytochrome P450 dependent pathway by hydroxylation at the C-2, C-4 and C-16 positions of the steroid ring forming hydroxylated metabolites. The main and most studied metabolites include 2-hydroxyestrogen (2-OH-E), 4-hydroxyestrogen (4-OH-E) and 16-hydroxyestrogen (16 α -OH-E) have significant estrogenic activity (Figure 4). Those metabolites are further transformed by conjugation with a methyl group, glucuronic acid, and sulfuric acid (forming methoxy-metabolites, glucuronates and sulfates, respectively). Thus, many authors point out the necessity of studying a wide panel of estrogens, including minor metabolites in order to fully understand their influence on human physiology as well as the etiology and progression of various pathological states [59,60]. This relatively new approach needs easily accessible and reliable bioanalytical methods to determine their concentrations in human biofluids and tissues.

ESTROGENS	Shape secondary and tertiary sexual characteristics in women’s bodies Condition the development of the male reproductive system Lowering total cholesterol Shape the blood lipid profile Affect the musculoskeletal system Stimulating the repair process of damaged muscle fibers During menopause, there is a decrease in estrogen levels, which results in a decrease in muscle mass, as well as osteoporosis
ESTRIOL	Lowest biological activity Product of estrone and estradiol metabolism
17β-ESTRADIOL	Biological activity that is about 5 to 10 times greater than estrone

Figure 4. Biological activity of steroid hormones.

From the analytical point of view, this is not a straightforward task for several main reasons (Figure 5) Firstly, the analytical technique needs to have enough selectivity to differentiate between chemically similar compounds, so an efficient separation technique is required. To achieve that, chromatography is applied, with high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a method of choice [61,62]. Practically, it is not possible to separate lipophilic parent estrogens, their hydroxylated metabolites, and much more polar conjugates with glucuronic and sulfuric acids. In order to avoid the development validation of separate LC-MS methods for polar and nonpolar analytes, enzymatic hydrolysis is typically involved as a sample preparation step. β -glucuronidase/sulfatase from *Helix pomatia* has been proven to sufficiently hydrolyze estrogen metabolites [62]. The involvement of enzymatic cleavage enables us to gain detailed information about a wide range of estrogen metabolites. Secondly, due to the low levels of many of the above mentioned metabolites, the high sensitivity of the analysis is a critical issue. Sensitive quan-

tification depends on the detection method and sample preparation. Mass spectrometry, despite being expensive, can detect estrogen compounds down to the pmol/L level [59]. On the other hand, extensive clean-up of a sample with simultaneous preconcentration of analytes is beneficial to improve sensitivity and avoid interfering compounds. Improvement at the sample preparation step in estrogen analysis is thus still required. The application of novel selective materials, including sorbents processed by using 3D-printing, can be a promising approach, especially in a high throughput format [63,64]. More selective extraction utilizing specific sorbent-analyte interactions can potentially further improve quantification of a wide range of estrogens. In particular, boronate affinity solid-phase microextraction, as was previously claimed to be useful for diol-containing compounds [65], seems to be an attractive approach.

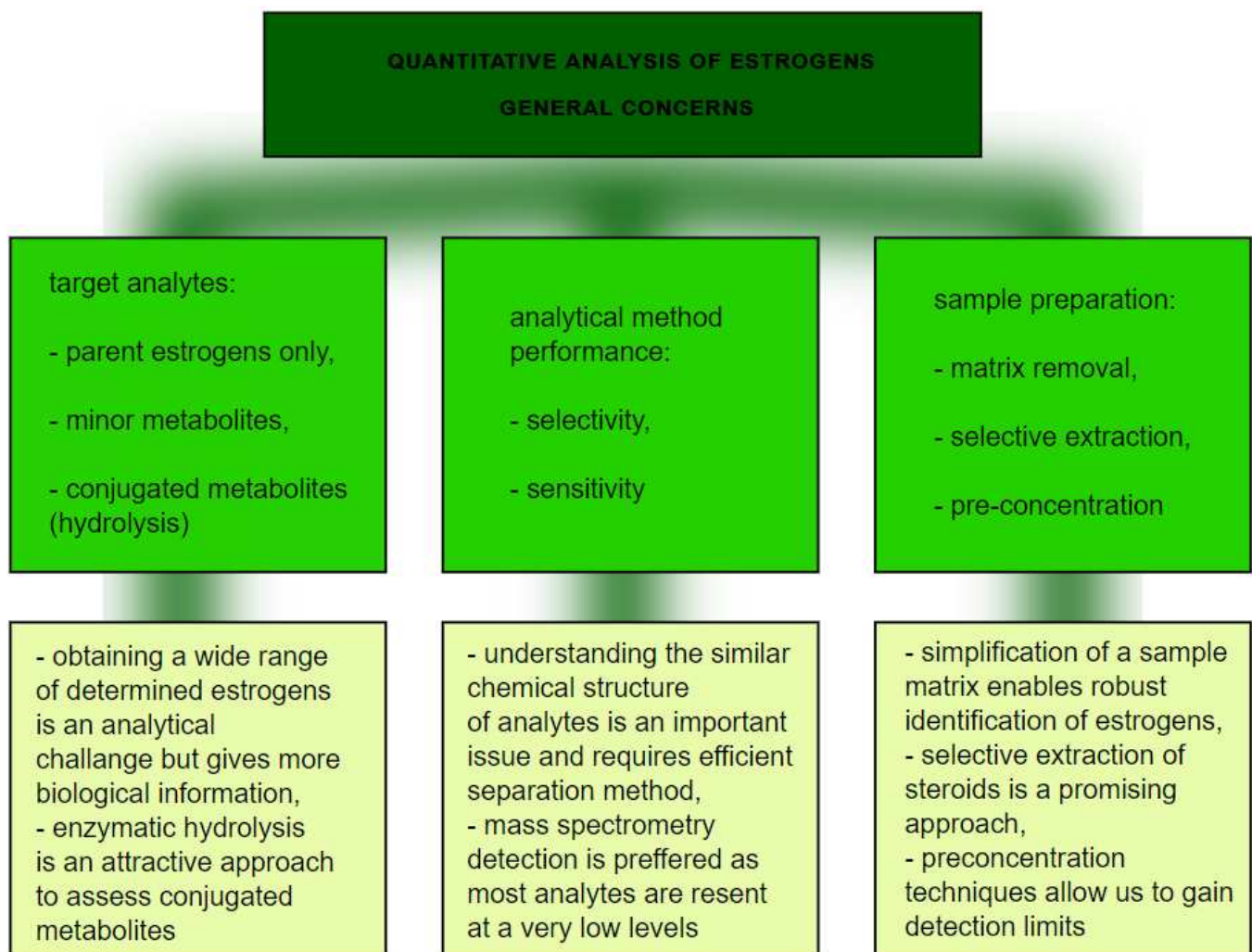


Figure 5. The graph presents quantitative analysis of estrogens.

The main role of estrogens in a woman's body is to shape secondary and tertiary sexual characteristics, which affects the development of external genitalia, as well as the fallopian tubes, uteri, vaginas and nipples. Estrogens also perform a key function in the male body—they condition the development of the male reproductive system [55,66–72].

Estrogens also have a positive effect on the cardiovascular system, among other factors, by lowering total cholesterol [60], shaping the blood lipid profile and also affecting the musculoskeletal system by stimulating the repair process of damaged muscle fibers [56,71]. Notably, during menopause, there is a decrease in estrogen levels, which results in a decrease in muscle mass, as well as osteoporosis. The lowest biological ac-

tivity is shown by estriol, which is considered to be the weakest of estrogens, being a product of estrone and estradiol metabolism. Estrone, in turn, exhibits a markedly higher biological activity [56,68–71]. Finally, the type of estrogen with the highest activity is a 17 β -estradiol, with a potency of about 5 to 10 times greater than the former type. Both types of estrogen receptors—ER α and ER β —have a relationship with the heat shock proteins (HSP) complex. In addition, estrogen receptors have the ability to form heterodimers and homodimers [47,68–71].

5. Estrogens in Etiopathogenesis and Therapy of Lung Cancer

It is well known that estrogens can cause carcinogenicity. The impact of estrogens is noted in female cancers, for example breast cancer, or in the case of modulation of genetic mutations. However, based on available clinical studies, it is also hypothesized that the mechanism of action of the estrogen pathway in lung cancer is similar to the one established for breast cancer [72–74].

Available studies indicate that estrogen affects lung carcinogenesis via non-genomic and genomic signaling. In genomic signaling, homodimers and heterodimers are formed acting as ligands, which bind to the ER nucleus. In contrast, non-genomic signaling works by means of the mitogen-activated protein kinase (MAPK1) pathways through the ER [71,75].

The endogenous metabolite of 17 β -estradiol (E2) resulting from the hydroxylation and methylation of the second-position is 2-methoxyestradiol (2ME, (17beta)-2-methoxyestra-1,3,5 (10)-triene-3,17-diol). This metabolite inhibits angiogenesis by reducing endothelial cell proliferation. In addition, 2ME is an antiproliferative and anti-angiogenic agent [76–79].

The metabolite 2ME inhibits carcinogenic cell growth due to tubulin binding. In vitro studies show that 2-methoxyestradiol inhibits a wide range of non-cancer and cancer cell lines. It has also been shown in vitro that 2ME inhibits several stages of the angiogenic cascade, thereby inhibiting proliferation and inducing tumor cell apoptosis. Cell line growth inhibition was achieved in the lung cancer line of human origin A459 and H460 *p53* wild-type. Minor changes after treatment with 2ME occurred in H322 *p53* and H358 type *p53* cell lines. Western Blot analysis was performed, which resulted in a significant increase in *p53* protein after treatment with 2-ME. The main change observed during the study involving treatment with 2ME was an eight-fold increase in endogenous *p53* protein. The level of mutated *p53* protein remained unchanged. The *p53* protein is the major tumor suppressor responsible for regulating the cell's life cycle and apoptosis [76,77].

The Charité University Clinic in Berlin conducted a study to confirm the inhibition of the growth of various cell lines with 2ME, including lung cancer. Orally administered 2-ME was combined with gene therapy and an adenovirus expressing the *p53* gene was administered intravenously. The results demonstrated that lung cancer cells that were resistant to cisplatin were particularly sensitive to 2ME [78].

Several experiments have been devoted to the metabolite 4-hydroxyestrogen (4-OH-E), which is a CYP1B1 product, and has mutagenic and carcinogenic effects [78]. Studies indicate that tobacco smoke stimulates the metabolism of 17 β -estradiol to the toxic metabolite 4-OH-E. In addition, 4-OH-E levels are elevated in patients with lung cancer as compared to healthy controls. It has been hypothesized that the 4-OH-E metabolite affects oncogene mutation in the lungs and also activates ER signaling, which increases the risk of lung cancer. Last year at the Research Institute of Fox Chase Cancer Center in Philadelphia, it was discovered that the human lung can metabolize estrogen to 4-hydroxyestrogen [79].

Studies show differential expression of nuclear ER- β in NSCLC [80]. Nuclear expression of ER- α and ER- β was determined by immunohistochemistry. The study identified ER- β nuclear expression in NSCLC tumor tissue and control tissue correctly, in both women and men. In men, nuclear ER- β expression was found to be more frequent in adenocarcinomas of the lung [80].

In the case of NSCLC, research indicates stimulation of tumor growth through the expression of ER forms that interact with the epidermal growth factor receptor (EGFR) [81].

Importantly, EGFR supports the growth of NSCLC and breast cancer. The available data indicate the responsibility of HER2 and EGFR for a number of states of endocrine immunity [66]. Moreover, in response to estrogen, the ERs proliferate as a result of their interaction with ER-containing vascular endothelial cells [81].

Estrogens regulate the expression of miRNAs, which are found in small non-coding RNAs containing about 21–25 nucleosites [82]. The miRNA finds application in distinguishing between different subtypes of lung cancer [82–84]. Studies have reported that miR-124a is characteristic of NSCLC lung adenocarcinoma and miR-205 for squamous cell carcinoma, while miR-375 and miR-21-5p are highly expressed in SCLC [82–88]. In addition, the histological patterns of growth of lung adenocarcinomas were analyzed, showing a significant influence of miRNA expression [89]. In tumors, the presence of solid components in tumors was demonstrated when miR-212, miR-27a and miR-132 were expressed [89]. However, in order to demonstrate the possible benefits of miRNA targeted therapy in lung cancer patients, more comprehensive studies should be conducted.

Research indicates that estradiol can be synthesized locally in NSCLC, analogous to breast cancer tissue [90]. Moreover, on the basis of the obtained results, it was proved that the concentration of estradiol in the NSCLC tissues was significantly 3.7 times higher in men than in women after menopause [90]. Researchers say that the essence of this phenomenon are the circulating androgens produced by aromatase, which in the case of NSCLC and estradiol production could be the leading substrates [90]. The study determined the estradiol concentration in 59 NSCLC cases, followed by in vitro A549 NSCLC cell cultures. Forty-three of the subjects showed an increase in the concentration of estradiol in the neoplastic tissues compared to the non-neoplastic lung tissues of the patients [90]. However, in the case of in vitro studies, the increase in the proliferation of cell cultures of both A549 + ER- α and A549 + ER- β was determined. Moreover, both cell cultures were found to express aromatase. Importantly, studies show an increase in A549 cell proliferation during testosterone use. Therefore, it is suggested on the basis of the obtained studies that if estrogens, and more specifically oestradiol occurring inside cancerous tumors by aromatase, including NSCLC, and favor their development, anti-estrogen therapy would be an effective therapy in the fight against cancer [90].

Both NSCLC and breast cancer are entities that frequently occur in everyday pathological diagnosis [91]. However, it should be remembered that both disease entities in the form of lung metastatic breast cancer and primary lung cancer are treated completely differently [91]. Typical immunohistochemical markers in the differential diagnosis of breast cancer are: HER2—tyrosine kinase receptor encoded by HER2—growth-promoting protein, ER, MAMG—mammaglobin, GATA3—GATA 3 binding protein (zinc finger transcription factor) and PgR—the steroid hormone progesterone receptor [91]. However, in the case of NSCLC, the most frequently used immunohistochemical markers are: TTF-1—thyroid transcription factor 1, Napsin A, CK7—cytokeratin 7, *p63*, *p40* and CK5—cytokeratin 5 [91]. In addition, molecular tests for mutations are performed to diagnose NSCLC activators in the EGFR gene [91]. Due to the limited research on the immunohistological expression of NSCLC markers, a study was conducted using clinical variables and staining results for CK5/6, *p40*, TTF-1 and napsin A [91]. An analysis of 1291 samples of NSCLC patients with successively diagnosed adenocarcinoma (ADC) was performed—636 patient samples, squamous cell carcinoma (SqCC)—536 patient samples, large cell carcinoma (LLC)—65 patient samples, polymorphic carcinoma (PC)—34 patient samples, and large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC)—20 patient samples. Most of the patients had disease stages I to III [91]. In addition, 380 patients were women with more ADC than SqCC, while the remaining 911 patients were men. ER-positive tumors were found to be much more common in women than in men. On the basis of the conducted studies, the expression of all five markers was found in many patients, thus it can be concluded that the interpretation of tumor markers is important in the differential diagnosis [91].

Estrogen is known to induce ER β -mediated cell growth in NSCLC [92]. Moreover, high levels of circulating interleukins 6 (IL6) are associated with poor prognosis for NSCLC;

however, the determination of the specific role of IL6 in NSCLC is not fully understood and requires a lot of research [92]. One of the studies assessed both the biological effects as well as the expression of interleukins in NSCLC cells after treatment with 17 β -estradiol (E2) [92]. The expression of IL6/ER β in 289 NSCLC samples was determined via immunohistochemistry [92]. The study included A549 and H1793 non-small cell lung cancer cells [92]. Cells were treated with E2. Their expression levels were determined sequentially by means of ELISA, western blotting and immunofluorescence staining [92]. The study also used an animal xenograft model to determine and observe differences in IL6 and ER β expression in NSCLC tumor growth [92]. Research showed an increased increase in both ER β and IL6, which was closely related, the researchers indicated, to either increased metastasis or decreased differentiation [92]. Indeed, the study showed ER β mediated regulation of IL6 expression through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways due to the use of E2 [92]. Importantly, an increase in malignancy of NSCLC cells was also found due to the regulation of E2 on IL6/ER β [92].

Experimental research indicate that the ER potentially promotes NSCLC progression via modulation of the membrane receptor signaling network, composed of the GSK3 β / β -catenin, Notch1 and EGFR pathways [93]. Furthermore, one of the treatments for lung cancer may be anti-estrogen therapy. Additionally, 17- β -estradiol is produced by aromatase activity, which in turn influences the control of estrogen levels in the lung cancer microenvironment [94,95]. Clinical studies suggest that aromatase inhibitors are a good therapeutic option for lung adenocarcinoma [94,96]. Aromatase inhibitors are classified into classes I and II: (I) irreversible steroid inhibitors; (II) non-steroidal inhibitors [94,96]. Sulfo-transferases activated by e.g., dexamethasone are also used in the treatment of hormone-dependent tumors [94,97]. Preclinical studies indicate inhibition of A549 cell tumor growth, while lowering estrogen levels [94,96]. Fulvestrant, an estrogen receptor degradator, is also used in NSCLC research [98]. According to the data, fulvestrant causes greater sensitization of the NSCLC tumor to chemotherapy and reduces the mesinochemical features [94,97]. Due to the fact that one of the leading elements of the patient's immune profile are steroid hormones, next to chemotherapy, radiotherapy or surgery, immunotherapy is an effective lung cancer treatment strategy [94]. The development of personalized medicine is conditioned by numerous preclinical and clinical studies taking into account sex differences or the expression of hormonal markers, in which the response to therapy in patients with NSCLC, survival as well as pathological and clinical features are tested [94].

6. Current Clinical Trials Registered for Non-Small Lung Cancer and Estrogens with Completed Status with Results

Currently, as of 20 December 2020, 3 clinical trials are registered on clinicaltrials.gov for lung cancer:

1. Study Evaluating the Addition of Fulvestrant to Erlotinib in Stage IIIB/IV Non-Small Cell Lung Cancer—ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00592007, disease entity: stage IIIB/IV NSCLC; drug treatment: fulvestrant, erlotinib; clinical trial is aimed at determining the effectiveness of the combination of fulvestrant which inhibits the access of estrogen to the tumor with erlotinib. Only patients who express estrogen are eligible for the study. Moreover, estrogen sensitivity was tested on previously removed tumor samples [99].
2. Fulvestrant and Anastrozole as Consolidation Therapy in Postmenopausal Women With Advanced Non-small Cell Lung Cancer—ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00932152; target audience: postmenopausal women, NSCLC; Drug: fulvestrant (Faslodex), anastrozole (Arimidex), bevacizumab (Avastin), best supportive care; clinical trail included the assessment of 17 β -estradiol, VEGF, E-selectin, thrombospondin-1 and IGF-1 levels and other plasma biomarkers. Evaluation of biomarkers such as ER α , ER β , PR, VEGF and aromatase expression. Archiving of tumor tissue was also used in the study [100].
3. Alisertib in Adults With Nonhematological Malignancies, Followed by Alisertib in Lung, Breast, Head and Neck or Gastroesophageal Malignancies—ClinicalTrials.gov

Identifier: NCT01045421; disease: advanced nonhematological malignancies, non-small cell lung cancer, small cell lung cancer, metastatic breast cancer, head and neck squamous cell carcinoma, gastroesophageal adenocarcinoma, drug: MLN8237 (Aisertib); in lung cancer, the chemo-sensitive, chemo-resistant population was analyzed, in breast cancer, ER2 and ER2 were analyzed. HR + = positive estrogen or progesterone receptor, both SCLC and NSCLC patients received 50 mg of MLN8237 orally twice daily for 7 days, consecutively 14 days off [101].

7. Conclusions

Extensive data, in vitro and in vivo studies indicate a significant role of the female sex hormone β -estradiol in the etiopathogenesis, clinical treatment and prognosis of NSCLC. This manuscript focuses on a review of the available data describing the hormonal difference between the sexes in the development of lung cancer.

Estrogen activity in the growth of NSCLC tumors has been confirmed by a number of studies, and lowering the level of estrogen hormones could have a positive effect on antitumor activity in this area.

There have been several reports suggesting an upward trend in the incidence of lung cancer in women. Compared to men, a much more common tumor suppressor *p53* mutation was observed in women with NSCLC [22,24,61].

There is enough in vivo and in vitro evidence that female sex hormones are an important factor in the development of neoplastic tumors, which are mitogenic and carcinogenic. Research indicates that women are more predisposed and exposed to adenocarcinoma, while men are more likely to suffer from squamous cell carcinoma [90].

There are two types of estrogen receptors in lung cancer cells: ER α and ER β . The ER α receptor has been detected in a number of lung cancer cell lines, and interestingly, the ER β receptor is a prognostic marker in NSCLC [37–40].

The manuscript presents the molecular basis of lung cancer in women. The authors point to a number of genetic abnormalities that may be closely related to the increased incidence of lung cancer among women. Advances in medicine and molecular diagnostics create an opportunity for more effective anti-cancer therapies and detection of lung cancer at an earlier stage. Role of estrogens in pathogenesis and diagnosis of lung cancer therefore still needs to be elucidated. The review was based on extensive literature emphasizing the important role of estrogen and estrogen receptors in the progression and development of NSCLC.

Author Contributions: Conceptualization M.G.-P.; resources M.G.-P.; writing—original draft preparation C.M. writing—review and editing M.G.-P., C.M., R.Z., T.B., L.K., M.B., A.K.-J., M.W., A.M.G. and F.C.; Visualization C.M., supervision M.G.-P.; project administration M.G.-P.; funding acquisition M.G.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The studies and manuscript publication were funded by the Iuventus Plus project of Polish Ministry of Science and Higher Education No IP 2015 022074. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: M.W. acknowledges support from ST46 (Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland).

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

References

1. Urman, A.; Hosgood, D. Lung Cancer Risk, Genetic Variation, and Air Pollution. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 491–492. [[CrossRef](#)]
2. Alberg, A.J.; Samet, J.M. Epidemiology of lung cancer. *Chest* **2003**, *123*, 21–49. [[CrossRef](#)]

3. Dela Cruz, C.S.; Tanoue, L.T.; Matthay, R.A. Lung cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.* **2011**, *32*, 605–644. [[CrossRef](#)]
4. Hansen, H.H. *Lung Cancer: European Commission: Series for General Practitioners*; Springer: Berlin, Germany, 1990; pp. 1–48.
5. Siegel, R.; Ward, E.; Brawley, O. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 212–236. [[CrossRef](#)]
6. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Burke, A.P.; Marx, A.; Nicholson, A.G. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2015.
7. Addario, B.J. Lung cancer is a global epidemic and requires a global effort. *Ann. Transl. Med.* **2015**, *3*, 26.
8. Lung Cancer in Europe. Available online: https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/our-focus-areas/Oncology/2020/lungcancer/Lung%20Cancer%20in%20Europe%20Backgrounder_APPROVED_MAY2020.pdf (accessed on 22 December 2020).
9. Lung Cancer Statistics. Available online: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/lung-cancer-statistics> (accessed on 22 December 2020).
10. Vlahopoulos, S.; Adamaki, M.; Khoury, N.; Zoumpourlis, V.; Boldogh, I. Roles of DNA repair enzyme OGG1 in innate immunity and its significance for lung cancer. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *194*, 59–72. [[CrossRef](#)]
11. Alegre, E.; Fusco, J.P.; Restituto, P.; Salas-Benito, D.; Rodríguez-Ruiz, M.E.; Andueza, M.P.; Gonzalez, A. Total and mutated EGFR quantification in cell free DNA from non-small cell lung cancer patients detects tumor heterogeneity and presents prognostic value. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 13687–13694. [[CrossRef](#)]
12. Brenner, D.R.; Fanidi, A.; Grankvist, K.; Muller, D.C.; Brennan, P.; Manjer, J.; Johansson, M. Inflammatory Cytokines and Lung Cancer Risk in 3 prospective Studies. *Am. J. Epidemiol.* **2017**, *185*, 86–95. [[CrossRef](#)]
13. Perera, F.P.; Mooney, L.A.; Stampfer, M.; Phillips, D.H.; Bell, D.A.; Rundle, A.; Cho, S.; Tsai, W.-Y.; Ma, J.; Blackwood, A.; et al. Associations between carcinogen–DNA damage, glutathione S-transferase genotypes, and risk of lung cancer in the prospective Physicians’ Health Cohort Study. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1641–1646. [[CrossRef](#)]
14. Church, D.F.; Pryor, W.A. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *64*, 111–126. [[CrossRef](#)]
15. Schnoll, R.A.; Martinez, E.; Tatum, K.L.; Weber, D.M.; Kuzla, N.; Glass, M.; Ridge, J.A.A.; Langer, C.; Miyamoto, C.; Wileyto, E.P.; et al. A bupropion smoking cessation clinical trial for cancer patients. *Cancer Causes Control* **2010**, *21*, 811–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cataldo, J.K.; Dubey, S.; Prochaska, J.J. Smoking Cessation: An Integral Part of Lung Cancer Treatment. *Oncology* **2010**, *78*, 289–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Chan, C.H.; Hsiao, C.F.; Chang, G.C. Interactive effect of cigarette smoking with human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) polymorphisms on the risk of lung cancer: A case–control study in Taiwan. *Am. J. Epidemiol.* **2009**, *170*, 695–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Denissenko, M.F.; Pao, A.; Tang, M.; Pfeifer, G.P. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* **1996**, *274*, 430–432. [[CrossRef](#)]
19. El-Telbany, A.; Ma, P.C. Cancer genes in lung cancer: Racial disparities: Are there any? *Genes Cancer* **2012**, *3*, 467–480. [[CrossRef](#)]
20. Porebska, I.; Wyrodek, E.; Kosacka, M.; Adamiak, J.; Jankowska, R.; Harłózińska-Szmyrka, A. Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. *In Vivo* **2006**, *20*, 599–604.
21. Stark, A.M.; Hugo, H.H.; Tscheslog, H.; Mehdorn, H.M. p53, BCL-2 and BAX in non-small cell lung cancer brain metastases: A comparison of real-time RT-PCR, ELISA and immunohistochemical techniques. *Neurol. Res.* **2007**, *29*, 435–440. [[CrossRef](#)]
22. Samet, J.M.; Avila-Tong, E.; Boffetta, P. Lung cancer in never smokers: Clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5626–5645. [[CrossRef](#)]
23. Brambilla, E.; Negoescu, A.; Gazzeri, S.; Lantuejoul, S.; Moro, D.; Brambilla, C.; Coll, J.L. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am. J. Pathol.* **1996**, *149*, 1941–1952.
24. Wang, S.; Zimmermann, S.; Parikh, K.; Mansfield, A.S.; Adjei, A.A. Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer. *Mayo Clin. Proc.* **2019**, *94*, 1599–1622. [[CrossRef](#)]
25. Byers, L.A.; Rudin, C.M. Small cell lung cancer: Where do we go from here? *Cancer* **2015**, *121*, 664–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Govindan, R.; Page, N.; Morgensztern, D. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: Analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 4539–4544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fruh, M.; De Ruyscher, D.; Papat, S. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 99–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Skarlos, D.V.; Samantas, E.; Kosmidis, P. Randomized comparison of etoposide-cisplatin vs. etoposide-carboplatin and irradiation in small-cell lung cancer: A Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Ann. Oncol.* **1994**, *5*, 601–607. [[CrossRef](#)]
30. Shoji, T.; Kikuchi, E.; Kikuchi, J. Evaluating the immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, *85*, 843–853. [[CrossRef](#)]
31. Schabath, M.B.; Wu, X.; Vassilopoulou-Sellin, R.; Vaporciyan, A.A.; Spitz, M.R. Hormone replacement therapy and lung cancer risk: A case–control analysis. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *1*, 113–123. [[CrossRef](#)]

32. Ramnath, N.; Menezes, R.J.; Loewen, G. Hormone replacement therapy as a risk factor for non-small cell lung cancer: Results of a case-control study. *Oncology* **2007**, *10*, 305–310. [[CrossRef](#)]
33. Antonia, S.J.; Villegas, A.; Daniel, D.; Vicente, D.; Murakami, S.; Hui, R.; Kurata, T.; Chiappori, A.; Lee, K.H.; de Wit, M.; et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2342–2350. [[CrossRef](#)]
34. Pinto, J.A.; Vallejos, C.S.; Raez, L.E. Gender and outcomes in non-small cell lung cancer: An old prognostic variable comes back for targeted therapy and immunotherapy? *ESMO Open* **2018**, *3*, 000344. [[CrossRef](#)]
35. Pujol, J.L.; Pirker, R.; Lynch, T.J.; Butts, C.A.; Rosell, R.; Shepherd, F.A.; Vansteenkiste, J.; O’Byrne, K.J.; de Blas, B.; Heighway, J.; et al. Meta-analysis of individual patient data from randomized trials of chemotherapy plus cetuximab as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2014**, *83*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Soria, J.C.; Mauguen, A.; Reck, M.; Sandler, A.B.; Saijo, N.; Johnson, D.H.; Burcoveanu, D.; Fukuoka, M.; Besse, B.; Pignon, J.P.; et al. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 20–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Shaw, A.T.; Kim, T.M.; Crinò, L.; Gridelli, C.; Kiura, K.; Liu, G.; Novello, S.; Bearz, A.; Gautschi, O.; Mok, T.; et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 874–886. [[CrossRef](#)]
38. Adami, H.O.; Persson, I.; Hoover, R.; Schairer, C.; Bergkvist, L. Risk of cancer in women receiving hormone replacement therapy. *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 833–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Deroo, B.J.; Korach, K.S. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 561–570. [[CrossRef](#)]
40. Devesa, S.S.; Bray, F.; Vizcaino, A.P.; Parkin, D.M. International lung cancer trends by histologic type: Male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int. J. Cancer* **2005**, *117*, 294–299. [[CrossRef](#)]
41. Zang, E.A.; Wynder, E.L. Differences in lung cancer risk between men and women: Examination of the evidence. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 183–192. [[CrossRef](#)]
42. Dresler, C.M.; Fratelli, C.; Babb, J.; Everley, L.; Evans, A.A.; Clapper, M.L. Gender differences in genetic susceptibility for lung cancer. *Lung Cancer* **2000**, *30*, 153–160. [[CrossRef](#)]
43. Kreuzer, M.; Boffetta, P.; Whitley, E.; Ahrens, W.; Gaborieau, V.; Heinrich, J.; Jockel, K.H.; Kreienbrock, L.; Mallone, S.; Merletti, F.; et al. Gender differences in lung cancer risk by smoking: A multicentre case-control study in Germany and Italy. *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 227–233. [[CrossRef](#)]
44. Zhang, G.; Liu, X.; Farkas, A.M.; Parwani, A.V.; Lathrop, K.L.; Lenzner, D.; Land, S.R.; Srinivas, H. Land, Harish Srinivas, Estrogen Receptor β Functions through Nongenomic Mechanisms in Lung Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* **2009**, *23*, 146–156. [[CrossRef](#)]
45. Prabavathy, D.; Swarnalatha, Y.; Ramadoss, N. Lung cancer stem cells-origin, characteristics and therapy. *Stem Cell Investig.* **2018**, *5*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chakraborty, S.; Ganti, A.K.; Marr, A.; Batra, S.K. Lung cancer in women: Role of estrogens. *Expert Rev. Respir. Med.* **2010**, *4*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Henschke, C.I.; Miettinen, O.S. Women’s susceptibility to tobacco carcinogens. *Lung Cancer* **2004**, *43*, 1–5. [[CrossRef](#)]
48. Liang, H.; Pan, Z.; Cai, X.; Wang, W.; Guo, C.; He, J.; Chen, Y.; Liu, Z.; Wang, B.; He, J.; et al. AME Lung Cancer Cooperative Group. The association between human papillomavirus presence and epidermal growth factor receptor mutations in Asian patients with non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **2018**, *7*, 397–403. [[CrossRef](#)]
49. Kanwal, M.; Ding, X.J.; Cao, Y. Familial risk for lung cancer. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 535–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bain, C.; Feskanich, D.; Speizer, F.E.; Thun, M.; Hertzmark, E.; Rosner, B.A.; Colditz, G.A. Lung cancer rates in men and women with comparable histories of smoking. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 826–834. [[CrossRef](#)]
51. Mollerup, S.; Ryberg, D.; Hewer, A.; Phillips, D.H.; Haugen, A. Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3317–3320.
52. Kligerman, S.; White, C. Epidemiology of lung cancer in women: Risk factors, survival, and screening. *Am. J. Roentgenol.* **2011**, *196*, 287–295. [[CrossRef](#)]
53. Sun, S.; Schiller, J.H.; Gazdar, A.F. Lung cancer in never smokers—A different disease. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 778–790. [[CrossRef](#)]
54. Mollerup, S.; Jorgensen, K.; Berge, G.; Haugen, A. Expression of estrogen receptors α and β in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer* **2002**, *37*, 153–159. [[CrossRef](#)]
55. Thomas, L.; Doyle, L.A.; Edelman, M.J. Lung cancer in women: Emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest* **2005**, *128*, 370–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kalita, K.; Lewandowski, S.; Skrzypczak, M.; Szymczak, S.; Tkaczyk, M.; Kaczmarek, L. *Receptory Strogenowe, Receptory i Mechanizmy Przekazywania Sygnału*; PWN: Warszawa, Poland, 2004; pp. 604–616.
57. Anstead, G.M.; Carlson, K.E.; Katzenellenbogen, J.A. The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **1997**, *62*, 268–303. [[CrossRef](#)]
58. Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Häggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **1997**, *138*, 863–870. [[CrossRef](#)]
59. Sampson, J.N.; Falk, R.T.; Schairer, C.; Moore, S.C.; Fuhrman, B.J.; Dallal, C.M.; Bauer, D.C.; Dorgan, J.F.; Shu, X.O.; Zheng, W.; et al. Association of Estrogen Metabolism with Breast Cancer Risk in Different Cohorts of Postmenopausal Women. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 918–925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

60. Fuhrman, B.J.; Xu, X.; Falk, R.T.; Dallal, C.M.; Veenstra, T.D.; Keefer, L.K.; Graubard, B.I.; Brinton, L.A.; Ziegler, R.G.; Gierach, G.L. Assay reproducibility and interindividual variation for 15 serum estrogens and estrogen metabolites measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 2649–2657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Xu, X.; Roman, J.M.; Issaq, H.J.; Keefer, L.K.; Veenstra, T.D.; Ziegler, R.G. Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7813–7821. [[CrossRef](#)]
62. Xu, X.; Keefer, L.K.; Ziegler, R.G.; Veenstra, T.D. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitative analysis of urinary endogenous estrogen metabolites. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1350–1355. [[CrossRef](#)]
63. Konieczna, L.; Belka, M.; Okońska, M.; Pyszka, M.; Bączek, T. New 3D-printed sorbent for extraction of steroids from human plasma preceding LC–MS analysis. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1545*, 1–11. [[CrossRef](#)]
64. Belka, M.; Konieczna, L.; Okońska, M.; Pyszka, M.; Ulenberg, S.; Bączek, T. Application of 3D-printed scabbard-like sorbent for sample preparation in bioanalysis expanded to 96-wellplate high-throughput format. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1081*, 1–5. [[CrossRef](#)]
65. He, J.; Liu, Z.; Ren, L.; Liu, Y.; Dou, P.; Qian, K.; Chen, H.Y. On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules. *Talanta* **2010**, *82*, 270–276. [[CrossRef](#)]
66. Kang, J.S.; Jung, N.J.; Kim, S.; Kim, D.J.; Jang, D.D.; Yang, K.H. Downregulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats. *Exp. Oncol.* **2004**, *26*, 31–35.
67. Corcoran, M.P.; Lichtenstein, A.H.; Meydani, M.; Dillard, A.; Schaefer, E.J.; Lamon-Fava, S. The effect of 17 β -estradiol on cholesterol content in human macrophages is influenced by the lipoprotein milieu. *J. Mol. Endocrinol.* **2011**, *47*, 109–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Price, R.H., Jr.; Handa, R.J. Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat. *Neurosci. Lett.* **2000**, *288*, 115–118. [[CrossRef](#)]
69. Cui, J.; Shen, Y.; Li, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 197–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Hewitt, S.C.; Winuthayanon, W.; Korach, K.S. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J. Mol. Endocrinol.* **2016**, *56*, 55–71.
71. Schulster, M.; Bernie, A.M.; Ramasamy, R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J. Androl.* **2016**, *18*, 435–440.
72. Van Pelt, R.E.; Gavin, K.M.; Kohrt, W.M. Regulation of Body Composition and Bioenergetics by Estrogens. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2015**, *44*, 663–676. [[CrossRef](#)]
73. Yaşar, P.; Ayaz, G.; User, S.D.; Güpür, G.; Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* **2016**, *16*, 4–20. [[CrossRef](#)]
74. Mukhopadhyay, T.; Roth, J.A. Induction of apoptosis in human lung cancer cells after wild-type p53 activation by methoxyestradiol. *Oncogene* **1997**, *14*, 379–384. [[CrossRef](#)]
75. LaVallee, T.M.; Zhan, X.H.; Herbstritt, C.J.; Kough, E.C.; Green, S.J.; Pribluda, V.S. 2-Methoxyestradiol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis Independently of Estrogen Receptors α and β . *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3691–3697.
76. Schumacher, G. *2-Methoxyestradiol als Neue Substanz zur Behandlung Solider Tumore*; Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu: Berlin, Germany, 2004; pp. 1–109.
77. Marino, M.; Galluzo, P.; Ascenzi, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genom.* **2006**, *7*, 497–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Miao, S.; Yang, F.; Wang, Y.; Shao, C.; Zava, D.T.; Ding, Q.; Shi, Y.E. 4-Hydroxy estrogen metabolite, causing genomic instability by attenuating the function of spindle-assembly checkpoint, can serve as a biomarker for breast cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 4992–5007. [[PubMed](#)]
79. Peng, J.; Meireles, S.I.; Xu, X.; Smith, W.E.; Slifker, M.J.; Riel, S.L.; Zhai, S.; Zhang, G.; Ma, X.; Kurzer, M.S.; et al. Estrogen metabolism in the human lung: Impact of tumorigenesis, smoke, sex and race/ethnicity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 106778–106789. [[CrossRef](#)]
80. Schwartz, A.G.; Prysak, G.M.; Murphy, V.; Lonardo, F.; Pass, H.; Schwartz, J.; Brooks, S. Nuclear Estrogen Receptor β in Lung Cancer: Expression and Survival Differences by Sex. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7280–7287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Pietras, R.J.; Márquez-Garbán, D.C. Membrane-Associated Estrogen Receptor Signaling Pathways in Human Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4672–4676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wu, K.L.; Tsai, Y.M.; Lien, C.T.; Kuo, P.L.; Hung, A.J. The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Bishop, J.A.; Benjamin, H.; Cholakh, H.; Chajut, A.; Clark, D.P.; Westra, W.H. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 610–619. [[CrossRef](#)]
84. Lebanony, D.; Benjamin, H.; Gilad, S.; Ezagouri, M.; Dov, A.; Ashkenazi, K.; Gefen, N.; Izraeli, S.; Rechavi, G.; Pass, H. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2030–2037. [[CrossRef](#)]
85. Lujambio, A.; Ropero, S.; Ballestar, E.; Fraga, M.F.; Cerrato, C.; Setien, F.; Casado, S.; Suarez-Gauthier, A.; Sanchez-Cespedes, M.; Git, A. eGenetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1424–1429. [[CrossRef](#)]

86. Zhang, Y.K.; Zhu, W.Y.; He, J.Y.; Chen, D.D.; Huang, Y.Y.; Le, H.B.; Liu, X.G. miRNAs expression profiling to distinguish lung squamous-cell carcinoma from adenocarcinoma subtypes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2012**, *138*, 1641–1650. [[CrossRef](#)]
87. Nishikawa, E.; Osada, H.; Okazaki, Y.; Arima, C.; Tomida, S.; Tatematsu, Y.; Taguchi, A.; Shimada, Y.; Yanagisawa, K.; Yatabe, Y. miR-375 Is Activated by ASH1 and Inhibits YAP1 in a Lineage-Dependent Manner in Lung Cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6165–6173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Demes, M.; Aszyk, C.; Bartsch, H.; Schirren, J.; Fisseler-Eckhoff, A. Differential miRNA-Expression as an Adjunctive Diagnostic Tool in Neuroendocrine Tumors of the Lung. *Cancers* **2016**, *8*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Nadal, E.; Zhong, J.; Lin, J.; Reddy, R.M.; Ramnath, N.; Orringer, M.B.; Chang, A.C.; Beer, D.G.; Chen, G. A MicroRNA Cluster at 14q32 Drives Aggressive Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3107–3117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Niikawa, H.; Suzuki, T.; Miki, Y.; Suzuki, S.; Nagasaki, S.; Akahira, J.; Honma, S.; Evans, D.B.; Hayash, S.; Kondo, T. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4417–4426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Kriegsmann, K.; Zgorzelski, C.; Muley, T.; Christopoulos, P.; von Winterfeld, M.; Herpel, E.; Goepfert, B.; Mechtersheimer, G.; Sinn, P.; Stenzinger, A.; et al. Immunohistological expression of oestrogen receptor, progesterone receptor, mammaglobin, human epidermal growth factor receptor 2 and GATA-binding protein 3 in non-small-cell lung cancer. *Histopathology* **2020**, *77*, 900–914. [[CrossRef](#)]
92. Huang, Q.; Zhang, Z.; Liao, Y. 17 β -estradiol upregulates IL6 expression through the ER β pathway to promote lung adenocarcinoma progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 133. [[CrossRef](#)]
93. Gao, X.; Cai, Y.; Wang, Z.; He, W.; Cao, S.; Xu, R.; Chen, H. Estrogen receptors promote NSCLC progression by modulating the membrane receptor signaling network: A systems biology perspective. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 308. [[CrossRef](#)]
94. Rodriguez-Lara, V.; Hernandez-Martinez, J.M.; Arrieta, O. Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 482–497. [[CrossRef](#)]
95. Smida, T.; Bruno, T.C.; Stabile, L.P. Influence of Estrogen on the NSCLC Microenvironment: A Comprehensive Picture and Clinical Implications. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 137. [[CrossRef](#)]
96. Koutras, A.; Giannopoulou, E.; Kritikou, I. Antiproliferative effect of exemestane in lung cancer cells. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 109. [[CrossRef](#)]
97. Wang, L.J.; Li, J.; Hao, F.R. Dexamethasone suppresses the growth of human non-small cell lung cancer via inducing estrogen sulfotransferase and inactivating estrogen. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 845–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Tang, H.; Liao, Y.; Zhang, C. Fulvestrant-mediated inhibition of estrogen receptor signaling slows lung cancer progression. *Oncol. Res.* **2014**, *22*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Study Evaluating the Addition of Fulvestrant to Erlotinib in Stage IIIB/IV Non-Small Cell Lung Cancer. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00592007?term=estrogen&rslt=With&cond=Lung+Cancer&draw=2&rank=1> (accessed on 20 December 2020).
100. Fulvestrant and Anastrozole as Consolidation Therapy in Postmenopausal Women with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00932152?term=estrogen&rslt=With&cond=Lung+Cancer&draw=2&rank=2> (accessed on 20 December 2020).
101. Alisertib in Adults With Nonhematological Malignancies, Followed by Alisertib in Lung, Breast, Head and Neck or Gastroesophageal Malignancies. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01045421?term=estrogen&rslt=With&cond=Lung+Cancer&draw=2&rank=5> (accessed on 20 December 2020).



Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer

Claudia Musial^a, Narcyz Knap^a, Renata Zaucha^b, Paulina Bastian^a, Giampaolo Barone^c, Giosuè Lo Bosco^{d,e}, Fabrizio Lo-Celso^f, Lucyna Konieczna^g, Mariusz Belka^g, Tomasz Bączek^g, Antonella Marino Gammazza^h, Alicja Kuban-Jankowska^a, Francesco Cappello^{e,h}, Stephan Nussbergerⁱ, Magdalena Gorska-Ponikowska^{a,c,e,i,*}

^a Department of Medical Chemistry, Medical University of Gdansk, Debinki 1, 80-211, Gdansk, Poland

^b Department of Clinical Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdansk, 80-214, Gdansk, Poland

^c Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo, 90128, Palermo, Italy

^d Department of Mathematics and Computer Science, University of Palermo, 90133, Palermo, Italy

^e Euro-Mediterranean Institute of Science and Technology, 90139, Palermo, Italy

^f Department of Physics and Chemistry 'Emilio Segrè', University of Palermo, 90128, Palermo, Italy

^g Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdansk, 80-416, Gdansk, Poland

^h Department of Biomedicine, Neuroscience and Advanced Diagnostics, University of Palermo, 90127, Palermo, Italy

ⁱ Department of Biophysics, Institute of Biomaterials and Biomolecular Systems, University of Stuttgart, 70569, Stuttgart, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Lung cancer
Lung adenocarcinoma
Non-small cell lung cancer
2-Methoxyestradiol
Estrogen metabolites
Biomarker
Blood serum
Molecular modeling
electrophilic potential

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most common cancers worldwide, causing nearly one million deaths each year. Herein, we present the effect of 2-methoxyestradiol (2-ME), the endogenous metabolite of 17 β -estradiol (E2), on non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. We observed that 2-ME reduced the viability of lung adenocarcinoma in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) spheroidal A549 cell culture models. Molecular modeling was carried out aiming to visualize amino acid residues within binding pockets of the acyl-protein thioesterases, namely 1 (APT1) and 2 (APT2), and thus to identify which ones were more likely involved in the interaction with 2-ME.

Our findings suggest that 2-ME acts as an APT1 inhibitor enhancing protein palmitoylation and oxidative stress phenomena in the lung cancer cell. In order to support our data, metabolomics of blood serum from NSCLC patients was also performed. Moreover, computational analysis suggests that 2-ME as compared to other estrogen metabolism intermediates is relatively safe in terms of its possible non-receptor bioactivity within healthy human cells due to a very low electrophilic potential and hence no substantial risk of spontaneous covalent modification of biologically protective nucleophiles.

We propose that 2-ME can be used as a selective tumor biomarker in the course of certain types of lung cancers and possibly as a therapeutic adjuvant or neoadjuvant.

1. Introduction

Estrogens are enzymatically synthesized from cholesterol. 17 β -estradiol (E2) and estrone (E1) are formed by aromatase from testosterone and androstendione, respectively [1]. Their metabolites are being formed in target tissues, and may be either biologically active or inactive. First, E1 and E2 undergo cytochrome CYP450-mediated hydroxylation into their 2, 4, and 16-hydroxy-derivatives. Subsequently, they

are metabolized by catechol-O-methyltransferase to their methoxy-derivatives (2-OMEs) [1].

2-Methoxyestradiol (2-ME) is a major metabolite of E2. Interestingly, in contrast to its parent compound, it has potent anticancer and anti-angiogenic activity as confirmed in several *in vitro* and *in vivo* studies [2–7,58]. In our previous research we have established that 2-ME might be potentially used as an effective anticancer agent in therapy of osteosarcoma, neuroblastoma and possibly other solid tumors [6–8]. The

* Corresponding author. Department of Medical Chemistry, Medical University of Gdansk, Debinki 1, 80-211, Gdansk, Poland.

E-mail address: magdalena.gorska-ponikowska@gumed.edu.pl (M. Gorska-Ponikowska).

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102395>

Received 11 May 2022; Received in revised form 15 June 2022; Accepted 2 July 2022

Available online 8 July 2022

2213-2317/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

therapeutic efficacy of 2-ME (trade name Panzem) has been documented in Phase I and II clinical trials for the treatment of advanced kidney, prostate, ovarian and carcinoid cancers [4,9–17].

In addition, *in vitro* studies have confirmed the antitumor potential of 2-ME in the treatment of breast, colon and lung cancer [18–29]. However, 2-ME did not enter Phase III clinical trials due to the low bioavailability upon oral administration. Therefore, new derivatives and drug formulations of 2-ME are being developed in numerous studies and also by our team.

Despite numerous studies, the detailed mode of anticancer action of 2-ME has not yet been fully elucidated. Previously, we have evidenced that from the mechanistic point of view 2-ME induces the expression and nuclear translocation of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) leading to local nitro-oxidative stress and DNA damage, which ultimately results in death of actively dividing cells or carcinogenesis [2, 20]. We have further proved that 2-ME at both physiological and pharmacological concentrations induces mitochondrial fission and mitophagy resulting in BAX activation and osteosarcoma cell death [21].

In our present study we focused on a possible 2-ME-mediated regulation of protein S-palmitoylation as one of the plausible mechanisms of 2-ME anticancer activity. Protein S-palmitoylation is a reversible post-translational modification of protein molecules which alters the localization, stability, and function of hundreds of proteins in the cell [22]. S-palmitoylation is essential for the function of both oncogenes (e.g., NRAS and EGFR) and tumor suppressors (e.g., SCRIB, melanocortin 1 receptor) [23]. In mammalian cells, the removal of palmitate residue is catalyzed by serine hydrolases, including acyl-protein thioesterases (APTs). These enzymes modulate the function of critical oncogenes and tumor suppressors, and often display altered expression patterns in cancer [24].

Notably, targeting S-palmitoylation or the enzymes involved in cellular palmitoylation dynamics may therefore be considered as a potential therapeutic strategy in various types of cancer. Our research has demonstrated that S-palmitoylation serves as a molecular switch regulating the BCL-2-associated X (BAX) trafficking to mitochondria and consequently inducing apoptosis [25]. APT enzymes are soluble, mostly localized in the cytoplasm, and play active roles in maintaining the directional palmitoylation cycle which seems to be of critical importance for the peripheral membrane protein trafficking [25]. However, up to date, a potential role of palmitoylation in the lung cancer has not been established.

Herein, we have focused on lung cancer, as one of the most common causes of cancer-related deaths worldwide [26]. According to the literature, less than half of the reported deaths concern women. This suggests that lung cancer is a far more common cause of female mortality than breast cancer, ovarian cancer, or uterine cancer. As far as the histological characteristic is concerned, lung cancer is typically divided into the small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) which can be specifically further subdivided into adenocarcinoma, large cell carcinoma and squamous cell carcinoma [26].

The available data indicate that estrogen receptors (ERs) are expressed in NSCLC cells via both genomic and non-genomic mechanisms. Nevertheless, the role of ERs in the etiopathogenesis as well as progression and prognosis for NSCLC patients is under discussion, and more in-depth research is still necessary. Importantly, certain studies indicate that high expression of the estrogen alpha (ER α) receptors, as well as the estrogen beta (ER β) receptor are valuable prognostic markers for the lung cancer patients [27,28].

Researchers point out that cellular processes of critical importance like the induction of NSCLC cell proliferation as well as apoptosis, migration and cancer cell invasion can be mediated via ERs. A number of studies show that women suffering from NSCLC have much more promising results in the course of chemotherapy than men with comparable progression of the disease. This observation suggests that cancer responsiveness to treatment and consequently the prognosis is

dependent on sex hormones profile. However, it should be emphasized that hormone replacement therapy in NSCLC women, increases the overall mortality [29]. Moreover, it is important to mention that estrogens have been proved to activate proliferation of the lung cancer cells derived from female patients [30].

Clinical diagnosis of the disease at the earliest possible stage is obviously correlating with an increase in the survival rate [24]. Thus, it is so important to search for novel and easily detectable biomarkers of the disease which may help to predict the risk of cancer development or monitor the course of the disease and specifically, cancer responsiveness to therapy [31].

Based on both *in vitro* studies and clinical analyses, we propose that 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation seems to be a physiological anticancer protection mechanism, and that 2-ME should be seriously considered as a useful clinical biomarker or a potential therapeutic in patients suffering from NSCLC.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

A549 cell line (ATCC® CCL-185™) was kindly offered by the University of Rzeszów, Poland. 2-methoxyestradiol, 2-hydroxyestradiol, supplements and cell culture media were obtained from Sigma Aldrich. Palmostatin B was purchased from Merck Millipore (178501).

The laboratory equipment used at the Department of Medical Chemistry, Medical University of Gdańsk, in order to process blood samples from patients and the control group was bought from Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.2. Cell culture

The A549 two-dimensional cell line were cultured in Nutrient Mixture F-12 Ham medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 μ g/mL penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine (GlutaMAX™). All cells tested negative for mycoplasma and were cultured sequentially. The culture was maintained at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Cell culture density was kept at the maximum of 1×10^4 cells/mL. At least every two days, medium was replaced with the fresh one, and the cells were counted and reseeded to maintain the recommended density.

Before starting experimental procedures, the optimal cell density was determined by sequentially seeding the cells at different concentrations. Next, cellular confluency analysis within 96-well microplates was performed with CytoSMART® Omni apparatus (Omni, CytoSMART; Eindhoven, The Netherlands) allowing for visualization of each and every well. Cell confluence at the beginning of each experiment was ca. 70% which guarantees accuracy and comparability of the obtained results. Importantly, the cells were never taken out of the incubator in order to eliminate a potential thermal shock effect. All samples were monitored in real time with a series of measurements performed at selected time points.

Wild-type human lung epithelial carcinoma, A549 cell line as 3D cell culture spheroids were obtained by plating cells with an average density of 8000 cells/cm² in 96-well U-bottom and V-bottom Lipidure® cell culture plates (Amsbio, Abingdon, United Kingdom) coated with phosphorylcholine which is naturally found in cell membranes. Spheroids were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12 Medium, Sigma-Aldrich®), supplemented with 10% FBS, 100 μ g/mL penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine (GlutaMAX™). Spheroids were maintained in culture medium and passaged at 70% confluence.

2.3. Experimental design – doses and time of incubation

The experimental conditions, such as time and doses, were primarily

established based on our previous research [32–34]. The conditions were subsequently optimized according to lung cancer A549 cell line.

2.4. Cell viability assay (MTT and WST-1 assays)

The analysis was performed as previously described [25,26]. Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 1×10^4 cells/well and incubated in Nutrient Mixture F-12 Ham medium supplemented with FBS, antibiotics (penicillin/streptomycin) and amino acid (L-glutamine) at 37 °C for 24 h. After 24-h incubation, cells were treated with estrogen metabolites at various concentrations. Subsequently, after 24-h incubation, the solution of 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added onto the 96-well plates. Then the plates were incubated at 37 °C for 2–4 h and 100 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to each well on each microplate, and mixed thoroughly on a rocker shaker to dissolve dark blue crystals, which are clearly visible and marked under the microscope. The absorbance was read using a microplate (ELISA) reader at 540 nm wavelength. The experiments were conducted at least three times.

For the 3D culture of A549 cells, WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) assay was performed. The assay is based on the cleavage of tetrazoline salt into formazan. This process is mediated by cellular mitochondrial dehydrogenases. The WST-1 assay was specifically selected for the 3D models of A549 cells as it does not involve additional steps such as washing, harvesting, or solubilizing the spheroidal models. A549 cells were plated at a concentration of 8000 cells/cm² in a 96-well U-bottom and V-bottom Lipidure® cell culture plates (Amsbio, Abingdon, United Kingdom). Cells were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO₂. Sub Next, 10 μ L/well of Cell Proliferation Reagent WST-1 was added and the samples were incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. Then plates were put on a shaker for 1 min. The absorbance of the samples was taken against the background of the control as blank, using a microplate (ELISA) reader. According to manufacturer's protocol, the wavelength for measuring absorbance of the formazan product is between 420 and 480 nm. The experiments were conducted at least three times.

The data from the *in vitro* cell culture experiments were presented as the mean percentage (\pm SE) of at least three replicates of each study. Cytotoxicity was defined as the percentage of viable cells that remain after treatment with estrogen metabolite compounds. Response curves were determined using GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.5. Viability assessment of A549 cell line after treatment with 2-ME

Fluorescent staining allows to visualize cells during a period of cell death at the phase of late necrosis when the cytoplasmic membrane permeability has increased enough. Fluorescence amplification is directly caused by PI intercalation with double-stranded DNA. Microscopic images were acquired using the CytoSMART Lux3 fluorescence microscope (Lux 3, CytoSMART, Eindhoven, The Netherlands).

2.6. Molecular modeling

The structure of APT1 and APT2 proteins were taken from the Protein Data Bank with PDB ids of 5SYM and 5SYN, respectively. The missing eight initial amino acid residues were reconstructed using the MODELLER software package [35,36]. The structures of 2-ME complexes with APT1 and APT2 were first modeled through molecular docking calculations, using the Autodock Vina package [37]. The docking box, based on the ligand size and shape, was determined by Autodock Tools [27]. Two model complexed structures were selected for each of the binding complexes and molecular dynamics (MD) simulations were performed as previously reported [7,38,39].

MD simulations were performed using the AMBER99SB-ILDN force field [40] for the protein as implemented in the GROMACS 2020.2

software package [41]. The simulations for various systems were performed using a cubic box of NaCl 150 mM in explicit TIP3P water solution. Periodic boundary conditions were applied. The force field parameter files and initial configuration for the protein were created by GROMACS utilities programs. The force field parameters of 2-ME have been derived from the Merck Molecular ForceField (MMFF), with van der Waals parameters taken from the closest atom type in CHARMM22, through the SwissParam web interface [42]. The equilibration procedure was performed in several steps, starting from an NVT simulation at 300 K with the protein heavy atom positions restrained to equilibrate the solvent around it, followed by a NPT run at 300 K and the pressure at 1 bar, for a 10-ns run. After the equilibration phase, the system was run for at least 400 ns for an NVT production run; the trajectory was saved at a frequency of 10 ps to evaluate dynamical and structural properties. The simulations were always checked versus the root mean square displacement (RMSD) and the energy profile. During the production runs a velocity rescaling thermostat [43] was used for the temperature coupling, with a time coupling constant of 0.1 ps. A Parrinello–Rahman barostat [44] was used for the pressure coupling, with relaxation constant of 1 ps. The equations of motion were integrated through the Leap-Frog algorithm, using a 2 fs time step. The values of cut-offs of the Lennard-Jones and real space part of the Coulombic interactions were set to 10 Å. The Particle Mesh Ewald (PME) summation method [45–49] was used to evaluate the electrostatic interactions, with an interpolation order of 4 and 0.16 nm of FFT grid spacing.

The 2-ME/APT1 and 2-ME/APT2 complexes shown in Fig. 5 have been selected by clustering analysis [33,34] performed using the g_cluster tool implemented in GROMACS package, and following the method previously described [50]. Protein-ligand interactions were found by using the PLIP service [51]. Protein pictures and manipulation were done using Maestro [Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018, version 11.6.010] and Chimera [52].

2.7. Identification of reactive oxygen species (ROS) signal in 2-ME-treated A549 cells

Intracellular level of ROS was assessed by means of a fluorescence test. The ROS-Glo™ H2O2 Assay from Promega (Mannheim, Germany) was performed in accordance with the manufacturer's instructions. A549 cells were seeded at the density of 10,000 cells/well in a 96-well white cell culture plate with 100 μ L of F12 Ham and 10% FBS.

The level of ROS was also measured in the treated cells, control cells, medium alone as well as in the medium with 2-ME without A549 cells according to the experimental design.

The plate was returned to the incubator for 6 h. Subsequently, 100 μ L ROS-Glo™ signal detection solution was added to all the wells. The plate was further incubated for 20 min at room temperature, and the luminescence was recorded with the Promega GloMax® Discover luminometer (Mannheim, Germany). Statistical analysis was performed with GraphPad version 9 using the TTEST function (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

The selected concentrations were chosen as representative ones. The use of the ROS-Glo™ Detection Solution allowed for the conversion of a precursor compound to luciferin as well as for the administration of luciferase.

2.8. Study group

This study was approved by the Independent Bioethical Committee for Scientific Research at the Medical University of Gdańsk with the approval number of 666. The study population comprised fully consented patients with newly diagnosed lung adenocarcinoma and healthy volunteers. A written informed consent was obtained from each participant before any study-related procedures were taken. In order to objectively assess a potential correlation between the analyzed factors and clinical results, the study group was narrowed to only patients

presenting with the newly diagnosed lung adenocarcinoma. Adult patients at the age 18 years with newly diagnosed, histologically confirmed lung adenocarcinoma (all stages; TNM classification) were eligible for inclusion. The control group consisted of healthy volunteers. Patients with other histological subtypes and those who have already received oncological treatment such as chemotherapy, radiochemotherapy, surgery, immunotherapy or molecularly targeted therapies were excluded from the study. Exclusion criteria also comprised acute and chronic inflammatory diseases, asthma, allergies, autoimmune diseases, hormone replacement therapy, hormonal contraception, endocrinopathies, chronic steroid use, kidney failure, heart failure, and other malignancies (excluding radically treated early cervical cancer and early skin cancer) potentially affecting the lungs or function of the endocrine system. Analysis of the level of steroid hormones and the level of nitro-oxidative stress in the serum and urine from patients in both study and control groups were performed. In our study, the control group was comprised of healthy volunteers.

2.8.1. The human subjects

The study group included ten female patients, at the median age of 66 years (range 42–86 years) with newly diagnosed medically inoperable, histologically proven lung adenocarcinoma, poorly differentiated in 5 of 10 patients.

We took into account a number of patients with lung cancer - G2 invasive squamous cell carcinoma with phenotype: TTF1-, p40 +, adenocarcinoma TTF1 +, p63-, adenocarcinoma infiltrants predominantly acinar, non-small cell carcinoma with phenotype: p40 +, TTF1 +, CK- 7+, CK 20+ and: low-differentiated squamous cell carcinoma, PDL1 <3%, p63 +, TTF1-, p40 +, EBER- and small groups of low-differentiated lung adenocarcinoma cells with the phenotype: CK AE1/3 +, TTF1 +, p63. All patients underwent radiological assessments (computed tomography (CT), 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (PET/CT), and magnetic resonance of the brain (MR)) under the institutional standard of care. There were two patients without regional lymph node (LN) involvement (stage T2N0M0), two patients with hilar LN involvement (N1), two patients with mediastinal LN metastases (N2), and four patients with proven distant metastases (T2-4N2-3M1; liver, brain, bones). Comorbidities included chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 5 of 10 patients, diabetes in one of 10 patients, and hypertension in 6 of 10 patients. Two patients were actively smoking at study entry, while all others had a history of smoking – 1.5 to 60-packyears of smoking, median 40-packyears. There was no history of hormone replacement therapy in the whole group. Cancer family history included lung cancer in one patient and breast cancer in another patient. The control group consisted of 10 cancer-free, healthy non-smoker women aged 25 to 65 (median age of 45).

2.8.2. Taking blood serum samples from study participants

Blood samples were collected by qualified medical personnel under careful supervision of the attending physician. On the same day, the obtained material was transported to the Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdansk and stored under deep freezing conditions at –80 °C until LC-MS/MS analysis.

In order to improve detection, the tested estrogens and their derivatives were subjected to dehydration process, which resulted in an increase in the molecular weight of the monitored ions. As a result, their identification by the mass detector was enhanced, thereby improving the sensitivity of the method, since the analyte signal was increased at the expense of reduced noise signals. The result was a low pg LOD value. The properties of hydroxyl derivatives were also changed from hydrophilic to lipophilic, which enabled the use of a C18 column and perfect separation of the analytes to be determined in reverse phase. Derivatization was performed in a pre-column mode using dansyl chloride as the derating reagent. Due to the short duration of derivatization and mild conditions (30 s, room temperature), it differs from other reagents previously used in the literature. The advantage of the dansyl chloride

used in the present work is also easy availability on the market and relatively low cost. Prior to its use, derivatized analytes can be concentrated using, for example, an SPME extraction method. Derivative compounds for the purposes of this project were isolated from the biological matrix using the liquid-liquid extraction technique with the use of an organic solvent - dichloromethane.

Using the optimized and validated LC-MS/MS method, it is possible to determine 13 analytes: estrogens and their hydroxy and methoxy derivatives within 55 min. Obtaining a satisfactory separation of 13 structurally very similar compounds required the use of a very sensitive apparatus - a tandem mass spectrometer with a triple quadrupole analyzer, and the signals were recorded in the MRM post-reaction mode.

The first quadrupole Q1 captures the parent (quasi-molecular) ion m/z appropriate for each analyzed compound, which then enters the Q2 collision chamber. After triggering a collision, the ions fragment and are filtered through the third quadrupole. Each analyte was identified and determined by monitoring the appropriate ion transitions in the MRM follow-up monitoring mode.

Patient samples were analyzed by the proposed LC-MS/MS method in random order to avoid bias.

2.9. Estrogens analysis in blood serum

Whole blood samples were collected in a test tube containing an activator at the Department of Clinical Oncology and Radiotherapy of the University Clinical Center in Gdańsk. In the Department of Medical Chemistry, patients' blood samples were centrifuged for 10 min at 2000–3000 rpm. Subsequently, the obtained serum (supernatant) was transferred to new tubes. During the centrifugation process, the blood clots were removed. Tubes that could not be analyzed immediately were frozen at –80 °C according to the standard protocol. The amount of serum obtained from patients' whole blood depended on the individual hydration status as well as the amount of blood collected in the clinic.

500 μ L of blood serum samples were transferred into a 10-mL threaded glass tube. Next, 4 mL of dichloromethane was added, the samples were screwed with caps and placed onto a rotary shaker set at 40 rpm for 30 min. After that, the organic layer was collected and transferred into another glass tube. Then 10 μ L of radiolabeled estrogen derivatives with concentration of 1 μ g/mL were added and mixed on a single point shaker for 30 s. The prepared sample was placed in a vacuum concentrator at 30 °C and evaporated to dryness within 40 min. The next step was to carry out the derivatization process of the analytes, and hence 100 μ L of 0.1 M sodium bicarbonate buffer pH 9.0 and 100 μ L of dansyl chloride with the concentration of 1 mg/ml as dissolved in acetone was used as an analogous reagent. The content of the tube was mixed for 30 s on a single point shaker and transferred into a 500 μ L Eppendorf vial, and placed in microtitre plate shaker incubator (shaking heating block), where the samples were heated and mixed simultaneously at a temperature 60°C for 5 minutes. The next step was centrifugation at 8000 rpm for 5 min. and 100 μ L of the sample prepared in this way, was transferred into a glass insert of of 200 μ L volume, which was then placed in an autosampler and subjected to LC-MS/MS analysis under the conditions described below.

2.10. Determination of estrogens and their derivatives in human blood serum by LC-MS/MS technique

After carrying out the derivatization process, estrogens and their derivatives were determined by liquid chromatography technique coupled with tandem mass detection - LC-MS/MS using the LC-MS-8050 model from Shimadzu (Japan). The mass spectrometer was equipped with an electrospray (ESI) ion source and an MS/MS triple quadrupole analyzer. The estrogens were separated on a C18 core-shell column called Poroshell 120, measuring 100 \times 3.0 mm; 2.7 μ m, reversed phase (RP). A gradient elution was used in the process (Table 1). The mobile phase A consisted of ultrapure water with 0.1% formic acid, while phase

Table 1
Gradient elution conditions.

time, min	% share of phase B
0 → 45	72 → 87
45 → 47	87 → 100
47 → 48	100 → 72
48 → 55	72

B was methanol.

The optimized conditions for the analytical separation of estrogens and their derivatives by LC-MS/MS were as follows:

- sample volume dosed into the column: 3 μ L
- total time of a single analysis: 55 min
- volumetric flow rate of the mobile phase over time: 0.3 mL/min
- column thermostating temperature: 40 °C
- temperature within the autosampler chamber: 4 °C
- MS operating mode: positive
- ESI ion source temperature: 300 °C
- temperature of the heating block: 400 °C
- volumetric flow rate of heating gas (nitrogen) per unit time: 10 L/min.
- volumetric speed of drying gas (nitrogen) flow per time unit: 10 L/min.
- volumetric flow velocity of nebulizing (scattering) gas per time unit: 3 L/min.
- temperature of the desolvation line (DL): 250 °C
- voltage applied to the capillary: 3 kV

The developed analytical method was statistically evaluated in terms of specificity, linearity, LOD and LOQ. The specificity was examined by comparing the chromatogram obtained from the sample without standard addition (blank) with the chromatogram of the sample enriched with the standard solutions of estrogens and their derivatives. The lack of interference of the peaks of endogenous substances from the biological matrix with the peaks of the analyzed estrogens confirmed the specificity of the method. The linearity of the methods within the concentration range from 0.1 ng/mL to 50 ng/mL was confirmed on the basis of plotting a directly proportional relationship between nominal analyte concentrations and the ratio of the area under the peak of the test substance to the area of the internal standard peak. Then, the regression equations were calculated using the least squares method, and the numerical values of the determination coefficient R^2 close to the value of 1 are a measure of the degree of correlation of the variables. The limit of quantification was calculated from the signal-to-noise ratio ($S/N = 3$).

2.11. Computational chemistry analysis of potential non-receptor bioactivity of 2-ME

Computer analysis was performed by computational chemistry methods of possible non-receptor bioactivity of 2-ME as compared to other natural estradiol metabolites in terms of drug safety in the context of potential induction of oxidative stress and/or DNA damage.

Molecular modeling and optimization of the geometry of 17- β estradiol derivatives were performed in the Gaussian 09 program (revision D.01) made available on high-performance computing clusters as part of a grant from the PLGrid academic supercomputer network using quantum-mechanical methods, including the Hartree-Fock (RHF) computational method and density functional theory (DFT).

The optimization of the geometric structure and energy parameters of the studied molecules was performed at the level of the B3LYP density functional with a functional base of 6–31G (d), based on the Koopmans theorem [53] in terms of the density functional theory according to Kohn and Sham [54] using the method described by Parr [55]. The

potential reactivity with weak nucleophiles of cytoprotective importance and the tendency to form adducts with DNA nucleophilic amino groups were estimated by calculating the electrophilic potential of estradiol derivatives, including 17- β estradiol, 2-hydroxyestradiol, 2-methoxyestradiol (2-ME), 2,3-estradiol-ortho-benzoquinone and its methine isomer, as well as 4-hydroxyestradiol, 4-methoxyestradiol (4-ME), estradiol-3,4-ortho-benzoquinone, and analogous estrone derivatives. Lipophilicity and polar surface area of estradiol metabolites was evaluated using MarvinSketch 20.21 by ChemAxon (Academic License).

2.12. Statistical analysis

2.12.1. Statistical analysis of *in vitro* studies

Data were presented as the mean values (\pm SE) from at least three independent experiments. Data were analyzed performing one-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparison test; *significantly different at $p < 0.01$ versus the control. A representative experiment out of three performed is shown with GraphPad Prism 9.0 software.

2.12.2. Statistical analysis of clinical tests

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics 25 package. Analysis was performed with the Kruskal-Wallis test, which allowed to check whether there are statistically significant differences between individual groups of people. In the case of statistically significant differences, the Games-Howell post-hoc test was used. Such a selection was made based on the fact that the variances in the compared groups of people were not homogeneous, and also due to the relatively low number of people tested.

For comparison of two groups of people, the Mann-Whitney U test was used. The analysis of the Spearman correlation allowed to check whether there was a statistically significant relationship between the analyzed variables. Effect size was measured using the eta-square ratio. The following descriptive statistics were used in the analysis: arithmetic mean, median, standard deviation, minimum, maximum, first and third quartile. The p value < 0.05 was adopted as statistically significant.

3. Results

3.1. Formation of A549 cells spheroids

Chemical gradients of nutrients, oxygen and catabolites are unique to the 3D spheroidal cell culture model. It should be emphasized that the cells located on the periphery of spheroids are believed to illustrate the *in vivo* metabolic pattern of active tumor cells. Conversely, the cells located on the inside of spheroids usually undergo a cell death process. The photos of a single spheroid A549 cell line were included in the supplementary file.

3.2. Impact of 2-ME on the viability of 2D and 3D non-small lung cancer A549 cell line models

In order to determine potential anticancer effectiveness of 2-ME in the lung cancer model, A549 cells established in a 2D- and 3D cultures were tested using MTT and WST-1 assays, respectively. The anti-proliferative potential of 2-ME was assessed by 24-h treatment of A549 cells in two-dimensional culture with serial dilutions of 2-ME over a concentration range of 0.78 μ M–100 μ M in two-fold serial dilutions. The viability of A549 cells was lowered down to 64.6% after treatment with 50 μ M 2-ME, and to 55.34% with the concentration of 100 μ M 2-ME (Fig. 1A).

3D spheroidal cells of the A549 line, were treated with the same concentrations in a two-fold serial dilution pattern as the two-dimensional cell culture for comparison. However, in order to verify the resistance of the spheroidal cell model, the cells were also treated

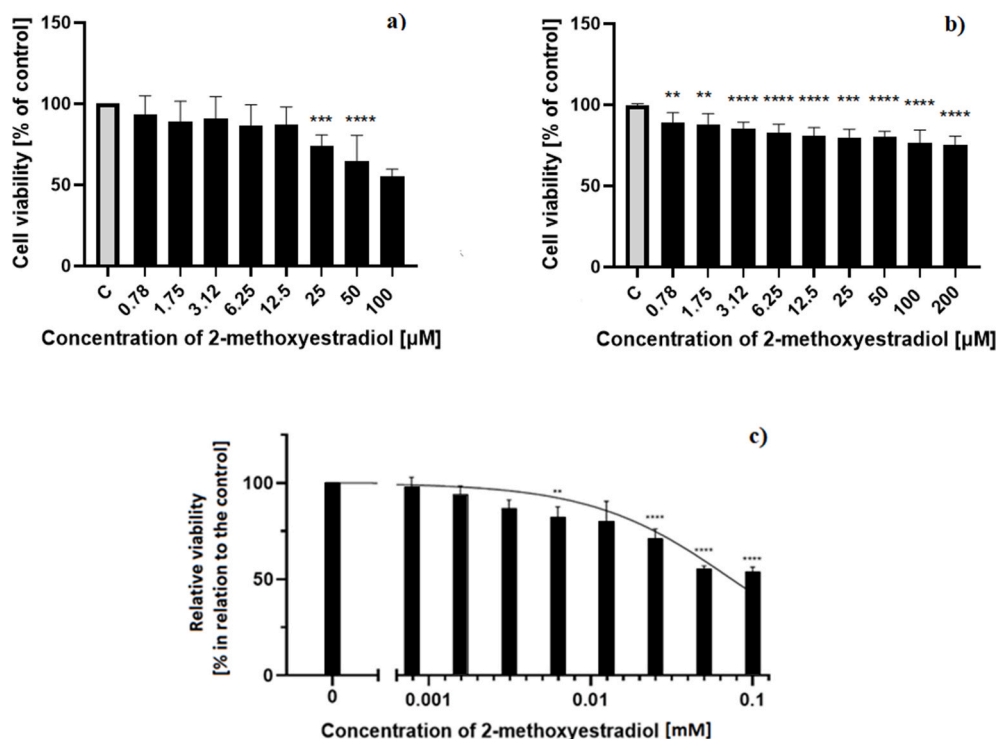


Fig. 1. (A) 2-ME significantly decreases A549 cell viability in a dose-dependent manner in the 2D culture model at concentrations less than or equal to 100 µM. A549 cells were treated with serial dilutions of 2-ME at a concentration range from 100 µM to 0.43 µM for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Presented values are the mean ± SE of three independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$ vs. control cells. (B) 2-ME reduces the cell viability of the A549 3D spheroidal models in a dose dependent manner with expenditures close to 200 µM. A549 cells were exposed to serial dilutions of 2-ME over a concentration range of 200 µM–0.78 µM for 48 h. Cell viability was determined by the WST-1 assay. Presented values are the mean ± SE of three independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$ vs. control cells. (C) IC50 values for the A549 cell line treated with 2-ME were >100 µM. These values were calculated by analyzing the relationship between concentrations and percentage (%) of inhibition using GraphPad Prism version 9.0 for Windows, GraphPad Software, CA, USA.

with a two-fold higher concentration (200 µM) of estrogen derivative.

The WST-1 proliferation test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was performed according to the vendor's protocol. WST-1 was chosen for the spheroidal culture tests because it has a much higher sensitivity and lower cytotoxicity and is stable up to 48 h. The concentration range of 2-ME was between 0.78 µM and 200 µM. A549 cell viability was lowered after treatment with 100 µM 2-ME down to 76.26% and with 200 µM 2-ME down to 75.49% for 48 h (Fig. 1B).

Subsequently, analysis of the inhibitory activity of 2-ME against A549 cells was performed. We found that the compounds we had selected were capable of significantly reducing the viability of A549 cells. The inhibitory activity was estimated from IC50 values within the micromolar ranges. The IC50 value for 2-ME is dependent on the type of cell culture (Fig. 1C).

3.3. Induction of ROS signal in 2-ME-treated A549 cell culture

Consequently, we examined the level of intracellular oxidative stress in 2-ME-treated A549 cells. We specifically measured the level of hydrogen peroxide in 2-ME-treated A549 cells. A549 cells were treated with 2-ME at physiological (10 nM) and pharmacological (100 nM, 1 µM) concentrations according to the experimental design. The level of oxidative stress as measured by hydrogen peroxide concentration proved to be significantly higher in 2-ME treated A549 cell relative to the non-treated cells or the culture medium with no cell at all (Fig. 2A).

3.4. 2-ME-induced cell death (necrosis and late apoptosis) in lung cancer cellular model

Subsequently, the level of late apoptotic and necrotic cell death of 2-

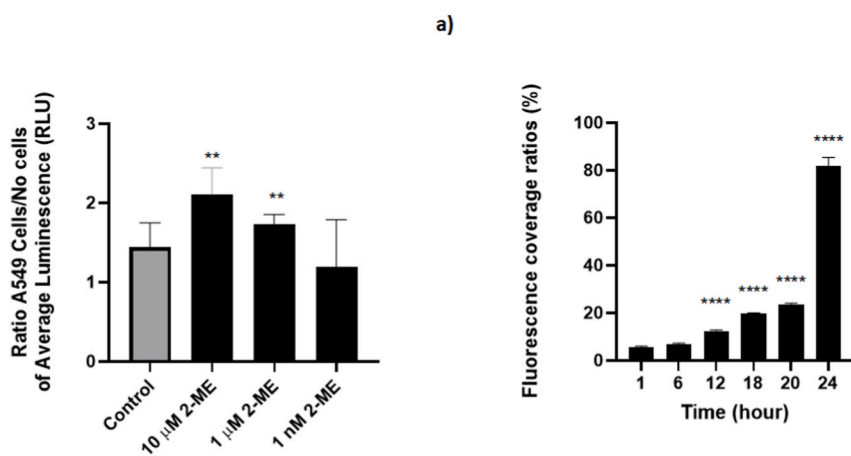


Fig. 2. (A) A549 cells as well as cell medium alone were treated with 2-ME at 10 µM, 1 µM and 10 nM concentrations, respectively. 2-ME treated A549 cells generated higher total hydrogen peroxide levels as compared to untreated control A549 cells incubated with Nutrient Mixture F-12 Ham medium alone. The obtained result comparing ROS induction in the wells with no cells and in the wells with A549 cells, indicates an increased production of ROS by the cancer cells. Luminescence was determined with a Glo-Max® Luminometer from Promega (Mannheim, Germany). Statistical analysis was performed using the GraphPad TTEST function (GraphPad Prism 9 version 9.0.0.). For analysis, both the mean of average luminescence (RLU) and the standard deviation were calculated. (B) Time-dependent growth rate of 2-ME-treated A549 cells. A549 cells treated with 2-ME 10 µM concentration up to 24 h. The analysis of the obtained results evaluated by staining with propidium iodide (PI) was performed using the CytoSMART Analysis System (Lux 3, CytoSMART, Eindhoven, The Netherlands). Values are presented as the mean ± SE of three independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$ vs. control cells.

ME-treated A549 cells was detected using propidium iodide (PI) labeling of technique. The A549 cells were treated with 2-ME at 10 μM concentration for 24 h. The increase in the fluorescence coverage factors was recorded 20 h after the start of the experiment at the fluorescence level to 23.25%. Related to cell confluence, the coverage target dropped to 22.90% after 24 h. Similarly, 24 h after the start of the 2-ME experiment, an increase in fluorescence to 85.17% was noted, which in our experiment was the highest level of cell death (Fig. 2B).

3.5. BAX-mediated 2-ME-induced cell death in lung cancer cellular model

Previously, we confirmed that the intrinsic pathway and BAX was activated by 2-ME in osteosarcoma 143B cells [2]. Herein, in order to further analyze the activation of BAX in 2-ME anticancer mechanism of action, we decided to use a BAX-inhibiting peptide, namely V5 [56]. It is as effective as the Caspase Inhibitor VI (Z-VAD-FMK; Cat. No. 219007) [2] for BAX-mediated apoptosis cellular model (~50–200 μM) [2]. Thus, the V5 inhibitor effectively blocks caspase-independent necrotic cell death [2].

Herein, the cells were pre-treated with 100 μM V5 peptide for 4 h, and then treated with 2-ME at a representative 1 μM concentration for 24 h. As demonstrated, pre-treatment with V5 reversed anti-proliferative effect of 2-ME toward the lung cancer A549 cells (Fig. 3A).

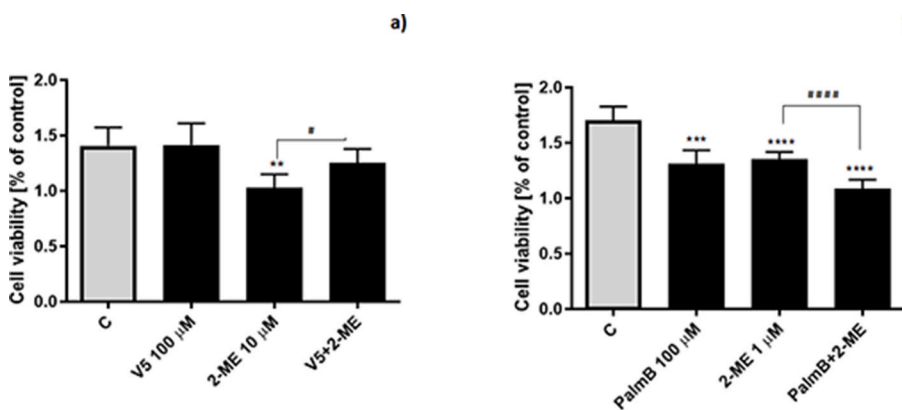
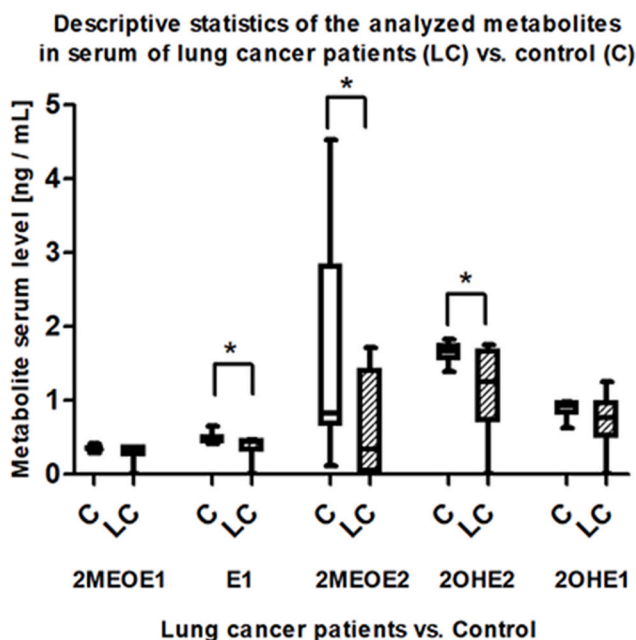


Fig. 3. (A). A549 cells were pretreated with V5 peptide at a concentration of 100 μM for 4 h, and then treated with 1 μM 2-ME for 24 h. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$ vs. control cells. (B) The cells were treated for 24 h with either 100 μM PalmB or 10 μM 2-ME, and a combination of both. Both PalmB and 2-ME alone, significantly decreased A549 cell viability. A synergistic effect on the viability decrease was observed for treatment with both PalmB and 2-ME used in combination. The cell viability was determined by MTT assay. Values are presented as the mean \pm SE of three independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$ vs. control cells C. Serum levels of critical estrogen metabolites analyzed in lung cancer patients (LC) as compared with healthy control (C) are presented as median, as well as quartile 1 and 3, with the minimum and maximum values, in the form of a typical box and whiskers plot. Statistically significant differences are marked with an asterisk * and refer to p -value < 0.05 . It is worth noting that 2-ME serum level is significantly lower in lung cancer patients as compared with the control group. Based on table No 2.



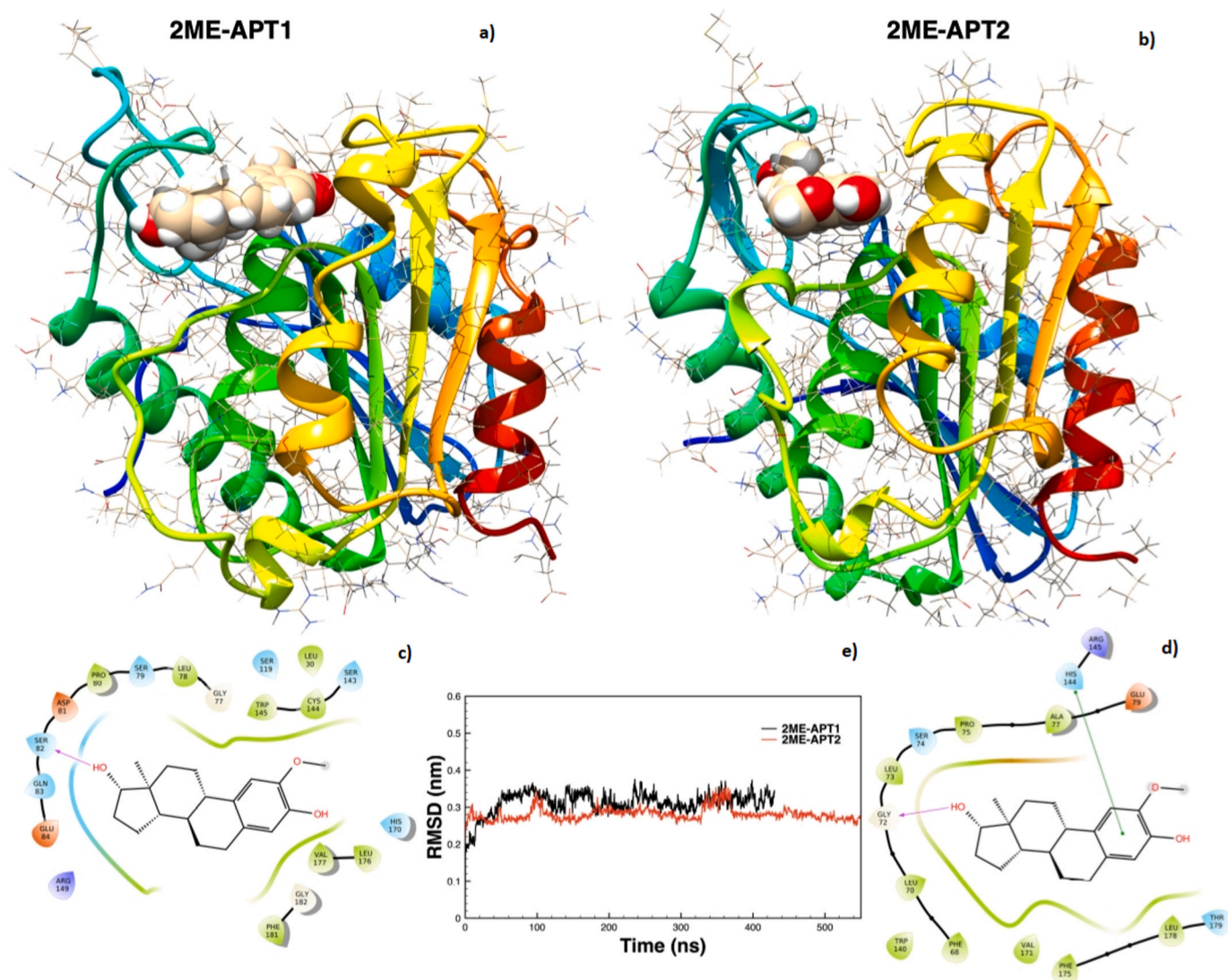


Fig. 4. The binding of 2-ME with APT1 (A) and APT2 (B) at the end of the MD trajectory. The two-dimensional protein residues surrounding the ligand (C), (D), and the RMSD plots are also shown (mean square displacement (RMSD) plots of the MD trajectory) (E).

upward, respectively (Fig. 4). The different orientation is a compromise representation, which maximizes the stabilizing hydrophobic and H-bond interactions, and reduces the steric repulsions of the ligand with the protein backbone. As a result, 2-ME is able to enter more effectively inside the binding pocket of APT1, as compared to APT2 and the 2-ME molecule is in a more external position relative to the binding site of the APT2 protein. For the same reason, the binding pocket in APT1 results more enlarged upon binding with 2-ME, as compared to APT2. These considerations support the hypothesis that 2-ME binds more selectively to APT1 rather than APT2. The obtained results suggest that the selective binding of 2-ME to an APT1 protein molecule might indeed potentially enhance the anticancer effect of PalmB as was experimentally proven (see Results section 3.6).

3.8. Cancer progression and estrogen derivatives serum levels

In order to give our study a translational value, we next verified the serum levels of the studied estrogens in NSCLC patients. We specifically verified the levels of estrogens which are known to be used for physiological synthesis of 2-ME (2-MEOE2), namely estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), 2-hydroxyestradiol (2-OHE2), 2-hydroxyestrone (2OHE1) and 2-methoxyestrone (2-MEOE1). As determined by clinical analyses, we

observed significantly decreased serum levels of 2-ME as compared with the control group (Table 2, Fig. 3C). A bunch of statistically significant differences were observed relative to critical estrogen metabolites, of which the lower serum concentrations of 2MEOE2 (2-ME) and 2OHE2 as detected in the lung cancer patients vs. control subjects are specifically noteworthy.

Similarly, much smaller decrease in estrogen metabolite levels in cancer patients as compared to the control group, could be noticed in the case of E1, 2MEOE1 and 2OHE1 (Fig. 3C). Interestingly, the parent molecule, namely E2, is only very slightly decreased in lung cancer patients as compared to control.

We thus hypothesize that hydroxylation at position 2 of the estradiol molecule, followed by methylation is a physiological anticancer protection mechanism. In order to better illustrate the biochemical relationships between different estrogen derivatives, we present the metabolic context involving natural estrogen biochemistry in the graphical form- Fig. 3C & graphical abstract.

3.9. Relative safety of 2-ME in terms of possible non-receptor bioactivity

The expected reactivity of 2-ME against weak nucleophiles of cytoprotective importance (glutathione, protein thiolates) as well as against

Table 2

Descriptive statistics of the analyzed metabolites in the group of lung cancer patients and the control. * Mann-Whitney *U* test; 1 - lung cancer patients, 2 - control group.

Variable	M		Me		SD		Min		Max		Q1		Q3		Statistical test result *
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
2MEOE1	0.28	0.34	0.35	0.34	0.15	0.03	0	0.29	0.36	0.42	0.26	0.34	0.36	0.35	U = 39,5; p = 0,27; η ² = 0,06
E1	0.36	0.49	0.44	0.48	0.19	0.07	0	0.41	0.47	0.65	0.33	0.44	0.45	0.5	U = 20; p = 0,01; η ² = 0,29
2MEOE2 (2-ME)	0.59	1.61	0.34	0.83	0.71	1.42	0	0.12	1.71	4.53	0.04	0.68	1.4	2.81	U = 20; p = 0,047; η ² = 0,21
2OHE2	1.11	1.63	1.25	1,67	0,64	0,13	0	1,39	1,75	1,83	0,73	1,57	1,66	1,74	U = 23; p = 0,02; η ² = 0,24
2OHE1	0.7	0.88	0.76	0.93	0.41	0.11	0	0.63	1.25	0.98	0.51	0.83	0.97	0.97	U = 32; p = 0,29; η ² = 0,06

amino groups of proteins and nucleic acids, estimated by calculation of its molecular electrophilic potential, was shown to be extremely low (electrophilic potential $\omega = 0.53$ eV) as compared to the highly reactive electrophiles, and specifically the potentially mutagenic 2,3-estradiol-ortho-benzoquinone ($\omega = 3.59$ eV) and its methine isomer ($\omega = 2.28$ eV), or 3,4-ortho-benzoquinone of estradiol ($\omega = 3.63$ eV). Thus, it can be assumed that the methoxy group of 2-ME is effective in preventing the spontaneous oxidation of catechol to highly reactive quinone derivatives of huge electrophilic potential, and consequently, against enzymatically uncontrolled, non-receptor-mediated damage to biomolecules essential for maintaining homeostasis at the cellular level, which makes 2-ME appear to be a relatively safe drug with a predictable and experimentally proven mechanism of action. The lipophilic nature of 2-ME ($\log P = 3.59$) and the relatively small polar surface area of the molecule (PSA = 49.69 Å²) ensure effective penetration through lipid bilayers and hence good bioavailability in different subcellular compartments and organelles of tumor cells. Interestingly, electrophilic potential of 2-ME parent molecules and biochemical conversion pathway intermediates, which were evaluated in clinical tests, also proved to be relatively low, as calculated for estradiol ($\omega = 0.66$ eV), estrone ($\omega = 0.85$ eV), 2-hydroxyestradiol ($\omega = 0.57$ eV), and 2-hydroxyestrone ($\omega = 0.79$ eV).

4. Discussion

Lung adenocarcinoma is one of the major non-small cell neoplasms of the lungs. Importantly, it is the most common lung cancer type in never-smoking patients. It should be emphasized that the incidence of this type of cancer in women is three times higher than in men. There is a possibility that 17 β -estradiol metabolites may affect the death/survival interplay of lung adenocarcinoma cells by activating the nitroxidative stress signaling pathways or affecting metabolic regulatory mechanisms.

Epidemiological data show a significant increase in the incidence of malignant neoplasms, including lung cancer, among women [16]. The p53 suppressor gene mutation in NSCLC was found to be significantly more frequent in women [59,60]. It is worth emphasizing the essence of female sex hormones, whose pro-carcinogenic and mitogenic effects are often of critical importance in clinical practice and scientific research. The correlation of oral contraceptives (OC) as well as hormone replacement therapy (HRT) with a significantly increased incidence of cancer has already been repeatedly described in the scientific literature [62,63]. There are two types of estrogen receptors ER: ER α and ER β , the presence of which is necessary to maintain the proper condition of the extracellular matrix in the lung tissue [1]. Moreover, ER β is present in both tissues and cell lines of NSCLC, which has been recognized as a prognostic marker so far [1].

Indeed, we have previously evidenced that the estrogenic activity of 2-ME at pharmacological concentration range is associated with the ER β modulation [64].

Herein, we provide a new insight into anticancer mechanism of action of 2-ME in both 2D and 3D NSCLC cell models. Interestingly, many studies have investigated a high research potential of using 3D spheroidal lung cancer cell culture [65–67].

3D spheroidal cell cultures have a significant advantage over the commonly used 2D cell cultures. Both morphologically and

physiologically, 3D cultures mimic the natural microenvironment of neoplastic cells in a much more natural and precise way, which allows for a better approximation of the *in vivo* conditions [68,69]. In response to unfavorable reports based on drug susceptibility studies in cultures of nodular lung cancer tumors, we similarly assessed the metabolites of 2-ME *in vitro*, with very promising results [70,71]. Based on the available literature data, in order to determine the anti-tumor potential of 2-ME, as well as due to the increased resistance of 3D cell cultures *in vitro*, which are similar in structure to neoplastic tumors *in vivo*, it was necessary to use a higher concentration of 2-ME. To the best of our knowledge, this is the first study to determine the effect of 2-ME on A549 cell death in a 3D model.

4.1. The mechanism of action of 2-ME depends on the induction of nitro-oxidative stress

Considering the nature of ROS in the tumor microenvironment, the essence of hypoxia should be particularly emphasized [72,73]. Importantly, the significance of hypoxia analogously to ROS impact within the tumor microenvironment should also be noted, as this phenomenon influences further metastasis from primary neoplastic tumors [49,62]. Moreover, it also influences angiogenesis process in the neoplastic tumor environment. HIF-1 α inhibition may be one of the potential therapeutic options for treatment of malignant neoplastic tumors. Importantly, 2-ME displays an inhibitory effect on the HIF-1 α protein [60,73].

Similarly to our studies on NSCLC cell models, according to the available data, sulfamoylated analogs of 2-ME, which influence the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, were investigated in the study of the role of ROS in breast cancer [61]. These studies showed that sulfamoylated estradiol induced generation of superoxide anion and hydrogen peroxide. To the best of our knowledge, herein, for the first time we have indicated an increase in the oxidative stress level caused by 2-ME at selected reference concentrations in A549 cells, relative to untreated cells. As indicated by the available data, lung cancer cells, including the A549 cell line, react similarly to treatment with hydrogen peroxide as in our research, with cell cycle arrest at G1 phase, tumor necrosis, as well as apoptosis [74]. The study by Park et al. [74] clearly correlates with our observations evidently supporting our hypothesis. The obtained results are in correlation with available scientific data [75–79].

4.2. Association of palmitoylation mechanism with lung cancer cells

In order to investigate an anti-tumor role of 2-ME and further its more detailed mechanism of action, we decided to define the most important potential biological roles of the compound in lung adenocarcinoma, which would involve cytosolic enzymes, palmitoylation, reactive oxygen species generation, as well as the effect of the compound on induction of cell death. Cytosolic enzymes such as acyl-protein thioesterase 1 (APT1) and 2 acyl-protein thioesterase 2 (APT2), play an important role in different biological processes [80]. The role of APT1 and APT2 was also an object of our research based on specifically designed cell culture models. Protein S-palmitoylation is a covalent attachment of fatty acid acyl residue to the sulfhydryl group of a cysteine

moiety. In terms of carcinogenesis process, in particular, the zDHC, PAT or APT enzymes, and more specifically APT1 and APT2, should be in particular taken into account [80]. According to the available data, it is more chemically effective to prevent the depalmitoylation process rather than to enhance protein palmitoylation [80]. Importantly, the inhibition of APT enzymes may inhibit the process of tumor formation, also having a toxic effect on tumor cells [80]. Hence, one of our goals was to investigate a potential anti-tumor activity mediated by APT modulation and consequently, via palmitoylation. APT1 and APT2 are expressed and active across nearly all tissues [81–83], yet their absence in most large-scale profiling research efforts suggests a non-stoichiometric relationship. Both APT1 and APT2 act as efficient depalmitoylases *in vitro* [84] and are presumed to broadly regulate S-palmitoylation and thus trafficking of some peripheral membrane proteins within the cell. Furthermore, overexpression of APT1 enhances the depalmitoylation of small GTPases interacting with endothelial nitric oxide synthase [85], and a number of other peripheral membrane proteins in transfected cells. Such overexpression could lead to a number of potential artifacts, e.g. by disruptive fusion. Consistently with these studies, our results strongly support the hypothesis of 2-ME binding selectively to APT1 rather than APT2. From a biochemical point of view, APT2 is functionally closely related to palmitoylation of protein substrates [86].

As indicated by the available studies in the field of neurodegenerative diseases [86], oxidative stress is often involved in the range of lipid signaling modulation, including palmitoylation, which is actually the subject of our research. The oxidative stress mechanism has been shown to directly inhibit palmitoylation by disrupting lipid mediator signaling and causing destructive effects on the cellular metabolism [87]. Hence, after having examined the effects of H₂O₂ on lung cancer cells, we decided to determine a potential role of S-palmitoylation in BAX-mediated apoptosis of A549 cells.

An equally significant aspect of our research is the investigation of a depalmitoylation inhibitor, namely PalmB. Unfortunately, the literature data on a potential effect of PalmB on NSCLC is very limited. Our critical achievement is an unambiguous proof of the synergistic effect of PalmB and 2-ME used in combination on a significant A549 cell viability reduction. Furthermore, based on the previous research [17], and also on the results obtained from our study, we hypothesize that 2-ME influences an increase in S-palmitoylation in the A549 cells, which seems to positively correlate with an observed increase in apoptosis-dependent cell death possibly via BAX protein palmitoylation.

4.3. A unique estrogen derivatives profile in the plasma from NSCLC patients potentially relating to lung cancer etiopathogenesis and progression

Based on our research, we conclude that targeting estrogen levels in lung cancer patients is a promising diagnostic, monitoring and therapeutic approach. In recent years, there has been much improvement in lung cancer treatment, including NSCLC, however, for most patients, lung cancer is a fatal disease, which is mainly caused by delayed diagnosis of very advanced cancer stage [29].

Current scientific reports [88–90] indicate a correlation between the endocrine system, mainly in women, and the increase in lung cancer incidence, especially NSCLC. Therefore, based on the finding of such relationship and the involvement of estrogen signaling in lung adenocarcinoma, combination therapies based on antiestrogen therapy and tyrosine kinase inhibitors (TKI) were assessed [88]. Moreover, available bioinformatics analyses indicate that ERs can directly influence modulation of NSCLC molecular pathways, primarily through signal transduction, as well as an activation of membrane receptors, which ultimately changes the morphology of NSCLC cells [89]. E₂, showing immunosuppressive properties, directly influences the pro-cancer microenvironment [90]. Moreover, analogously to lung cancer, E₂ has been shown to directly affect lung stromal cells as well as lung immune

cells [90]. One of the studies was devoted to the assessment of estrogens and their metabolites in the lung tissue of women suffering from lung cancer, and in the control group [91].

On the basis of the obtained results, it was possible to establish that estrogens, and specifically E₁, E₂, E₃, and their metabolites: 2-OHE₁, 2-OHE₂, 4-OHE₁, 4-OHE₂, 2-OME₁ and 2-OME₂, are found at much higher levels in the lung neoplastic tissue than in the lung tissue of healthy female control [91]. These results indicate that estrogens and their metabolites are found in the tissues of the human lung at substantial levels [91]. Moreover, the determination of estrogen metabolite levels, either in blood or urine samples obtained from clinical patients, may be used as a replacement biomarker for breast cancer risk [92]. As we observed in the performed clinical tests, the level of 2-ME significantly drops in lung cancer patients, which can be utilized for screening diagnostic tests as well as for monitoring progression of the disease in the course of anticancer therapy. Hence, our hypothesis is to a large extent based on the determination of the observable effects of estrogens and their metabolites found in the blood of lung cancer patients on cancer incidence and progression.

In summary, the results of our study indicate for the first time to the best of our knowledge, a possible use of estrogens both hydroxylated and methylated at position 2, as NSCLC tumor biomarkers. Obviously, more complex clinical studies including larger patient groups are necessary.

Our results open up an exciting new research pathways focusing on more advanced and comprehensive clinical trials with routine application of blood tests in order to better monitor lung cancer patients and healthy controls, as well as developing sophisticated *in vitro* experiments with other lung cancer cell lines, specifically in 3D cell culture model. Nevertheless, the obtained results seem to be potentially applicable in the process of clinical diagnosis and monitoring of NSCLC patients in the near future.

4.4. Safety profile of 2-ME as a potential therapeutic in terms of non-receptor mediated biological activity

We managed to prove beyond doubt on A549 cancer cell models that 2-ME has a strong anti-tumor activity. It might be potentially applied as a therapeutic in the form of an adjuvant or neoadjuvant in the course of lung cancer treatment. However, many estrogen metabolites are suspected of potentially deleterious non-receptor-mediated biological effects that could damage noncancer cells in the body giving rise to serious clinical complications. Computational analysis of 2-ME electrophilic potential proved that it is relatively low as compared to catechol estrogen quinones which are known to be highly reactive with nucleophiles of biological importance, and consequently deplete cellular glutathione level and covalently modify DNA causing generation of severe oxidative stress, and ultimately carcinogenesis [93,94]. The electrophilic potential of 2-ME ($\omega = 0.53$ eV) being less than 0.8 eV, classifies 2-ME as a marginal electrophile according to the electrophilicity scale as proposed by Domingo et al. [95]. Catechol estrogen quinones, such as 2,3-estradiol-ortho-benzoquinone ($\omega = 3.59$ eV) and its methine isomer ($\omega = 2.28$ eV), or 3,4-ortho-benzoquinone of estradiol ($\omega = 3.63$ eV) are quite the contrary, classified as very strong electrophiles as their potential is much greater than 1.5 eV [95]. Thus they are expected to readily create conjugates with glutathione, protein thiols as well as adducts with the DNA. Catechol estrogen quinones conjugation with biologically critical thiols is based on the Michael addition reaction mechanism which is not enzymatically controlled. Taking into account relatively high millimolar levels of cellular glutathione, hence estrogen quinones are rate limiting reactants for the process which makes them specifically dangerous in terms of potential carcinogenesis.

A physiological protection mechanism preventing the excess formation of estrogen quinones is based on O-methylation of catechol estrogens at position 2 or 4 by catechol O-methyltransferase (COMT) into methoxylated estrogens such as 2-methoxyestradiol, 2-methoxyestrone, 4-methoxyestradiol and 4-methoxyestrone which are all either very

weak or marginal electrophiles. As we demonstrated in NSCLC patients, the serum levels of 2-ME are significantly lower than in healthy control with a simultaneously slightly lower level of its parent catechol molecule, 2-hydroxyestradiol (2OHE2). It may suggest that in the group of lung cancer patients there is an impaired O-methylation of catechols which consequently fuel an alternative metabolic pathway catalyzed by cytochrome P450 and peroxidases as well as through non-enzymatic, oxidative stress-mediated mechanisms, into potentially carcinogenic catechol estrogen quinones [93,94].

That is why, determination of 2-ME level in patient's blood or urine might be utilized as a reasonable screening test allowing for lung cancer early diagnosis and prevention as well as a convenient way to monitor progression of the disease. The idea of using 2-ME as an anti-cancer drug of well defined mechanism of action, and at the same time, a relatively safe one due to its low electrophilic potential, for effective adjuvant or neoadjuvant therapy of NSCLC, seems very tempting, however, it definitely demands further research and specialized clinical trials.

5. Conclusions

Herein, we presented a complex research study, regarding further investigation of 2-ME anti-tumor detailed mechanism of action. Using an experimental non-small-cell lung carcinoma model, it was shown that 2-ME inhibited tumor cell viability, both in a commonly used *in-vitro* two-dimensional model as well as in 3D spheroidal cellular models. In addition, it was determined that ROS generation was increased in A549 cells as a result of 2-ME treatment. The presence of necrotic/late apoptotic cells following treatment with 2-ME was also confirmed via green and red fluorescence. Moreover, has been proven that 2-ME significantly decreases A549 cell viability as compared to combination treatment with 2-ME and V5. Very importantly, the study showed a synergistic inhibitory effect of 2-ME and PalmB used in combination on lung cancer cell viability. Only APT1 is located primarily in the mitochondria. This indicates that this may be a new spectrum for APT1 only substrates, where they are unavailable for APT2. Hence, it opens up a new area of research in the field of 2-ME and APT1 and APT2 relative to cell death [96]. The evidence from the study implied that 2-ME might serve as a prognostic and monitoring biomarker in lung cancer patients. Moreover, the results of our research on A549 lung adenocarcinoma cells suggested that 2-ME should work as an effective APT inhibitor increasing the level of cellular protein palmitoylation. We also hypothesized that 2-ME effect on palmitoylation might be clinically applicable as a novel target for anti-cancer therapy. The review of scientific publications on the issues raised by our team so far indicates that the right direction of research has been chosen [97–104].

Moreover, computational analysis proves that 2-ME as compared to other estrogen metabolism intermediates is relatively safe in terms of its possible non-receptor bioactivity within healthy human cells due to a very low electrophilic potential and hence no substantial risk of spontaneous covalent modification of biologically protective nucleophiles. Lipophilic character of 2-ME suggests effective penetration through lipid membranes and optimal interaction with hydrophobic domains of critical proteins within cancer cells.

It is worth mentioning that clinical application of the conclusions from our study would not cause much of a problem as it mostly involves determination of specific estrogen metabolites in patients' blood or even better in urine which makes it a practically non-invasive diagnostic approach which in addition to that, is relatively fast and affordable.

All in all, the developed methodology has found its practical dimension, and moreover, strongly supports the anti-tumor activity of 2-ME and its potential role in clinical diagnosis, monitoring and potential anticancer therapy.

Funding

The study was funded by IDUB Program's Research Project for Young

Scientist MTN No 71–1203 (Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland).

MGP & NK acknowledge support from ST46 funding (Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland) for molecular modeling computation system.

Data availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

MGP, AKJ & NK acknowledge support from ST46 funding (Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland). This research was supported in part by PLGrid Infrastructure providing Gaussian 09 chemical computational software (revision D.01 by Frisch, M. J. et al., [2016]) as well as GaussView v.5.0.8. (NK).

Marvin ChemAxon Academic License was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, Marvin 20.21, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>). (NK) Multifunctional Wavefunction Analyzer (Multiwfn, v. 3.3.8 by Tian Lu, Feiwu Chen, J. Comp. Chem. 33, 580–592 [2012]).

We would like to thank dr Michal Ordak (Ekspertat) for his assistance in statistical analysis.

We would like to thank CytoSMART (CytoSMART, Eindhoven, The Netherlands), for providing the CytoSMART Omni automated bright-field microscope, CytoSMART Lux2 compact automated system and the Cytosmart LUX3 imaging system consisting of two fluorescence microscopes devices to our research project, as well as the Promega manufacturer (Mannheim, Germany), for providing the GloMax® Discover Microplate Reader, which enriched the value of our research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102395>.

References

- [1] C. Musial, R. Zaucha, A. Kuban-Jankowska, L. Konieczna, M. Belka, A. Marino Gammazza, T. Baczek, F. Cappello, M. Wozniak, M. Gorska-Ponikowska, Plausible role of estrogens in pathogenesis, progression and therapy of lung cancer, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 18 (2) (2021) 648.
- [2] M. Gorska-Ponikowska, P. Bastian, A. Zauszkiewicz-Pawlak, et al., Regulation of mitochondrial dynamics in 2-methoxyestradiol-mediated osteosarcoma cell death, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1616.
- [3] M.H. Kulke, J.A. Chan, J.A. Meyerhardt, A.X. Zhu, T.A. Abrams, L. S. Blazskowsky, E. Regan, C. Sidor, C.S. Fuchs, A prospective phase II study of 2-methoxyestradiol administered in combination with bevacizumab in patients with metastatic carcinoid tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2) (2011) 293–300.
- [4] J.Y. Bruce, J. Eickhoff, R. Pili, T. Logan, M. Carducci, J. Arnott, A. Treston, G. Wilding, G. Liu, A phase II study of 2-methoxyestradiol nanocrystal colloidal dispersion alone and in combination with sunitinib malate in patients with metastatic renal cell carcinoma progressing on sunitinib malate, *Invest. N. Drugs* 30 (2) (2012) 794–802.
- [5] M. Gorska-Ponikowska, A. Ploska, D. Jacewicz, M. Szkatula, G. Barone, G. Lo Bosco, F. Lo Celso, A.M. Dabrowska, A. Kuban-Jankowska, M. Gorzynik-Debicka, N. Knap, L. Chmurzynski, L.W. Dobrucki, L. Kalinowski, M. Wozniak, Modification of DNA structure by reactive nitrogen species as a result of 2-methoxyestradiol-induced neuronal nitric oxide synthase uncoupling in metastatic osteosarcoma cells, *Redox Biol.* 32 (2020), 101522.
- [6] M. Gorska-Ponikowska, A. Kuban-Jankowska, A. Daga, S. Nussberger, 2-Methoxyestradiol reverses the pro-carcinogenic effect of L-lactate in osteosarcoma 143B cells, *Cancer Genomics Proteomics* 14 (2017) 483–493.
- [7] M. Gorska-Ponikowska, A. Kuban-Jankowska, S.A. Eisler, U. Perricone, G. Lo Bosco, G. Barone, S. Nussberger, 2-Methoxyestradiol affects mitochondrial

- biogenesis pathway and succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A in osteosarcoma cancer cells, *Cancer Genomics Proteomics* 15 (1) (2018) 73–89.
- [8] M. Gorska, A. Kuban-Jankowska, R. Milczarek, M. Wozniak, Nitro-oxidative stress is involved in anticancer activity of 17 β -estradiol derivative in neuroblastoma cells, *Anticancer Res.* 36 (4) (2016) 1693–1698.
- [9] 2-Methoxyestradiol in Treating Patients with Advanced Solid Tumors, 2021. Available online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00028821?cond=panzem&draw=2&rank=8> (20/08/2021).
- [10] A Combination Study to Determine the Safety and Efficacy of Panzem NCD with Avastin in Metastatic Carcinoid Tumors, 2021. Available online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00328497?cond=panzem&draw=2&rank=4> (20/08/2021).
- [11] A Phase 2 Study with Panzem in Patients with Relapsed or Plateau Phase Multiple Myeloma, 2021. Available online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00592579?cond=panzem&draw=2&rank=6> (20/08/2021).
- [12] A Combination Study to Determine the Safety and Efficacy of Panzem NCD with Avastin in Metastatic Carcinoid Tumors, 2021. Available online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00328497?term=panzem&draw=2&rank=2> (20/08/2021).
- [13] Efficacy and Pharmacodynamic Study of Panzem® NCD in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer, 2021. Available online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00394810?term=panzem&draw=2&rank=6> (20/08/2021).
- [14] Phase 2 Study of Panzem Nanocrystal Colloidal Dispersion (NCD) in Combination With Fixed-Dose Temozolomide to Patients With Recurrent Glioblastoma Multiforme (GBM), 2021. Available online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00481455?term=panzem&draw=2&rank=5>.
- [15] M.R. Harrison, N.M. Hahn, R. Pili, W.K. Oh, H. Hammers, C. Sweeney, G. Liu, A phase II study of 2-methoxyestradiol (2ME2) NanoCrystalA (R) dispersion (NCD) in patients with taxane- refractory, metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC), *Invest. N. Drugs* 29 (2011) 1465–1474.
- [16] M.H. Kulke, J.A. Chan, J.A. Meyerhardt, A.X. Zhu, T.A. Abrams, L.S. Blaszkowsky, C.S. Fuchs, A prospective phase II study of 2-methoxyestradiol administered in combination with bevacizumab in patients with metastatic carcinoid tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 293–300.
- [17] D. Matei, J. Schilder, G. Sutton, S. Perkins, T. Breen, C. Quon, C. Sidor, Activity of 2-methoxyestradiol (Panzem (R) NCD) in advanced, platinum-resistant ovarian cancer and primary peritonealcarcinomatosis: a Hoosier Oncology Group trial, *Gynecol. Oncol.* 115 (2009) 90–96.
- [18] E.J. Solum, Ø.W. Akselsen, A. Vik, T.V. Hansen, Synthesis and pharmacological effects of the anti-cancer agent 2-methoxyestradiol, *Curr. Pharmaceut. Des.* 21 (38) (2015) 5453–5466.
- [19] B.S. Kumar, D.S. Raghuvanshi, M. Hasanain, S. Alam, J. Sarkar, K. Mitra, F. Khan, A.S. Negi, Recent Advances in chemistry and pharmacology of 2-methoxyestradiol: an anticancer investigational drug, *Steroids* 110 (2016 Jun) 9–34.
- [20] P. Bastian, J. Dulski, A. Roszmann, D. Jaczewicz, A. Kuban-Jankowska, J. Slawek, M. Wozniak, M. Gorska-Ponikowska, Regulation of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease-is 2-methoxyestradiol a missing piece? *Antioxidants* 10 (2) (2021) 248.
- [21] M. Gorska, A. Kuban-Jankowska, M.A. Zmijewski, M. Gorzynik, M. Szkatula, M. Wozniak, Neuronal nitric oxide synthase induction in the antitumorogenic and neurotoxic effects of 2-methoxyestradiol, *Molecules* 19 (2014) 13267–13281.
- [22] M.E. Zaballa, F.G. van der Goot, The molecular era of protein S-acylation: spotlight on structure, mechanisms, and dynamics, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53 (4) (2018) 420–451.
- [23] P.J. Ko, S.J. Dixon, Protein palmitoylation and cancer, *EMBO Rep.* 19 (10) (2018), e46666.
- [24] L. Abrami, M. Audagnotto, S. Ho, Palmitoylated acyl protein thioesterase APT2 deforms membranes to extract substrate acyl chains, *Nat. Chem. Biol.* 17 (2021) 438–447.
- [25] M. Fröhlich, B. Dejanovic, H. Kashkar, G. Schwarz, S. Nussberger, S-palmitoylation represents a novel mechanism regulating the mitochondrial targeting of BAX and initiation of apoptosis, *Cell Death Dis.* 5 (2) (2014) e1057.
- [26] C.S. Dela Cruz, L.T. Tanoue, R.A. Matthey, Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention, *Clin. Chest Med.* 32 (2011) 605–644.
- [27] Z. Zhu, Z. Zheng, J. Liu, Comparison of COVID-19 and lung cancer via reactive oxygen species signaling, *Front. Oncol.* 11 (2021), 708263.
- [28] J. Stepiak, M. Karbownik-Lewinska, 17 β -estradiol prevents experimentally-induced oxidative damage to membrane lipids and nuclear DNA in porcine ovary, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 62 (1) (2016) 17–21.
- [29] D.J. Heineman, J.M. Daniels, W.H. Schreurs, Clinical staging of NSCLC: current evidence and implications for adjuvant chemotherapy, *Ther Adv Med Oncol* 9 (9) (2017) 599–609.
- [30] L. Helguero, M. Faulds, J.Å. Gustafsson, Estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11, *Oncogene* 24 (2005) 6605–6616.
- [31] W.D. Travis, E. Brambilla, A.P. Burke, A. Marx, A.G. Nicholson, WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2015.
- [32] M. Gorska-Ponikowska, A. Ploska, D. Jaczewicz, M. Szkatula, G. Barone, G. Lo Bosco, F. Lo Celso, A.M. Dabrowska, A. Kuban-Jankowska, M. Gorzynik-Debicka, N. Knap, L. Chmurzynski, L.W. Dobrucki, L. Kalinowski, M. Wozniak, Modification of DNA structure by reactive nitrogen species as a result of 2-methoxyestradiol-induced neuronal nitric oxide synthase uncoupling in metastatic osteosarcoma cells, *Redox Biol.* 32 (2020 May), 101522.
- [33] M. Gorska-Ponikowska, P. Bastian, A. Zauszkiewicz-Pawlak, et al., Regulation of mitochondrial dynamics in 2-methoxyestradiol-mediated osteosarcoma cell death, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1616.
- [34] M. Gorska-Ponikowska, A. Kuban-Jankowska, A. Marino Gammazza, A. Daca, J. M. Wierzbicka, M.A. Zmijewski, H.H. Luu, M. Wozniak, F. Cappello, The major heat shock proteins, Hsp70 and Hsp90, in 2-methoxyestradiol-mediated osteosarcoma cell death model, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 616.
- [35] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (3) (1993) 779–815.
- [36] A. Fiser, A. Sali, MODELLER: generation and refinement of homology-based protein structure models, in: C.W. Carter, R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 374, Academic Press, San Diego, 2003, pp. 463–493.
- [37] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2) (2010) 455–461.
- [38] A. Kuban-Jankowska, T. Kostrzewa, C. Musiał, G. Barone, G. Lo Bosco, F. Lo Celso, M. Gorska-Ponikowska, Green tea catechins induce inhibition of PTP1B phosphatase in breast cancer cells with potent anti-cancer properties: in vitro assay, molecular docking, and dynamics studies, *Antioxidants* 9 (12) (2020) 1208.
- [39] M. Gorska-Ponikowska, U. Perricone, A. Kuban-Jankowska, G. Lo Bosco, M. Barone, 2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor, *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 3030–3049.
- [40] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D. E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, *Proteins* 78 (8) (2010) 1950–1958.
- [41] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis, *J. Mol. Model.* 7 (2001) 306–317.
- [42] V. Zoete, M.A. Cuendet, A. Grosdidier, O. SwissParam Michielin, A fast force field generation tool for small organic molecules, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 2359–2368.
- [43] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (1) (2017), 014101.
- [44] M. Parrinello, Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.* 52 (1981) 7182–7190.
- [45] T. Darden, Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089–10092.
- [46] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995), 8577–8493.
- [47] F. Camastra, R. Amato, M.D. Di Taranto, A. Staiano, Advances in computational methods for genetic diseases, *Comput. Math. Methods Med.* 645649 (2015).
- [48] R. Giancarlo, F. Utro, Speeding up the Consensus Clustering methodology for microarray data analysis, *Algorithm Mol. Biol.* 6 (2011) 1.
- [49] R. Giancarlo, G.L. Bosco, L. Pinello, F. Utro, The three steps of clustering in the post-genomic era: a synopsis, in: R. Rizzo, P.J.G. Lisboa (Eds.), *Computational Intelligence Methods for Bioinformatics and Biostatistics*. CIBB 2010, Lecture Notes in Computer Science, vol. 6685, Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.
- [50] P. Söderhjelm, G.A. Tribello, M. Parrinello, Locating binding poses in protein-ligand systems using reconnaissance metadynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (14) (2012) 5170–5175.
- [51] S. Salentin, S. Schreiber, V.J. Haupt, M.F. Adasme, M. Schroeder, PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler, *Nucleic Acids Res.* 43 (W1) (2015) W443–W447.
- [52] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E. C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [53] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica* 1 (1933) 104–113.
- [54] W. Kohn, L.J. Sham, Self-consistent equations including exchange and correlation effects, *Phys. Rev. B* 140 (1965) A1133–A1138.
- [55] R.G. Parr, W. Yang, Density-functional theory of the electronic structure of molecules, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 46 (1995) 701–728.
- [56] R. Fernandes, C. Tsuda, A.L. Perumalsamy, et al., NLRP5 mediates mitochondrial function in mouse oocytes and embryos, *Biol. Reprod.* 86 (5) (2012), 138–10.
- [57] F.J. Dekker, C. Hedberg, Small molecule inhibition of protein depalmitoylation as a new approach towards downregulation of oncogenic Ras signalling, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (4) (2011) 1376–1380.
- [58] T.M. LaVallee, X.H. Zhan, C.J. Herbstreit, E.C. Kough, S.J. Green, V.S. Pribluda, 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors α and β , *Cancer Res.* 62 (13) (2002) 3691–3697.
- [59] G. Shen, Q. Wang, Q. Zhang, H. Sun, Y. Zhao, Z. Zhang, B. Du, Tissue distribution of 2-methoxyestradiol nanosuspension in rats and its antitumor activity in C57BL/6 mice bearing lewis lung carcinoma, *Drug Deliv.* 19 (7) (2012) 327–333.
- [60] A. Aquino-Gálvez, G. González-Ávila, J. Delgado-Tello, M. Castillejos-López, C. Mendoza-Milla, J. Zúñiga, M. Checa, H.A. Maldonado-Martínez, A. Trinidad-López, J. Cisneros, L.M. Torres-Espíndola, C. Hernández-Jiménez, B. Sommer, C. Cabello-Gutiérrez, L.H. Gutiérrez-González, Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1 α and HIF-2 α expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia, *Oncol. Rep.* 35 (1) (2016) 577–583.
- [61] Y. Romero, M. Castillejos-López, S. Romero-García, A.S. Aguayo, I. Herrera, M. O. Garcia-Martin, L.M. Torres-Espíndola, M.C. Negrete-García, A.C. Olvera, J. C. Huerta-Cruz, R.V. Cruz, J. Cisneros, E.F. Soto, H. Solís-Chagoyán, C. Mendoza-Milla, C. Cabello-Gutiérrez, V. Ruiz, A. Aquino-Gálvez, Antitumor therapy under hypoxic microenvironment by the combination of 2-methoxyestradiol and

- sodium dichloroacetate on human non-small-cell lung cancer, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2020), 3176375.
- [62] P.C. Rath, T. Mukhopadhyay, p53 gene expression and 2-methoxyestradiol treatment differentially induce nuclear factor kappa B activation in human lung cancer cells with different p53 phenotypes, *DNA Cell Biol.* 28 (12) (2009) 615–623.
- [63] Y. Zhang, C.Y. Han, F.G. Duan, p53 sensitizes chemoresistant non-small cell lung cancer via elevation of reactive oxygen species and suppression of EGFR/PI3K/AKT signaling, *Cancer Cell Int.* 19 (2019) 188.
- [64] T.E. Sutherland, M. Schuliga, T. Harris, B.L. Eckhardt, R.L. Anderson, L. Quan, A. G. Stewart, 2-methoxyestradiol is an estrogen receptor agonist that supports tumor growth in murine xenograft models of breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 11 (5) (2005) 1722–1732.
- [65] A. Mogi, H. Kuwano, TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer, *J. Biomed. Biotechnol.* (2011), 583929.
- [66] F. Saleh, A. Harb, N. Soudani, H. Zaraket, A three-dimensional A549 cell culture model to study respiratory syncytial virus infections, *J Infect Public Health* 13 (8) (2020) 1142–1147.
- [67] H. Eguchi, R. Akizuki, R. Maruhashi, M. Tsukimoto, T. Furuta, T. Matsunaga, S. Endo, A. Ikari, Increase in resistance to anticancer drugs involves occludin in spheroid culture model of lung adenocarcinoma A549 cells, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018), 15157.
- [68] H. Eguchi, H. Matsunaga, S. Onuma, Y. Yoshino, T. Matsunaga, A. Ikari, Down-regulation of claudin-2 expression by cyanidin-3-glucoside enhances sensitivity to anticancer drugs in the spheroid of human lung adenocarcinoma A549 cells, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2) (2021) 499.
- [69] F. Sambale, A. Lavrentieva, F. Stahl, C. Blume, M. Stiesch, C. Kasper, D. Bahneemann, T. Scheper, Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing, *J. Biotechnol.* 205 (2015) 120–129.
- [70] S. Sant, P.A. Johnston, The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery, *Drug Discov. Today Technol.* 23 (2017) 27–36.
- [71] R. Di Liello, V. Ciaramella, G. Barra, M. Venditti, C.M. Della Corte, F. Papaccio, F. Sparano, G. Viscardi, M.L. Iacovino, S. Minucci, M. Fasano, F. Ciardiello, F. Morgillo, Ex vivo lung cancer spheroids resemble treatment response of a patient with NSCLC to chemotherapy and immunotherapy: case report and translational study, *ESMO Open* 4 (4) (2019), e000536.
- [72] Y. Jo, N. Choi, K. Kim, H.J. Koo, J. Choi, H.N. Kim, Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking in vitro models in anti-cancer drug development, *Theranostics* 8 (19) (2018) 5259–5275.
- [73] Y. Romero, A. Aquino-Gálvez, Hypoxia in cancer and fibrosis: Part of the problem and part of the solution, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (15) (2021) 8335.
- [74] W.H. Park, Hydrogen peroxide inhibits the growth of lung cancer cells via the induction of cell death and G1 phase arrest, *Oncol. Rep.* 40 (3) (2018 Sep) 1787–1794.
- [75] H. Sherman, H.J. Gitschier, A.E. Rossi, A novel three-dimensional immune Oncology model for high-throughput testing of tumoricidal activity, *Front. Immunol.* 9 (2018) 857.
- [76] M. Gorska, A. Kuban-Jankowska, M. Zmijewski, A. Marino Gammazza, F. Cappello, M. Wnuk, M. Gorzynik, I. Rzesutek, A. Daca, A. Lewinska, M. Wozniak, DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol, *Oncotarget* 6 (17) (2015) 15449–15463.
- [77] A. Parada-Bustamante, C. Valencia, P. Reuquen, P. Diaz, R. Rincion-Rodriguez, P. A. Orihuela, Role of 2-methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, in health and disease, *Mini Rev. Med. Chem.* 15 (5) (2015) 427–438.
- [78] Górska Magdalena, Żmijewski Michał, Kuban-Jankowska Alicja, Wnuk Maciej, Rzesutek Iwona, Woźniak Michał, Neuronal nitric oxide synthase-mediated genotoxicity of 2-methoxyestradiol in hippocampal HT22 cell line, *Mol. Neurobiol.* 53 (7) (2016) 5030–5040.
- [79] Górska Magdalena, Wyszowska Roksana Maja, Kuban-Jankowska Alicja, Woźniak Michał, Impact of apparent antagonism of estrogen receptor β by fulvestrant on anticancer activity of 2-methoxyestradiol, *Anticancer Res.* 36 (5) (2016) 2217–2226.
- [80] A.J. Lee, M.X. Cai, P.E. Thomas, A.H. Conney, B.T. Zhu, Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms, *Endocrinology* 144 (8) (2003) 3382–3398.
- [81] P.J. Ko, S.J. Dixon, Protein palmitoylation and cancer, *EMBO Rep.* 19 (10) (2018), e46666.
- [82] V. Rodriguez-Lara, J.M. Hernandez-Martinez, O. Arrieta, Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications, *J. Thorac. Dis.* 10 (1) (2018) 482–497.
- [83] D.A. Bachovchin, T. Ji, W. Li, G.M. Simon, J.L. Blankman, A. Adibekian, H. Hoover, S. Niessen, B.F. Cravatt, Superfamily-wide portrait of serine hydrolase inhibition achieved by library-versus-library screening, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (49) (2010) 20941–20946.
- [84] L. Abrami, T. Dallavilla, P.A. Sandoz, M. Demir, B. Kunz, G. Savoglidis, V. Hatzimanikatis, F.G. van der Goot, Identification and dynamics of the human ZDHHC16-ZDHHC6 palmitoylation cascade, *Elife* 6 (2017), e27826.
- [85] C. Hedberg, F.J. Dekker, M. Rusch, S. Renner, S. Wetzel, Development of highly potent inhibitors of the ras-targeting human acyl protein thioesterases based on substrate similarity design, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 50 (2011) 9832–9837.
- [86] D.C. Yeh, J.A. Duncan, S. Yamashita, T. Michel, Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33148–33154.
- [87] G. Morris, K. Walder, B.K. Puri, M. Berk, M. Maes, The deleterious effects of oxidative and nitrosative stress on palmitoylation, membrane lipid rafts and lipid-based cellular signalling: new drug targets in neuroimmune disorders, *Mol. Neurobiol.* 53 (7) (2016 Sep) 4638–4658.
- [88] V. Rodriguez-Lara, J.M. Hernandez-Martinez, O. Arrieta, Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications, *J. Thorac. Dis.* 10 (1) (2018) 482–497.
- [89] X. Gao, Y. Cai, Z. Wang, W. He, S. Cao, R. Xu, H. Chen, Estrogen receptors promote NSCLC progression by modulating the membrane receptor signaling network: a systems biology perspective, *J. Transl. Med.* 17 (1) (2019) 308. Sep. 11.
- [90] T. Smida, T.C. Bruno, L.P. Stabile, Influence of estrogen on the NSCLC microenvironment: a comprehensive picture and clinical implications, *Front. Oncol.* 10 (2020) 137. Feb 18.
- [91] J. Peng, S.I. Meireles, X. Xu, et al., Estrogen metabolism in the human lung: impact of tumorigenesis, smoke, sex and race/ethnicity, *Oncotarget* 8 (63) (2017) 106778–106789.
- [92] B.J. Fuhrman, C. Schairer, M.H. Gail, et al., Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women, *J Natl Cancer Inst* 104 (4) (2012) 326–339, <https://doi.org/10.1093/jnci/djr531>.
- [93] E.L. Cavalieri, D.E. Stack, P.D. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S.L. Johansson, K.D. Patil, M.L. Gross, J.K. Gooden, R. Ramanathan, R.L. Cerny, E.G. Rogan, Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 10937–10942.
- [94] J.L. Bolton, G.R. Thatcher, Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 93–101.
- [95] L.R. Domingo, M. Rios-Gutierrez, P. Perez, Applications of the conceptual density functional theory indices to organic chemistry reactivity, *Molecules* 21 (2016).
- [96] M.E. Zaballa, F.G. van der Goot, The molecular era of protein S-acylation: spotlight on structure, mechanisms, and dynamics, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53 (4) (2018 Aug) 420–451.
- [97] S.J. Won, Cheung see kit M, martin BR. Protein depalmitoylases, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53 (1) (2018) 83–98.
- [98] M.O. Parat, R.Z. Stachowicz, P.L. Fox, Oxidative stress inhibits caveolin-1 palmitoylation and trafficking in endothelial cells, *Biochem. J.* 361 (Pt 3) (2002) 681–688.
- [99] Y. Romero, A. Aquino-Gálvez, Hypoxia in cancer and fibrosis: Part of the problem and part of the solution, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (15) (2021) 8335.
- [100] K. Skjefstad, T. Grindstad, M.R. Khanekhenari, E. Richardsen, T. Donnem, T. Kilvaer, S. Andersen, R.M. Bremnes, L.T. Busund, S. Al-Saad, Prognostic relevance of estrogen receptor α , β and aromatase expression in non-small cell lung cancer, *Steroids* 113 (2016) 5–13.
- [101] A.L. Titan, H. He, N. Lui, D. Liou, M. Berry, J.B. Shrager, L.M. Backhus, The influence of hormone replacement therapy on lung cancer incidence and mortality, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 159 (4) (2020) 1546–1556.
- [102] V. Rodriguez-Lara, M.R. Avila-Costa, An overview of lung cancer in women and the impact of estrogen in lung carcinogenesis and lung cancer treatment, *Front. Med.* 8 (2021), 600121.
- [103] V. Rodriguez-Lara, J.M. Hernandez-Martinez, O. Arrieta, Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications, *J. Thorac. Dis.* 10 (1) (2018) 482–497.
- [104] X. Gao, Y. Cai, Z. Wang, W. He, S. Cao, R. Xu, H. Chen, Estrogen receptors promote NSCLC progression by modulating the membrane receptor signaling network: a systems biology perspective, *J. Transl. Med.* 17 (1) (2019) 308. Sep. 11.