

mgr Bartosz Kazimierz Słowikowski

„Estrogeny i palenie – analiza molekularnego mechanizmu komórkowego  
związanego z odpowiedzią na benzopiren i estradiol  
w niedrobnokomórkowym raku płuc”

**Rozprawa na stopień naukowy doktora  
 nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
 w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Paweł Piotr Jagodziński

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2019



Praca współfinansowana z grantu OPUS 6 „*Rola estrogenów w epigenetycznej regulacji ekspresji genów związanych z hipoksją podczas rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuc*” nr **503-13-01124182-10039-07474** (kierownik: prof. dr hab. Paweł Jagodziński) oraz grantu dla młodych naukowców Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr **502-14-01124182-10482** (kierownik: mgr Bartosz Słowikowski)

**Słowa kluczowe: rak płuc; estrogeny; benzopiren; CYP1A1; CYP1B1; PELP1; palenie;**

**Key words: lung cancer, estrogens, benzopyrene; CYP1A1; CYP1B1; PELP1; smoking**



*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi  
Profesorowi dr. hab. Pawłowi P. Jagodzińskiemu za  
motywację i umożliwienie realizacji pracy doktorskiej*

*Dziękuję również Wszystkim Koleżankom i Kolegom z  
Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej,  
w szczególności Hannie Drzewieckiej i Bartoszowi Fryczowi  
za ciepłe przyjęcie, cenne rady oraz niejednokrotną pomoc*



*Dziękuję swoim przyjaciołom ze wszystkich zakątków Polski,  
ponieważ każdy potrzebuje się czasem pośmiać  
i zapomnieć o trudach pracy.*





*Pracę dedykuję rodzicom i dziadkom,  
bez których studia w Poznaniu i początek pracy naukowej  
pozostałby tylko w sferze marzeń.*



## Spis Treści

1. Wstęp .....	25
1.1 Wprowadzenie.....	25
1.2 Biosynteza estrogenów oraz ich rola w rozwoju nowotworu płuc .....	26
1.3 Receptory estrogenowe i ich rola w rozwoju raku płuc .....	28
1.4 PELP1/MNAR - koaktywator receptora estrogenowego .....	32
1.5 Metabolizm i znaczenie katecholowych pochodnych estrogenów .....	34
1.6 Metabolizm znaczenie benzo(a)pirenu oraz jego pochodnych .....	37
1.7 Działanie receptora dla węglowodorów aromatycznych i jego rola w regulacji ekspresji CYP1A1 i CYP1B1.....	39
1.8 Rola CYP1A1 i CYP1B1 w powstawaniu i rozwoju raka płuc .....	43
2. Założenia i cele pracy .....	45
3. Materiały i metody .....	47
3.1 Materiał kliniczny .....	47
3.2 Ustalone linie komórkowe .....	49
3.3 Odczynniki i sprzęt laboratoryjny .....	49
3.3.1 Hodowla komórkowa .....	49
3.3.2 Izolacja i pomiar stężenia RNA oraz białka .....	50
3.3.3 Elektroforetyczna analiza jakościowa RNA i DNA .....	51
3.3.4 Analiza żywotności i proliferacji komórek .....	52
3.3.5 Analiza ilościowa mRNA (synteza cDNA, Real-Time PCR, analiza produktów topnienia).....	52
3.3.6 Analiza jakościowa i ilościowa białek (western blotting).....	53
3.3.7 Pomiar ilościowy wewnątrztkankowych estrogenów .....	54
3.3.8 Analiza genotoksyczności B(a)P, 2-OH-E <sub>2</sub> oraz 4-OH-E <sub>2</sub> – test kometkowy	55
3.3.9 Sprzęt jednorazowy oraz drobny sprzęt laboratoryjny .....	56
3.4 Bufory .....	57
3.5 Metody .....	61
3.5.1 Homogenizacja tkanek w ciekłym azocie .....	61
3.5.2 Hodowla komórkowa .....	61
3.5.3. Izolacja całkowitego RNA oraz jego ocena ilościowa oraz jakościowa .....	66
3.5.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR, qPCR) .....	67
3.5.5. Izolacja i oznaczanie stężenia białka .....	72

3.5.6. Oznaczanie wewnątrztkankowego poziomu E <sub>1</sub> i E <sub>2</sub> .....	76
3.5.7. Test genotoksyczności – tekst kometkowy .....	78
3.5.8. Analizy statystyczne .....	80
4. Wyniki .....	81
4.1 Analiza ilości mRNA oraz białka PELP1, AhR, CYP1A1 oraz CYP1B1 w komórkach A549, Calu-1 oraz Beas-2b hodowanych w obecności B(a)P oraz E <sub>2</sub> .....	81
4.1.1 PELP1 .....	81
4.1.2 AHR .....	82
4.1.3 CYP1A1 .....	82
4.1.4 CYP1B1 .....	83
4.2 Wpływ B(a)P, E <sub>2</sub> oraz 4-OH E <sub>2</sub> i 2-OH E <sub>2</sub> na proliferację ustalonych linii komórkowych Calu-1, A549, Beas-2b .....	135
4.3 Test kometkowy – analiza właściwości genotoksycznych B(a)P, E <sub>2</sub> oraz 4-OH E <sub>2</sub> w zależności od obecności ERβ .....	140
4.4 Analiza ilości transkryptu i białka w materiale tkankowym pochodzącym od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc .....	149
4.4.1 PELP1 (Ryc. 77) .....	149
4.4.2 AHR (Ryc. 75) .....	150
4.4.3 CYP1A1 (Ryc. 75) .....	150
4.4.4 CYP1B1 (Ryc. 76) .....	150
4.5 Oznaczenie wewnątrztkankowego poziomu E <sub>2</sub> i E <sub>1</sub> .....	161
5. Dyskusja .....	163
Streszczenie .....	176
Abstract .....	179
Bibliografia .....	181

## Spis rycin i tabel

Ryc. 1	Podział i częstość występowania raka płuc w zależności od typu histopatologicznego. ....	25
Ryc. 2	Schemat steroidogenezy w gonadach i tkankach obwodowych. ....	27
Ryc. 3	Wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe związane z odpowiedzią na estrogeny; .....	31
Ryc. 4	Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania koaktywatora PELP1. ....	33
Ryc. 5	Struktura wielopierścieniowa najbardziej aktywnych biologicznie estrogenów: estronu i estradiolu.....	34
Ryc. 6	Synteza katecholowych pochodnych estrogenów i ich dalsze przemiany .....	35
Ryc. 7	Powstawanie metabolitów estrogenów oraz ich wewnątrzkomórkowe szkodliwe działanie .....	36
Ryc. 8	Synteza pochodnych benzo(a)pirenu i tworzenie się adduktów DNA.....	38
Ryc. 9	Wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe związane z odpowiedzią na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne .....	40
Ryc. 10	Potencjalne możliwe wzajemne oddziaływania typu cross talk między AhR i ER (na podstawie Matthews et al. 2006 [92]) .....	42
Ryc. 11	Wzajemne oddziaływanie receptorów AhR oraz ER .....	43
Ryc. 12	Synergiczny, kancerogeny efekt estrogenów oraz związków zawartym w dymie papierosowym.....	44
Ryc. 13	Wzór wysiewania komórek na krzywą standardową wzrostu dla A549, Calu-1 i Beas-2b .....	63
Ryc. 14	Krzywe standardowe wzrostu dla ustalonych linii komórkowych Calu-1; A549; Beas-2b wysianych na płytkę 24-dołkową. ....	64
Ryc. 15	Krzywe standardowe wzrostu dla ustalonych linii komórkowych A549 oraz Beas-2b wysianych na płytkę 96-dołkową. ....	65
Ryc. 16	Krzywa wzorcowa wyznaczona dla testu BCA.....	73
Ryc. 17	Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla estronu (E1) .....	77

Ryc. 18	Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla estradiolu (E2).....	78
Ryc. 19	Schemat eksperymentu oceniającego potencjalny udział ER w promowaniu genotoksycznego działania B(a)P, E <sub>2</sub> , 2-OH E <sub>2</sub> oraz 4-OH E <sub>2</sub> .....	79
Ryc. 20	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Calu-1, po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	84
Ryc. 21	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Calu-1, po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	85
Ryc. 22	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Calu-1, po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	86
Ryc. 23	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Calu-1, w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji.....	87
Ryc. 24	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej A549, po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	88
Ryc. 25	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej A549, po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	89
Ryc. 26	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej A549, po 72h godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	90
Ryc. 27	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej A549, w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji.....	91
Ryc. 28	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Beas-2b, po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	92
Ryc. 29	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Beas-2b, po 48h godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	93
Ryc. 30	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Beas-2b, po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	94
Ryc. 31	Poziom transkryptu PELP1 w linii komórkowej Beas-2b, w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji.....	95
Ryc. 32	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Calu-1 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.....	97

Ryc. 33	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Calu-1 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	98
Ryc. 34	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Calu-1 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	99
Ryc. 35	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Calu-1 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji .....	100
Ryc. 36	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej A549 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	101
Ryc. 37	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej A549 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	102
Ryc. 38	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej A549 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	103
Ryc. 39	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej A549 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji .....	104
Ryc. 40	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Beas-2b po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	105
Ryc. 41	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Beas-2b po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	106
Ryc. 42	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Beas-2b po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	107
Ryc. 43	Poziom transkryptu AHR w linii komórkowej Beas-2b w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji .....	108
Ryc. 44	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej A549 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	109
Ryc. 45	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej A549 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	110
Ryc. 46	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej A549 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	111
Ryc. 47	Poziom transkryptu CYP1A1 w linii komórkowej A549 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji .....	112

Ryc. 48	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	113
Ryc. 49	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	114
Ryc. 50	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	115
Ryc. 51	Poziom transkryptu CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji.....	116
Ryc. 52	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Beas-2b po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	117
Ryc. 53	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Beas-2b po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	118
Ryc. 54	Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Beas-2b po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	119
Ryc. 55	Poziom transkryptu CYP1A1 w linii komórkowej Beas-2b w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji.....	120
Ryc. 56	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej A549 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	121
Ryc. 57	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej A549 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	122
Ryc. 58	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej A549 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	123
Ryc. 59	Poziom transkryptu i CYP1B1 w linii komórkowej A549 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji.....	124
Ryc. 60	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	125
Ryc. 61	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	126
Ryc. 62	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	127



Ryc. 63	Poziom transkryptu CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji .....	128
Ryc. 64	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Beas-2b po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	129
Ryc. 65	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Beas-2b po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	130
Ryc. 66	Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Beas-2b po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami. ....	131
Ryc. 67	Poziom transkryptu CYP1B1 w linii komórkowej Beas-2b w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji .....	132
Ryc. 68	Wpływ B(a)P lub/i E <sub>2</sub> na proliferację komórek linii Calu-1. ....	136
Ryc. 69	Wpływ B(a)P lub/i E <sub>2</sub> oraz jego 2- i 4- hydroksylowanych pochodnych na proliferację komórek linii A549 .....	137
Ryc. 70	Wpływ B(a)P lub/i E <sub>2</sub> oraz jego 2- i 4- hydroksylowanych pochodnych na proliferację komórek linii Beas-2b .....	138
Ryc. 71	Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na niemodyfikowanej linii A549, poddanej inkubacji z B(a)P; E <sub>2</sub> ;4- i 2-OH E <sub>2</sub> .....	141
Ryc. 72	Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na ZA549 z wyciszonym genem lucyferazy (kontrola transdukcji), poddanej inkubacji z B(a)P; E <sub>2</sub> ;4- i 2-OH E <sub>2</sub> .....	143
Ryc. 73	Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na A549 z wyciszonym genem kodującym ERβ (kontrola transdukcji), poddanej inkubacji B(a)P; E <sub>2</sub> ;4- i 2-OH E <sub>2</sub> .....	145
Ryc. 74	Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na A549 z powielonym genem kodującym ERβ poddanej inkubacji z B(a)P; E <sub>2</sub> ;4- i 2-OH E <sub>2</sub> .....	147
Ryc. 75	Porównanie ilości transkryptu genów AHR i CYP1A1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej ( A ). Analizy B – E dotyczą	

porównania ilości mRNA badanego genu w tkance nowotworowej dla danych zbiorów.

153

Ryc. 76 Porównanie ilości transkryptu genu (A) i białka (F) CYP1B1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej.....155

Ryc. 77 Porównanie ilości transkryptu genu (A) i białka (F) PELP1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej.....157

Ryc. 78 Wykresy prezentujące wewnątrzkomórkowy poziom E1 oraz E2 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej.....162

## Spis Tabel

Tabela 1. Wytyczne 7 edycji klasyfikacji TNM obejmującej ocenę wielkości guza (T), stan regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz przerzuty odległe (M). .....	47
Tabela 2 C.D. Wytyczne 7 edycji klasyfikacji TNM obejmującej ocenę wielkości guza (T), stan regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz przerzuty odległe (M). .....	48
Tabela 3. Warunki eksperymentów komórkowych dla linii A549, Calu-1 i Beas-2b....	62
Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym .....	70
Tabela 5. Profil temperaturowy reakcji dla cDNA genów PELP1, PBGD, hMRPL, POLR2A, .....	71
Tabela 6. Profil temperaturowy reakcji dla cDNA genów CYP1A1, CYP1B1 oraz AhR (zgodnie z zaleceniami producenta wykorzystanych starterów) .....	71
Tabela 7. Sekwencje starterów przedniego F (ang. forward) i wstecznego R (ang. reverse) dla wybranych genów referencyjnych .....	71
Tabela 8 Sekwencje starterów przedniego (F) i wstecznego R dla badanych genów. Sekwencje starterów dla genów CYP1A1, CYP1B1 oraz AHR są tajemnicą firmy, w związku z tym, w tabeli podane zostały numery katalogowe zamówionych testów .....	72
Tabela 9. Charakterystyka użytych przeciwciał i ich zastosowane rozcieńczenia .....	75
Tabela 10. Kolejność buforów i czas płukania w procedurze strippingu. ....	76
Tabela 11. Wyniki półilościowej analizy białek Western Blot .....	133
Tabela 12. Analiza statystyczna wpływu B(a)P, E2 oraz jego 2 – i 4- hydroksylowanych pochodnych na proliferację badanych linii komórkowych.....	139
Tabela 13 Analiza statystyczna ilości transkryptów CYP1A1 oraz CYP1B1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej uwzględniająca dane kliniczne i histopatologiczne badanego materiału.....	159
Tabela 14 Analiza statystyczna ilości transkryptów PELP1 oraz AhR w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej uwzględniająca dane kliniczne i histopatologiczne badanego materiału.....	160



## Wykaz stosowanych skrótów

Skrót	Rozwinięcie polskie	Rozwinięcie angielskie
<b>2-OH E<sub>1</sub></b>	2-hydroksyestron	N/A
<b>2-OH E<sub>2</sub></b>	2-hydroksyestradiol	N/A
<b>4-OH E<sub>1</sub></b>	4-hydroksyestradiol	N/A
<b>4-OH E<sub>2</sub></b>	4-hydroksyestron	N/A
<b>AhR</b>	receptor dla węglowodorów aromatycznych	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
<b>AhRR</b>	represor receptora węglowodorów aromatycznych	<i>aryl hydrocarbon receptor repressor</i>
<b>AP-1</b>	białko aktywujące 1	<i>activating protein 1</i>
<b>ARNT</b>	transporter jądrowy receptora węglowodorów aromatycznych	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter</i>
<b>B(a)P</b>	benzo(a)piren	N/A
<b>BCA</b>	test kwasu bichoninowego	<i>bicinchoninic acid assay</i>
<b>BSA</b>	bydlęca albumina osoczowa	<i>bovine serum albumin</i>
<b>cAMP</b>	cykliczne AMP	<i>cyclic AMP</i>
<b>cDNA</b>	komplementarne DNA	<i>complementary DNA</i>
<b>CYP19A1</b>	cytochrom P450 19 A1 (aromataza)	N/A
<b>CYP1A1</b>	cytochrom p 450 1 A1	<i>cytochrome p450 1 A1</i>
<b>CYP1B1</b>	cytochrom p 450 1 B1	<i>cytochrome p450 1 B1</i>
<b>DHEA</b>	dihydroepiandrostenon	N/A
<b>DHEA-S</b>	siarczan dihydroepiandrostenon	N/A
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek	N/A
<b>E1</b>	estron	N/A
<b>E1-S</b>	siarczan Estronu	N/A
<b>E2</b>	estradiol	N/A
<b>E2-S</b>	siarczan estradiolu	N/A
<b>EGFR</b>	receptor dla czynnika wzrostu nabłonka	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>ER (α/β)</b>	receptor estrogenowy α/β	<i>estrogen receptor α/β</i>

<b>ERE</b>	miejsca odpowiedzi na estrogen	<i>estrogen response elements</i>
<b>Erk</b>	kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym	<i>extracellular-regulated kinase</i>
<b>ESD;</b>	hydrolaza S-formylglutationu	<i>S-formylglutathione hydrolase</i>
<b>EST</b>	sulfotransferaza estrogenowa	<i>estrogen sulphotransferase</i>
<b>FBS</b>	płodowa surowica bydlęca	<i>fetal bovine serum</i>
<b>GAPDH</b>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GFR</b>	receptor czynnika wzrostu	<i>growth factor receptor</i>
<b>GPR30</b>	związany z białkiem G receptor estrogenowy	<i>g-coupled estrogen receptor</i>
<b>hMRPL19,</b>	mitochondrialne białko rybosomalne L19	<i>human mitochondrial ribosomal protein L19</i>
<b>HRP</b>	peroksydaza chrzanowa	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>HSD17β</b>	dehydrogenaza 17β hydroksysteroidowa	<i>17β hydroxysteroid dehydrogenase</i>
<b>MAPK</b>	aktywowana mitogenami kinaza białek	<i>mitogen acitvated protein kinase</i>
<b>MNAR</b>	modulator niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych	<i>modulator of nongenomic action of estrogen receptor</i>
<b>NDRP/NSCLC</b>	niedrobnokomórkowy rak płuc	<i>non-small cell lung cancer</i>
<b>NF-κB</b>	jądrowy czynnik κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
<b>PBGD</b>	deaminazę profobilinogenu	<i>porphobilinogen deaminase</i>
<b>PBS</b>	buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej	<i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PELP1</b>	białko bogate w prolinę, kwas glutaminowy i leucynę	<i>proline- glutamic acid- and leucine rich protein</i>
<b>PI3K</b>	kinaza 3-fosfoinozotolu	<i>phosphoinositol 3-kinase</i>
<b>POLR2A</b>	podjednostka A polimerazy II RNA	<i>RNA Polymerase II Subunit A</i>
<b>pRb</b>	białko siatkówczaka	<i>retinoblastoma protein</i>
<b>qPCR</b>	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>ROS</b>	reaktywne formy tlenu	<i>reactive oxygen species</i>

<b>RP</b>	rak płuc	<i>lung cancer</i>
<b>SDS</b>	dodecylosiarczan sodu	N/A
<b>SP-1</b>	białko specyficzności 1	<i>specificity protein 1</i>
<b>STS</b>	sulfataza steroidowa	<i>steroid sulphatase</i>
<b>TF</b>	czynnik transkrypcyjny	<i>transcription factor</i>
<b>WWA</b>	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne	<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
<b>XRE</b>	rejony odpowiedzi na ksenobiotyki	<i>xenobiotic response elements</i>

N/A\* - nie dotyczy

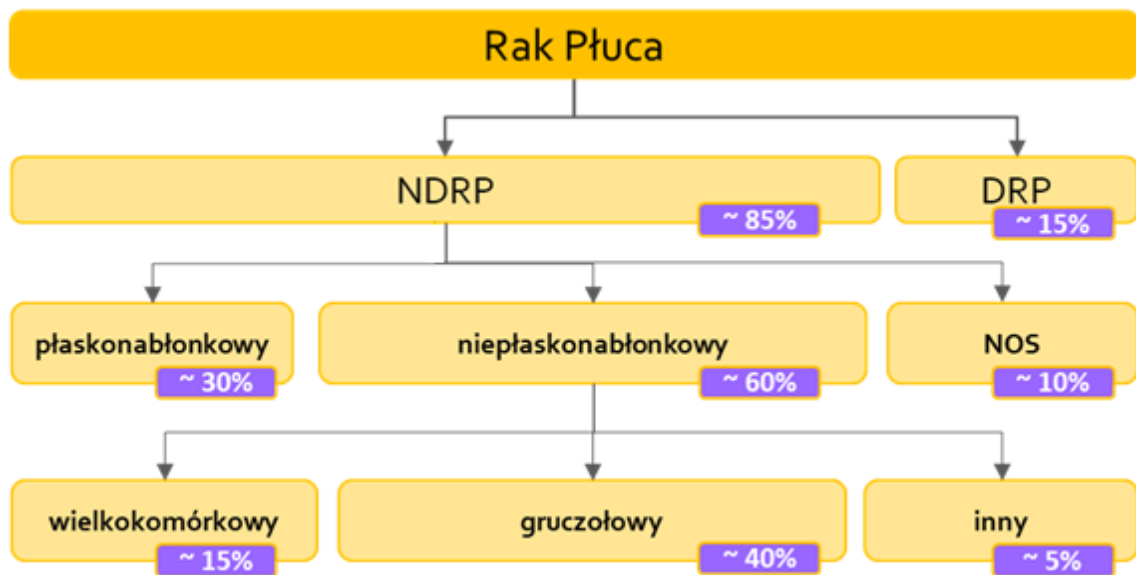




## 1. Wstęp

### 1.1 Wprowadzenie

Zgodnie z najnowszymi statystykami rak płuca (RP; ang. *lung cancer*) jest jednym z najczęściej diagnozowanych typów nowotworów. Stanowi on około 11.6% wszystkich rozpoznanych przypadków zmian neoplastycznych na całym świecie. Mimo to, jego wyleczalność nie poprawiła się znacząco w ciągu ostatnich lat i wciąż pozostaje on jedną z najpowszechniejszych przyczyn śmierci spowodowanych nowotworami zarówno wśród mężczyzn (22%) jak i kobiet (13.8%) [1]. W Polsce, RP również jest najczęściej diagnozowaną zmianą złośliwą i stanowi główną przyczynę zgonów z powodu nowotworów. Istotnym jest, że od kilku lat notuje się zwiększoną umieralność wśród kobiet (zwłaszcza po 50 roku życia) i wzrost liczby zachorowań u osób niepalących [2], [3]. Kliniczna klasyfikacja nowotworu płuca wyróżnia jego dwa główne typy histopatologiczne – występującego w około 85% wszystkich przypadków niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP; ang. *non-small cell lung cancer*) oraz raka drobnokomórkowego (DRP; ang. *small cell lung cancer*) diagnozowanego w pozostałych



Ryc. 1 Podział i częstość występowania raka płuca w zależności od typu histopatologicznego.

Skróty: **NDRP** - niedrobnokomórkowy rak płuca; **DRP** - drobnokomórkowy rak płuca;  
**NOS** - nieokreślony

15% zmian. NDRP jest dodatkowo różnicowany na trzy inne podtypy w zależności od jego cech mikroskopowych (Ryc. 1). Wśród nich wyróżniamy raka płaskonabłonkowego,

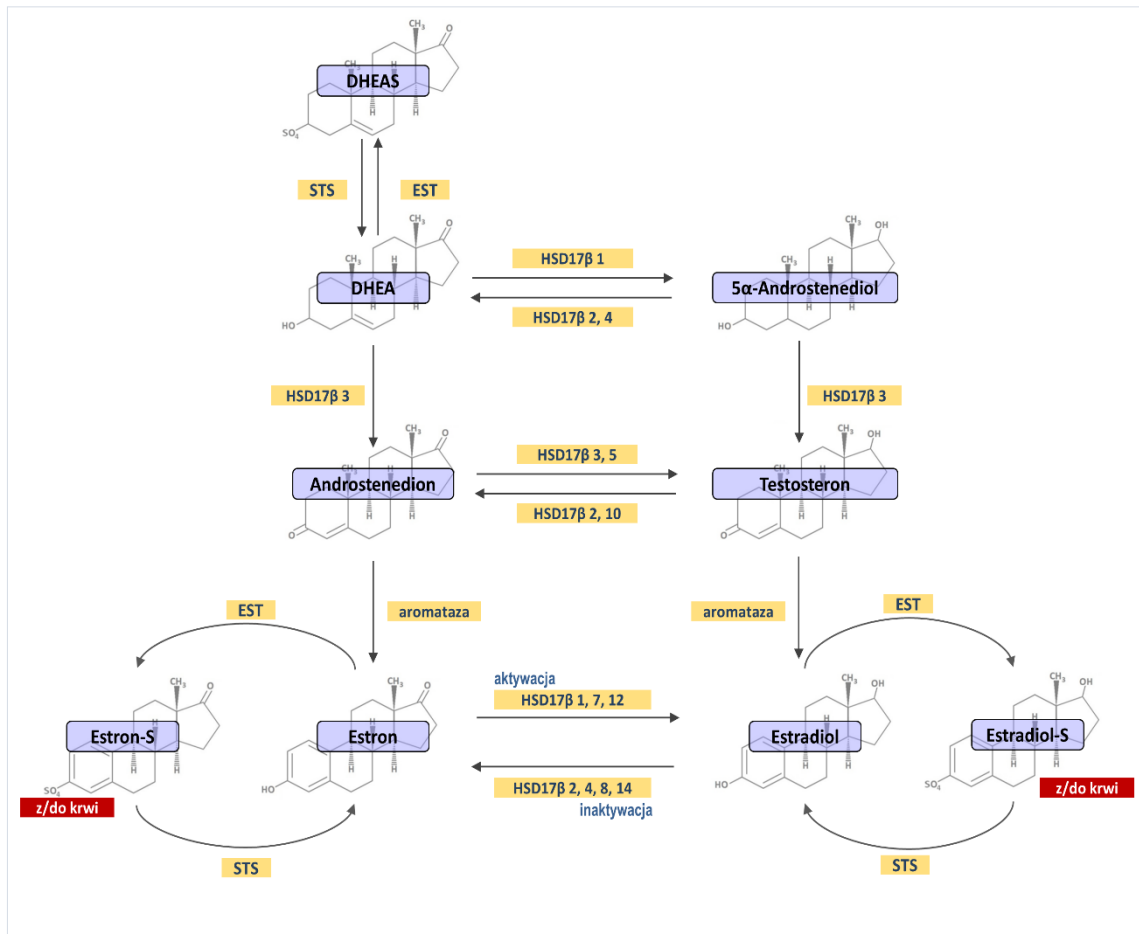
który powstaje z nabłonka wyściełającego drogi oddechowe na skutek palenia papierosów. Charakteryzuje się on powolnym wzrostem i późnym przerzutowaniem. Kolejnym typem jest rak gruczołowy, który występuje częściej u kobiet i wywodzi się z komórek gruczołowych umiejscowionych w nabłonku oddechowym. W tym przypadku przerzuty do węzłów chłonnych lub innych tkanek mogą pojawić się bardzo wcześnie. Ostatnim jest rak wielkokomórkowy, który rozpoznawany jest zazwyczaj również u osób palących [4], [5]. Złe rokowania i wysoki wskaźnik umieralności zmuszają do poznania biochemicznych i molekularnych procesów prowadzących do rozwoju i progresji tego nowotworu. Dzięki dogłębniemu zrozumieniu tych zależności możliwym stanie się znalezienie nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

Mechanizm powstawania i późniejszego rozrostu RP jest bardzo złożony i skomplikowany. Związany jest z wieloma czynnikami środowiskowymi, genetycznymi jak i molekularnymi. Powszechnie wiadomym jest, że główne zagrożenia odpowiedzialne za pojawienie się tego typu nowotworu uwarunkowane są długotrwałym wdychaniem substancji takich jak azbest, opary rozpuszczalników organicznych czy dym tytoniowy. Niestety przeważająca większość ludzi chorująca na RP to byli lub obecni palacze – zarówno bierni jak i czynni [4]–[8]. Związek pomiędzy ekspozycją na dym papierosowy a rozwojem RP jest znany i dobrze udokumentowany, niemniej jednak obecne badania podkreślają istotną rolę którą odgrywają w tym procesie estrogeny [5], [9]–[11].

## **1.2 Biosynteza estrogenów oraz ich rola w rozwoju nowotworu płuc**

Estrogeny są związkami silnie lipofilnymi. Właściwość ta ułatwia im przenikanie przez błonę komórkową bezpośrednio do cytoplazmy. Powstają one w wyniku przekształcenia cholesterolu i są wytwarzane głównie w jajnikach [12], ale na potrzeby lokalne mogą powstawać w komórkach innych tkanek obwodowych (np. gruczołu sutkowego, wątroby [13], tkanki tłuszczowej żółtej [14], jelita grubego [15], płuc [16]) (Ryc. 2). Aktualne badania pokazują, że wewnątrzkomórkowa synteza aktywnych hormonów steroidowych, bez ich wydzielania do przestrzeni pozakomórkowej i układu krążenia, jest zjawiskiem powszechnym. Badaniem tego typu procesów zajmuje się intrakrynologia, która jest stosunkowo nowym działem endokrynologii [17]. Wśród estrogenów możemy wyróżnić cztery rodzaje związków steroidowych: estron ( $E_1$ ),  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), estriol oraz esterol, który powstaje tylko w czasie ciąży [12], [18].

W tkankach obwodowych (w tym płucach) istnieją trzy główne szlaki metaboliczne prowadzące do syntezy E<sub>2</sub>, który jest uważany za najbardziej aktywny biologicznie estrogen [19]. Pierwszy z nich związany jest aktywnością aromatazy (CYP19A1) - enzymu przeprowadzającego aromatyzację androstenedionu do E<sub>1</sub> lub testosteronu do E<sub>2</sub> (Ryc. 2) [11], [20]. Drugi szlak zależy od działania sulfatazy steroidowej (STS; ang. *steroid sulphatase*), która hydrolizuje napływające z krwi



**Ryc. 2** Schemat steroidogenezy w gonadach i tkankach obwodowych (źródło: opracowanie własne).

**Skróty:** **DHEAS** - siarczan dihydroepiandrostenonu; **HSD17β** - dehydrogenaza hydroksysteroidowa; **DHEA** - dihydroepiandrostenon; **STS** - sulfataza steroidowa; **EST** - sulfotransferaza estrogenowa; **Estron-S** - siarczan estronu, **Estradiol-S** - siarczan estradiolu;

siarczanowe pochodne E<sub>1</sub> lub E<sub>2</sub> do wolnych form, czyniąc je tym samym bardziej aktywnymi i podatnymi na kolejne przemiany [21]–[23]. Trzeci szlak wykorzystuje dehydrogenazę 17-beta hydroksysteroidową typu 1 (HSD17β1; ang. *hydroxysteroid 17β dehydrogenase type 1*). Enzym ten katalizuje redukcję E<sub>1</sub> do znacznie bardziej aktywnego E<sub>2</sub> (Ryc. 2.) [16], [24], [25]. Ilość estrogenów w układzie krążenia jest dodatkowo regulowana przez sulfotransferazę estrogenową (EST; ang. *estrogen*

*sulphotransferase*) oraz dehydrogenazę 17 $\beta$  hydroksysteroidową typu 2 (HSD17 $\beta$ 2; ang. *hydroxysteroid 17 $\beta$  dehydrogenase type 2*). EST wiążąc estrogeny z resztami siarczanowymi, przekształca je w nieaktywne formy, natomiast HSD17 $\beta$ 2 katalizuje inaktywację E<sub>2</sub> poprzez jego utlenienie do E<sub>1</sub> (Ryc. 2) [23].

Wyniki wielu prac wskazują, że tkanka nowotworu płuc w porównaniu do histopatologicznie niezmięnionej charakteryzuje się zwiększoną ilością wewnątrzkomórkowego E<sub>2</sub>, co może leżeć u podstaw przyspieszonej progresji nowotworu [10], [24], [26]. Istnieją doniesienia, które sugerują, że nieprawidłowe stężenie E<sub>2</sub> w komórkach może być spowodowane deregulacją lokalnej tkankowo steroidogenezy. Wiele niezależnych badań wykazało, że tkanka nowotworowa płuc wyróżnia się zmienioną (w porównaniu do tkanki zdrowej) ilością enzymów zaangażowanych w syntezę estrogenów *in situ*. Do tej grupy należą głównie, wspomniane wcześniej białka CYP19A1, HSD17 $\beta$ 1 i HSD17 $\beta$ 2, które są odpowiedzialne za bezpośredni metabolizm androstenedionu, testosteronu, E<sub>1</sub> oraz E<sub>2</sub> (Ryc. 2) [11], [16], [25]–[28]. Naukowcy podkreślają, że wysoki poziom estrogenów odgrywa istotną rolę w przyspieszaniu proliferacji *in vitro* wielu linii komórkowych RP [27], [29], [30]. Wyniki te są potwierdzone licznymi badaniami epidemiologicznymi, które dowiodły, że estrogeny mogą indukować progresję RP. Zostało to przede wszystkim zaobserwowane u pacjentek, które stosowały hormonalną terapię zastępczą. Charakteryzowały się one gorszym współczynnikiem przeżycia, podobnie jak mężczyźni posiadający większą masę żółtej tkanki tłuszczowej, która może być źródłem estrogenów [31]–[33].

### 1.3 Receptory estrogenowe i ich rola w rozwoju raku płuc

Udowodniona obecność receptorów estrogenowych (ER; ang. *estrogen receptor*) w tkance płuc – zarówno izoformy  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) jak i  $\beta$  (ER $\beta$ ) - sugeruje ważną rolę biologiczną estrogenów w tkance płuc [34]–[37]. ER $\alpha$  i ER $\beta$  są kodowane przez geny (odpowiednio) *ESR1* oraz *ESR2*. Obydwie izoformy ER są aktywne biologicznie i wykazują specyficzność tkankową oraz powinowactwo do ligandów zarówno endo- jak i egzogennych. Receptory te najliczniej występują w komórkach tkanek gruczołu sutkowego oraz endometrium, gdzie odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji wielu genów [38]–[40]. W następstwie aktywacji ER wzrasta ekspresja genów kodujących białka, które stymulują proliferację i przeżycie komórek, w tym również komórek nowotworowych [41].

W komórkach tkanki płuc ER $\beta$  jest głównym receptorem, przez który estrogeny regulują rozwój i funkcje tego narządu. W badaniach na myszach wykazano, że samice z wyciszonym genem *ESR2* charakteryzowały się zredukowaną ilością pęcherzyków płucnych, a co za tym idzie zwiększoną produkcją surfaktantu. Zmian takich nie zaobserwowano u samców, co tłumaczono mniejszą ilością estrogenów we krwi obwodowej [42]. Inne doświadczenie, wykorzystujące myszy z nokautem *ER*, pozwoliło wykazać, że zarówno samce jak i samice posiadają źle rozwinięte płuca z niewystarczającą ilością pęcherzyków płucnych i charakteryzujące się nieprawidłową dystrybucją kolagenu. Obserwacja ta sugeruje, że estrogeny są bardzo ważne w prawidłowym rozwoju, funkcjonowaniu i regeneracji tkanki płuc [43]. ER $\alpha$  jak i ER $\beta$  zostały również zidentyfikowane w tkance płuc zmienionych nowotworowo, które często odznaczają się ich zwiększoną ilością w porównaniu do komórek prawidłowych [44], [45]. W ciągu ostatnich lat pojawiły się liczne badania, dotyczące konsekwencji jakie niesie za sobą podwyższona ilość wspomnianych receptorów. Jedne z nich sugerują, że może wiązać się to z gorszą prognozą przeżycia pacjentów z RP [28], inne zaś wskazują, że rokowania są bardziej korzystne [45]. Przyczyna tych niezgodności może być spowodowana tym, że przy ocenie korelacji pod uwagę bierze się tylko status ER, natomiast wielu naukowców podkreśla, że przy tego typu analizach, w tkance nowotworowej powinno się uwzględnić poziom aromatazy [28], HSD17B1 [24], receptora dla progesteronu lub czynnika wzrostu naskórka (EGFR; ang. *epidermal growth factor receptor*) [46]. Pomimo różnic w uzyskanych wynikach, potwierdzona obecność ER $\alpha$  i ER $\beta$  w tkance RP pozwala sugerować ich istotną rolę w progresji tego nowotworu.

Połączenie się estrogenu z ER inicjuje sygnał wewnątrzkomórkowy, który może wpływać na biologiczne właściwości komórek za pośrednictwem kilku różnych szlaków molekularnych. Wśród nich możemy wyróżnić dwie ścieżki sygnalizacyjne, które są najistotniejszymi drogami działania estrogenów w komórkach docelowych: genomową, pozwalającą na długotrwałe programowanie komórki na poziomie regulacji genetycznych oraz niegenomową umożliwiającą relatywnie szybkie przystosowanie się komórki do dynamicznie zmieniających się warunków środowiskowych [47] (Ryc. 3)

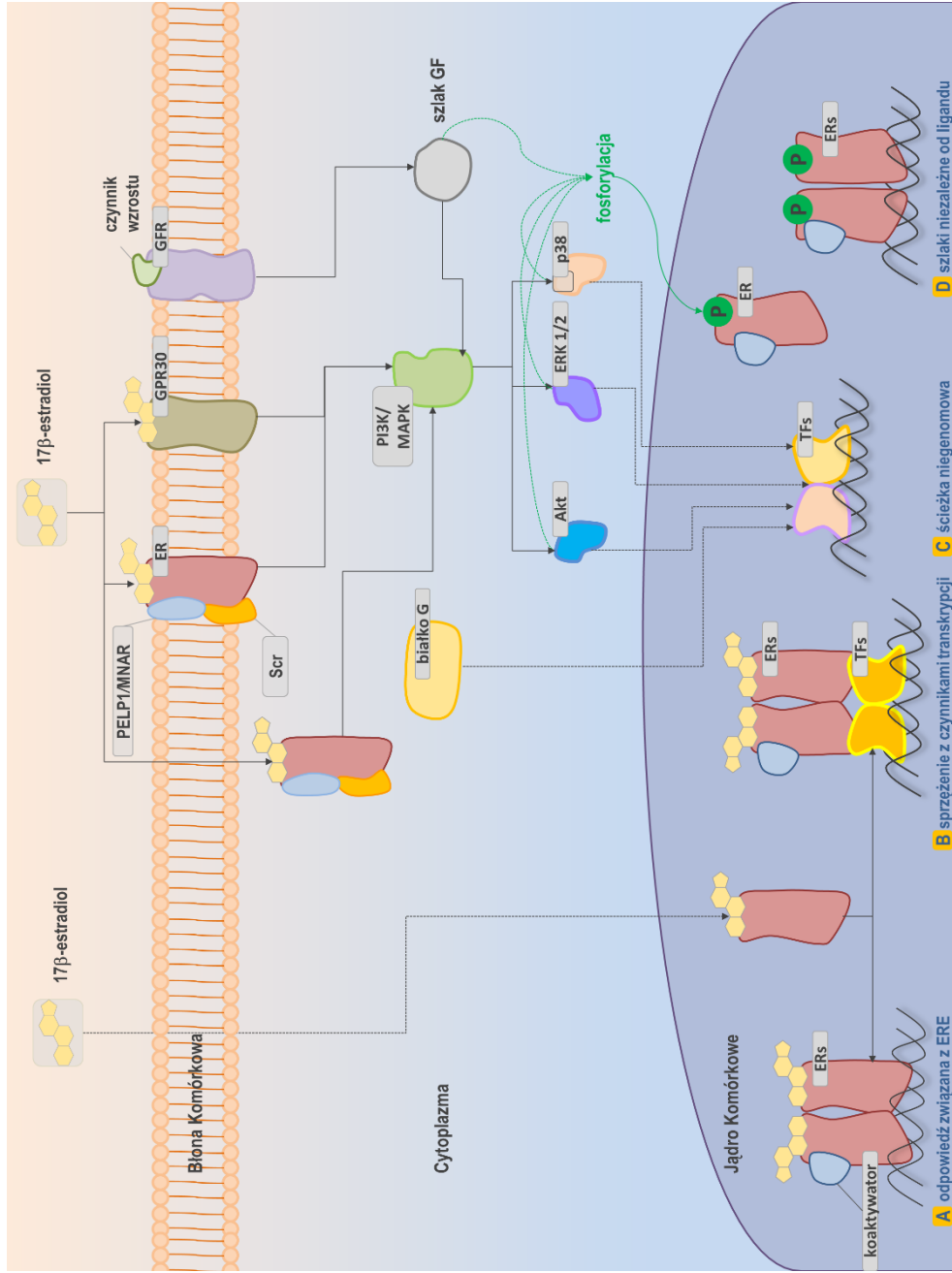
W ścieżce genomowej, która uważana jest za klasyczny mechanizm oddziaływania estrogenów, hormon łączy się z ER, co prowadzi do dimeryzacji receptora

i jego translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się on z DNA w miejscach znanych jako rejony odpowiedzi na estrogen (ERE; ang. *estrogen response elements*), które zlokalizowane są zazwyczaj w promotorze docelowych genów. W efekcie związanie ER z ERE indukuje transkrypcję genów zależnych od działania estrogenu [36], [37] (Ryc. 3A) Inną możliwością jest przyłączenie się aktywnego dimeru ER do różnych czynników transkrypcyjnych. Inicjuje to przyciąganie dodatkowych koaktywatorów i pozwala na utworzenie kompleksów białkowych regulujących transkrypcję genów, których promotory nie zawierają ERE. Grupę tę stanowi około jedna trzecia regulowanych przez estrogeny genów (Ryc. 3B). Do czynników transkrypcyjnych, oddziałujących z ER w ten sposób zaliczamy, między innymi białka AP-1 (ang. *activating protein 1*), SP1 (ang. *specifity protein 1*) oraz czynnik NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa B*) [48], [49]. Mechanizm ten odpowiada za regulację ekspresji genów kodujących między innymi kolagenazę, insulinopodobny czynnik wzrostu 1, receptor LDL czy interleukinę 6 [37], [38], [50].

W szlaku niegenomowym (często nazywanym nietranskrypcyjnym), estrogen tworzy kompleks głównie z błonowymi izoformami ER, zlokalizowanymi w tak zwanych kaweolach - wpukleniach błony komórkowej, które można spotkać w wielu typach komórek [51]. Inną równie powszechną drogą działania jest aktywacja receptorów związanych z białkiem G, wśród których największe znaczenie ma receptor GPR30 (ang. *G-coupled receptor for estrogen*) [47], [52]. Połączenie liganda z tego typu receptorem skutkuje wyzwoleniem natychmiastowego efektu, jakim jest stymulacja cyklazy adenylanowej, a co za tym idzie produkcji cyklicznego AMP (cAMP) oraz uwolnienie dużej ilości jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej. Aktywowany jest szereg kinaz cytoplazmatycznych, między innymi kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK; ang. *mitogen acitvated protein kinase*) czy kinazy 3-fosfoinozoytolu (PI3K; ang. *phosphoinositol 3-kinase*) (Ryc. 3C) [37], [51], [53]

**Ryc. 3** Wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe związane z odpowiedzią na estrogeny (źródło: opracowanie własne);

**A. Klasyczna droga genomowa:** Związanie się aktywnego ER z ERE w sekwencjach promotorowych genów docelowych uruchamia ich transkrypcję; **B. Szlak genomowy nie wymagający związania z ERE:** Aktywny ER tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi regulując w ten sposób ekspresję genów, które nie posiadają miejsc ERE; **C. Ścieżka niengenomowa:** Połączenie się hormonu z ER lub GPR30 aktywuje różne kinazy białkowe co skutkuje wywołaniem kaskady fosforylacji i szybką odpowiedzią komórkową; **D. Szlak niezależny od ligandu:** ER mogą być stymulowane przez czynniki wzrostu co powoduje ich fosforylację, umożliwiając wiązanie się z DNA i działanie jako czynnik transkrypcyjny.



**Skróty:** **ER** – receptor estrogenowy; **PELP1/MNAR** – białko bogate w prolinę, kwas glutaminowy i leucynę (ang. *proline- glutamic acid- and leucine rich protein*); **GPR30** – receptor estrogenowy związany z białkiem G (ang. *G-coupled receptor for estrogen*); **GFR** – receptor czynników wzrostu (ang. *growth factor receptor*); Scr – kinaza tyrozynowo-białkowa Scr; **PI3K** – kinaza 3-fosfoinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*); **MAPK** – kinaza aktywowana mitogenem (ang. *mitogen activated kinase*); **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa; **Erk** – kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym (ang. *extracellular-regulated kinase*); **TF** – czynnik transkrypcyjny (ang. *transcription factor*).

Szlak genomowy jest ściśle związany z innym mechanizmem działania ER. Opiera się on na możliwości oddziaływania receptora niezależnie od ligandu. Jest to możliwe dzięki jego fosforylacji, która jest wynikiem opisanej powyżej kaskady kinaz białkowych. W wyniku tego następuje aktywacja ER i połączenie go z DNA, gdzie działa jako swojego rodzaju czynnik transkrypcyjny (Ryc. 3D) [50].

Za pośrednictwem wszystkich powyższych ścieżek sygnalizacyjnych, regulacji mogą podlegać procesy przeżycia, migracji i proliferacji komórek, a także tworzenia nowych naczyń krwionośnych, co ma istotne znaczenie w przypadku powstawania i rozwoju nowotworu [41], [47].

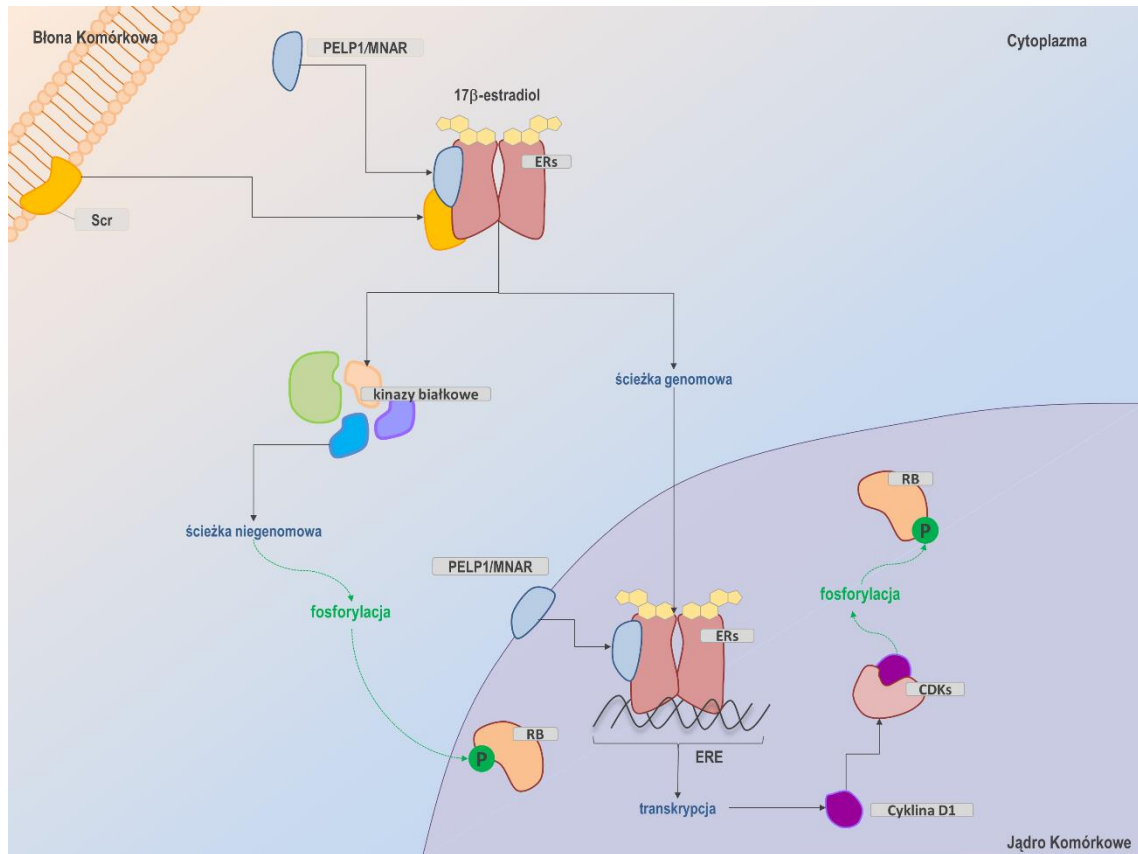
#### **1.4 PELP1/MNAR - koaktywator receptora estrogenowego**

Molekularny mechanizm przekazywania sygnału hormonalnego jest bardzo skomplikowany i wymaga zaangażowania licznych wewnątrzkomórkowych cząsteczek. W celu wyzwolenia odpowiedzi komórkowej, często dochodzi do związania receptorów z koaktywatorami. Cząsteczki te bardzo często są białkami i nie uczestniczą bezpośrednio w transkrypcji genów, jednakże modulują funkcje kompleksu transkrypcyjnego [37], [54]. Na szczególną uwagę zasługuje białko PELP1 (białko bogate w prolinę, kwas glutaminowy i leucynę; ang. *proline- glutamic acid- and leucine rich protein*), wcześniej znane pod nazwą modulatora niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych (MNAR, ang. *modulator of nongenomic action of estrogen receptor*). Nazwa ta okazała się jednak nieadekwatna, ponieważ PELP1 uczestniczy zarówno w genomowej jak i niegenomowej odpowiedzi na estrogen (Ryc. 4) [55]. W ścieżce genomowej wiąże się z kompleksem estrogen-ER, co skutkuje przyspieszeniem jego transportu do jądra komórkowego i transkrypcją swoistych genów, w tym kluczowego regulatora cyklu komórkowego cykliny D1, która koordynuje działanie kinaz zależnych od cyklin (Ryc. 4). Z kolei w szlaku niegenomowym, integracja PELP1 z ER prowadzi do nasilenia sygnalizacji za pośrednictwem MAPK, PI3K i Scr [55]. Prowadzi to do fosforylacji i zahamowania funkcji białka pRb (ang. *retinoblastoma protein*), które jest znanym regulatorem proliferacji i różnicowania komórkowego. [56]. Opisane, możliwe oddziaływania z innymi cząsteczkami wewnątrzkomórkowymi mogą zachodzić dzięki specyficznej budowie PELP1, które jest białkiem wielodomenowym, zawierającym w swojej strukturze obszary bogate w leucynę (motyw LXXLL) oraz prolinę i kwas



glutaminowy (motyw PXXP). Obecność tych sekwencji umożliwia zwiążanie się koaktywatora z odpowiednimi białkami komórkowymi [37], [55], [57], [58].

PELP1 ulega ekspresji w wielu tkankach, gdzie pośredniczy w przekazywaniu fizjologicznego efektu zapewnianego przez estrogen, ale jest szczególnie znane z roli jaką pełni w rozwoju ER-pozytywnego raka gruczołu sutkowego [59]. Intensywne badania prowadzone nad PELP1 zakwalifikowały go do uznania za protoonkogen, gdyż



**Ryc. 4** Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania koaktywatora PELP1 (źródło: opracowanie własne)

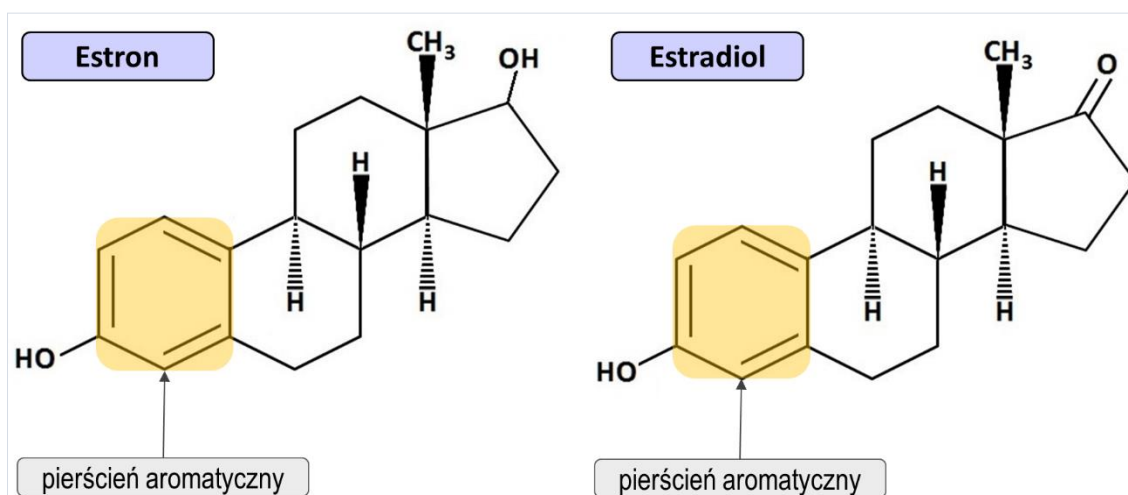
**Skróty:** **Scr** - kinaza serynowo-treoininowa Scr; **PELP1** - białko bogate w prolinę, kwas glutaminowy i leucynę (ang. *proline- glutamic acid- and leucine rich protein*); **ERs** - receptory estrogenowe (ang. *estrogen receptors*); **ERE** - miejsca odpowiedzi na estrogen (ang. *estrogen response elements*); **RB** - białko siatkówczaka (ang. *retinoblastoma protein*)

zaobserwowano, że ulega on nadekspresji również w wielu innych rodzajach nowotworów, między innymi jajnika, prostaty i endometrium [9], [57], [58], [60]. Zwiększona ilość cząsteczek PELP1 utrzymuje stężenie cykliny D1 na wyższym niż zwykle poziomie oraz stymuluje fosforylację wspomnianego pRb. Związane jest to z deregulacją cyklu komórkowego, zwiększoną proliferacją i zaburzonym

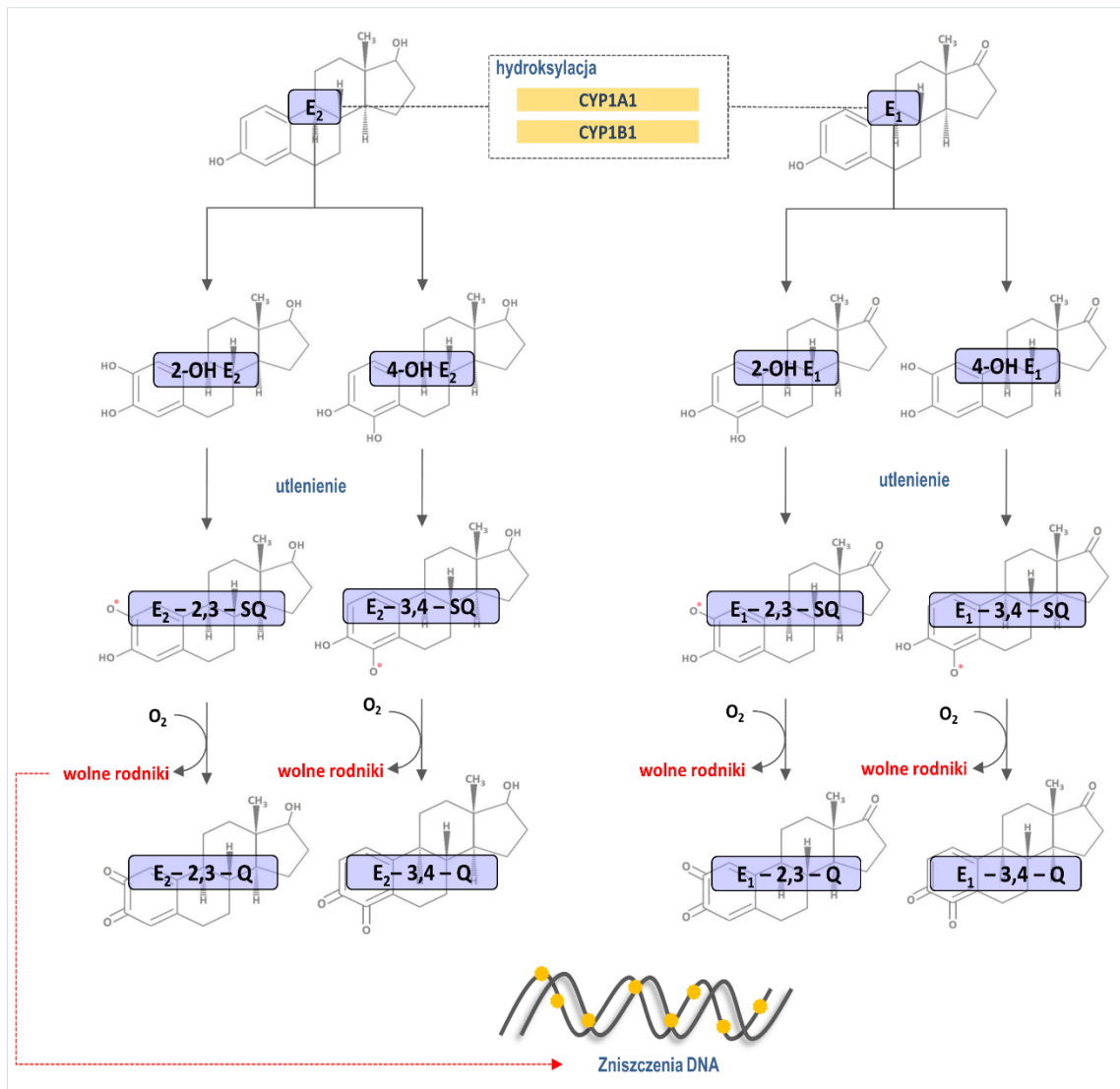
różnicowaniem komórek. Mechanizm ten promuje powstawanie i progresję nowotworu [54], [61].

### 1.5 Metabolizm i znaczenie pochodnych katecholowych estrogenów

Powstawanie i rozwój RP jest ściśle związane z paleniem papierosów i efektem jaki wywiera na komórki płuc dym tytoniowy. Mechanizm ten może być dodatkowo wzmacniany przez oddziaływanie estrogenów z ich receptorem. Mimo to estrogeny poza ścieżkami sygnalizacyjnymi, w których biorą udział, mogą być również metabolizowane wewnątrzkomórkowo przez enzymy z rodziny cytochromów p450 [62]. Dokonują one hydroksylacji pierścienia aromatycznego, wchodzącego w strukturę chemiczną estrogenów (Ryc. 5). Enzymami, zasługującymi na szczególną uwagę ze względu na udział w transformacji estrogenów, są cytochrom 450 1A1 (CYP1A1) i cytochrom 450 1B1 (CYP1B1). Białka te są odpowiedzialne za szereg reakcji metabolicznych, w tym, hydroksylację  $E_1$  oraz  $E_2$  w pozycji drugiej (CYP1A1) i czwartej (CYP1B1) (Ryc. 6). Wynikiem ich działania jest powstanie tak zwanych katecholowych metabolitów estrogenów, w których wyróżniamy 4-hydroksyestradiol/estron (4 OHE<sub>2</sub>/4 OHE<sub>1</sub>) i 2-hydroksyestradiol/estron (2OH E<sub>2</sub>/2OH E<sub>1</sub>) [62]–[64].



Ryc. 5 Struktura wielopierścieniowa najbardziej aktywnie biologicznie estrogenów: estronu i estradiolu (źródło: opracowanie własne)

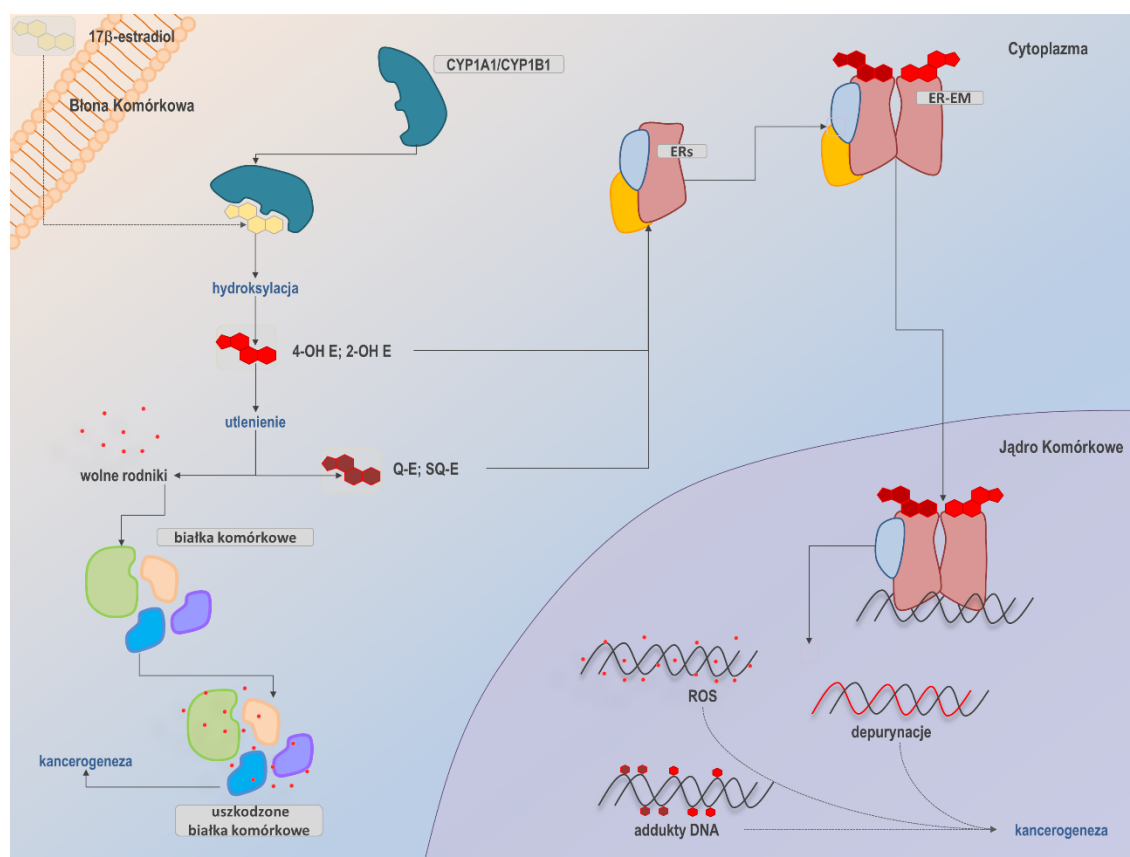


**Ryc. 6** Synteza katecholowych pochodnych estrogenów i ich dalsze przemiany (źródło: opracowanie własne)

**Skróty:** 2-OH E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub> – 2-hydroksyestradiol/estron; 4-OH E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub> – 4-hydroksyestradiol/estron; E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub>-2,3-SQ – 2,3 semichinon estradiolu/estronu; E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub>-3,4-SQ – 3,4 semichinon estradiolu/estronu; E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub>-2,3-Q – 2,3 chinon estradiolu/estronu; E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub>-3,4-Q – 3,4 chinon estradiolu/estronu;

Wykazano, że 2-OH E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> pochodne są nieszkodliwe dla komórki, natomiast 4-OH E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> są uważane za związki kancerogenne [65], [66]. Warto zaznaczyć, że katecholowe pochodne estrogenów mogą być wewnątrzkomórkowo utlenione przez nieswoiste oksydazy. Prowadzi to do syntezy bardzo reaktywnych semichinonów i o-chinonów (Ryc. 6), które dzięki silnym właściwościom elektrofilowym mogą indukować powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS; ang. *reactive oxygen species*) podczas swoich reakcji redoks [10], [67]–[69]. Wszystkie wspomniane związki są bardzo szkodliwe i mogą destruktywnie wpływać na komórkę za pośrednictwem kilku różnych

szlaków. Metabolizm chinonów i semichinonów prowadzi do uwolnienia ogromnej ilości ROS, w tym wolnego rodnika hydroksylowego, który ze względu na swoją silną reaktywność i możliwość oddziaływania praktycznie z każdą cząsteczką w komórce, jest uważany za najbardziej szkodliwy czynnik utleniający [70]. Obecność tych cząsteczek w cytoplazmie może prowadzić do uszkodzeń organelli i białek, a w jądrze komórkowym przyczyniać się do powstawania pęknięć nici DNA czy formowania adduktów, między innymi okso-2-deoksyguanozyny – najczęstsze uszkodzenia DNA, będącego wynikiem jego utlenienia [67], [71], [72]. Wykazano, że ze względu na strukturalne podobieństwo do estrogenów, ich katecholowe i chinonowe pochodne mogą wiązać się



**Ryc. 7** Powstawanie metabolitów estrogenów oraz ich wewnątrzkomórkowe szkodliwe działanie (źródło: opracowanie własne)

**Skróty:** ER – receptór estrogenowy, EM – metabolit estrogeny; 2-OH/4-OH E – 2/4 hydroksylowana pochodna estrogeny, Q/SQ – E - chinon/semichinon estrogeny; ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

z ER i w tej formie być transportowane do jądra komórkowego. Niepożądana obecność tych związków prowadzi do depurynacji DNA, powstawania mutacji, tworzenia adduktów czy uszkodzeń materiału genetycznego wywołanych emisją wolnych rodników [10], [71]–[73]. Opisane powyżej mechanizmy działania ROS mogą indukować transformację nowotworową komórki i prowadzić do rozwoju nowotworu.

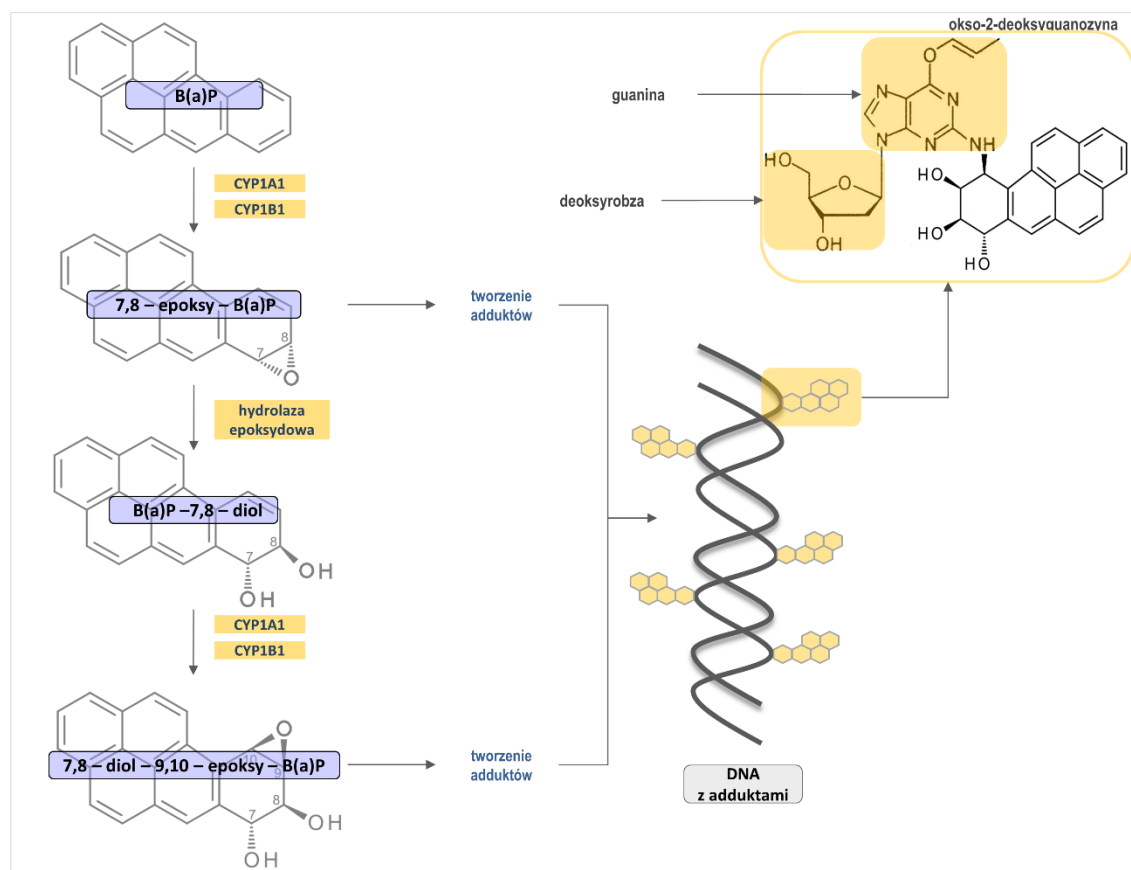
## 1.6 Metabolizm znaczenie benzo(a)pirenu oraz jego pochodnych

Należy podkreślić, że CYP1A1 oraz CYP1B1 są zaangażowane nie tylko w reakcje z udziałem estrogenów, ale przede wszystkim odpowiedzialne są za biotransformację związków zawartych w dymie tytoniowym – przekształcają obecne w nim prokancerogeny do kancerogennych pochodnych. Enzymy te są zdolne do aktywacji wielu potencjalnych ludzkich promutagenów, w szczególności powszechnych w dymie papierosowym, spalinach przemysłowych i samochodowych, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) [74]–[76].

WWA występują w środowisku najczęściej w postaci mieszanin wieloskładnikowych, których skład zależy od rodzaju i warunków spalania materiału [76]. Najbardziej powszechnym, a zarazem najbardziej poznanym związkiem należącym do WWA, jest benzo(a)piren (B(a)P), który, aby wywołać skutek, musi być przekształcony do silnie elektrofilowej formy epoksydu. B(a)P był jednym z pierwszych WWA przebadanych pod kątem toksyczności. Jego kancerogenne działanie udowodniono w wielu badaniach na zwierzętach. Toksyczne efekty jego stosowania były widoczne niezależnie od drogi podania substancji, zarówno w miejscu aplikacji jak i w innych narządach [76]. Z przeprowadzonych badań wynika, że około 60% pirenów jest gromadzonych w płucach [77], dlatego też testy toksykologiczne z wykorzystaniem B(a)P dotyczą głównie układu oddechowego.

Skutkiem transformacji B(a)P jest powstanie wielu związków ale, ze względu na udowodnione, znaczne genotoksyczne właściwości, najistotniejszym z nich jest 7,8-diol-9,10-epoksybenzo(a)piren [76], [78], [79]. Za reakcję prowadzącą do powstania tej cząsteczki odpowiedzialne są, wspomniane wcześniej białka, tj. CYP1A1 oraz CYP1B1 (Ryc. 8). Warto zaznaczyć, że w przypadku tych dwóch struktur to CYP1B1 jest enzymem charakteryzującym się znacznie wyższą aktywnością [75].

Proces biotransformacji B(a)P opiera się głównie na jego hydroksylacji i epoksydacji. Wynikiem tej modyfikacji jest powstanie elektrofilowych cząsteczek, które mają możliwość kowalencyjnego wiązania się ze strukturami komórkowymi, takimi jak DNA, RNA lub białka i tworzenia adduktów, (takich jak wspomniana wcześniej okso-2-deksguanozyna). Efektem tego są mutacje kodu genetycznego i zaburzenia cyklu komórkowego (Ryc. 8) [75], [76], [78], [79]. Transformacja nowotworowa tkanki, mimo tak destruktywnego działania metabolitów B(a)P, jest procesem długotrwałym i wieloetapowym. Jest to spowodowane działaniem enzymów, takich jak hydroksylaza epoksydowa czy transferaza glutationu. W związku tym warto pamiętać, że prawdopodobieństwo powstania indukowanego B(a)P-em nowotworu zależy od szybkości działania mechanizmów aktywujących (CYP1A1/CYP1B1), unieczynnających i naprawczych.



**Ryc. 8** Synteza pochodnych benzo(a)pirenu i tworzenie się adduktów DNA (źródło: opracowanie własne)

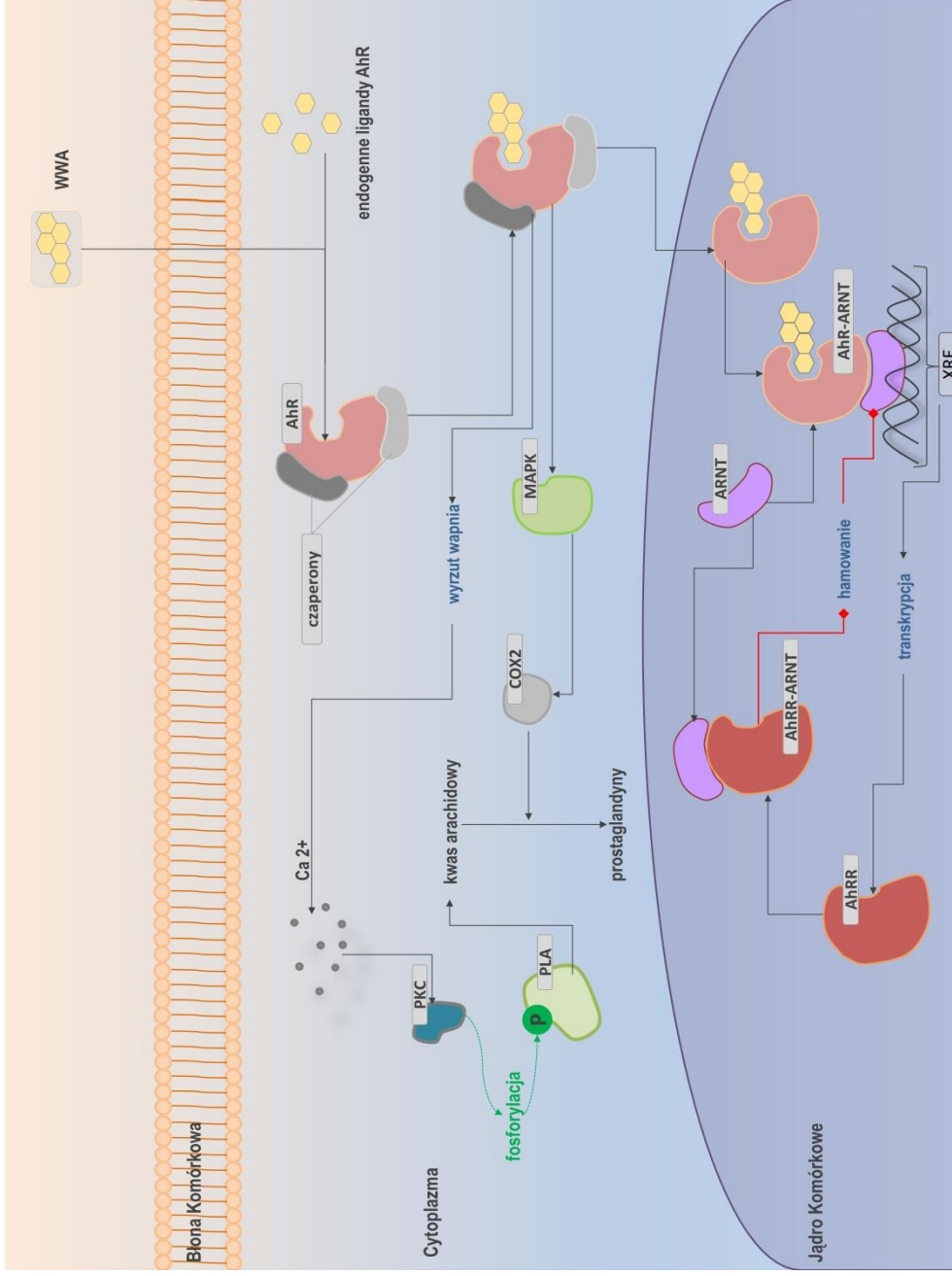
**Skróty:** B(a)P – benzo(a)piren; **7,8-epoksy-B(a)P** – 7,8-epoksyd benzo(a)pirenu;  
**B(a)P-7,8-diol** – benzo(a)pireno-7,8-hydroksydiol; **7,8-diol-9,10-epoksy-B(a)P** –  
 9,10-epoksyd benzo(a)pireno-7,8-hydroksyldiolu; **w okręgu:** przykładowy addukt tworzący  
 okso-2-deksguanozynę

## 1.7 Działanie receptora dla węglowodorów aromatycznych i jego rola w regulacji ekspresji CYP1A1 i CYP1B1

Zarówno CYP1A1 jak i CYP1B1 należą do enzymatycznej superrodziny monooksygenaz zaangażowanych w metabolizm ksenobiotyków i związków steroidowych. Zgodnie z bazą „The Human Protein Atlas” ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) ulegają ekspresji w wielu tkankach (na poziomie białka jak i RNA) w tym płucach, wątrobie i nerkach. Ze względu na opisany wcześniej rodzaj przeprowadzanych przez nie reakcji enzymatycznych, istotnym wydaje się być fakt, że ich poziom w komórce podnosi się w następstwie pojawienia się ksenobiotyków, takich jak WWA [64], [80], [81]. Wiele badań pokazuje wielokrotny wzrost wewnątrzkomórkowych ilości zarówno CYP1A1 jak i CYP1B1 po ekspozycji na związki dymu tytoniowego [75], [82], [83]. Proces ten regulowany jest za pośrednictwem receptora dla węglowodorów aromatycznych (AhR; ang. *aryl hydrocarbon receptor*) [74], [81].

AhR jest jednym z wielu receptorów, które odgrywają istotną rolę w odpowiedzi na ksenobiotyki. W formie nieaktywnej znajduje się on w cytoplazmie i tworzy kompleksy z licznymi białkami opiekuńczymi (ang. *chaperons*) do momentu połączenia się z odpowiednimi ligandami [84]. Do tychże zaliczamy wiele związków, między innymi wspomniane WWA, w tym B(a)P, a także dioksyny – aromatyczne dwupierścieniowe cząsteczki powstające w wyniku procesu spalania [85]. Najnowsze badania dowodzą, że AhR może być pobudzony również przez tryptofan i jego pochodne, bilirubinę lub kwas arachidonowy i jego metabolity [86].

Podobnie jak w przypadku ER, pobudzenie AhR może skutkować aktywacją wielu ścieżek sygnalizacyjnych, w tym również genomową i niegenomową (Ryc. 9.). W szlaku genomowym AhR jest przenoszony do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z białkiem ARNT (transporter jądrowy receptora węglowodorów aromatycznych; ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter*), formując aktywny heterodimer [87]. Powstały kompleks przyłącza się do specyficznych koaktywatorów oraz charakterystycznych sekwencji DNA nazywanych rejonami odpowiedzi na ksenobiotyki (XRE; ang. *xenobiotic response elements*) i indukuje transkrypcję odpowiednich genów, w tym CYP1A1, CYP1B1 [86], [88] oraz kluczowego, ze względu na jego rolę w regulacji, AhRR (represora receptora węglowodorów aromatycznych; ang. *aryl hydrocarbon receptor repressor*) [89].



**Ryc. 9** Wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe związane z odpowiedzią na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (źródło: opracowanie własne)

**Droga genomowa:** Ligand wiąże się z receptorem i umożliwia jego translokację do jądra komórkowego, gdzie tworzy on heterodimer ze swoim koaktywatorem. Umożliwia to związanie się ze specyficznymi sekwencjami DNA

i włączenie transkrypcji odpowiednich genów. W celu ochrony komórki przed nadmierną stymulacją produkowany jest represor, który hamuje wiązanie się receptora z XRE.

**Droga niegenomowa:** związanie się ligandu z receptorem powoduje wyrzut jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego i aktywację wielu kinaz białkowych. Proces ten uruchamia kaskadę fosforylacji i produkcję czynników prozapalnych.

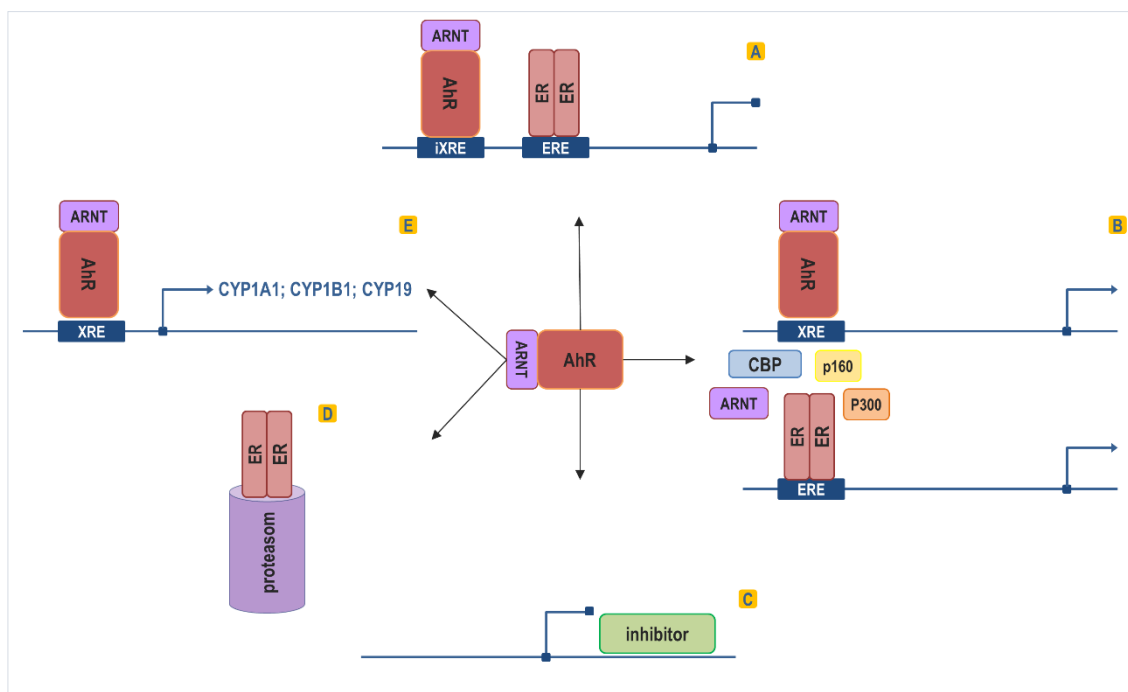
**Skróty:** **WWA** – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne; **AhR** – receptor węglowodórów aromatycznych (ang. *aryl hydrocarbon receptor*); **PKC** – kinaza białek C (ang. *protein kinase C*); **PLA** – fosfolipaza 2 (ang. *phospholipase 2*); **COX2** – cyklooksygenaza 2 (ang. *cyclooxygenase 2*); **ARNT** – jądrowy transporter receptora dla węglowodórów aromatycznych (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter*); **AhRR** – represor receptora dla węglowodórów aromatycznych (ang. *aryl hydrocarbon receptor repressor*); **XRE** – miejsca odpowiedzi na ksenobiotyki (ang. *xenobiotic response elements*);



Cząsteczka AhRR wykazuje strukturalne podobieństwo do AhR, ale ze względu na brak specyficznej domeny białkowej, nie jest zdolna do połączenia się z ligandem. Jej funkcja polega na zahamowaniu AhR poprzez utworzenie kompleksu z ARNT i XRE. Blokują to możliwość transportu AhR do XRE oraz jednocześnie hamuje transkrypcję genów zależnych od AhR. Sam receptor jest następnie usuwany do cytoplazmy, gdzie zachodzi jego ubiquitynacja i degradacja w proteasomach. Taki podwójny “mechanizm ochronny” ma na celu zabezpieczyć komórkę przed nadmierną stymulacją przez agonistów receptora i zapewnić czasową kontrolę nad przekazywaniem sygnału (Ryc. 9) [86], [88], [89].

W odpowiedzi niegenomowej, po połączeniu się AhR z ligandem, może dojść do nagłego wyrzutu jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego, a co za tym idzie, mobilizacji wielu kinaz białkowych posiadających domenę kalmoduliny. Prowadzi to do intensyfikacji ogólnej fosforylacji białek komórkowych i rozwoju stanu zapalnego związanego z nadprodukcją prostaglandyn z kwasu arachidonowego [90]. Inną możliwością jest aktywacja Src i towarzyszące jej pobudzenie białek MAPK, ERK1 oraz ERK2. Skutkiem tego jest indukcja transkrypcji, między innymi odpowiedzialnej za syntezę prostaglandyn, cyklooksygenazy 2 (COX-2), co dodatkowo intensyfikuje stan zapalny (Ryc. 9) [91], [92].

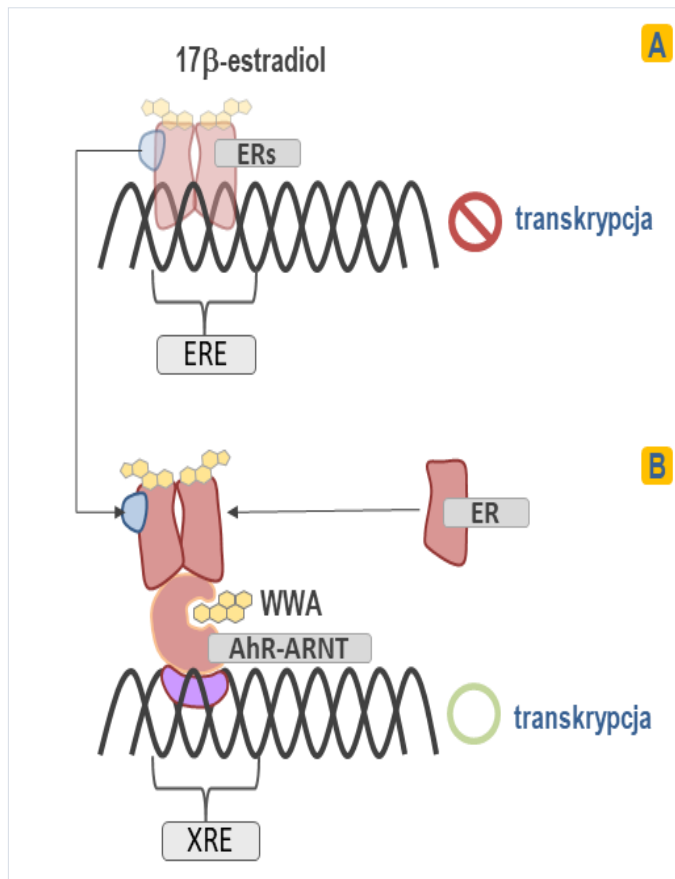
Warto wspomnieć, że istnieją badania wskazujące na możliwość wzajemnego oddziaływania (ang. *cross talk*) między ER a AhR (Ryc. 10). Sugeruje się, że AhR jest w stanie hamować aktywność ER poprzez kombinację kilku mechanizmów. Wśród nich można wskazać bezpośrednią inhibicję przez aktywny kompleks AhR-ARNT, który wiąże się do sekwencji DNA genów związanych z odpowiedzią na estrogeny i hamuje w ten sposób ich ER zależną transkrypcję. Innymi możliwościami są: dzielenie się wspólnymi koaktywatorami, synteza niepoznanych do tej pory cząsteczek inhibitorowych czy zmniejszenie puli dostępnego estrogenu, poprzez jego przyspieszony metabolizm przez cytochromy, które syntetyzowane są wówczas w znacznych ilościach [93], [94]



**Ryc. 10** Potencjalne możliwe wzajemne oddziaływania typu cross talk między AhR i ER (na podstawie Matthews et al. 2006 [92])

**A.** Bezpośrednie hamowanie przez heterodimer AhR-ARNT związany z inhibitorowymi miejscami odpowiedzi na ksenobiotyki; **B.** Dzielenie się wspólnymi koaktywatorami; **C.** Inhibicja przez niezbadane dotąd białka; **D.** Degradacja proteosomowa ER; **E.** Zmniejszona ilość dostępnego estradiolu na skutek działania innych enzymów; **Skróty:** **ARNT** – jądrowy transporter receptora dla węglowodorów aromatycznych; **AhR** – receptor dla węglowodorów aromatycznych; **ER** – receptor estrogenowy; **ERE** – miejsca odpowiedzi na estrogen; **XRE** – miejsca odpowiedzi na ksenobiotyki; **p100** – prekursor czynnika transkrypcji NF- $\kappa$ B; **p300** – acylotransferaza histonowa p300; **CBP** – białko wiążące się z domenami CREB

Innym zjawiskiem, w którym uczestniczy AhR, jest możliwość jego połączenia z homodimerem ER w mega-kompleks białkowy, przyspieszając w ten sposób transkrypcję genów zależnych od jego aktywności, w tym CYP1A1 i CYP1B1 [95] (Ryc. 11). Przypuszcza się, że to oddziaływanie może zachodzić zarówno w obecności estrogenów jak ich braku [94], [95] i nie wymaga obecności dodatkowych cząsteczek pomocniczych, ale jest spowodowane bezpośrednią interakcją białko-białko pomiędzy receptorami [96]. *Matthews et al.* podkreśla, że mechanizm ten nie jest jeszcze całkowicie poznany, ale może być zaangażowany w regulowanie ilości białka ER i tym samym wpływać na molekularny efekt zapewniany przez estrogen



**Ryc. 11 Wzajemne oddziaływanie receptorów AhR oraz ER (źródło: opracowanie własne)**

**A.** Aktywny AhR oddziałuje ze związanym/niezwiązanym z ligandem ER, uniemożliwiając tym samym jego interakcję z ERE i transkrypcję genów odpowiedzi na estrogen;

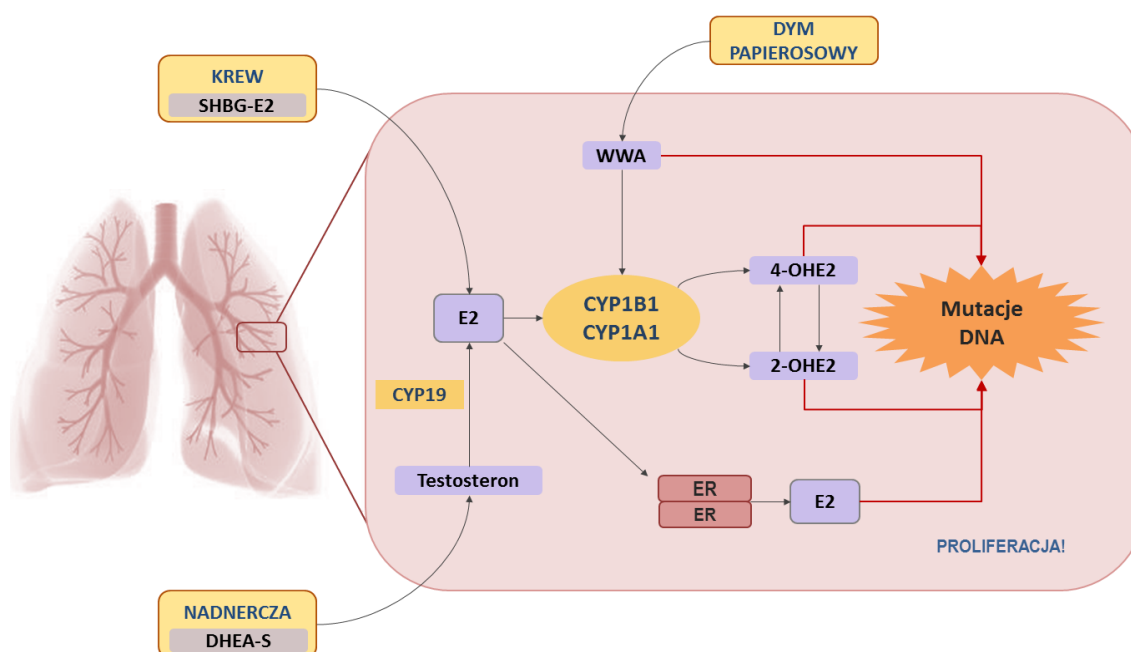
**B.** Regulacja zależnej od AhR transkrypcji genów przez

**Skróty:** ER – receptor estrogenowy; AhR – receptor dla węglowodorów aromatycznych; ARNT – jądrowy transporter receptora węglowodorów aromatycznych; ERE – miejsca odpowiedzi na estrogen, XRE – miejsca odpowiedzi na ksenobiotyki

## 1.8 Rola CYP1A1 i CYP1B1 w powstawaniu i rozwoju raka płuc

Jak wspomniano wcześniej, CYP1A1 oraz CYP1B1 są odpowiedzialne za metabolizm estrogenów oraz aktywację prokancerogenów zawartych w dymie tytoniowym. Wiele badań podkreśla kluczową rolę tych cytochromów w formowaniu się zależnego od palenia papierosów nowotworu płuc. Powodem tego jest zarówno rodzaj reakcji przeprowadzanej przez te białka, ale również fakt, że ich poziom jest regulowany przez AhR, którego aktywatorem są licznie występujące w dymie WWA. Pokazano, że poziom tych enzymów w tkankach osób palących, jest znacznie wyższy niż u osób niepalących [97]. Ilość, w szczególności, CYP1B1 może mieć fundamentalne znaczenie na początku rozwoju, indukowanej paleniem papierosów, kancerogenezy. *Meireles et al.* na podstawie eksperymentu wykorzystującego mysz model zwierzęcy, stwierdziła, że poziom zarówno transkryptu jak i białka CYP1B1 był podwyższony. Co więcej zaobserwowano, że podniesiony poziom enzymu utrzymywał się w tkance przez cały okres ekspozycji na dym tytoniowy. Jednoczesna analiza poziomu E<sub>2</sub> wykazała jego znaczące ilości w tkance płuc [98]. Liczne badania genetyczne łączą istniejące

polimorfizmy w genie *CYP1B1* ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na RP [97], [99]. Warto nadmienić, iż z punktu widzenia niniejszej dysertacji istotnym jest, że *CYP1B1*, z powodu obecności miejsc ERE w swojej sekwencji, może być regulowany przez E<sub>2</sub>. Hipoteza ta została potwierdzona w badaniach z użyciem ER(+) komórek raka piersi, MCF7, przez zespół pod kierunkiem Yuki'ego Tsuchiya z Uniwersytetu w Kanazawie (Japonia) [62]. W innym badaniu przeprowadzonym przez Peng'a *et al.* uzyskane dane potwierdziły istotny związek składników dymu tytoniowego z ilością kancerogennych metabolitów estrogenów, których stężenie przekładało się na rozrost nowotworu płuc u myszy. Pokazano również, że delecja *CYP1B1* spowodowała zasadniczy spadek stężenia wewnątrztkankowych katecholowych pochodnych [10]. Na podstawie powyższych doniesień można przypuszczać, że (głównie) *CYP1B1* oraz *CYP1A1* mogą odgrywać kluczowe znaczenie w indukowanej dymem tytoniowym kancerogenezie. Dzięki tym białkom, potencjalne, estrogenowe środowisko komórki może oddziaływać z mutagennością składników dymu papierosowego, przyspieszając rozwój nowotworu (Ryc. 12).



Ryc. 12 Synergiczny, kancerogeny efekt estrogenów oraz związków zawartym w dymie papierosowym (źródło: opracowanie własne)

**Skróty:** SHGB – globulina wiążąca hormony płciowe (ang. *sex-hormone binding globulin*);  
 E<sub>2</sub> – estradiol; CYP19 – aromataza; DHEA-S – siarczan dihydroepiandrosteronu;  
 ER – receptor estrogenowy; 2-/4-OH E<sub>2</sub> – katecholowe pochodne estradiolu;  
 WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

## 2. Założenia i cele pracy

Rak płuc jest jednym z najczęściej występujących nowotworów, zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Pomimo ciągłych postępów naukowych i wdrażaniu coraz nowocześniejszych metod diagnostyki i leczenia, co roku stanowi on najczęstszą przyczynę śmierci z powodu chorób nowotworowych. Powodem niskiego stopnia przeżycia jest głównie późne zdiagnozowanie nowotworu, czego skutkiem jest opóźnione wdrożenie leczenia. Złe rokowania i wysoki wskaźnik zgonów zmuszają do poznania biochemicznych i molekularnych mechanizmów, leżących u podstaw rozwoju tego nowotworu, co przyczyni się do postępu w dziedzinie diagnostyki, profilaktyki i terapii tego schorzenia.

Powstanie i rozrost raka płuc jest zależny od wielu czynników zarówno molekularnych jak i środowiskowych. Główne zagrożenia, które mogą spowodować rozwój nowotworu płuc, są związane z długotrwałą ekspozycją na lotne rozpuszczalniki organiczne czy związki zawarte w dymie tytoniowym. Mimo, że zależność między paleniem papierosów i rakiem płuc jest dobrze znana i bezdyskusyjna, to wiele badań podkreśla istotną rolę estrogenów w samej kancerogenezie jak i w późniejszych stadiach nowotworu. Co więcej, udowodniona obecność ER w tkance płuca i ustalonych liniach komórkowych pozwala sądzić, że za ich pośrednictwem hormony mogą wywierać swój wpływ na komórkę. Przekazywanie sygnału odbywa się często w towarzystwie białkowych koaktywatorów, które ułatwiają wiązanie się do promotora genów czy umożliwiają transport receptora do miejsca wykorzystania. Takim, szczególnym koaktywatorem ER jest PELP1, które ze względu na swoje właściwości uzyskało status protoonkogenu.

Poza działaniem poprzez receptor, estrogeny z powodu swojej struktury zawierającej pierścień aromatyczny, mogą być metabolizowane przez enzymy z rodziny cytochromów p450. Z perspektywy rozwoju nowotworu najistotniejsze wydają się być białka CYP1A1 oraz CYP1B1, które katalizują reakcję hydroksylacji estradiolu przy węglu w 2- i 4- pozycji. Otrzymane w ten sposób katecholowe pochodne mają charakter genotoksyczny (zwłaszcza 4-OH E<sub>2</sub>), a dodatkowo mogą być utlenione do form chinonowych, co indukuje uwalnianie reaktywnych form tlenu, które destruktywnie wpływają na komórkę. Warto nadmienić, że wspomniane metabolity estrogenów mogą działać w komórce na zasadzie „konia trojańskiego”. Wiążą się z ER i w formie

kompleksu przemieszczają się do jądra komórkowego, powodując mutacje i rozległe zniszczenia DNA i białek jądrowych spowodowanych działaniem wolnych rodników.

CYP1A1 oraz CYP1B1 poza metabolizmem estrogenów biorą udział w przemianach prokancerogenów zawartych w dymie tytoniowym, głównie WWA do rakotwórczych pochodnych. Wiele badań pokazuje, że poziom tych enzymów jest ściśle regulowany przez działanie AhR, który jest receptorem dla wielu związków obecnych w dymie tytoniowym, w tym najlepiej poznanego B(a)P. Nie dziwi więc, że poziom zarówno transkryptu jak i białka u osób palących, jest znacznie wyższy niż u niepalących. Zjawisko to pozwala twierdzić, że CYP1A1 i CYP1B1 mogą odgrywać kluczową rolę w indukowanej związkami rakotwórczymi kancerogenezie, w szczególności w obecności estrogenów, co na zasadzie synergii może stworzyć środowisko sprzyjające rozwojowi nowotworu. Do tej pory jednak niewiele jest doniesień określających status wyżej wymienionych białek w nowotworze płuc.

Celem pracy jest weryfikacja hipotezy odnośnie potencjalnej synergii pomiędzy rakotwórczymi pochodnymi dymu tytoniowego a środowiskiem estrogenowym, najczęściej diagnozowanego niedrobnokomórkowego raka płuc.

**Cel pracy doktorskiej był realizowany w oparciu o następujące zadania:**

- Analiza ilościowa CYP1A1, CYP1B1, PELP1 oraz AhR na poziomie transkryptu lub/i białka w pierwotnym materiale nowotworowym i histopatologicznie niezmiennym pochodzącym od pacjentów ze zdiagnozowanym nie drobnokomórkowym rakiem płuc,
- Analiza ilościowa mRNA i białek CYP1A1, CYP1B1, PELP1, AhR w ustalonych liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i Calu-1 oraz w komórkach linii prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b inkubowanych z B(A)P lub/i E<sub>2</sub>,
- Ocena wpływu katecholowych pochodnych 2-OH E<sub>2</sub> oraz 4-OH E<sub>2</sub>, B(a)P oraz E<sub>2</sub> na proliferację i żywotność komórek niedrobnokomórkowego raka płuc A549, Calu-1 oraz linii prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b,
- Oznaczenie poziomu wewnątrztkankowego E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> w pierwotnym materiale nowotworowym i histopatologicznie niezmiennym pochodzącym od pacjentów z niedrobnokórkowym rakiem płuc,
- Określenie genotoksyczności 2-OH E<sub>2</sub> oraz 4-OH E<sub>2</sub>, B(a)P oraz E<sub>2</sub> w linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuc A549 z wyciszonym lub powielonym Erβ.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Materiał kliniczny

Materiał badawczy stanowił fragment guza, który został pobrany w trakcie zaplanowanego zabiegu chirurgicznego od 75 pacjentów leczonych w Klinice Torakochirurgii Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu, mieszczącej się na ulicy Szamarzewskiego. Kontrolę stanowiła tkanka oceniona jako histopatologicznie niezmienniona, pobrana w tym samym czasie, od tego samego pacjenta, z miejsca oddalonego przynajmniej o 10 – 20 cm od ogniska nowotworu. Po wycięciu tkanki zostały natychmiast zamrożone w ciekłym azocie. Klasyfikacja histopatologiczna uzyskanych fragmentów tkanek, w tym stopień złośliwości histologicznej i stadium nowotworu została przeprowadzona przez doświadczonego patologa, zgodnie z wytycznymi 7 edycji TNM American Joint Committee on Cancer (AJCC) [100] (Tab. 1). Podobnej ocenie poddane były fragmenty materiału histopatologicznie niezmiennionego. Tkanki były przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu ich homogenizacji. Tkanki nowotworowe i kontrolne uzyskano od pacjentów, którzy nie byli poddani wcześniejszej chemio lub radioterapii. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 360/15).

**Tabela 1. Wytyczne 7 edycji klasyfikacji TNM obejmującej ocenę wielkości guza (T), stan regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz przerzuty odległe (M). Na podstawie [100]**

<b>T (tumor) – ocena guza pierwotnego nowotworu</b>	
<b>TX</b>	Obecność guza udowodniona na podstawie obecnych komórek nowotworowych w wydzielinie oskrzelowej, ale bez cech guza w badaniach radiologicznych klatki piersiowej i bronchoskopii
<b>T0</b>	Brak dowodów na zdiagnozowanie nowotworu pierwotnego
<b>Tis</b>	<i>carcinoma in situ</i>
<b>T1</b>	Guz 3 cm lub mniejszy w największym wymiarze, otoczony opłucną płucną lub trzewną, bez bronchoskopowych dowodów naciekania, bardziej proksymalnie do oskrzela płatowego
<b>T1a</b>	Guz o średnicy $\leq 2\text{cm}$
<b>T1b</b>	Guz o średnicy $> 2\text{--}3\text{cm}$

**Tabela 2 C.D. Wytyczne 7 edycji klasyfikacji TNM obejmującej ocenę wielkości guza (T), stan regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz przerzuty odległe (M). Na podstawie [100]**

<b>T2</b>	Guz o średnicy > 3 – 7cm, Zajęcie oskrzela głównego w odległości nie mniejszej niż 2 cm od ostrogi głównej, naciekanie opłucnej płuca, towarzysząca niedodma niezajmująca całego płuca
<b>T2a</b>	Guz o średnicy > 3– 5cm
<b>T2b</b>	Guz o średnicy > 5– 7cm
<b>T3</b>	Guz > 7 cm naciekający jedno z wymienionych miejsc: ścianę klatki piersiowej, przeponę, osierdzie, opłucną śródpiersiową lub guz oskrzela głównego umiejscowiony w odległości mniejszej niż 2 cm od ostrogi głównej, lecz bez jej zajęcia lub guz z towarzyszącą niedodmą całego płuca lub zmiany satelitarne w obrębie tego samego płata co ognisko pierwotne
<b>T4</b>	Guz naciekający śródpiersie, serce, wielkie naczynia, ostrogę główną, tchawicę, przełyk, kręgi, zmiany satelitarne po tej samej stronie, ale w innych płatach niż ognisko pierwotne
<b>N (lymph nodes) - stan regionalnych węzłów chłonnych</b>	
<b>Nx</b>	nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych
<b>N0</b>	brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
<b>N1</b>	Przerzuty w węzłach chłonnych okołoskrzelowych i/lub wnąkowych po stronie guza pierwotnego oraz wewnątrzplucnych
<b>N2</b>	Przerzuty w węzłach chłonnych śródpiersia po stronie guza pierwotnego i/lub rozwidlenia tchawicy
<b>N3</b>	Przerzuty w węzłach chłonnych śródpiersia lub wnąki po stronie przeciwnej, pod mięśniem pochyłym i/lub nadobojczykowych po stronie guza pierwotnego lub po stronie przeciwnej
<b>M (metastasis) – odległe przerzuty</b>	
<b>M1</b>	Przerzuty odległe
<b>M1a</b>	Zmiany satelitarne w przeciwległym płacie, rozsiew guzkowy lub wysięk w opłucnej lub osierdziu
<b>M1b</b>	Obecność przerzutów do odległych narządów



### 3.2 Ustalone linie komórkowe

Ustalone linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuc A549 oraz Calu-1 zostały zakupione z banku linii komórkowych American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD), natomiast linię komórkową prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b otrzymano dzięki uprzejmości Pani Dr Rusin z Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej - Curie w Gliwicach. Specyfikacja oraz charakterystyka wszystkich linii jest dostępna na stronie internetowej ATCC (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>). Linie komórkowe były przechowywane w ciekłym azocie do momentu ich użycia.

### 3.3 Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

#### 3.3.1 Hodowla komórkowa

Odczynniki	
Medium RPMI 1640 (czerwone) z dodatkiem czerwieni fenolowej	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Medium DMEM F12 (czerwone) z dodatkiem czerwieni fenolowej	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Medium RPMI 1640 (białe) -bez czerwieni fenolowej	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Medium DMEM F12 (białe) – bez czerwieni fenolowej	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Wodorowęglan sodu	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej w tabletkach (PBS; ang. <i>phosphate-buffered saline</i> )	BioShop (Ontario, Kanada)
Trypsyna 10x stężona	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Roztwór antybiotkowy i przeciwgrzybiczy (penicylina, streptomycyna, amfoterycyna B)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Płodowa surowica bydlęca (FBS; ang. <i>Fetal Bovine Serum</i> )	BioWest (Nuaille, Francja)
Węgiel aktywny	Polskie Odczynniki Chemiczne
Benzo(a)piren	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Estradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
2-OH estradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
4-OH estradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Błękit trypanu	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)

**Sprzęt**

Komora Laminarna	NuAire Inc. (Plymouth, MN)
Inkubator z płaszczem wodnym, do hodowli komórek	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Wirówka	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Automatyczny licznik komórek EVE™	Nanoentek (Korea Południowa)
Mikroskop fluorescencyjny EVOS	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)

**3.3.2 Izolacja i pomiar stężenia RNA oraz białka****Odczynniki**

Woda dejonizowana	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Tri Reagent	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Zestaw do DNAzowania	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Bufor lizujący do izolacji całkowitego białka komórkowego RIPA	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Siarczan miedzi	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Kwas bicinechinowy (BCA; ang. <i>bicinchoninic acid</i> )	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Woda z eterem dietylowym kwasu pirowęglowego (DEPC; ang. <i>diethyl pyrocarbonate</i> )	BioShop (Ontario, Kanada)
Koktajl inhibitorów proteaz	Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)
Standard białkowy z bydlęcej albuminy osoczowej (BSA; ang. <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Chloroform	Polskie Odczynniki Chemiczne
Alkohol izopropylowy	Polskie Odczynniki Chemiczne
Alkohol etylowy	Polskie Odczynniki Chemiczne

<b>Sprzęt</b>	
Spektrofotometr (BioPhotometer)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Wirówka z chłodzeniem (Centrifuge 5804R)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Spektrofotometr (Nanodrop One)	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Komora Laminarna	Euroclone (Milan, Włochy)
Termoblok (Thermomixer comfort)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Wytrząsarka o ruchu drgającym (Vortex Genie® 2-Mixer)	Witko (Łódź)

### 3.3.3 Elektroforetyczna analiza jakościowa RNA i DNA

<b>Odczynniki</b>	
Agaroza	BioShop (Ontario, Kanada)
10x stężony koncentrat buforu TBE (Tris-Boran-EDTA)	BioShop (Ontario, Kanada)
Bufor obciążający 6xSB do RNA i DNA	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Marker wielkości DNA 100bp (GeneRuler 100bp)	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Bromek etydyny	BioShop (Ontario, Kanada)

<b>Sprzęt</b>	
Zasilacz (Elite 300)	Wealtec Corp. (Sparks, NV)
Aparat do elektroforezy (multiSub Maxi)	Biocom (San Diego, CA)
System do obrazowania żeli (MiniBis Pro)	DNR Bio-Imaging Systems (Izrael)
Wirówka	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)

### 3.3.4 Analiza żywotności i proliferacji komórek

#### Odczynniki

Błękit trypanu	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej w tabletkach (PBS; ang. <i>phosphate-buffered saline</i> )	BioShop (Ontario, Kanada)
Sól tetrazolowa (MTT)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)

#### Sprzęt

Komora laminarna	NuAire Inc. (Plymouth, MN)
Inkubator z płaszczem wodnym, do hodowli komórek	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Spektrofotometr EPOCH	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)

### 3.3.5 Analiza ilościowa mRNA (synteza cDNA, Real-Time PCR, analiza produktów topnienia)

#### Odczynniki

Woda dejonizowana	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Odwrotna transkryptaza SuperScript IV	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Zestaw SybrGreen Master Mix	Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)
Oligonukleotydy	IBB PAN (Polska)
Mieszanina deoksynukleotydów (dNTP)	Novazym (Polska)
Sześcionukleotydowe startery losowe (ang. <i>hexamers</i> )	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Oligonuklotydy tyminowe (oligo dT)	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
RNAse inhibitor (RNAsin)	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)

Sprzęt	
Wirówka (Centrifuge 5418)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Komora laminarna (BioAir Aura Mini)	Euroclone (Milan, Włochy)
Termocykler (T100 Thermalcycler)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Light Cycler®480 Real-Time PCR System	Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)

### 3.3.6 Analiza jakościowa i ilościowa białek (western blotting)

Odczynniki	
Tris zasadowy	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Tris-HCL	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Chlorek sodu	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Siarczan dodecyłu sodu (SDS)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
TEMED (tetrametyloetylenodiamina)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Ponceau S	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Meraktoetanol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Glicyna	Polskie Odczynniki Chemiczne
Metanol	Polskie Odczynniki Chemiczne
Tween® 20	BioShop (Ontario, Kanada)
Kwas octowy	Polskie Odczynniki Chemiczne
Błękit bromofenolowy	Polskie Odczynniki Chemiczne
40% akrylamid/bisakrylamid	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Marker wielkości białka	ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
Membrana z nitrocelulozy/polifluorku winylidenu (PVDF) do transferu białek	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Bibuły do półsuchego transferu białek	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Przeciwciała I i II rządowe	ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
Beztłuszczowe mleko w proszku	-
Substrat chemiluminescencyjny (SuperSignal West Femto)	ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)

**Sprzęt**

Termoblok (Thermomixer Comfort)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Wirówka (Centrifuge 5418)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Mieszadło orbitalne	Biosan (Ryga, Łotwa)
Multi-Rotator	Biosan (Ryga, Łotwa)
Zasilacz	Wealtec Corp. (Sparks, NV)
Aparat do półsuchego transferu Pierce	ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
Biospectrum® Imaging System 500	UVP (Upland, CA)
Aparat do rozdzielania białek Mini Protean	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

**3.3.7 Pomiar ilościowy wewnątrztkankowych estrogenów****Odczynniki**

Standard analityczny estronu znakowany izotopem C13	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Standard analityczny estradiolu znakowany izotopem C13	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Estradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Estron	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Eter dietylowy	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Metanol	Polskie Odczynniki Chemiczne
Acetonitryl	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Węglan sodu	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Węglan amonu	Polskie Odczynniki Chemiczne
Kolumny z węglem C18	Waters (Milford MA, US)

**Sprzęt**

Wirówka (Centrifuge 5418)	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Koncentrator tkankowy	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Spektrometr Masowy Nano Acquity UPLC,	Waters (Milford MA, US)

**3.3.8 Analiza genotoksyczności B(a)P, 2-OH-E<sub>2</sub> oraz 4-OH-E<sub>2</sub>– test kometkowy**

<b>Odczynniki</b>	
Aceton	Polskie Odczynniki Chemiczne
Chlorek Sodu	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
EDTA (warsenian disodu)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Tris zasadowy	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Tris-HCl	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Triton X-100	Polskie Odczynniki Chemiczne
Wodorotlenek sodu	Polskie Odczynniki Chemiczne
Barwnik fluorescencyjny/chemiluminescencyjny	Polskie Odczynniki Chemiczne
Agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMP; ang. <i>normal melting point</i> )	BioShop (Ontario, Kanada)
Agarozą o niskiej temperaturze topnienia (LMP; ang. <i>low melting point</i> )	BioShop (Ontario, Kanada)
Benzo(a)piren	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
2-OH estradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
4-OH estradiol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
<b>Sprzęt</b>	
Zasilacz (Elite 300)	Wealtec Corp. (Sparks, NV)
Aparat do elektroforezy (multiSub Maxi)	Biocom (San Diego, CA)
Mikroskop fluorescencyjny	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Wirówka	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Automatyczny licznik komórek EVE™	Nanoentek (Korea Południowa)

### 3.3.9 Sprzęt jednorazowy oraz drobny sprzęt laboratoryjny

Sprzęt	
Końcówki do pipety (tipsy) 10 $\mu$ l	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Końcówki do pipety (tipsy) 200 $\mu$ l	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Końcówki do pipety (tipsy) 1000 $\mu$ l	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Końcówki do pipety (tipsy) 5000 $\mu$ l	Nerbe (Lucy, Niemcy)
15 ml probówki polipropylenowe	Nerbe (Lucy, Niemcy)
50 ml probówki polipropylenowe	Nerbe (Lucy, Niemcy)
1,5 ml probówki polietylenowe („ependorfy”)	Nerbe (Lucy, Niemcy)
2,0 ml fiolki do mrożenia w ciekłym azocie	TechnoPlastic Products AG (Szwajcaria)
0,2 $\mu$ l próbówki do reakcji PCR („PCRówki”)	Nerbe (Lucy, Niemcy)
Płytki 96-dołkowe do reakcji PCR	Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)
Plastikowe pipety Pasteura 3ml	Nerbe (Lucy, Niemcy)
Płytki 6-dołkowe do hodowli komórkowej	Sarstedt (Nümbrecht, Niemcy)
Płytki 24-dołkowe do hodowli komórkowej	Sarstedt (Nümbrecht, Niemcy)
Płytki 96-dołkowe do hodowli komórkowej	Sarstedt (Nümbrecht, Niemcy)
Kuweta do pomiaru spektrofotometrycznego	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
Kuwety do pomiaru spektrometrycznego	Waters (Milford MA, US)
0,5-10 $\mu$ l pipeta jednokanałowa	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
10 - 100 $\mu$ l pipeta jednokanałowa	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
100-1000 $\mu$ l pipeta jednokanałowa	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
0,5-10 $\mu$ l pipeta wielokanałowa	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)
10-100 $\mu$ l pipeta j wielokanałowa	Eppendorf (Hamburg, Niemcy)



### 3.4 Bufory

➤ **Bufor glicynowy 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,024M
Glicyna	0,19M
SDS	1%

➤ **Bufor do transferu 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,032M
Glicyna	0,24M
SDS	0,17%
Metanol	25 %

➤ **Bufor TBS 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,032M
Chlorek sodu	0,24M

➤ **Bufor TBST 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01M
Chlorek sodu	0,15M
Tween®20	0,1%

➤ **Bufor do rozpuszczania przeciwciał (TBST-M) 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01M
Chlorek sodu	0,15M
Tween®20	0,1%
Mleko w proszku beztłuszczowe	1%

➤ **Bufor blokujący (TBST-B) 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01M
Chlorek sodu	0,15M
Tween®20	0,1%
Mleko w proszku beztłuszczowe	5%

➤ **Bufor obciążający do białek 3× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris-HCL	0,24M
SDS	6%
Glicerol	30%
Błękit bromofenolowy	0.06 %
β-merkaptioetanol	1,6 %

➤ **Bufor do odmywania przeciwciał 1× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Glicyna	0,2M
SDS	0,1%
Tween®20	1%

Ustalić pH=2,2

➤ **Żel rozdzielający do pionowej elektroforezy białek**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	10-16%
Tris-HCL 1M pH=8,8	0,25M
SDS	0,1%
APS	0.05 %
TEMED	0,15 %

➤ **Żel rozdzielający do pionowej elektroforezy białek**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	5%
Tris-HCL 0,375M pH=6,8	0,1M
SDS	0,1%
APS	0.05 %
TEMED	0,15 %

➤ **Bufor neutralizujący do testu kometkowego**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris-HCl	0.4M

➤ **Żel rozdzielający do pionowej elektroforezy białek**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	5%
Tris-HCL 0,375M pH=6,8	0,1M
SDS	0,1%
APS	0.05 %
TEMED	0,15 %

➤ **Bufor lizujący do testu kometkowego A**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Chlorek sodu	2,5M
EDTA	0,1M
Tris zasadowy	0,01M

Ustalić pH=10

➤ **Bufor lizujący do testu kometkowego B**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Triton-X	10%

Ustalić pH=7,5

➤ **Bufor do elektroforezy testu kometkowego**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Wodorotlenek sodu	0,3M
EDTA	0,001M

### 3.5 Metody

#### 3.5.1 Homogenizacja tkanek w ciekłym azocie

Tkanki, uprzednio przechowywane w ciekłym azocie, poddano homogenizacji z wykorzystaniem jałowych porcelanowych moździerzy i tłuczków. Przed procedurą wszystkie naczynia i narzędzia schłodzono w ciekłym azocie. Do przygotowanego w ten sposób moździerza przeniesiono fragment tkanki, który ucierano do momentu otrzymania jednolitego homogenatu (proszku). Roztartą tkankę przeniesiono do schłodzonej w ciekłym azocie próbówki do mrożenia. Tak przygotowany materiał biologiczny przechowywano do momentu procedury izolacji, w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.2 Hodowla komórkowa

Ustalone linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuc A549 oraz Calu-1 hodowano rutynowo w czerwonym (z czerwienią fenolową) medium RPMI 1640 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO), natomiast w przypadku komórek prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b zastosowano czerwone medium DMEM F12 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO). Media były wzbogacone o 10% inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicę płodową (BioWest; Nuaille, Francja) i 2mM glutaminę i węglan sodu (Sigma Aldrich; St. Louis, MO). Komórki hodowane były w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , atmosferze wzbogaconej 5%  $\text{CO}_2$  nasyconej parą wodną. Po osiągnięciu odpowiedniego zagęszczenia, komórki były pasażowane z wykorzystaniem 1x stężonego roztworu trypsyny (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) do nowych naczyń hodowlanych.

#### *Inkubacja ustalonych linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i Calu-1 oraz komórek prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b z badanymi substancjami (Tab. 3)*

Aby określić genotoksyczność badanych substancji, ich oddziaływanie na proliferację i żywotność komórek oraz wpływ na poziom mRNA i białek analizowanych cząsteczek biologicznych, komórki wysiewano na odpowiednie naczynia hodowlane (płytki 6-, 24-; 96-dołkowe). W tym celu odtrawiono je za pomocą 1x stężonej trypsyny (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) i policzono przy użyciu błękitu trypanu (Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts) oraz licznika komórek (Nanoentek; Korea Południowa). Jako że w badaniu stosowano estrogeny i ich pochodne, to minimum 24 godziny przed rozpoczęciem eksperymentu, komórkom zmienione zostało medium hodowlane na takie bez czerwieni fenolowej - RPMI 1640 dla A549 i Calu-1 i DMEM-F12 dla Beas-2b

(Sigma Aldrich; St. Louis, MO). Dodatkowo, standardową surowicę bydlęcą zastąpiono inaktywowaną termicznie surowicą oczyszczaną węglem aktywnym (Polskie Odczynniki Chemiczne). Zabieg ten miał na celu zniwelować potencjalny wpływ czerwieni fenolowej (która ma udowodnione działanie estrogeno-podobne) oraz obecnych w surowicy czynników wzrostowych. Po 24 godzinnej inkubacji komórek podano media zawierające docelowe stężenie substancji badanej (Tab. 3), które wymieniano co 24 godziny. Kontrolę do eksperymentu stanowiły linie, w których pożywce znajdowała się odpowiednia objętość roztworu rozpuszczalnika analizowanego związku, którego końcowe stężenie w medium nie przekraczało 0.01%. Komórki hodowano przez 24, 48 i 72 godziny. Po tym czasie były wykorzystywane na potrzeby dalszych procedur – izolacja RNA i białka, ocena żywotności i proliferacji, test kometkowy.

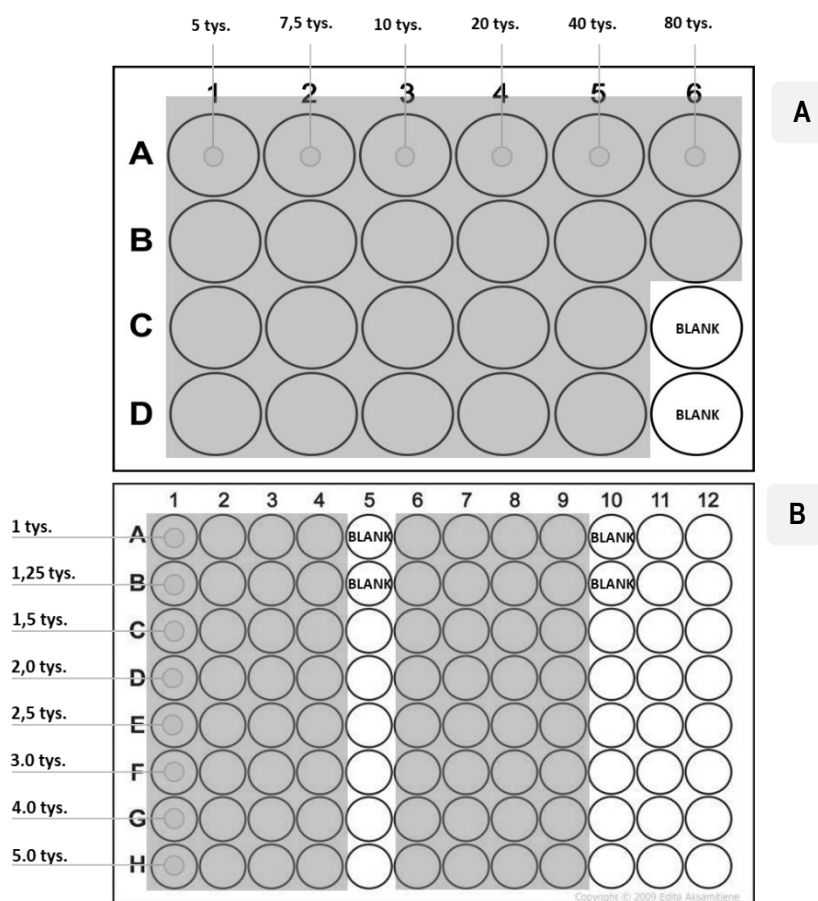
**Tabela 3. Warunki eksperymentów komórkowych dla linii A549, Calu-1 i Beas-2b**

Substancja badana	Stężenie substancji badanej	Rozpuszczalnik (kontrola)	Czas inkubacji
Benzo(a)piren	2,5 $\mu$ M	DMSO	24h, 48h, 72h
	5,0 $\mu$ M		
Benzo(a)piren +	2,5 $\mu$ M	DMSO +	24h, 48h, 72h
	10nM		
Estradiol	10 nM	96% etanol	24h, 48h, 72h
2-OH Estradiol	5 nM	96% etanol	24h, 48h, 72h
	10 nM		
4-OH Estradiol	5 nM	96% etanol	24h, 48h, 72h
	10 nM		

### ***Ocena proliferacji i żywotności metodą MTT***

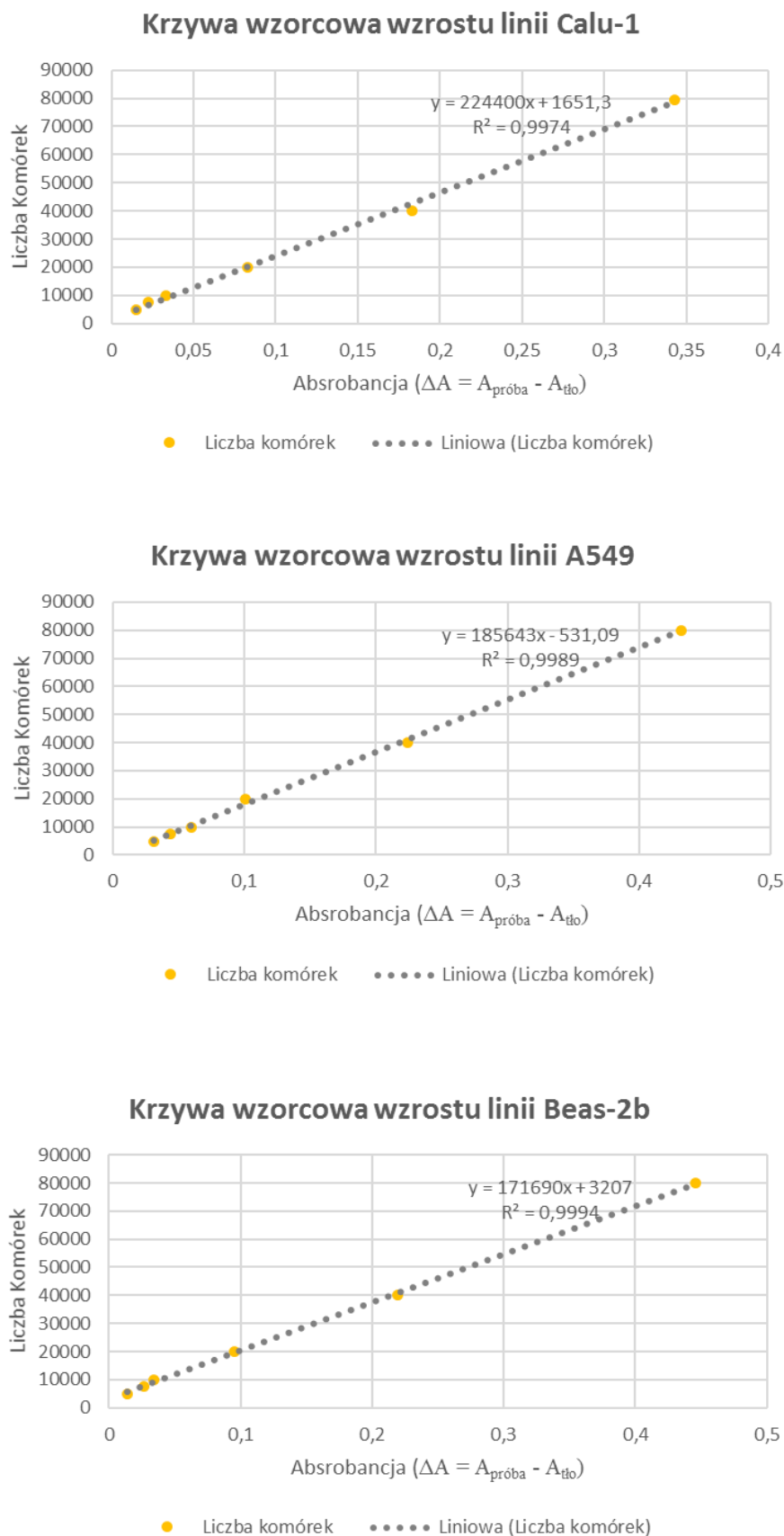
Test MTT opiera się na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowo - żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego ciemnofioletowego formazanu. Wytrącone kryształy rozpuszcza się, w wyniku czego powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do aktywności dehydrogenazy, czyli między innymi do liczby aktywnych metabolicznie komórek.

Po każdym okresie inkubacji komórek z badaną substancją, do medium dodano rozpuszczoną w PBS sól tetrazolową 1g/1ml (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) w ilości 10% objętości pożywki, przypadającej na naczynie hodowlane. Następnie komórki pozostawiono w inkubatorze (37°C) na około 4 godziny. Po tym czasie usunięto medium hodowlane wraz z MTT, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczono w odpowiedniej ilości DMSO. Absorbancję (A) roztworu zmierzono dla długości fali 570 nm (próba) oraz 690 nm (tło) za pomocą spektrofotometru EPOCH (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Różnicę otrzymanych wartości ( $A_{\text{próba}} - A_{\text{tło}}$ ) odniesiono do ustalonych wcześniej dla każdej linii komórkowej, krzywych wzorcowych wzrostu (Ryc. 13)



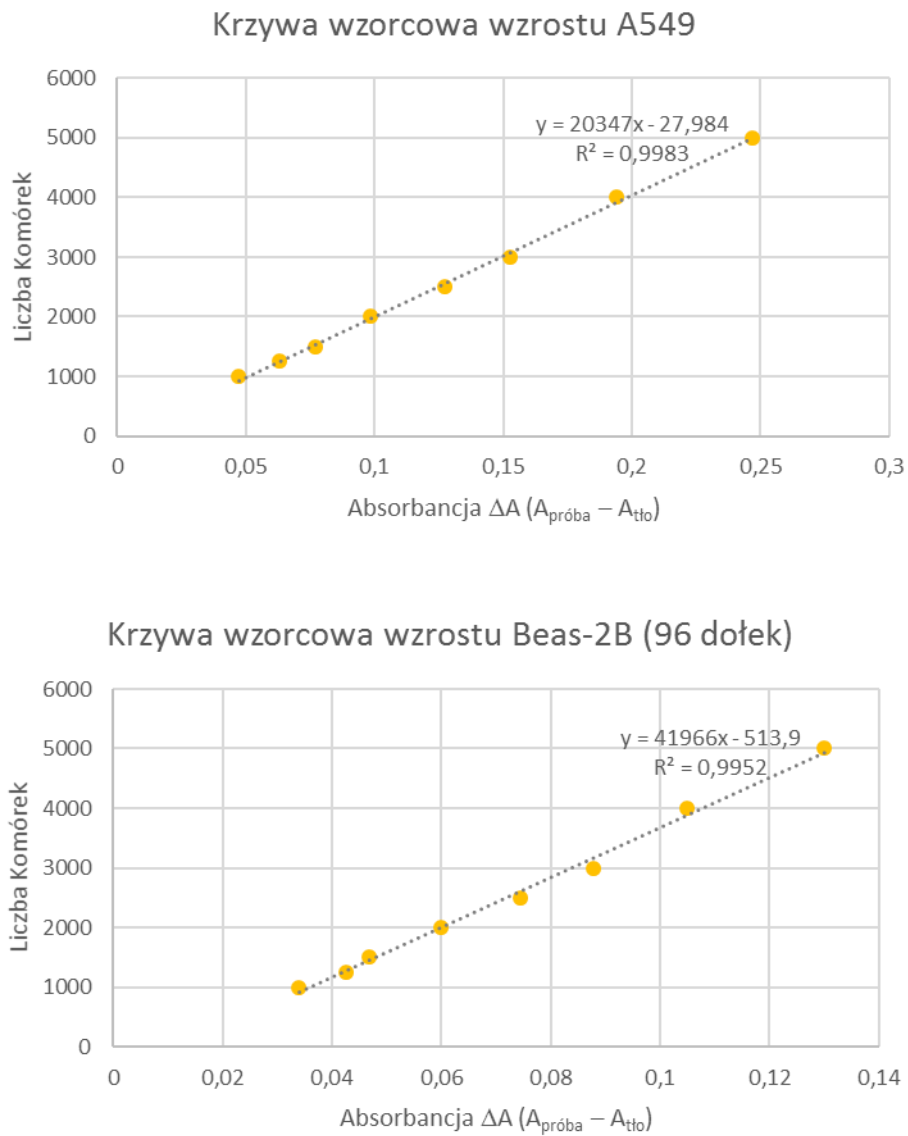
**Ryc. 13** Wzór wysiewania komórek na krzywą standardową wzrostu dla A549, Calu-1 i Beas-2b

A. Dla naczynia 24-dółkowego zagęszczenie komórek wynosiło 5-80 tys./dółek B. Dla naczynia 96-dółkowego zagęszczenie komórek wynosiło 1-5 tys./dółek; BLANK – kontrola negatywna (na dółek nie wysiano komórek). Po 24 godzinnej inkubacji do każdego dółka dodawano 10% objętości MTT (1mg/ml) i inkubowano przez 4 godziny w 37°C. Po tym czasie odczytywano absorbancję przy długościach fali 570 (próba) i 690 (tło)



Ryc. 14 Krzywe standardowe wzrostu dla ustalonych linii komórkowych Calu-1; A549; Beas-2b wysianych na płytkę 24-dółkową.





**Ryc. 15** Krzywe standardowe wzrostu dla ustalonych linii komórkowych A549 oraz Beas-2b wysianych na płytkę 96-dółkową.

### 3.5.3. Izolacja całkowitego RNA oraz jego ocena ilościowa oraz jakościowa

#### *Izolacja całkowitego RNA*

Izolacja całkowitego RNA z linii komórkowych i tkanek pobranych od pacjentów była wykonana pod komorą z laminarnym przepływem powietrza. Izolację prowadzono w oparciu o metodę Chomczyńskiego-Sacchi [101], wykorzystując specjalnie przeznaczony do tego odczynnik Tri-Reagent® (Sigma Aldrich; St. Louis, MO). W tym celu użyto około 30 mg homogenatu tkankowego/osadu ustalonych linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc, który przeniesiono do uprzednio schłodzonej w ciekłym azocie, 1.5 ml próbki polietylenowej. Fragment materiału biologicznego zalano 1 ml odczynnika do izolacji Tri-Reagent®, a następnie mieszano energicznie na wytrząsarce z ruchem drgającym (VortexGenie®; Witko, Łódź) w celu dokładnego rozbicia komórek pobranego homogenatu. Następnie próbkę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 2-3 minuty, po czym dodano 0.2 ml chloroformu (Polskie Odczynniki Chemiczne), ponownie wytrząsano przez 30 sekund i odstawiono na 3 minuty w celu wstępnego rozdzielania fazy wodnej i organicznej. Kolejny etap polegał wirowaniu próbek przez 15 minut, z szybkością 12000×g, w temperaturze 4°C co pozwoliło na dokładne rozdzielanie się faz roztworu. Górna warstwa – wodna (zawierająca RNA) – została przeniesiona do nowych 1.5 ml probówek polietylenowych, a następnie dodano do niej 1 ml, schłodzonego do temperatury -20°C, alkoholu izopropylowego), wymieszano dokładnie i pozostawiono na około 30 minutową inkubację, również w - 20°C. Po tym czasie próbki wirowano przez 15 minut, z szybkością 12000×g, w temperaturze 4°C – miało to na celu wytrącenie się i zebranie osadu RNA na dnie próbki. Czynność powtórzono, uprzednio ostrożnie zlewając supernatant i zastępując go świeżym alkoholem izopropylowym. Po zakończeniu drugiego wirowania, supernatant ponownie usunięto a powstały osad płukano dwukrotnie w 1 ml zimnego 75 % alkoholu etylowego (Polskie Odczynniki Chemiczne) rozpuszczonego w wodzie dejonizowanej z DEPC (5 minut, 12000×g, 4°C). W kolejnym etapie alkohol usunięto, a powstały osad RNA dokładnie wysuszono pod komorą laminarną i zawieszono w 20µl wody dejonizowanej z DEPC. W celu rozpuszczenia i stabilizacji RNA, próbki inkubowano przez 10 minut w 60°C. Uzyskany w ten sposób materiał zbadano pod kątem jakościowym i ilościowym (opis niżej) i przechowywano w - 80°C do momentu dalszych procedur.

### *Analiza jakościowa i ilościowa całkowitego RNA komórkowego*

Stężenie i stopień zanieczyszczenia wyizolowanego RNA w próbce zmierzono spektrofotometrycznie za pomocą urządzenia NanoDropOne (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Pomiar odbył się w trzech długości fali:  $\lambda=230\text{nm}$ , 260 nm i 280 nm i był wykonany wobec próby zerowej, którą była woda z DEPC. Do oceny ilościowej wykorzystano 2  $\mu\text{l}$  izolatu, który nałożono na soczewkę aparatu, aby dokonać pomiaru. Próby oceniano pod kątem stężenia RNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), współczynnika absorbancji  $A_{260}/A_{280}$ , określającego stopień zanieczyszczenia białkami oraz współczynnika  $A_{260}/A_{230}$  opisującego zawartość etanolu w preparacie. Do dalszych procedur wybrano próby, których  $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$ , a  $A_{260}/A_{230} \geq 2.2$ . Wartości te świadczyły o braku zanieczyszczeń preparatu, które istotnie mogłyby wpływać na wynik dalszych analiz.

W celu oceny integralności całkowitego RNA przeprowadzono elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym i 1 $\times$ stężonym buforze TBE. 2  $\mu\text{l}$  preparatu mieszano razem z buforem obciążającym i wodą, a następnie nakładano na, zawierający bromek etydyny (0.25  $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  żelu), żel agarozowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 60 minut przy napięciu 120V. Prążki RNA uwidoczniono w świetle UV z pomocą systemu do dokumentacji żeli (MiniBis Pro, DNR Bio-Imaging Systems, Izrael). Próbki, w których stwierdzono degradację materiału genetycznego, zostały wykluczane z analiz, a w tych, u których oprócz charakterystycznych dla RNA prążków, stwierdzono prążki DNA, zostawały poddane enzymatycznemu działaniu DNAzy z wykorzystaniem przeznaczonego do tego celu zestawu (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts), zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **3.5.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR, qPCR)**

### *Analiza jakościowa i ilościowa całkowitego RNA komórkowego*

Reakcję odwrotnej transkrypcji przygotowywano w komorze z laminarnym przepływem powietrza (NuAire Inc, Plymouth, MN). Do syntezy komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy całkowitego RNA użyto zestaw do wysokosprawnej odwrotnej transkrypcji SuperScript IV<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Reakcję podzielono na dwa etapy. W pierwszym następowało związanie się matrycy mRNA ze

starterami – mieszaniną oligonukleotydów poli(dT) (0,5  $\mu$ l) i sześci nukleotydowych starterów losowych (0,5  $\mu$ l) (ang. *hexamers*). Otrzymaną próbkę inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie szybko schładzano do 4°C. Miało to na celu likwidację II rzędowych struktur obecnych w mRNA, co umożliwiło trwałe i specyficzne wiązanie się użytych sześci nukleotydowych starterów losowych i oligonukleotydów poli(dT). Drugi etap polegał na dodaniu do mieszaniny reakcyjnej właściwego enzymu – odwrotnej transkryptazy (SuperScript IV®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) w ilości 0,5  $\mu$ l (200U/  $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l inhibitora RNaz (RNaseOUT®, Thermo Scientific, Waltham) oraz dostarczonego przez producenta buforu reakcyjnego (4  $\mu$ l) i DTT (2  $\mu$ l). Przygotowaną w ten sposób mieszaninę (objętość końcowa 20  $\mu$ l) umieszczono w termocyklerze i włączono odpowiedni profil temperaturowy reakcji (10 minut/25°C; 10 minut/55°C; 10 minut/80°C), co umożliwiło syntezę wysokiej jakości cDNA. Próbkę następnie schłodzono i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszej analizy – ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.

#### ***Reakcja Łańcuchowa Polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, Real Time PCR)***

Reakcję qPCR przygotowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Miała ona na celu oznaczenie względnego poziomu mRNA badanych genów w tkankach niedrobnokomórkowego raka płuc, histopatologicznie niezmiennym materiale oraz w ustalonych liniach komórkowych A549, Calu-1 i Beas-2b. Reakcje prowadzono na matrycy cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji (opis wyżej). Ilościowy PCR polega na określeniu względnej ilości transkryptu w analizowanych próbach jako wielokrotność jego poziomu w kalibratorze. W tym przypadku kalibratorem była mieszanina matryc cDNA pochodząca z każdej analizowanej próbki. Dla pacjentów była to mieszanina prób pochodzących z tkanek zmienionych chorobowo i zdrowych, dla komórek, z kolei, mieszanina wszystkich dostępnych próbek otrzymanych z izolacji linii komórkowych, zarówno poddanych inkubacji z substancją badaną jak i komórki kontrolne.

Aby móc porównać względną transkryptu pomiędzy próbkami należy najpierw znormalizować poziom mRNA każdej z nich. Powszechnie znaną i skuteczną metodą jest odniesienie poziomu transkryptu genu badanego do odpowiednio dobranego transkryptu genu referencyjnego. Takie geny powinny charakteryzować się stałą

wartością ekspresji mRNA, niezależnie od stanu fizjologicznego tkanki lub warunków doświadczenia. Z tego powodu najczęściej wybieranymi genami są tak zwane geny metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), które jak wskazuje sama nazwa kodują białka, które są odpowiedzialne za podstawowe procesy życiowe komórki i ich poziom ekspresji jest stały. Na podstawie dostępnych danych literaturowych wybrano cztery, potencjalnie odpowiednie dla analizy raka płuc, geny referencyjne: hydrolazę S-formyloglutationu (*ESD*; ang. *S-formylglutathione hydrolase*), mitochondrialne białko rybosomalne L19 (*hMRPL19*, ang. *human mitochondrial ribosomal protein L19*), deaminazę profobilinogenu (*PBGD*, ang. *porphobilinogen deaminase*) oraz podjednostkę A polimerazy II RNA (*POLR2A*, ang. *RNA Polymerase II Subunit A*). W wytypowaniu genów referencyjnych wykorzystano algorytmy statystyczne Normfinder i GeNorm. Na ich podstawie uznano, że najbardziej stabilnymi okazały się transkrypty kodowane przez geny *PBGD*, *hMRPL* oraz *POLR2A*.

Dla każdego badanego transkryptu ustalono krzywą wzorcową, która umożliwiła dokładne ustalenie wydajności przeprowadzonej reakcji. Wydajność była liczona ze wzoru  $E = (10^{-1/\text{nachylenie}} - 1) * 100\%$ , gdzie E to wydajność amplifikacji (ang. *efficiency*), natomiast "nachylenie" określa stopień nachylenia krzywej standardowej względem osi x. Uzyskanie odpowiedniej wydajności prowadzonej reakcji jest kluczowe dla właściwej interpretacji uzyskanych wyników, która jest najbardziej trafna przy uzyskaniu wydajności amplifikacji na poziomie 90-100% ( $E=1.9-2.0$ ). Wartości  $<90\%$  oznaczają obecność pewnych czynników hamujących reakcję, natomiast wydajność  $>100\%$  oznacza najczęściej amplifikację dodatkowych, niechcianych produktów. W obydwóch przypadkach może dojść do uzyskania błędnych wyników. Do przygotowania krzywej wzorcowej wykorzystano mieszaninę matryc cDNA pacjentów bądź linii komórkowych, w zależności, od prób które były analizowane. Z mieszaniny tej wykonano serię rozcieńczeń, których końcowe stężenia matrycy wynosiły odpowiednio:  $1\times$ ;  $0,5\times$ ;  $0,25\times$ ;  $0,125\times$ ,  $0,0625\times$  i  $0,03125\times$ .

Całość analiz wykonano przy użyciu aparatu Light Cycler®480 RealTime PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy) oraz komercyjnego zestawu LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy), który jako barwnik fluorescencyjny wykorzystuje SybrGreen. Ma on zdolność wiązania się z kwasami nukleinowymi, w przestrzeniach między zasadami azotowymi. W czasie postępującej reakcji łańcuchowej polimerazy, ilość produktu wzrasta aż osiąga

taki poziom, aby detektory mogły zaobserwować świecenie. Na tej podstawie wyliczana jest początkowa ilość transkryptu. Sekwencje badanych genów (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *AhR*, *PEL1*, *PBGD*, *hMRPL*, *POLR2A*) uzyskano w bazie danych Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Startery do genów *PEL1*, *PBGD*, *hMRPL* oraz *POLR2A* były projektowane z użyciem programu Oligo® (DBA Oligo, Colorado Springs, USA) (Tab. 7 i 8), natomiast dla genów *CYP1A1*, *CYP1B1* oraz *AhR* startery zostały zaprojektowane i zakupione w firmie BioRad (PrimePCR™, Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) (Tab. 8). W celu uniknięcia amplifikacji genomowego DNA startery zostały zaprojektowane na granicy eksonów. W tym celu również zostało przeprowadzone inkubowanie z DNAzą wyizolowanego wcześniej całkowitego RNA. Przy ustalaniu warunków reakcji każdorazowo dodawano próbę zerową – bez matrycy, próbę z genomowym DNA oraz próbę z całkowitym RNA komórkowym. Miało to na celu dokładne potwierdzenie specyficzności reakcji. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowy reakcji dla poszczególnych genów został przedstawiony w tabelach poniżej.

**Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym**

Odczynnik	Objętość
2 × stężony SybrGreen Master I mix	5,0 µl
Starter FORWARD (10 µM)	0,5 µl
Starter REVERSE (10 µM)	0,5 µl
Woda dejonizowana	3,0 µl
Matryca cDNA	1,0 µl
<b>Końcowa objętość mieszaniny:</b>	<b>10 µl</b>

Specyficzność reakcji qPCR była oceniana przez analizę krzywej temperatury topnienia produktu PCR oraz wykonanie elektroforezy produktów PCR w 2 % żelu agarozowym w buforze 1× TBE.

Tabela 5. Profil temperaturowy reakcji dla cDNA genów *PELP1*, *PBGD*, *hMRPL*, *POLR2A*,

Etap	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja (aktywacja polimerazy)	95°C	8 minut
Denaturacja	95°C	8 sekund
Przyłączenie starterów	58°C	8 sekund
Wydłużanie	72°C	8 sekund
Topnienie	65-95°C	0.1°C/sekundę

Tabela 6. Profil temperaturowy reakcji dla cDNA genów *CYP11A1*, *CYP11B1* oraz *AhR* (zgodnie z zaleceniami producenta wykorzystanych starterów)

Etap	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja (aktywacja polimerazy)	95°C	8 minut
Denaturacja	95°C	8 sekund
Przyłączenie starterów z wydłużaniem	60°C	30 sekund
Topnienie	65-95°C	0.1°C/sekundę

Tabela 7. Sekwencje starterów przedniego F (ang. *forward*) i wstecznego R (ang. *reverse*) dla wybranych genów referencyjnych

Gen	Sekwencja	Numer Ensemble
<i>PBGD3</i>	F ACC ACA GGG ACA AGA TTC	ENSG00000256269
	R TTC TCT GGC AGG GTT TCT A	
<i>POLR2A</i>	F AAG TGG TGG AGG GAG TGC AAG	ENSG00000181222
	R CGC AAG TGG ATG TTG AAA GAG	
<i>hMRPL</i>	F ACT TTA TAA TCC TCG GGT C	ENSG00000115364
	R ACT TTC AGC TCA TTA ACA G	

**Tabela 8** Sekwencje starterów przedniego (F) i wstecznego R dla badanych genów. Sekwencje starterów dla genów CYP1A1, CYP1B1 oraz AHR są tajemnicą firmy, w związku z tym, w tabeli podane zostały numery katalogowe zamówionych testów

Gen	Sekwencja	Numer Ensemble
<i>PELPI</i>	F GAG CAT TCA GCA GTG TTA C	ENSG00000141456
	R AGG TGG TTC ATG GAG ATG TC	
<i>CYP1A1</i>	F	10025636
	R	
<i>CYP1B1</i>	F	10025636
	R	
<i>AhR</i>	F	10025636
	R	

### 3.5.5. Izolacja i oznaczanie stężenia białka

#### *Izolacja całkowitego białka komórkowego*

Całkowite białko komórkowe zostało wyizolowane z tkanki nowotworowej, histopatologicznie niezmięnionej oraz z osadu linii komórkowych poddanych inkubacji z analizowanymi substancjami. Około 30 mg homogenatu tkankowego lub osadu komórkowego zostało przeniesione do 1,5 ml próbówki polietylenowej uprzednio schłodzonej w ciekłym azocie. Następnie do tak przygotowanego materiału dodano 50 µl buforu RIPA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), zawierającego 10% inhibitorów proteaz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy). Próby inkubowano 30-40 minut w lodzie, w celu uzyskania wydajnej ekstrakcji białka. Lizaty następnie zwirowano w 10 000×g, przez 15 minut, w temperaturze 4°C. Skutkiem tego było osadzanie się resztek komórkowych, nie podlegających lizie komórkowej, na dnie próbówki. Powstały supernatant przenoszono do nowych, schłodzonych w lodzie probówek polietylenowych.

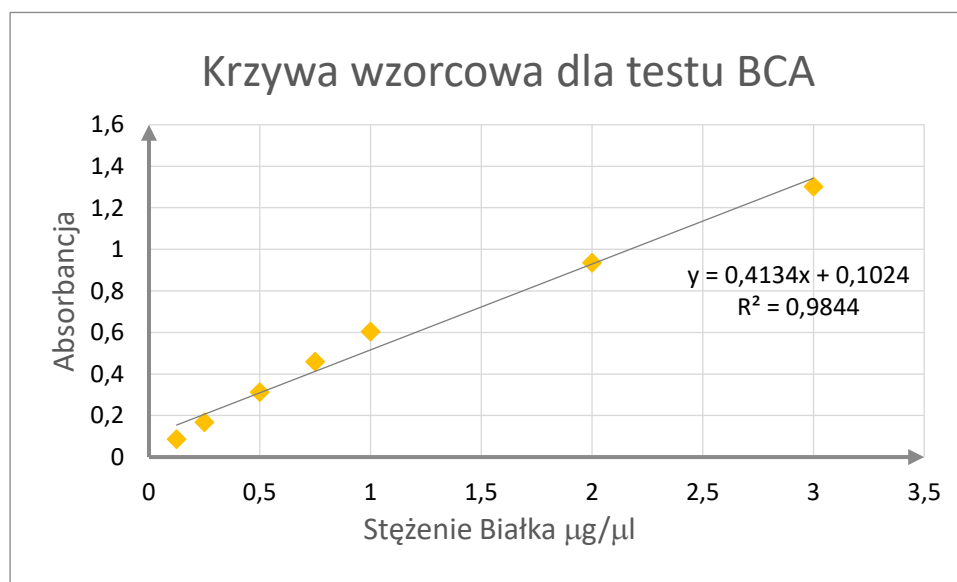
#### *Pomiar stężenia wyizolowanego białka całkowitego*

Do pomiaru stężenia białka użyto 5 µl lizatu, a pozostałą część zamrożono w - 80°C i przechowano do momentu dalszych analiz western blot. Stężenie białka w izolacie oznaczono spektrofotometrycznie przy pomocy testu kwasu bincichoninowego (BCA; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Metoda to opiera się na pomiarze ilości jonów Cu<sup>+</sup>



powstających z  $\text{Cu}^{2+}$  przy udziale kompleksu Biuretowego i BCA[102]. W wyniku reakcji chemicznej dochodzi do interakcji jonów miedzi z białkowymi resztami cysteiny, cystyny, tryptofanu oraz tyrozyny, co prowadzi do zmiany zabarwienia roztworu z zielonego na fioletowy. Intensywność barwy jest następnie mierzona przy długości fali 562 nm. Pomiar stężenia właściwych prób był poprzedzony przygotowaniem odpowiedniej krzywej wzorcowej, do której wykonania użyto standardu białkowego w postaci albuminy wołowej (BSA, ang. *bovine serum albumin*) o stężeniu wyjściowym  $1 \text{ mg/ml}$ . W 1,5 ml probówkach typu „Eppendorf” z roztworu BSA przygotowano serię rozcieńczeń, w których końcowe stężenie białka wynosiło 3; 2; 1; 0,75; 0,5; 0,25;  $0,125 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Do nowych probówek podano 495  $\mu\text{l}$  mieszaniny  $\text{CuSO}_4$  (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) i BCA w stosunku 1:50, oraz 5  $\mu\text{l}$  odpowiedniego rozcieńczenia. Do próby ślepej, zamiast białka, dodano 5  $\mu\text{l}$  buforu RIPA. Próbki inkubowano przez 10 minut, a następnie zmierzono ich absorbancję przy długości fali 560 nm za pomocą spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf AG, Niemcy). Uzyskane wyniki posłużyły do wykreślenia krzywej wzorcowej (Ryc. 16)

Przygotowana w ten sposób krzywa standardowa została wykorzystana



Ryc. 16 Krzywa wzorcowo wyznaczona dla testu BCA

do oznaczenia stężenia białka wyizolowanego z tkanek i linii komórkowych. W celu pomiaru stężenia użyto 5  $\mu\text{l}$  odpowiedniego lizatu białkowego oraz 495  $\mu\text{l}$  mieszaniny BCA i  $\text{CuSO}_4$ . Próbę zerową stanowiło 5  $\mu\text{l}$  buforu RIPA. Całą procedurę pomiaru wykonano analogicznie jak przy wyznaczaniu krzywej wzorcowej.

### ***Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)***

Do wykonania procedury Western blot wykorzystano 30 µg białka wyizolowanego z ustalonych linii komórkowych bądź tkanek. W zależności od stężenia izolatu pobrano 2-10 µl roztworu białek i zmieszano z 6 µl denaturującego buforu obciążającego oraz wodą dejonizowaną, tak aby całość mieszaniny miało objętość końcową 18 µl. W ten sposób przygotowane próby umieszczono w termobloku i inkubowano w 99 °C przez 10 minut. Preparaty następnie schłodzono w lodzie i zwirowano przez 15 sekund. Gotowe próbki nałożono na 10% żel poliakrylamidowy (zawierający SDS) i poddano rozdziałowi elektroforetycznemu. Dodatkowo, na każdym żelu umieszczono marker masy cząsteczkowej białek (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) w objętości 5 µl. Elektroforeza była prowadzona za pomocą aparatu Mini Protean (Bio-Rad, Hercules, CA), w 1× stężonym buforze glicynowym, schłodzonym do temperatury 4°C. Na początku elektroforezy stosowano napięcie 80V do momentu, aż białka przedostały się z żelu zagęszczającego do żelu rozdzielającego. Wówczas napięcie zwiększono do 120 V, a rozdział prowadzono około 2h, do momentu aż niebieski barwnik, będący komponentem obciążającego buforu denaturującego, wypłynął z żelu. Po tym czasie żele wyjęto i umieszczono w buforze do transferu białek w celu przygotowania ich do przeniesienia na błonę nitrocelulozową/PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA).

### ***Elektrotransfer, wiązanie przeciwciał oraz detekcja białek***

Do elektrotransferu białek użyto membrany nitrocelulozowej lub PVDF, o wielkości porów 0,45 µm oraz aparatu do transferu półsuchego Pierce (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Błona PVDF przed użyciem była aktywowana alkoholem metylowym przez około minutę. Transfer białek był prowadzony w 1× stężonym buforze do transferu, przez około 30 minut - w zależności od wielkości białka, proces był prowadzony dłużej (przy większych białkach) lub krócej. Reakcja była wykonywana w temperaturze pokojowej i stabilizowana natężeniem 500 mA. Po zakończonej procedurze, membranę barwiono przez 3 minuty buforem Ponceau S. Pozwoliło to uwidocznić związane z błoną białka i ocenić wydajność transferu. Membranę następnie przepłukano wodą dejonizowaną, tak aby odmyć z niej barwnik i umieszczono w 30 ml buforu blokującego (5% beztłuszczowe mleko rozpuszczone w TBST). Naczynie z błoną umieszczono na rotatorze (Biosan, Ryga, Łotwa) i inkubowano przez godzinę,

w temperaturze pokojowej. W trakcie blokowania przygotowano I-rzędowe przeciwciała (Tab. 9)

**Tabela 9. Charakterystyka użytych przeciwciał i ich zastosowane rozcieńczenia**

<b>Badane białko</b>	<b>Firma</b>	<b>Pochodzenie p-ciała</b>	<b>Rozcieńczenie p-ciała</b>	<b>Masa białka</b>
CYP1A1	Thermo Scientific	Poliklonalne, królicze	1:300	~55 kD
CYP1B1	Thermo Scientific	Poliklonalne, królicze	1:300	~56 kDa
PELP1	Bethyl Laboratories	Poliklonalne, królicze	1:2500	171 kDa
GAPDH	Santa Cruz	Poliklonalne, mysie	1:2500	35 kDa
Przeciwciało II rzędowe (1)	Santa Cruz	Poliklonalne kozie, antykrólicze	1:5000	N/A
Przeciwciało II rzędowe (2)	Thermo Scientific	Poliklonalne królicze, antymysie	1:3300	N/A

Po inkubacji w 5% mleku membranę umieszczono w 50 ml próbówce polipropylenowej („Falcon”), zawierającej odpowiednio rozcieńczone I-rzędowe przeciwciała i umieszczono na wytrząsarce o ruchu obrotowym, po czym inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie, błonę wypłukano kilkakrotnie buforem TBST i przełożono do naczynia zawierającego właściwe II-rzędowe przeciwciało, które sprzężone było z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. horseradish peroxidase) i inkubowano kolejne 2 godziny, w temperaturze pokojowej na rotatorze. Następnym krokiem było wypłukanie membrany z resztek niezwiązanych przeciwciał II-rzędowych, buforem TBS i podanie 1 ml mieszaniny substratu dla HRP (SuperSignal West Femto Substrate, ThermoScientific Inc. Waltham, MA). Odczyt sygnału został wykonany za pomocą aparatu do detekcji chemiluminescencji (Biospectrum® Imaging System 500, UVP Upland, CA) a otrzymane wyniki zanalizowano za pomocą programu ImageJ2x (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### ***Odmywanie przeciwciał***

Po detekcji sygnału, błona, na którą dokonano elektrotransferu, była wykorzystywana ponownie, w celu oznaczenia białka referencyjnego GAPDH (dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego; ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Przed rozpoczęciem kolejnych analiz z membrany należało usunąć, wcześniej związane przeciwciało. Procedura opierała się na inkubacji błony w serii buforów płuczących (Tab. 10), na rotatorze, w temperaturze pokojowej. Po zakończonym płukaniu membranę umieszczono w buforze blokującym i przeprowadzono procedurę wiązania się białka z przeciwciałem anti-GAPDH i przeciwciałem II – rzędowym – analogicznie do poprzednich białek.

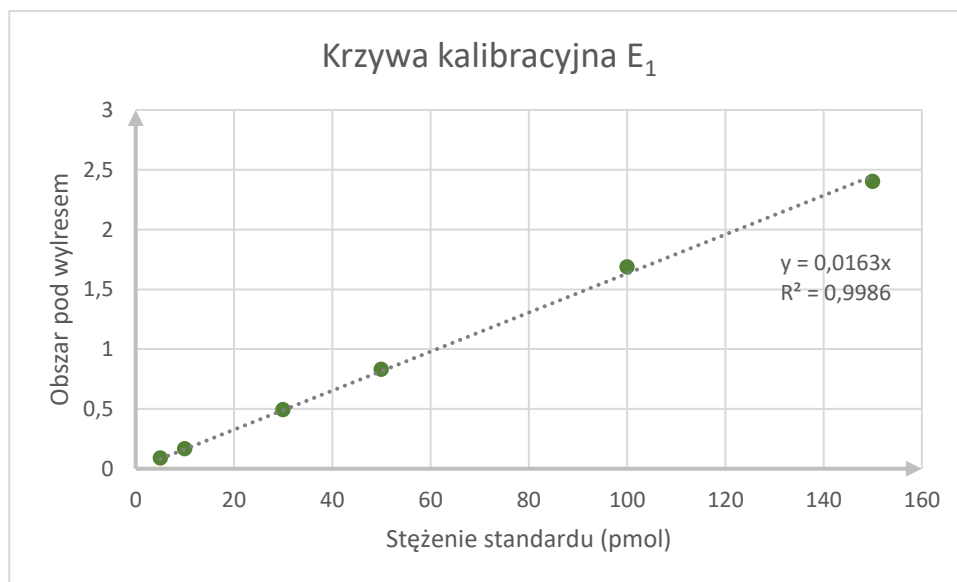
**Tabela 10. Kolejność buforów i czas płukania w procedurze strippingu.**

<b>Bufor</b>	<b>Czas inkubacji</b>
TBST	5 minut
Bufor do strippingu 1× stężony	15 minut
Bufor do strippingu 1× stężony	15 minut
Bufor do strippingu 1× stężony	15 minut
TBS	15 minut
TBS	10 minut
TBST	5 minut

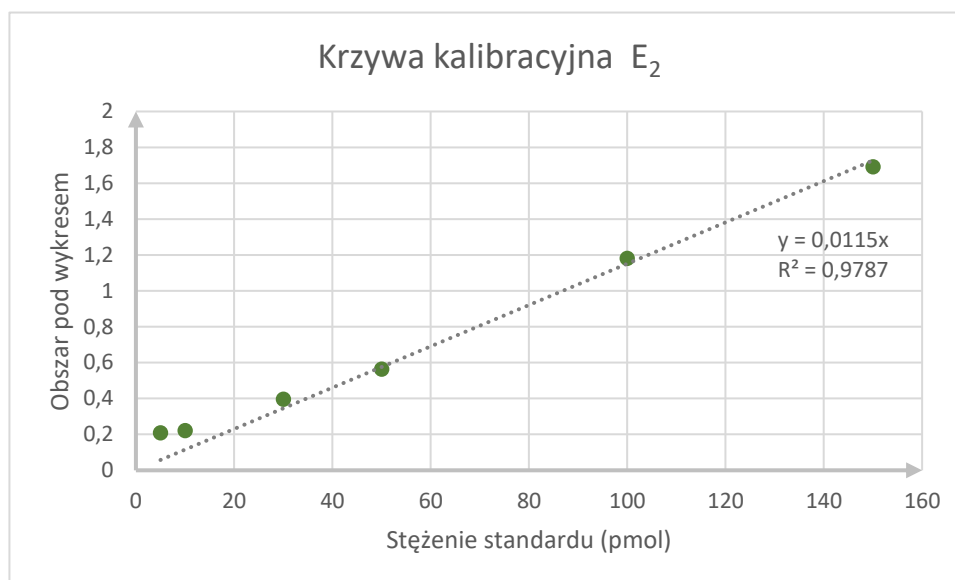
### **3.5.6. Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub>**

Oznaczenie wewnątrzkomórkowego stężenia E<sub>1</sub> oraz E<sub>2</sub> osiągnięto poprzez współpracę z Pracownią Spektrometrii Mas, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. W celu wykonania analizy z nowotworowej i histopatologicznie niezmiętej tkanki, wyizolowano frakcję hormonów steroidowych. W tym celu użyto maksymalnie 50 mg homogenatu tkankowego, który zmieszano z 1 ml eteru dietylowego oraz wody dejonizowanej w 2.0 ml, w schłodzonych probówkach polietylenowych. Do każdej z prób dodano również wewnętrznego standardu E<sub>1</sub> oraz E<sub>2</sub> znakowanego izotopem węgla C<sup>13</sup>(Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Miało to na celu między innymi ocenę wydajności izolacji, co uwzględniane było w późniejszych obliczeniach. Materiał Po rozbiciu materiału biologicznego za pomocą ultradźwięków, zebrano fazę organiczną preparatu i w koncentratorze (Eppendorf

Hamburg, Niemcy) odparowano eter dietylowy. Uzyskaną frakcję hormonów zawierającą E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> rozpuszczono w 50 mmol roztworze węgla sodu, a następnie poddano oczyszczaniu poprzez przepuszczenie roztworu przez kolumnę z węglem C18, którą uprzednio aktywowano 2 ml metanolu oraz wody dejonizowanej. Związane E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> zostały eluowane z kolumny za pomocą 90% metanolu. Kolejnym etapem było ponownie odparowanie rozpuszczalnika i rozpuszczenie frakcji estrogenów w fazie nośnej, którą był 50% roztwór acetonitrylu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). W ten sposób przygotowane próbki zostały umieszczone w kuwetach do spektrometrii masowej (Waters, Milford MA, US) i przeanalizowane przez aparat do wysokosprawnościowej chromatografii cieczowej/spektrometrii mas, opartym na technologii Waters Nano Acquity. Analiza ilościowa została przeprowadzona w oparciu o przygotowane wcześniej krzywe kalibracyjne dla E<sub>1</sub> oraz E<sub>2</sub> (Ryc. 17), które wyznaczono poprzez pomiar spektrometryczny serii rozcieńczeń standardów E<sub>1</sub> oraz E<sub>2</sub> zawierającymi się w stężeniach: 5, 10, 30, 50, 100 i 150 pmol/ml. Podczas analizy oceniane było widmo masowe dla danego estrogenu oraz obszar jaki zajmowało pod krzywą. Otrzymane stężenie E<sub>1</sub> lub E<sub>2</sub> przeliczono na miligram suchej tkanki użytej do analizy. Dodatkowo wyliczony stosunek stężeń E<sub>1</sub>/E<sub>2</sub> dla każdej z analizowanych prób.



Ryc. 17 Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla estronu (E<sub>1</sub>)



Ryc. 18 Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla estradiolu (E<sub>2</sub>)

### 3.5.7. Test genotoksyczności – tekst kometkowy

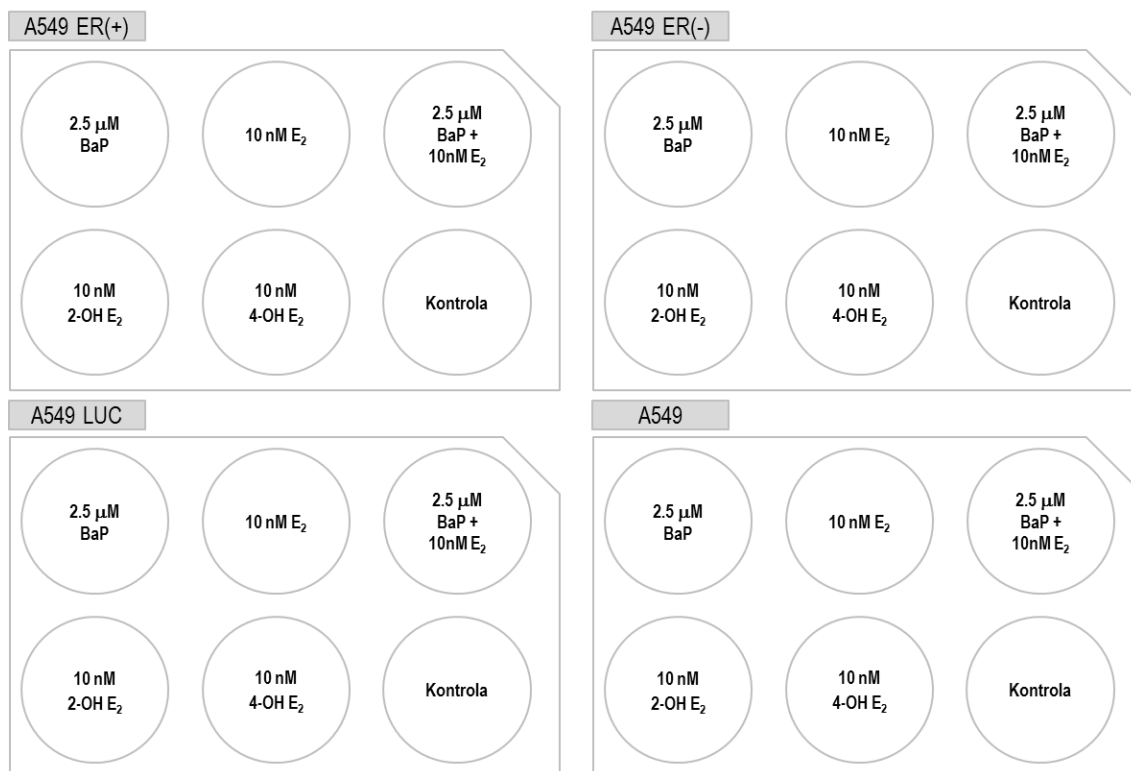
#### *Przygotowanie szkiełek podstawowych*

Szkiełka podstawowe zostały odtłuszczone za pomocą acetonu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) poprzez umieszczenie ich w naczyniu z rozpuszczalnikiem i pozostawiono je do całkowitego wyschnięcia. Szkiełka następnie zostały zanurzone w 1% agarozie (BioShop, Ontario, Kanada) o normalnej temperaturze topnienia (NMP), uprzednio dokładnie rozpuszczonej w wodzie destylowanej. Po wyciągnięciu, z dolnej powierzchni szkiełka usunięto bibułą agarozę, a górną powierzchnię pozostawiono do zestalenia i utworzenia cienkiego filmu. Gotowe szkiełka przechowywano bez dostępu do wilgoci, w eksykatorze.

#### *Przygotowanie komórek do testu kometowego*

Do testu kometowego wybrano komórki po 72 godzinnej inkubacji z badanymi substancjami: 2-OH E<sub>2</sub>, 4-OH E<sub>2</sub>, B(a)P, B(a)P + E<sub>2</sub> oraz E<sub>2</sub> (Ryc. 19). Kontrolą były komórki inkubowane w medium bez dodatku substancji badanej. Aby wykazać potencjalny udział receptora estrogenowego w transporcie szkodliwych metabolitów do wnętrza jądra komórkowego, wykorzystano komórki A549, w których za pomocą wektorów wirusowych zarówno wzmocniono (ER+) jak i wyciszono (ER-), ekspresję ER $\beta$ . Aby wykluczyć wpływ transfekcji wirusowej na poziom ER, zastosowano również wewnętrzną kontrolę z wklonowanym genem lucyferazy (LUC) oraz niemodyfikowane wirusem komórki linii A549 (Ryc. 19) Eksperyment był prowadzony zgodnie

z warunkami opisanymi w rozdziale 3.5.2 i dla każdego wykonano próbę kontrolną, którą stanowiły komórki hodowane bez dodatku substancji badanej.



Ryc. 19 Schemat eksperymentu oceniającego potencjalny udział ER w promowaniu genotoksycznego działania B(a)P, E<sub>2</sub>, 2-OH E<sub>2</sub> oraz 4-OH E<sub>2</sub>

Po inkubacji z odpowiednią substancją, komórki zbierano z powierzchni dołków, odklejając je za pomocą 1×stężonej trypsyny do 15 ml probówek polipropylenowych i przemywano w PBS poprzez wirowanie przez 4 minuty, w 200×g. Czynność tę powtórzono dwukrotnie. Następnie komórki liczone i zawieszono w takiej ilości PBS, aby ich zagęszczenie wynosiło  $1 \times 10^6$  komórek/ml

### *Liza Komórek*

Pobrano 60 µl zawiesiny komórkowej o gęstości  $1 \times 10^6$  komórek/ml dodano do 150 µl płynnej agarozы (BioShop, Ontario, Kanada) o niskiej temperaturze topnienia (LMP) i wymieszano. Następnie 60 µl uzyskanej mieszaniny nakropiono na przygotowane wcześniej szkiełka pokryte agarozą NMP, przykryto szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiono na 10 minut w temperaturze 4°C. Każdą próbę powtórzono 3 razy. Po zestaleniu, delikatnie usunięto szkiełko nakrywkowe i gotowe preparaty umieszczano na około 2 godziny w zimnym buforze lizującym, chroniąc jednocześnie przed światłem, w celu uniknięcia dodatkowych czynników mogących

powodować zniszczenia DNA. Po 2 godzinach, bufor lizujący zebrano, a szkiełka przepłukano trzykrotnie wodą destylowaną.

### ***Elektroforeza***

Szkiełka umieszczono w aparacie do elektroforezy poziomej, wypełnionego zimnym buforem do elektroforezy ( $\text{pH} > 13$ ) i inkubowano przez 30 minut. Następnie włączono zasilanie i ustawiono napięcie na poziomie 20V. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C, przez 40 minut, w ciemności.

### ***Neutralizacja, utrwalanie i barwienie preparatów.***

Po elektroforezie, szkiełka przemyto 3 razy zimną wodą destylowaną i przeprowadzono 10 minutową inkubację w zimnym buforze neutralizującym. Szkiełka ponownie przemyto trzykrotnie wodą destylowaną i umieszczono w naczyniu z 70% etanolem. Preparaty następnie osuszono i przechowywano w eksykatorze do momentu wykonania barwienia, do którego użyto barwnika Hoechst 33342 o końcowym stężeniu 0.5 µg/ml. Preparat oceniano pod względem jakościowym (obecność i długość ogona) za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego EVOS Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts).

### **3.5.8. Analizy statystyczne**

Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 13.5 (Statsoft Inc.) oraz Graph Pad Prism 8.1. Ocena normalności rozkładu dla zmiennych dotyczących pacjentów została przeprowadzona z użyciem testu Shapiro-Wilka. W zależności od jego wyniku zastosowano test parametryczny, obustronny t-studenta lub nieparametryczny test Manna-Whitney'a. Analizy dotyczące linii komórkowych opierały się na jedno lub wieloczynnikowym teście ANOVA z testem post-hoc Tukeya-Kramera, jeżeli dane charakteryzował rozkład normalny. Do określenia istotnych statystycznie zależności pomiędzy badanymi zmiennymi zastosowano analizę korelacji Pearsona, jeżeli rozkład wariancji był normalny, natomiast w przeciwnym przypadku zastosowano analizę rang Spearmana. Wszystkie wyznaczone różnice i współczynniki korelacji przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności  $P \leq 0.05$ . Oznaczenia: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$



## 4. Wyniki

### 4.1 Analiza ilości mRNA oraz białka PELP1, AhR, CYP1A1 oraz CYP1B1 w komórkach A549, Calu-1 oraz Beas-2b hodowanych w obecności B(a)P oraz E<sub>2</sub>

Wszystkie szczegółowe dane, zarówno, statystyczne jak i graficzne zaprezentowano na rycinach 21 – 68. W tabelach przedstawiono wyniki analizy statystycznej dla różnic pomiędzy względną wartością ilości mRNA genów badanych w komórkach (A549, Calu-1, Beas-2b) kontrolnych i inkubowanych w analizowanej substancji (2.5  $\mu$ M B(a)P, 5  $\mu$ M B(a)P, 2.5  $\mu$ M B(a)P + 10 nM E<sub>2</sub> oraz 10 nM E<sub>2</sub>). Dodatkowo, w tabelach zamieszczono nienormalizowane wartości cDNA transkryptu, odchylenia standardowego (SD) i błędu standardowego średniej (SEM). Na wykresach zwizualizowano różnice pomiędzy poziomem mRNA badanych genów w stosunku do odpowiedniej kontroli. Słupki prezentują stosunek względnej ilości transkryptów (wraz z SEM) genu badanego, dla komórek badanych i odpowiedniej kontroli, przedstawiony jako jej wielokrotność. Na wykresach oznaczono również statystycznie istotne różnice pomiędzy ilością transkryptu w komórkach inkubowanych z poszczególnymi substancjami. Na rycinach 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 zestawiono względny poziom transkryptu w komórkach inkubowanych z badaną substancją dla poszczególnych czasów eksperymentu. W celu oceny statystycznej otrzymanych wyników zastosowano test jednostronnej ANOVY wraz z testem post-hoc Tuckey'a. Pod tabelami umieszczono reprezentatywne zdjęcia prążków z analizy Western blot. W górnym rzędzie przedstawiono białko badane, a w dolnym białko referencyjne GAPDH dla poszczególnych substancji badanych. Dane otrzymane w wyniku analizy białek zamieszczono w tabeli 11. Wartości przedstawiają stosunek gęstość optycznej prążków białka badanego względem referencyjnego w odniesieniu do kontroli dla danego czasu. W poniższych akapitach opisano najistotniejsze spostrzeżenia dotyczące poszczególnych analiz.

#### 4.1.1 PELP1

W przypadku linii nowotworowych A549 i Calu-1 nie zauważono istotnych zmian w poziomie transkryptu *PELP1* poza niewielkim spadkiem podczas inkubacji linii Calu-1 z 2.5  $\mu$ M B(a)P + 10 nM E<sub>2</sub> po 24 i 48 godzinach inkubacji (odpowiednio  $p=0.0038$  i  $p=0.0020$ ) w porównaniu do ilości jego transkryptu po 72 godzinie inkubacji (Ryc. 28). Jednak dla poszczególnych czasów, nie wykazano istotnych statystycznie

różnic pomiędzy komórkami hodowanymi z B(a)P i/lub E<sub>2</sub> a komórkami kontrolnymi (Ryc. 25-27). Natomiast w przypadku linii Beas-2b zaobserwowano obniżenie ilości transkryptu *PELPI* w porównaniu do kontroli po 24 godzinach inkubacji z 2.5 μM B(a)P + 10 nM E<sub>2</sub> (p=0.0004) (Ryc. 29). (Ryc. 32)

#### 4.1.2 AHR

Nie odnotowano istotnie statystycznych różnic w poziomie genu *AHR* w linii prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b pomiędzy kontrolami i komórkami badanymi w przypadku żadnej z badanych substancji (Ryc. 41 – 44). W ustalonych liniach nowotworowych A549 i Calu-1 zaobserwowano istotny spadek transkryptu *AHR* po inkubacji komórek z B(a)P. W linii Calu-1 najbardziej zauważalny efekt zaobserwowano przy stężeniu 2.5 μM B(a)P, po 48 (p>0.0001) i 72 godzinach (p>0.0001) inkubacji (Ryc. 38 – 40). Natomiast w linii A549 efekt obniżenia ilości mRNA *AHR* był widoczny niezależnie od dawki B(a)P i czasu inkubacji (Ryc. 33 – 36). Zaobserwowano również indukujący wpływ E<sub>2</sub> na poziom transkryptu *AHR* w obu badanych liniach nowotworowych. W linii A549 po 72 godzinach inkubacji (p=0.0586), w Calu-1 w przypadku wszystkich analizowanych czasów (p = 0.0452; p=0.0032; p=0.0163; Ryc. 33 – 36).

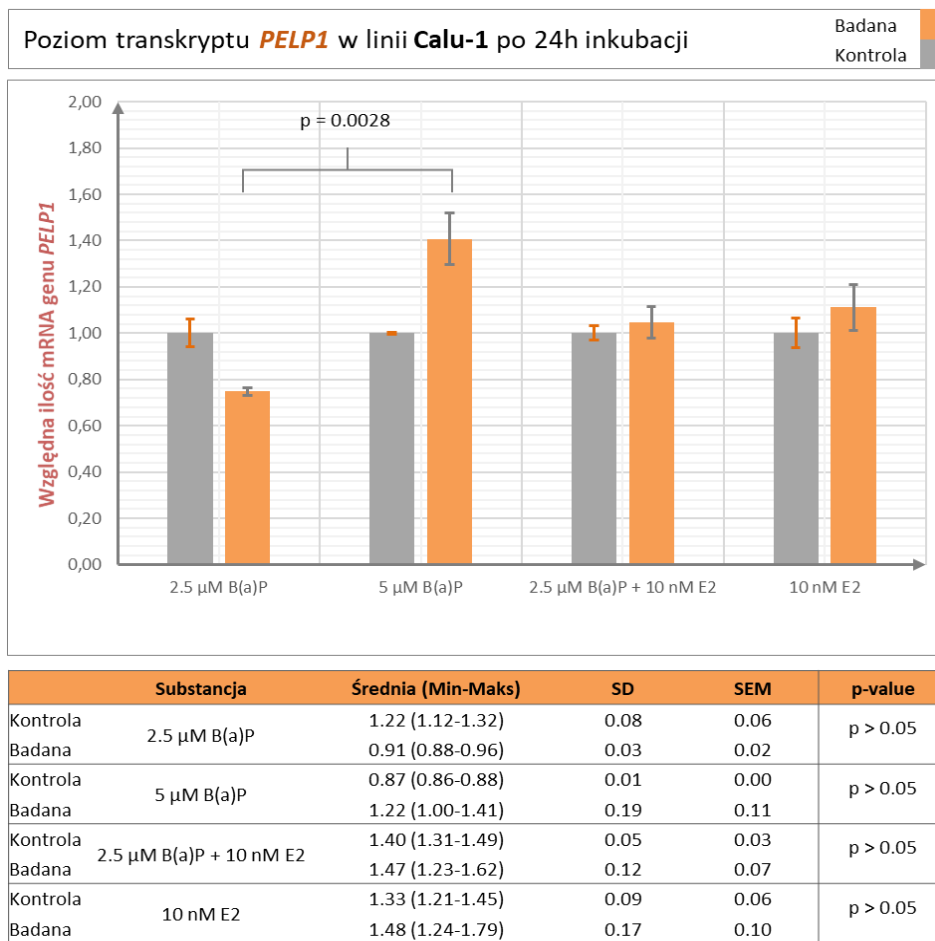
#### 4.1.3 CYP1A1

Wzrost ilości mRNA i białka CYP1A1 odnotowano we wszystkich liniach komórkowych poddanych inkubacji B(a)P. Najwyższy wzrost zarówno transkryptu jak i białka zaobserwowano w linii Calu-1. Po 24 godzinach inkubacji z B(a)P ilość mRNA badanego genu wzrosła około 20 – 25 razy w porównaniu do komórek kontrolnych. Efekt ten był obserwowany niezależnie od stężenia B(a)P w medium (Ryc. 49), co więcej po 48 godzinach poziom ten wzrósł o kolejne 30 – 35 razy (Ryc. 50) i utrzymywał się mniej więcej na tym samym poziomie po 72 godzinach eksperymentu (szczegółowe dane statystyczne opisano na poszczególnych rycinach). Wzrost ilości transkryptu skutkowało również wzrostem ilości białka (tabela 11) - z powodu ograniczeń pomiaru i walidacji metody udało się wykonać przybliżoną półilościową analizę. W linii A549 również zaobserwowano podniesienie ilości transkryptu i białka CYP1A1 po hodowaniu komórek w obecności B(a)P. Po 24 godzinach eksperymentu wykazano około 20-krotne

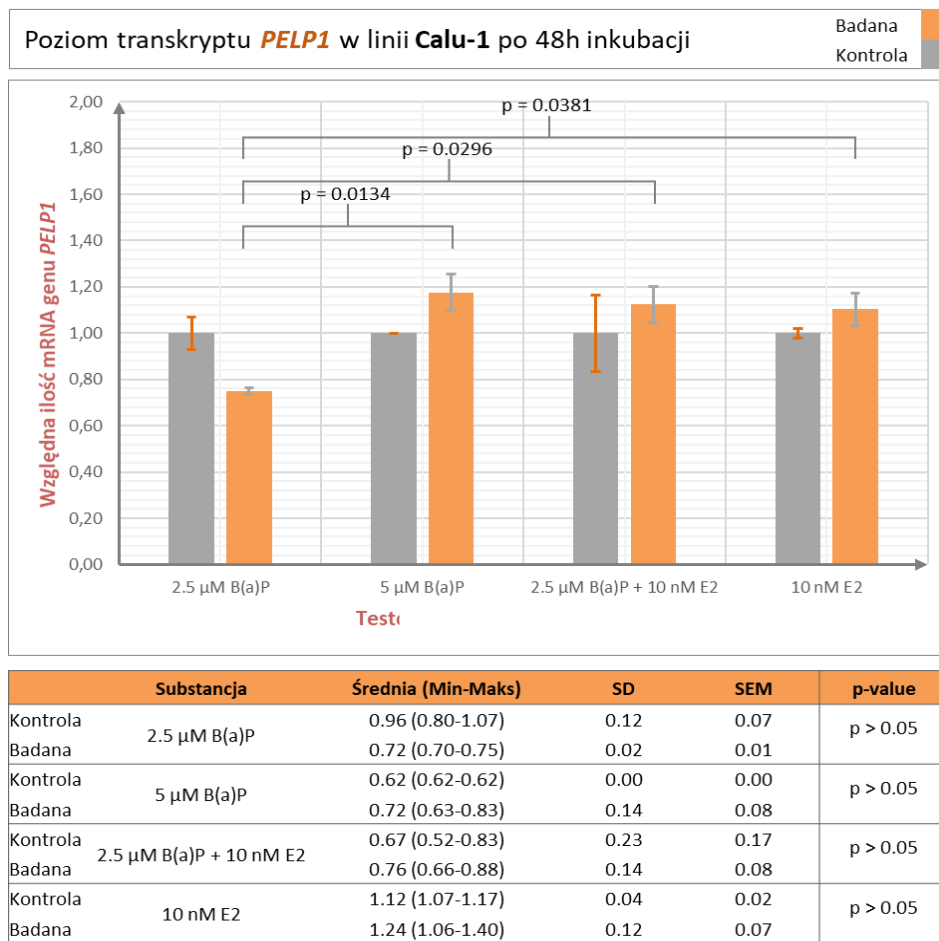
zwiększenie ilości mRNA *CYP1A1*, które wzrosło o kolejne 10 razy (w porównaniu do kontroli) po 48 godzinach i utrzymało się na tym poziomie do 72 godziny inkubacji (Ryc. 45-48). Linia komórkowa Beas-2b charakteryzowała się najmniejszymi zmianami w ilości badanego mRNA genu i białka. Mimo to, zmiany te były wciąż zauważalne i wykazywały wysoką istotność statystyczną. W przeciągu całego eksperymentu, po inkubacji z B(a)P, poziom *CYP1A1* wzrósł około 2-3 razy, w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych (Ryc 53 – 56). We wszystkich badanych liniach komórkowych nie zaobserwowano wpływu 10 nM  $E_2$  na zmiany ilości białka jak i mRNA *CYP1A1*.

#### 4.1.4 CYP1B1

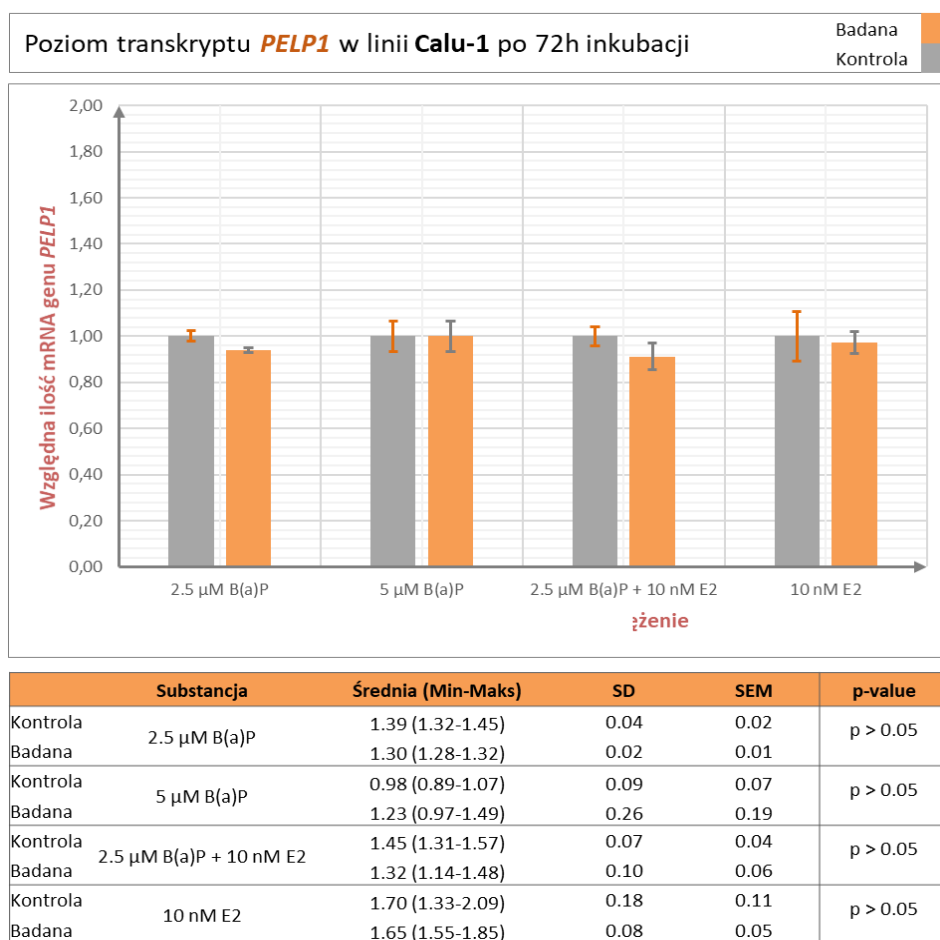
We wszystkich hodowanych z dodatkiem B(a)P liniach komórkowych zaobserwowano zwiększenie się ilości białka i transkryptu *CYP1B1*. Najwyższy wzrost transkryptu zaobserwowano w przypadku linii komórkowej Calu-1. Ilość mRNA podniosła się od 8 do 13 razy (Ryc. 61 – 63) w ciągu całego eksperymentu (w porównaniu do komórek kontrolnych) i była zależna od czasu – odnotowano stopniowe zwiększanie się ilości w poszczególnych momentach czasowych trwania eksperymentu (Ryc. 64). W linii A549, również zauważono, zależny od czasu inkubacji z B(a)P wzrost ilości mRNA *CYP1B1* (Ryc. 68). Po 24 godzinach zaobserwowano około 3-4 krotne zwiększenie ilości transkryptu, który w trakcie eksperymentu wzrósł jeszcze do około 7 razy (Ryc 57 – 59), niezależnie od stężenia użytego B(a)P. Zwiększeniu się ilości transkryptu towarzyszył również wzrost ilości białka (Ryc. 61-63) W Komórkach prawidłowego nabłonka oddechowego Beas-2b po inkubacji z B(a)P, poziom mRNA jak i białka *CYP1B1* niezależnie od stężenia B(a)P podniósł się około 2 – 2.5 krotnie (Ryc. 65 – 67). Zastosowanie 10 nM  $E_2$  nie spowodowało istotnych statystycznie zmian w ilości *CYP1A* w liniach A549 i Beas-2b, natomiast w linii Calu-1 możemy zaobserwować wzrost transkryptu i białka (Ryc. 61- 63).



Ryc. 20 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej Calu-1, po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



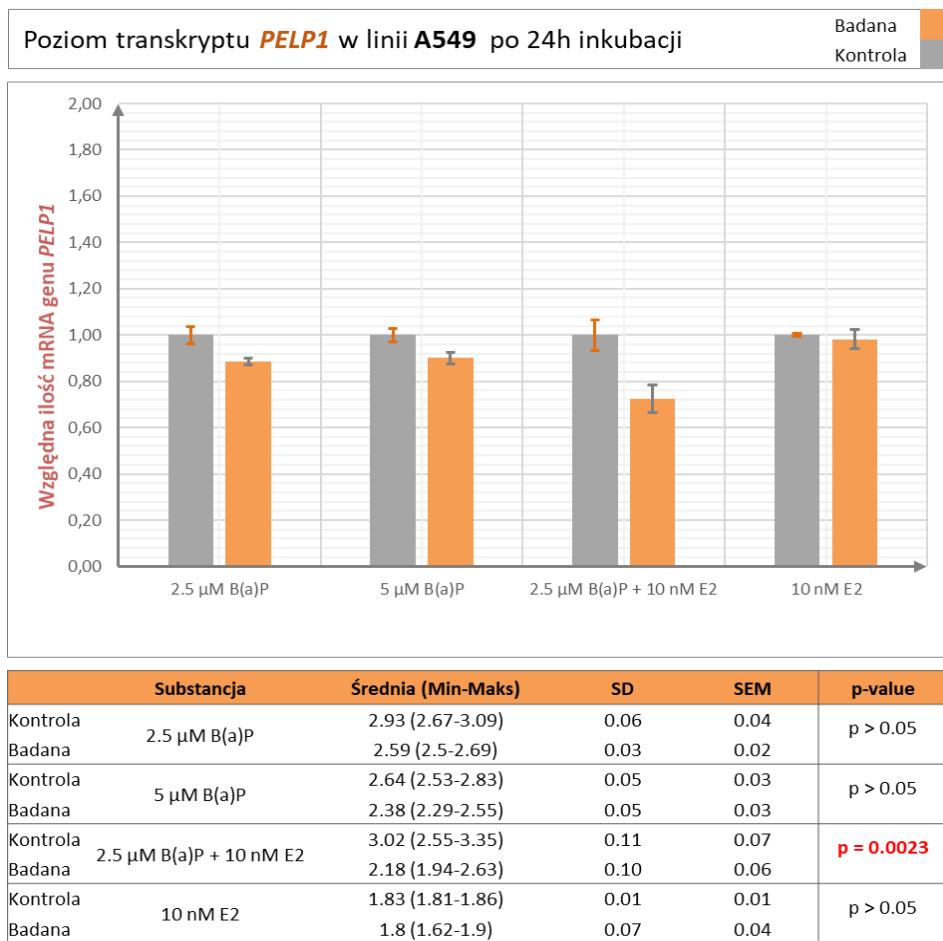
Ryc. 21 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej Calu-1, po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



Ryc. 22 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej Calu-1, po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

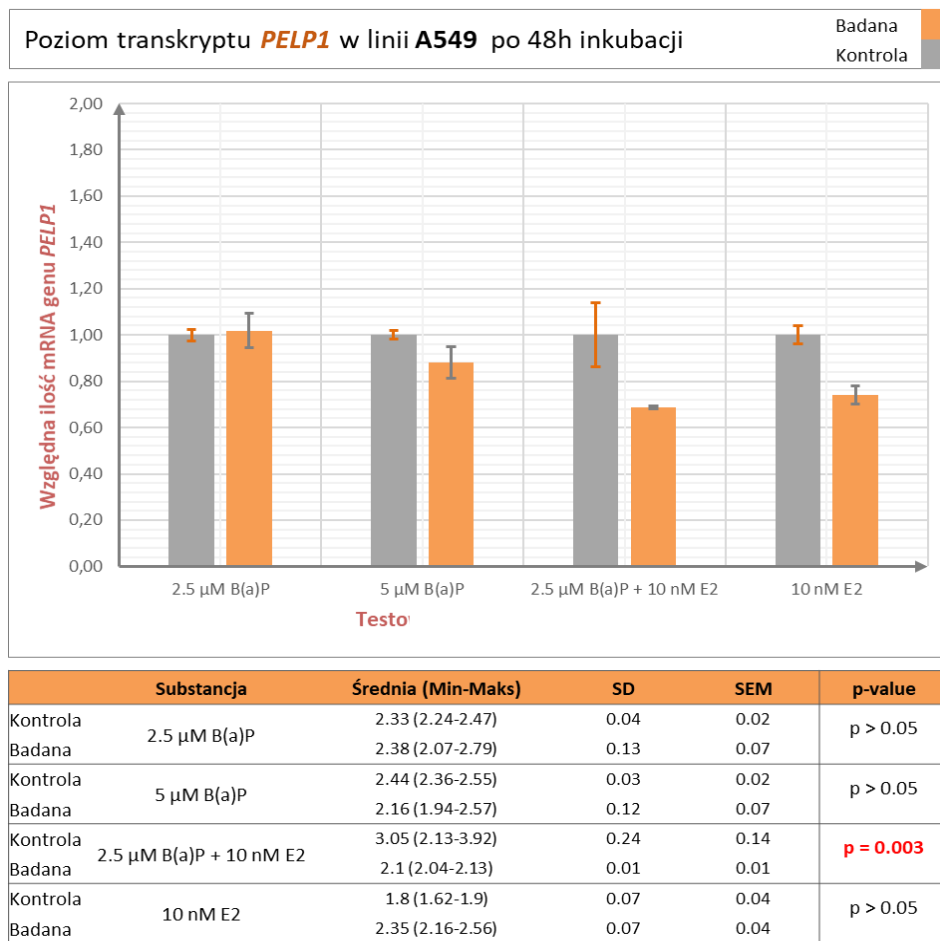


Ryc. 23 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej Calu-1, w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji

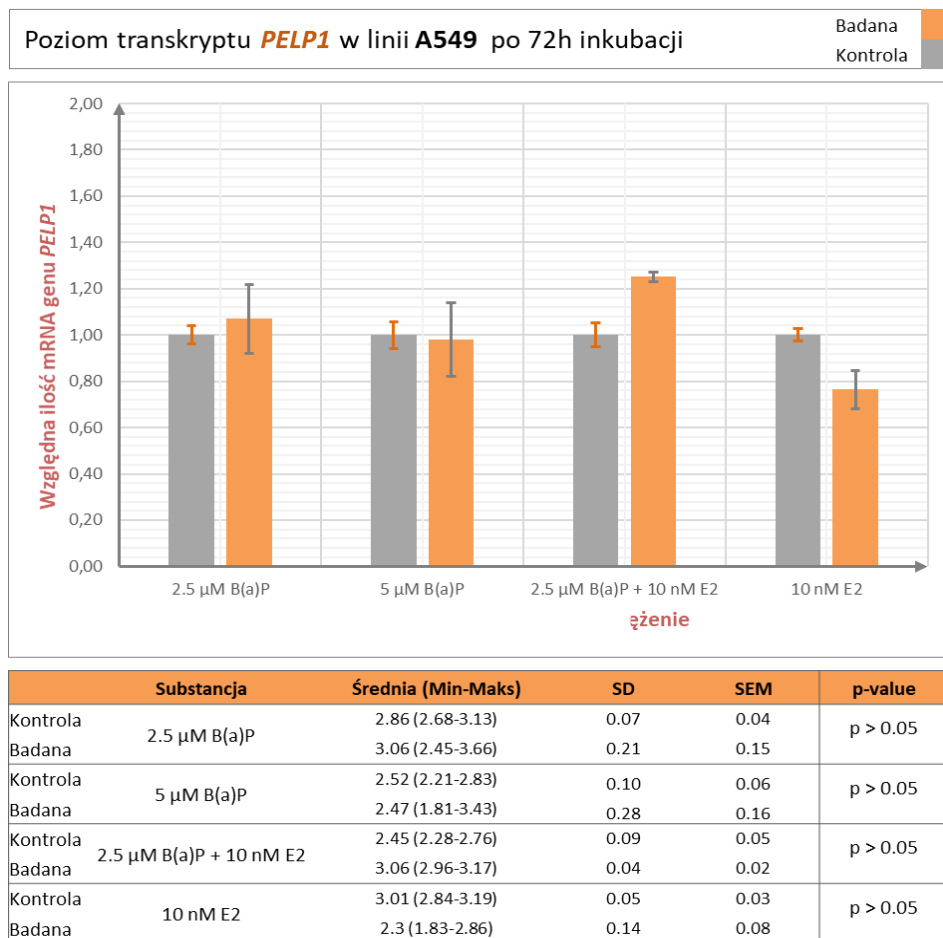


Ryc. 24 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej A549, po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

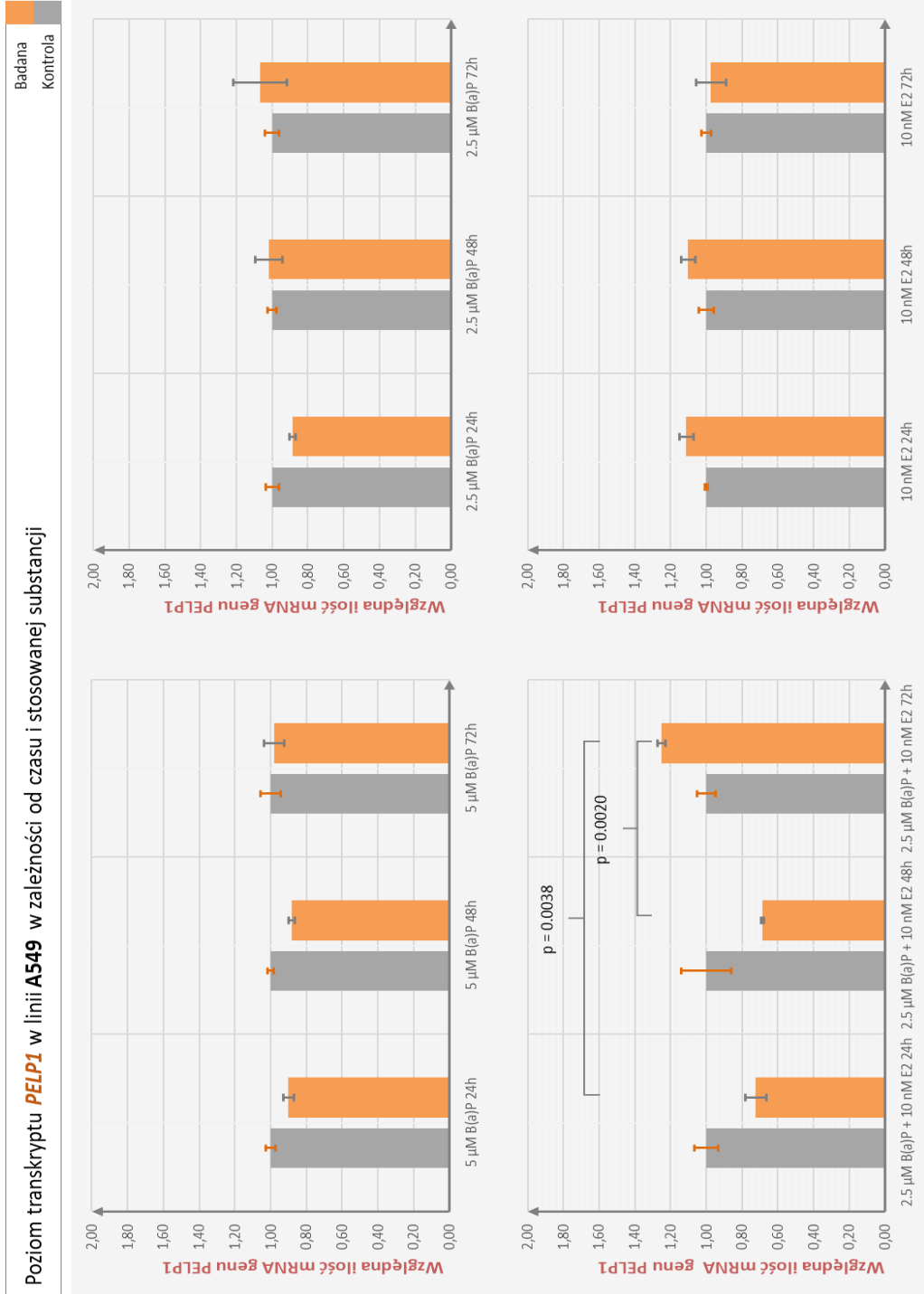




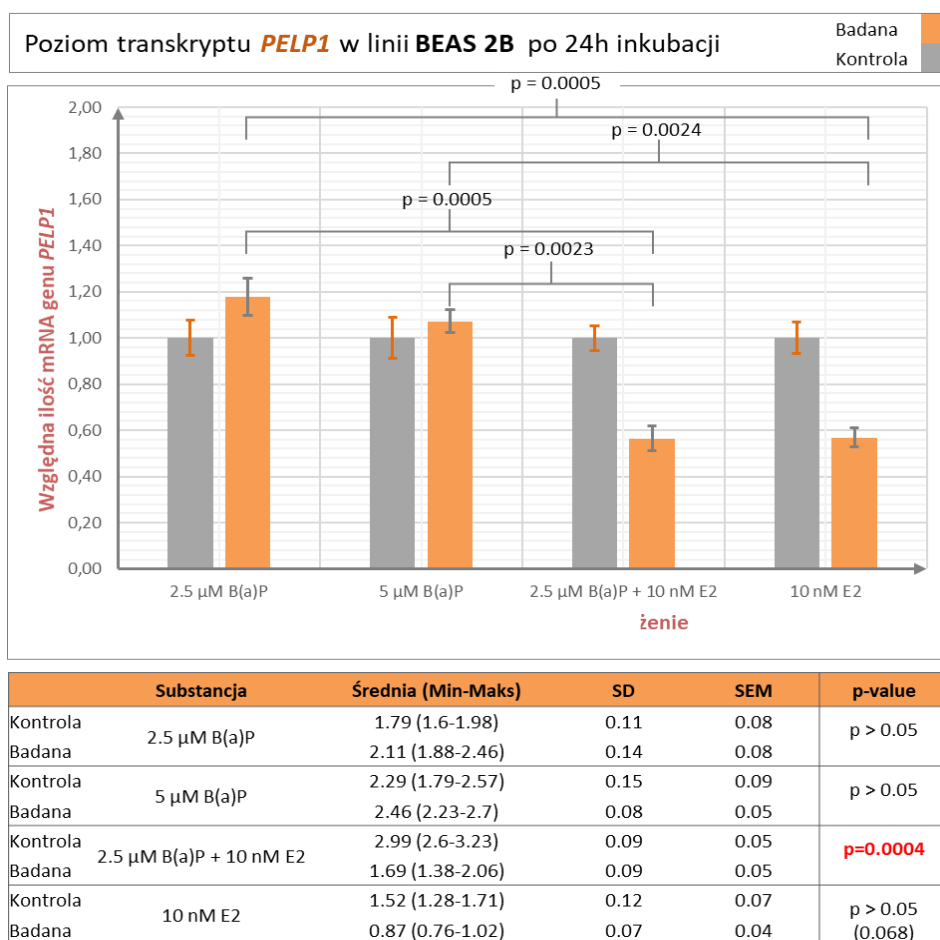
Ryc. 25 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej A549, po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



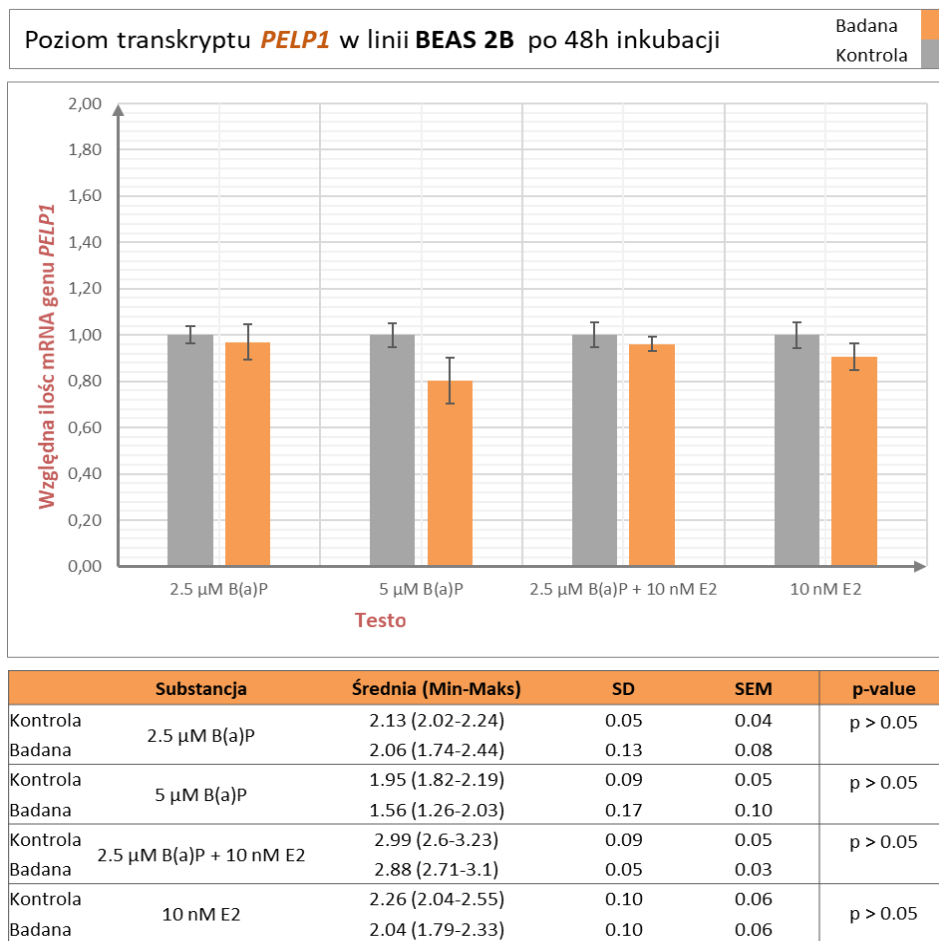
**Ryc. 26** Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej A549, po 72h godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



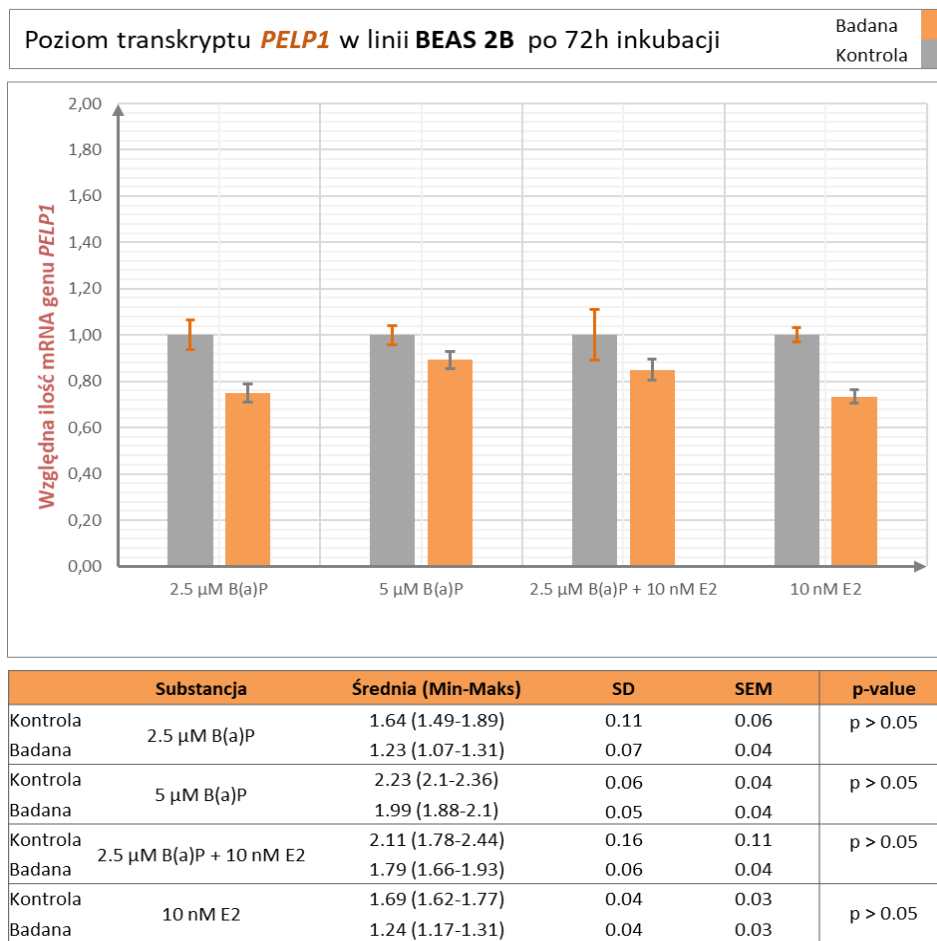
**Ryc. 27** Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej A549, w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji



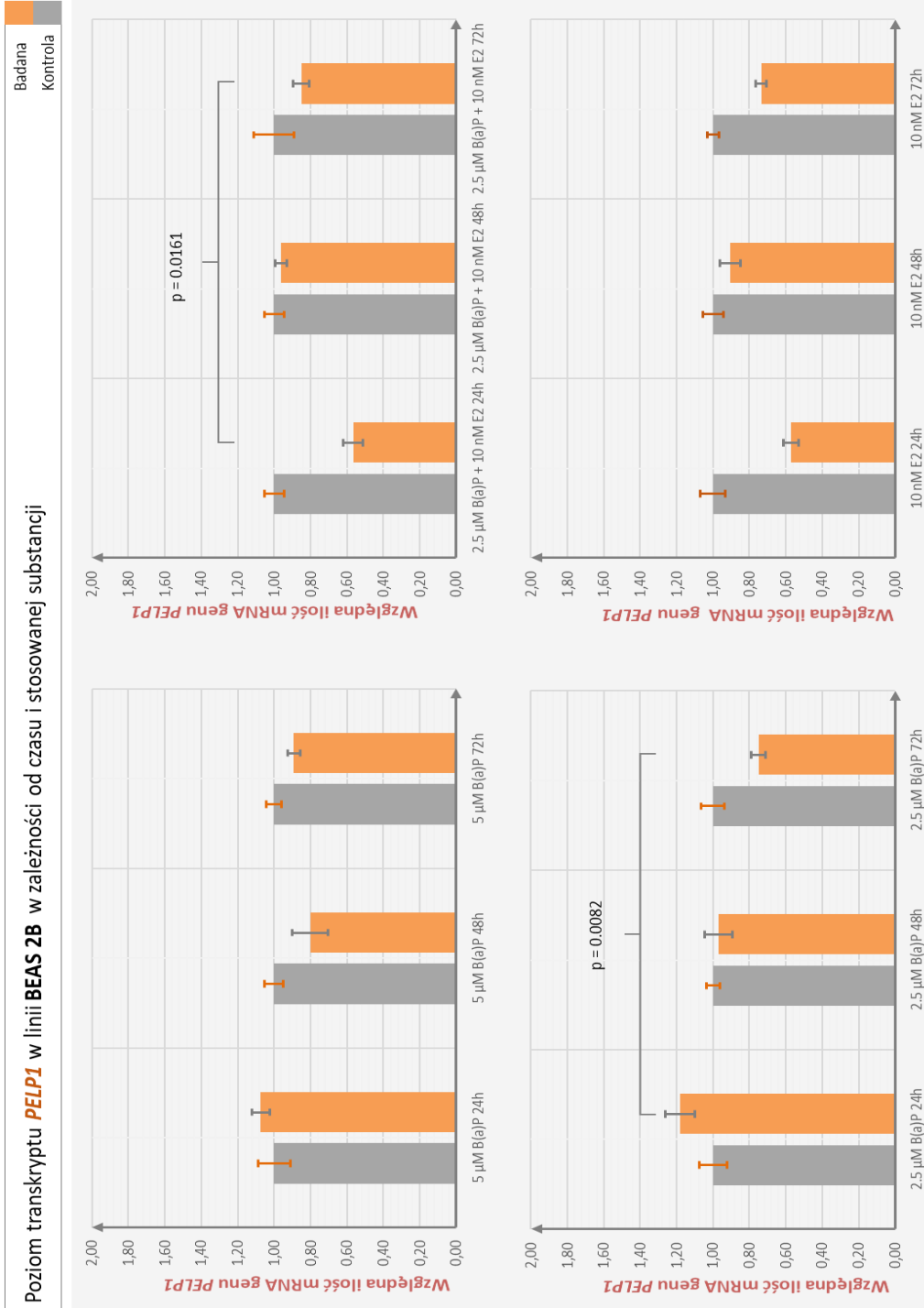
Ryc. 28 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej Beas-2b, po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



**Ryc. 29** Poziom transkryptu *PEL1* w linii komórkowej Beas-2b, po 48h godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



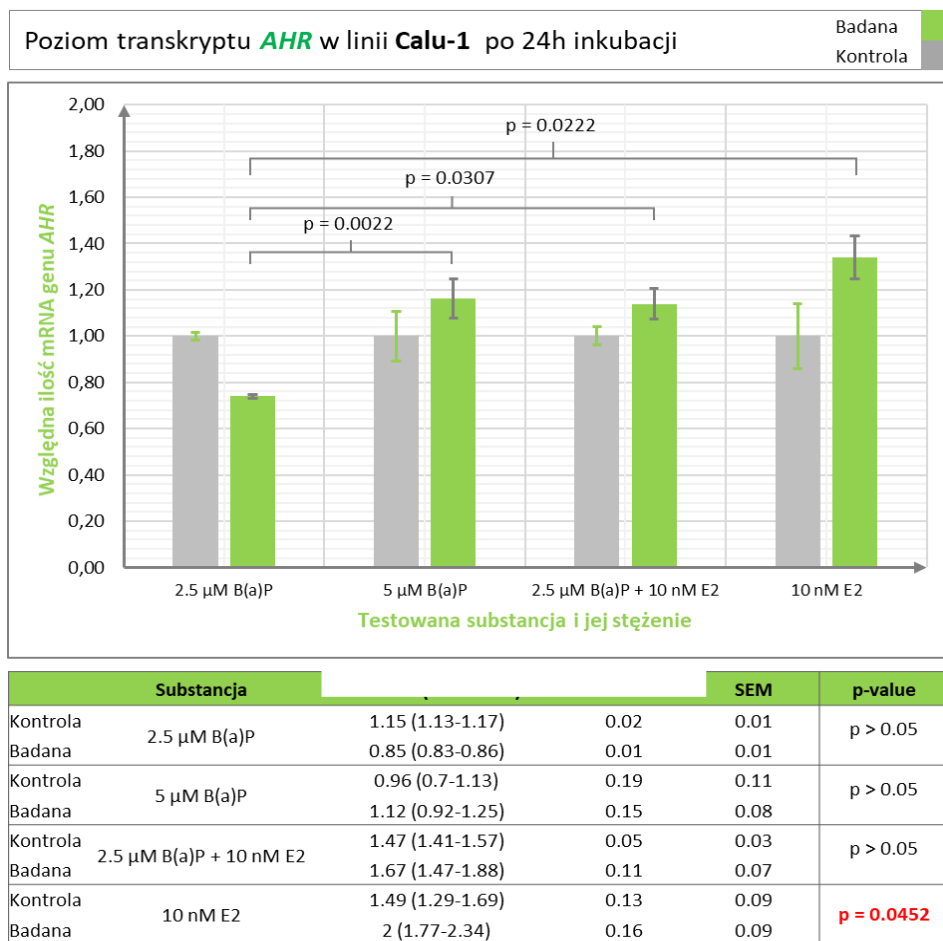
Ryc. 30 Poziom transkryptu *PELP1* w linii komórkowej Beas-2b, po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



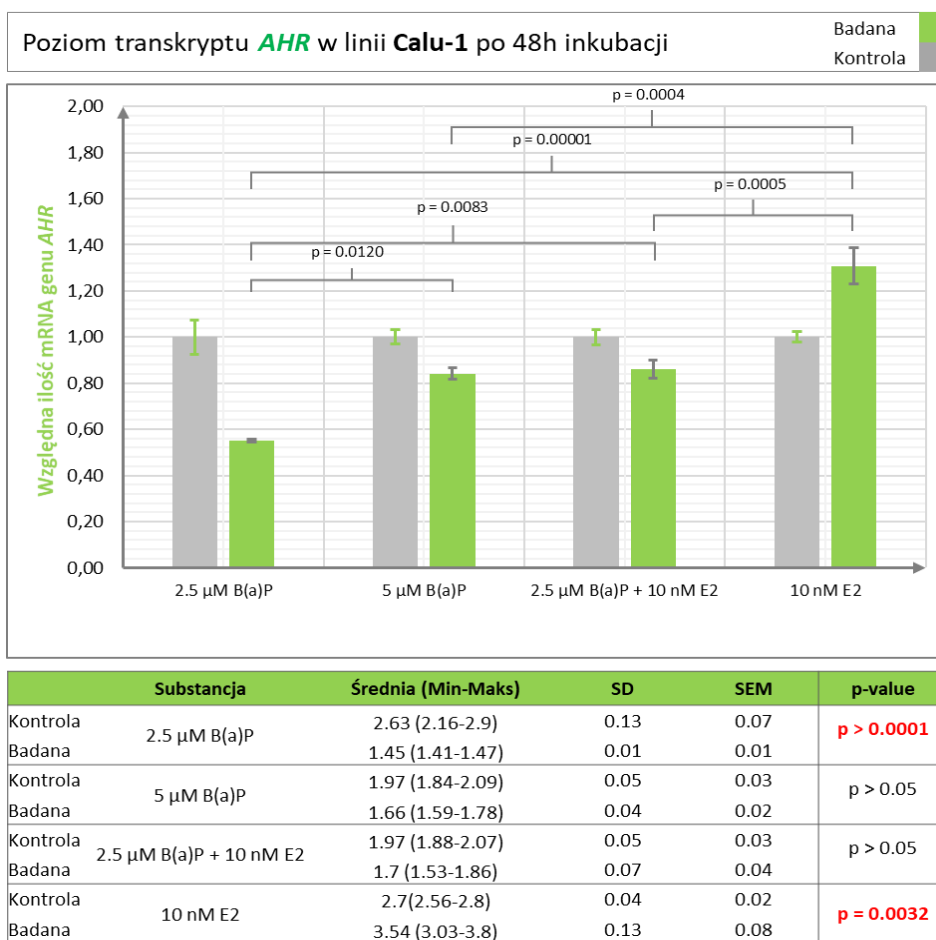
**Ryc. 31** Poziom transkryptu *PELPI* w linii komórkowej Beas-2b, w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji



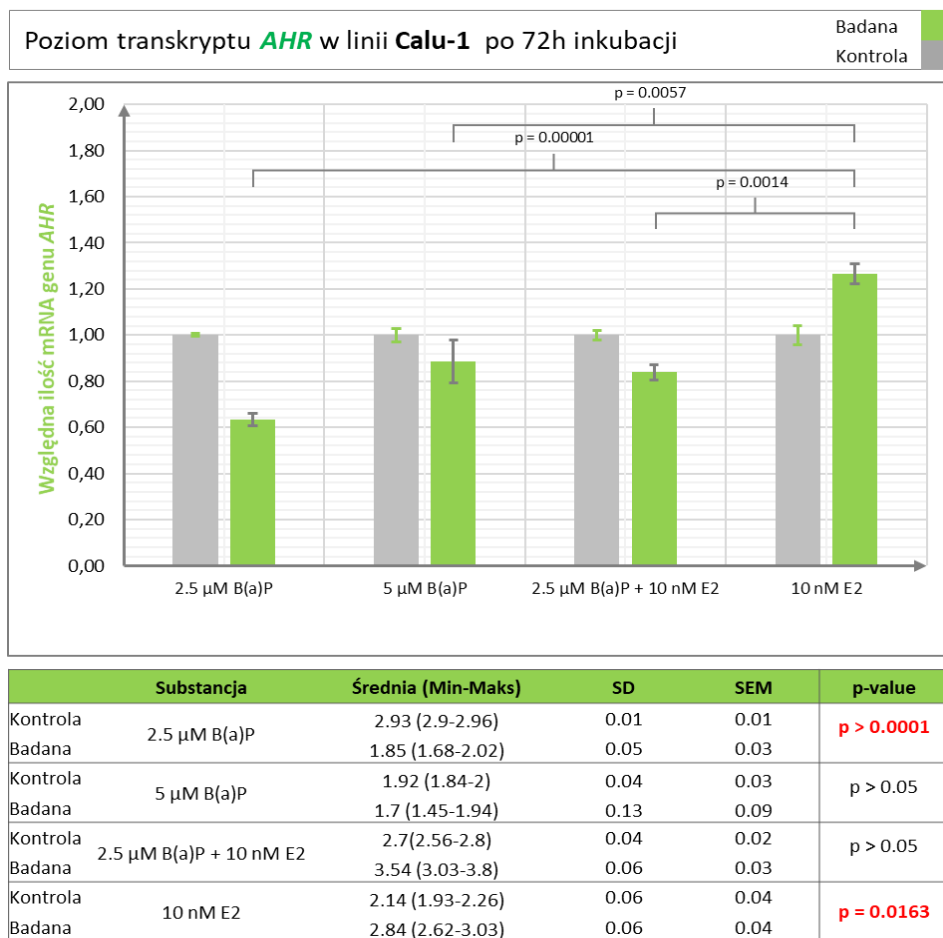




Ryc. 32 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej Calu-1 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



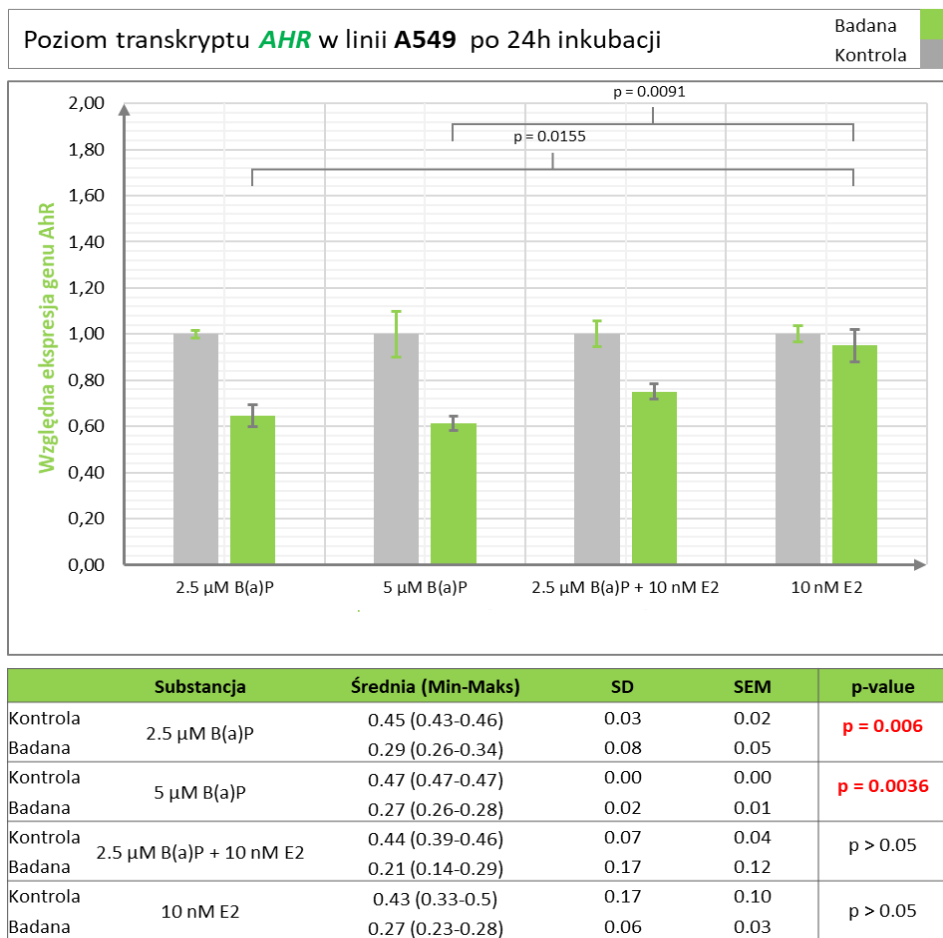
Ryc. 33 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej *Calu-1* 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



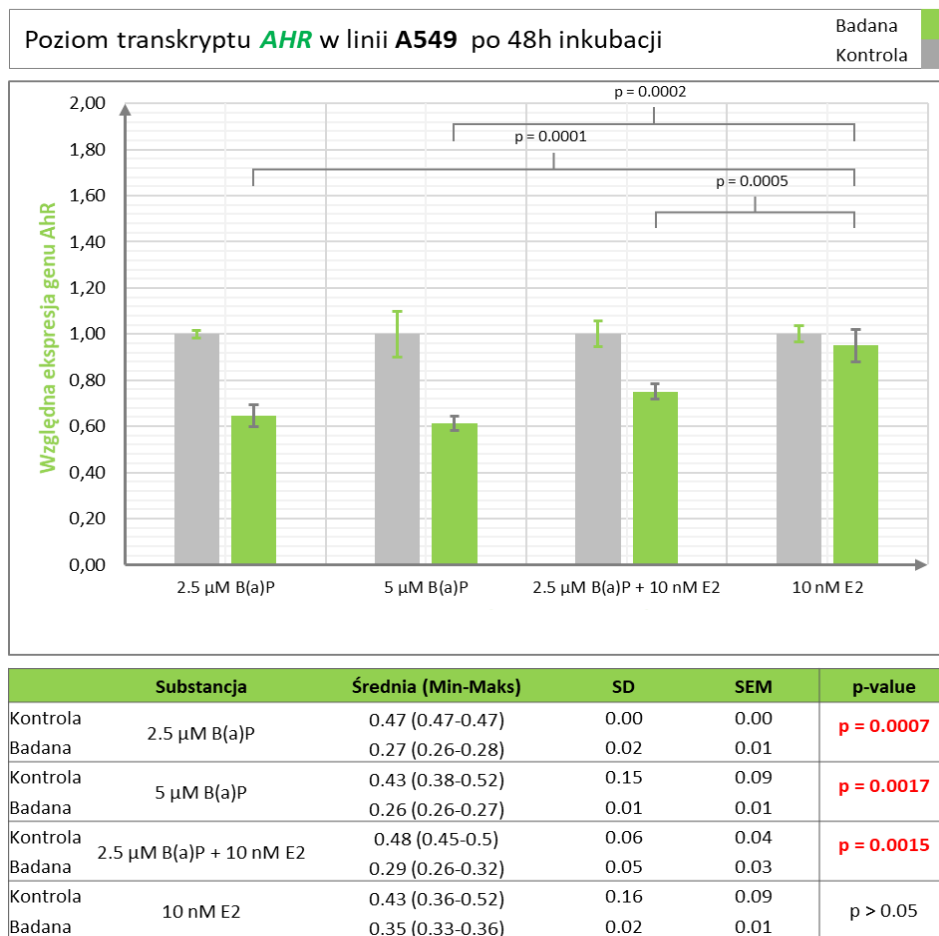
Ryc. 34 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej Calu-1 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



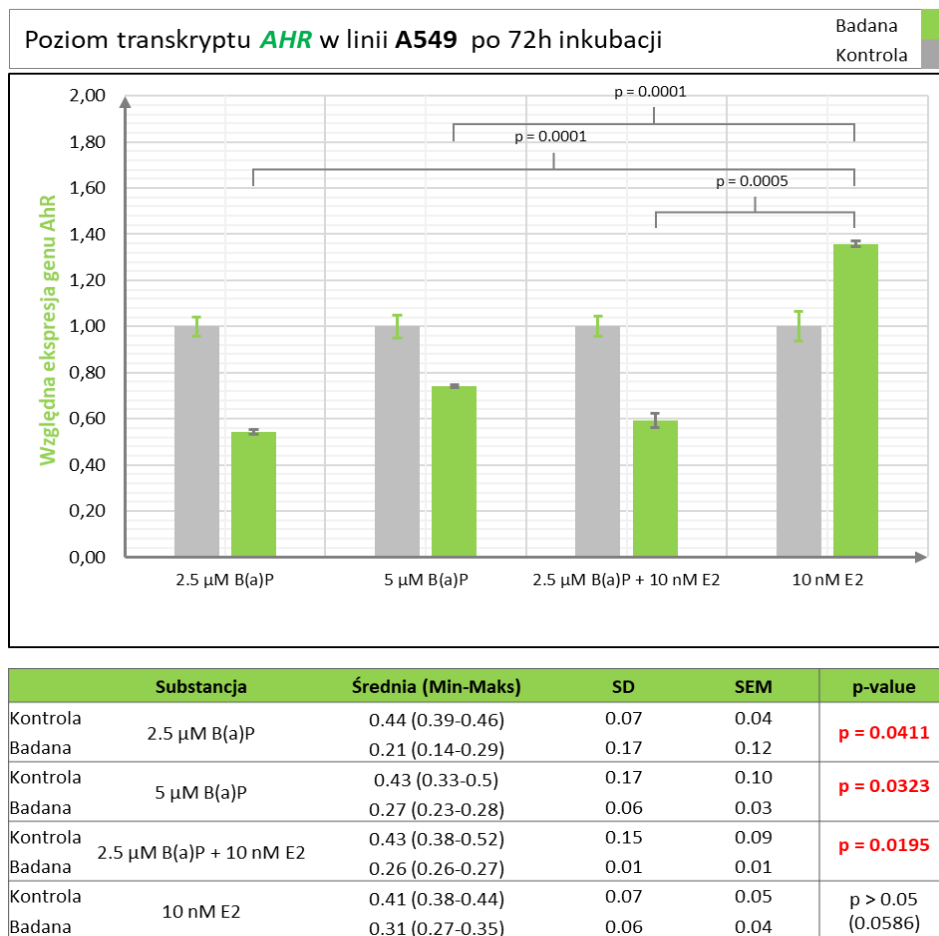
Ryc. 35 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej Calu-1 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji



**Ryc. 36 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej A549 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.**



**Ryc. 37** Poziom transkryptu **AHR** w linii komórkowej **A549** po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

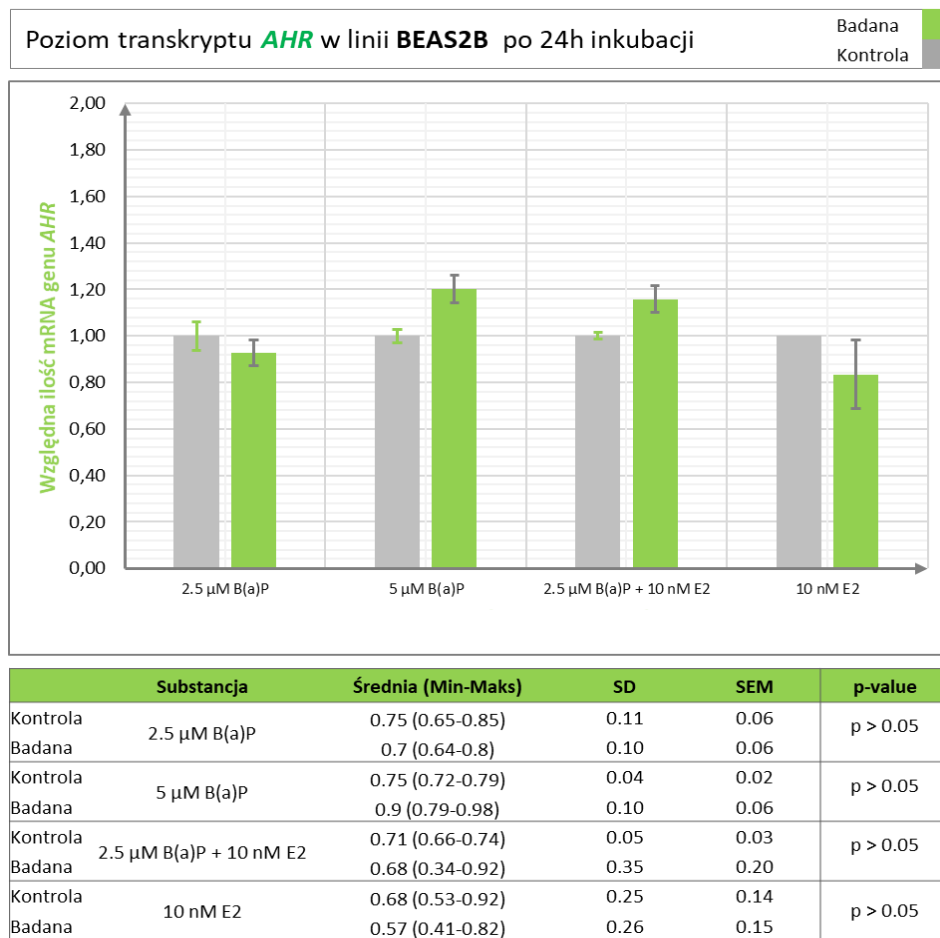


**Ryc. 38** Poziom transkryptu **AHR** w linii komórkowej **A549** po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

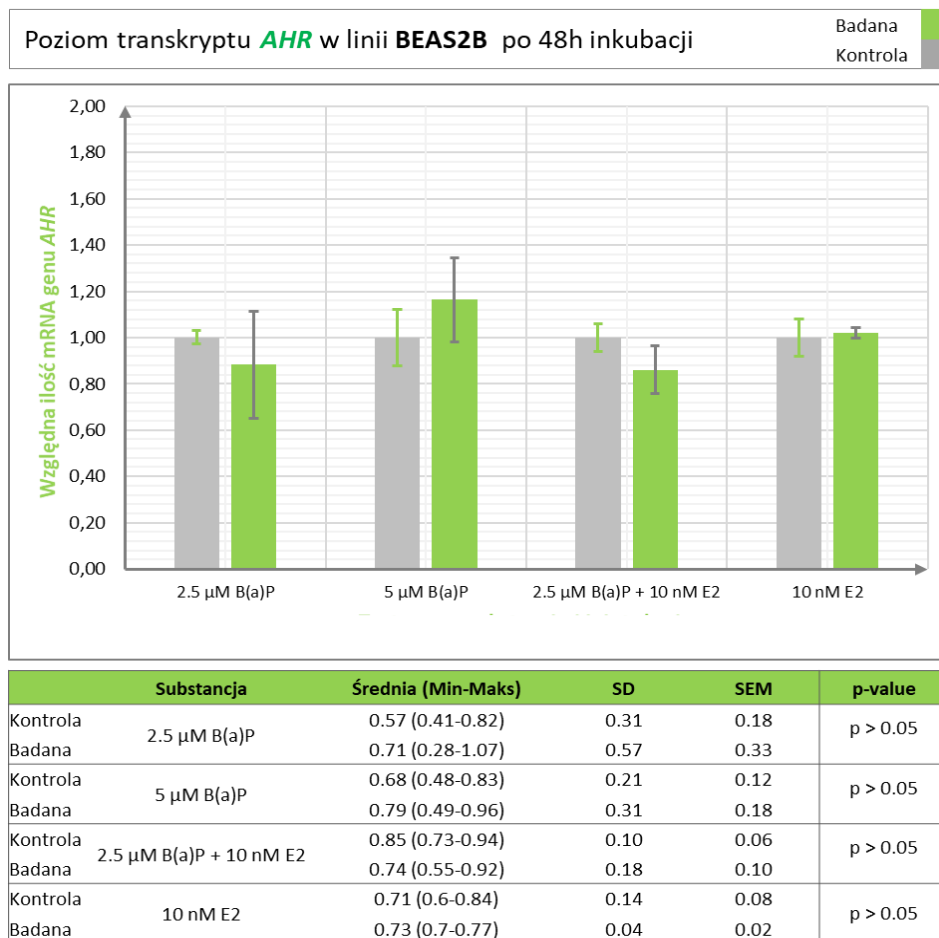


Ryc. 39 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej **A549** w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji

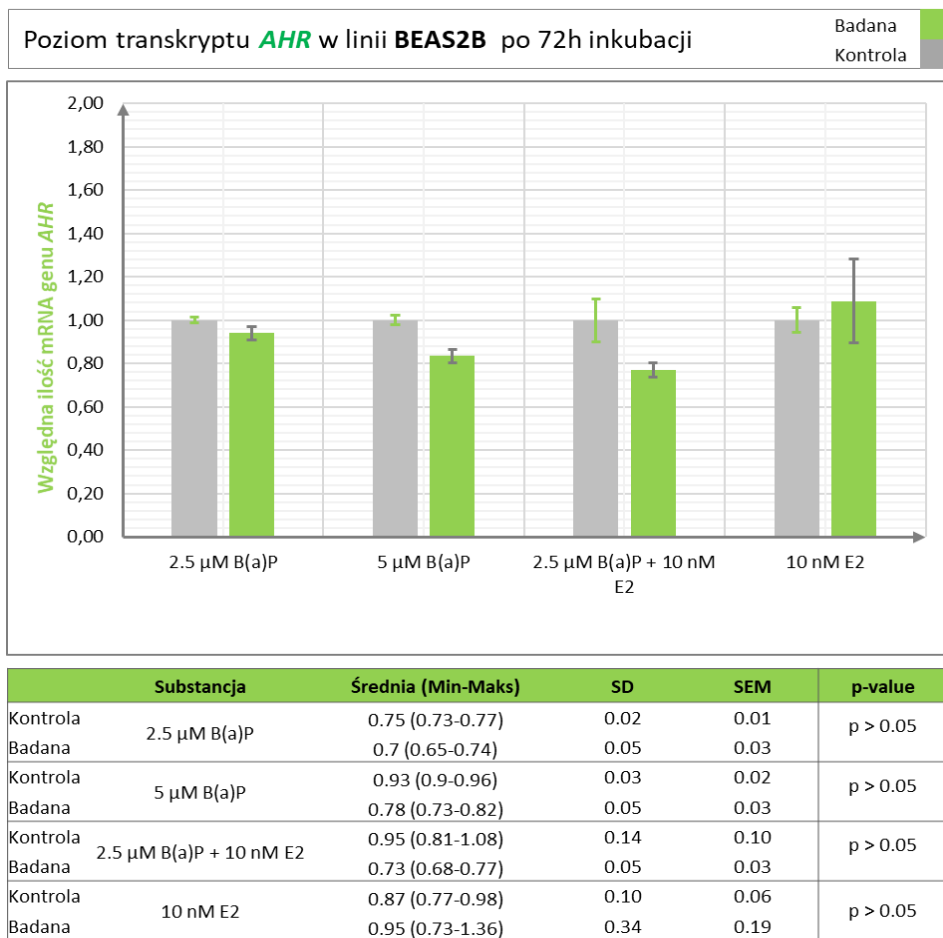




**Ryc. 40** Poziom transkryptu **AHR** w linii komórkowej **Beas-2b** po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



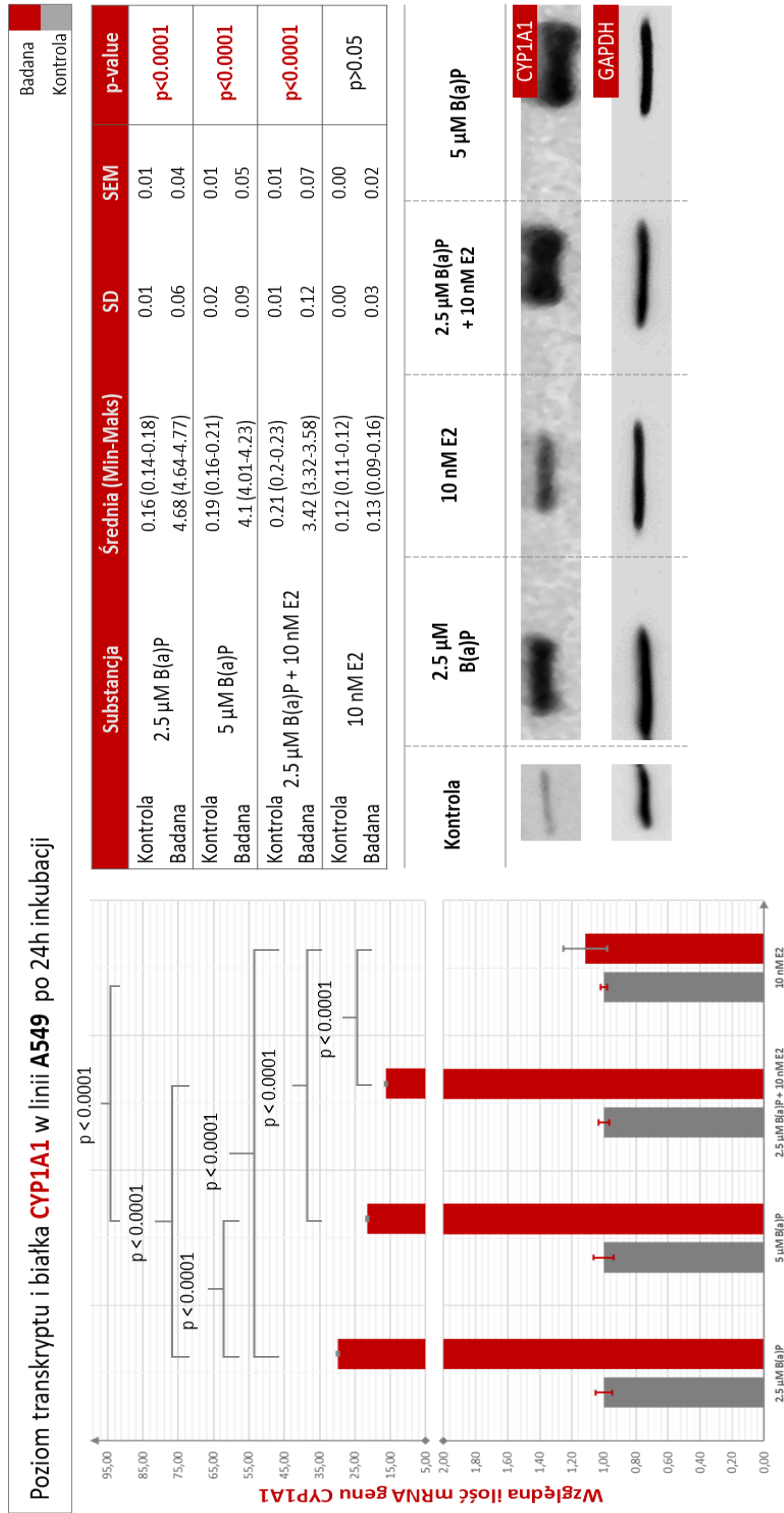
Ryc. 41 Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej Beas-2b po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



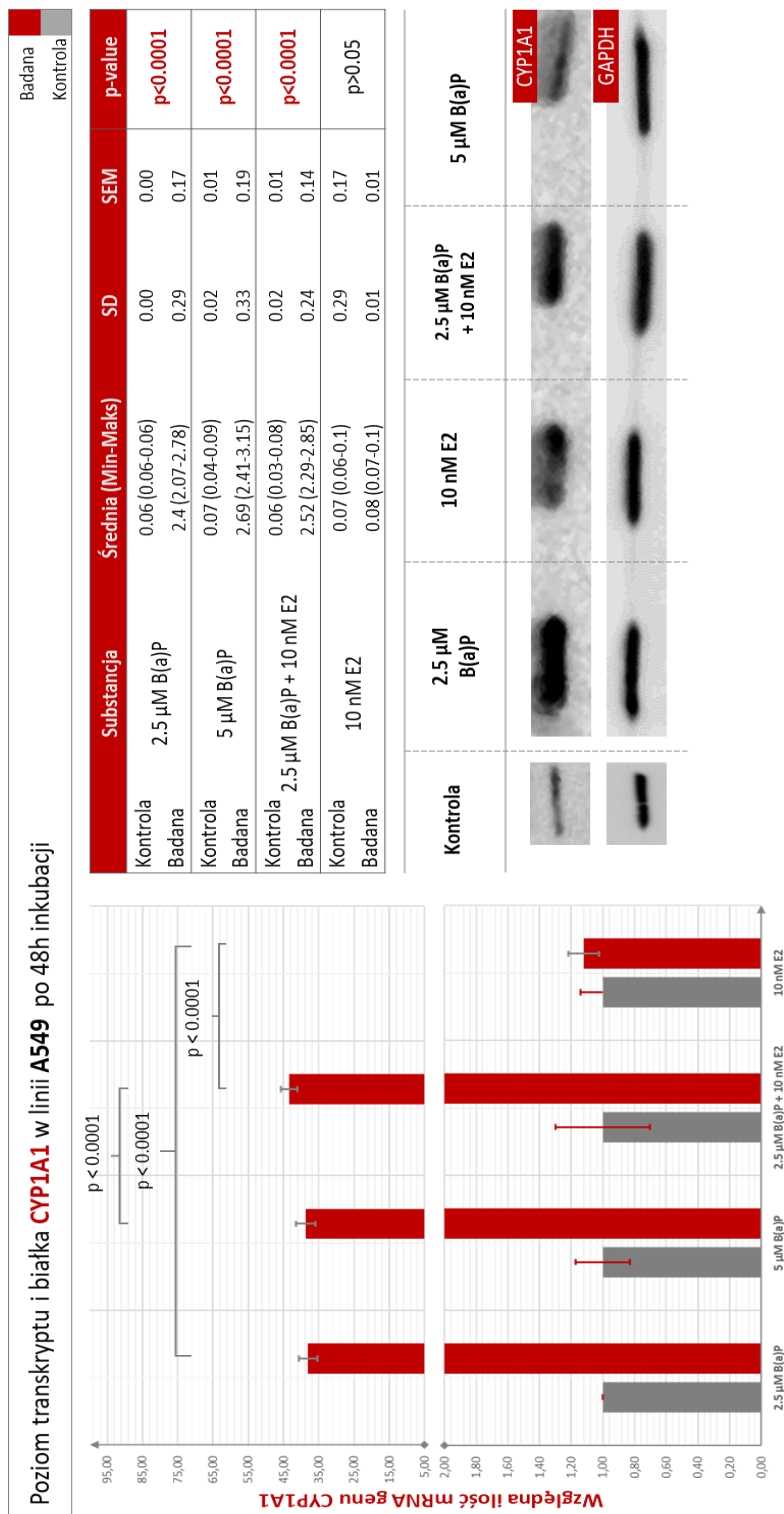
**Ryc. 42** Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej Beas-2b po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



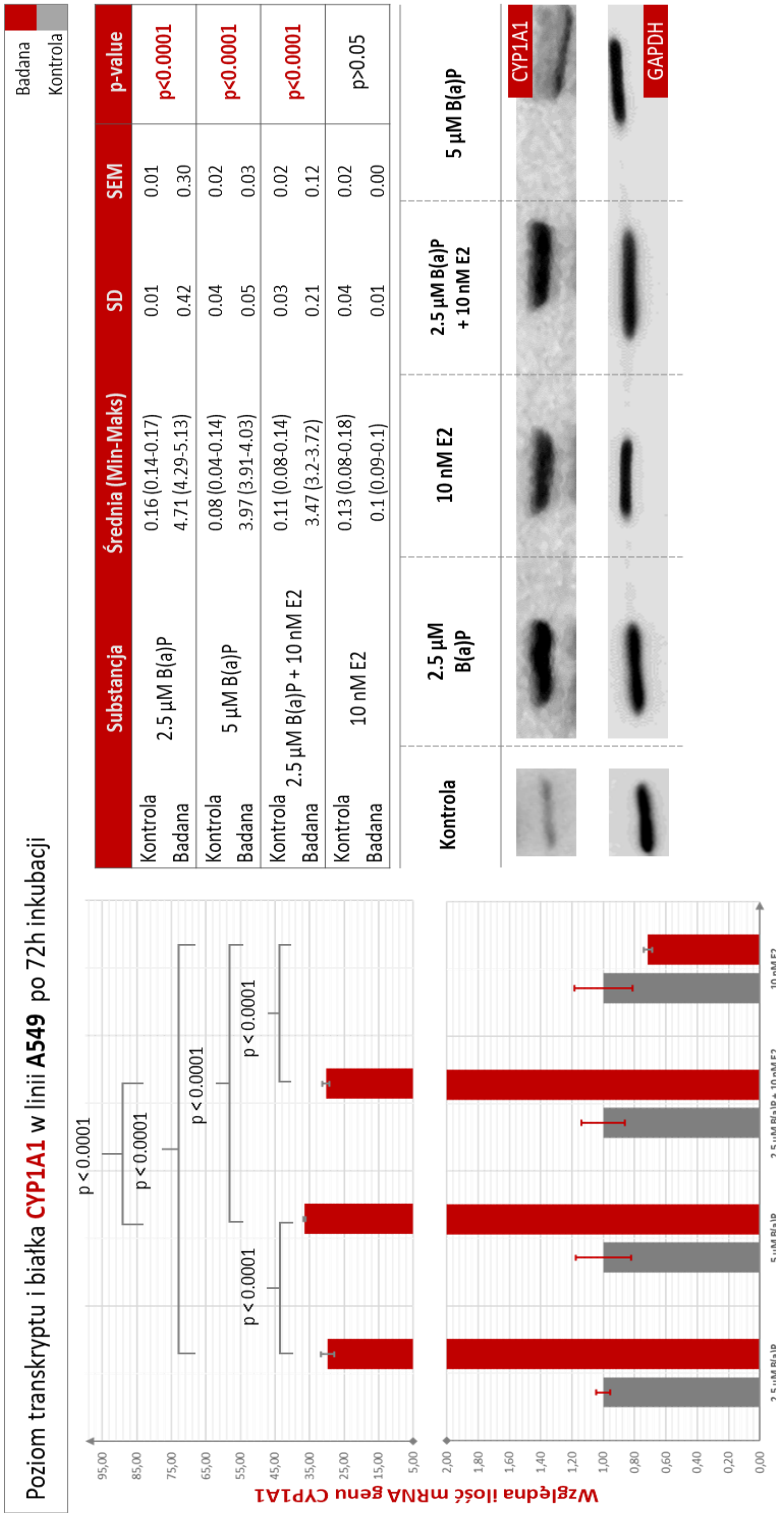
**Ryc. 43** Poziom transkryptu *AHR* w linii komórkowej Beas-2b w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji



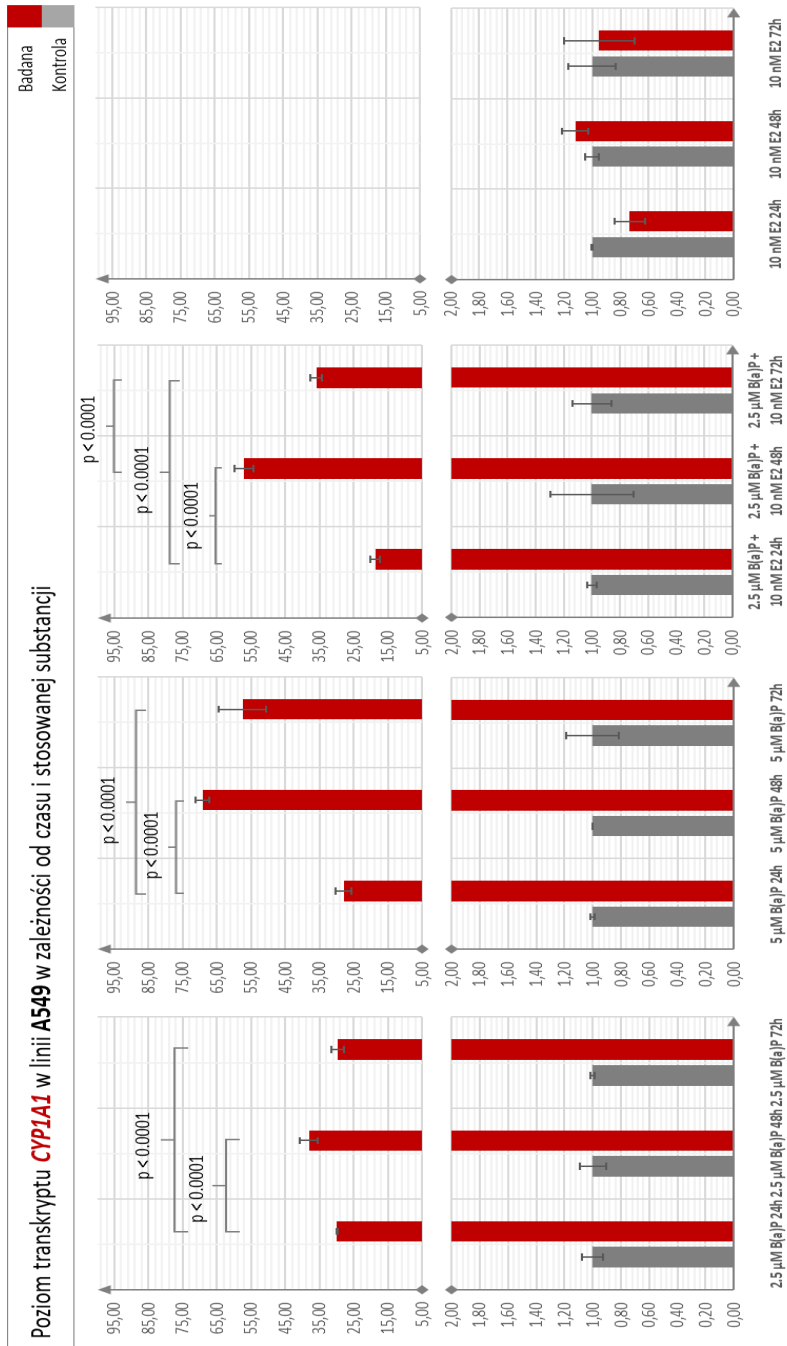
**Ryc. 44** Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej A549 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



**Ryc. 45** Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej A549 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

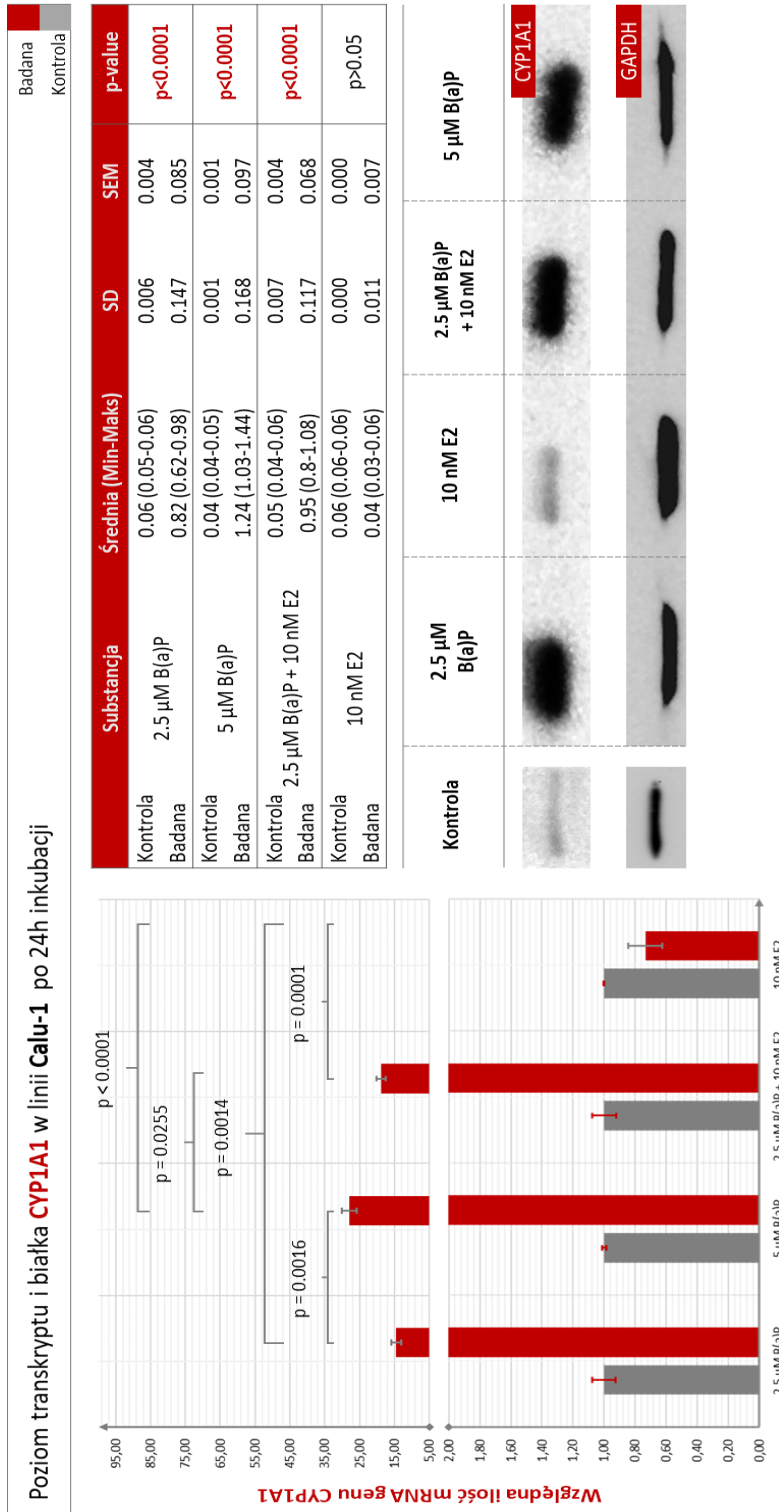


**Ryc. 46** Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej A549 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

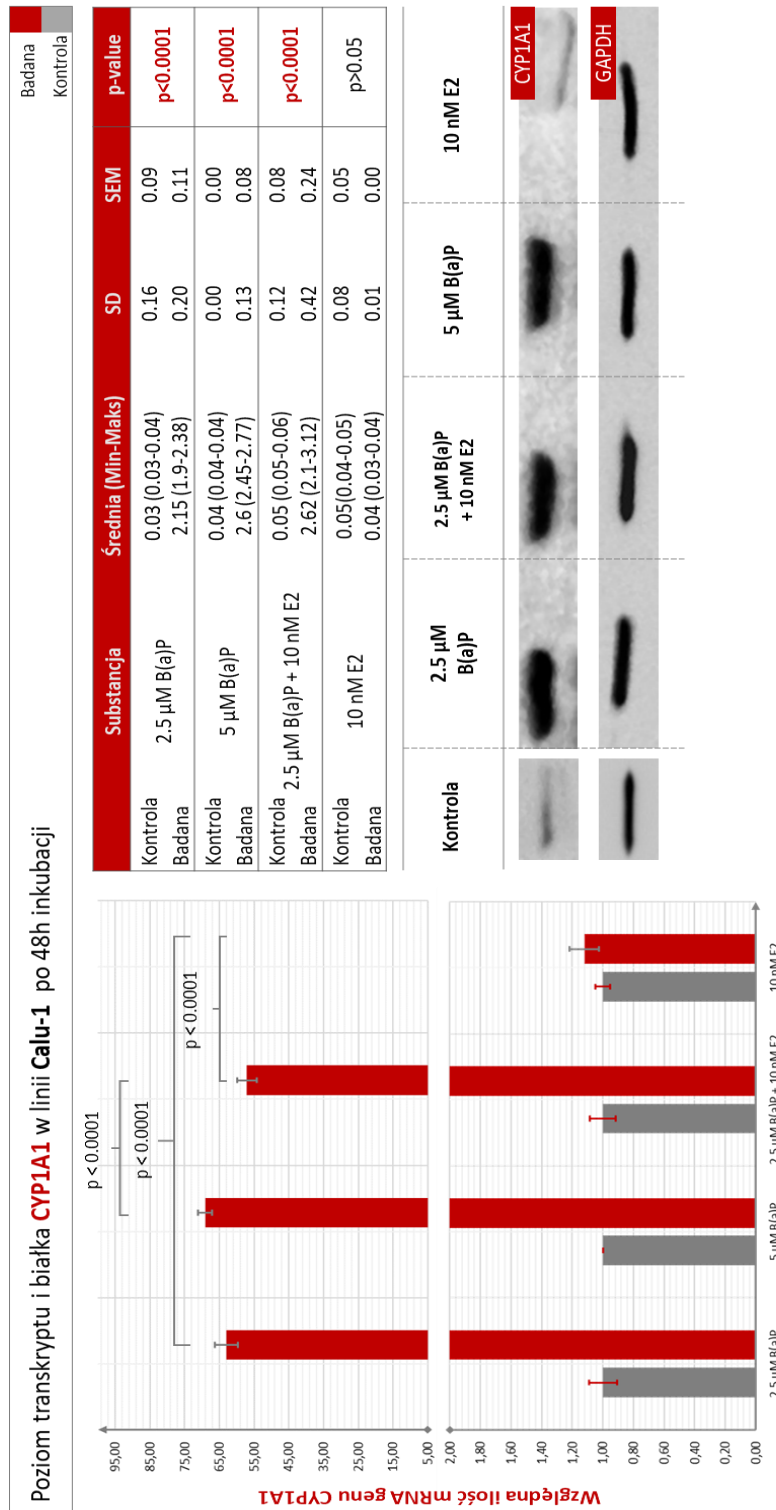


**Ryc. 47 Poziom transkryptu *CYP1A1* w linii komórkowej A549 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji**

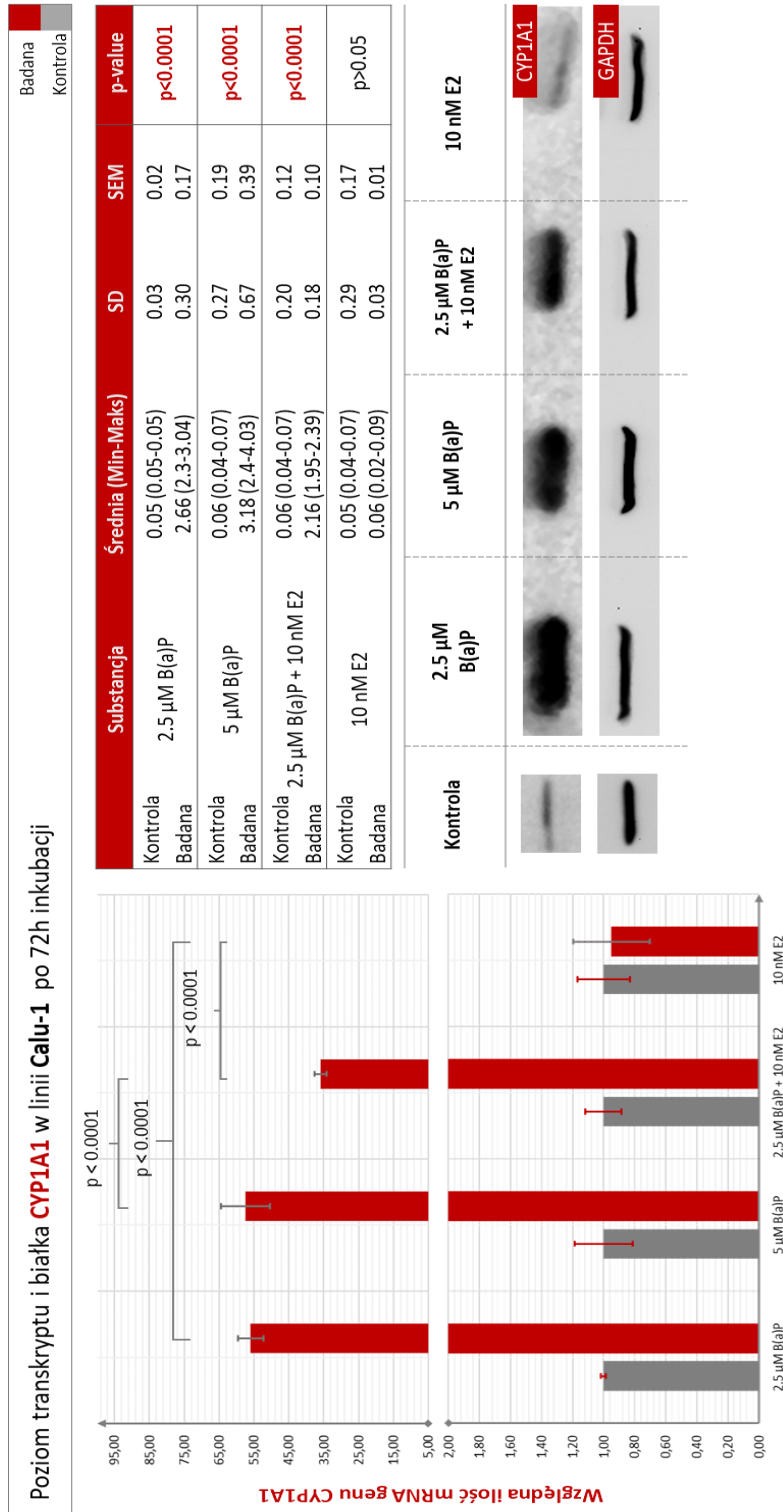




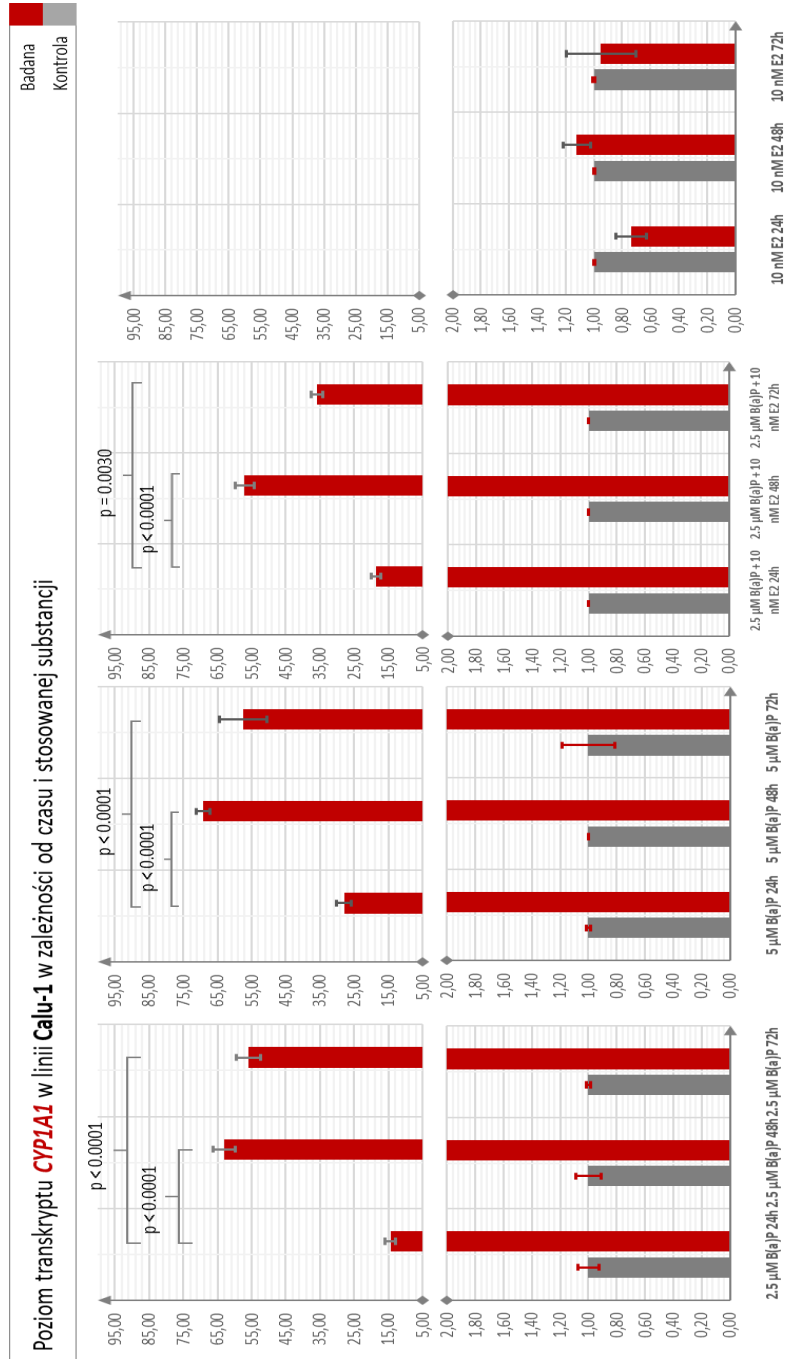
**Ryc. 48 Poziom transkrypcji i białka CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.**



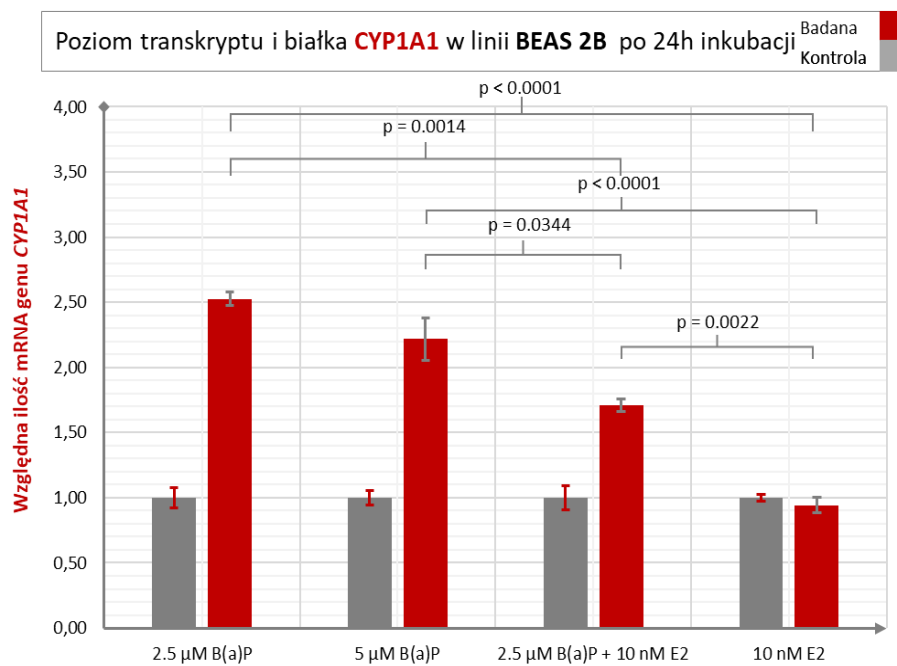
**Ryc. 49** Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



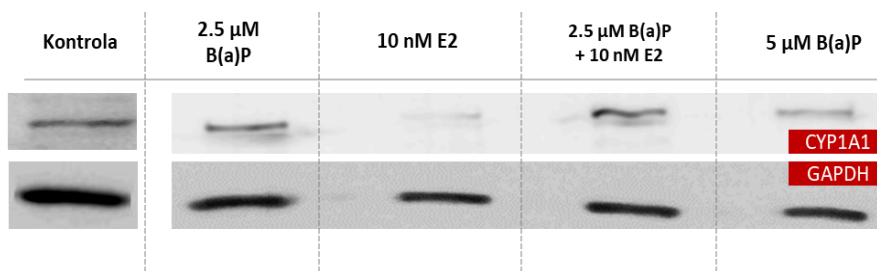
**Ryc. 50** Poziom transkryptu i białka CYP1A1 w linii komórkowej Calu-1 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



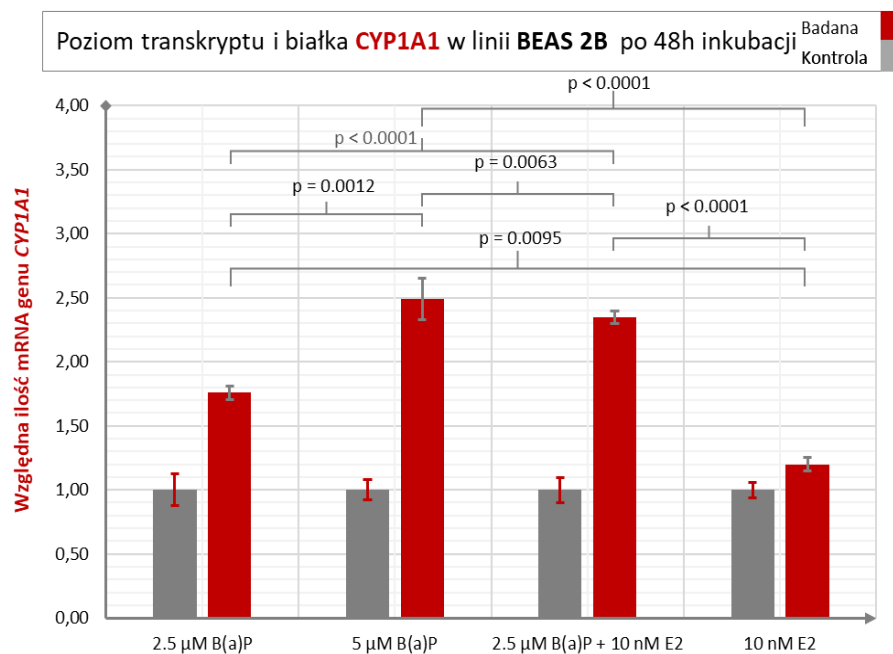
**Ryc. 51 Poziom transkryptu *CYP1A1* w linii komórkowej *Calu-1* w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji**



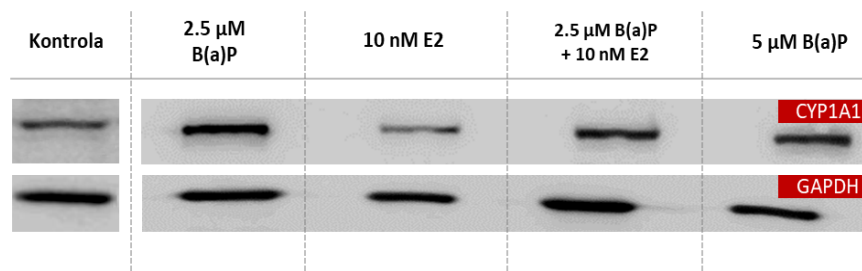
	Substancja	Średnia (Min-Maks)	SD	SEM	p-value
Kontrola	2.5 $\mu$ M B(a)P	0.48 (0.43-0.54)	0.05	0.04	<b>p&lt;0.0001</b>
Badana	2.5 $\mu$ M B(a)P	1.22 (1.16-1.27)	0.04	0.03	
Kontrola	5 $\mu$ M B(a)P	0.55 (0.48-0.6)	0.05	0.03	<b>p&lt;0.0001</b>
Badana	5 $\mu$ M B(a)P	1.22 (1.08-1.43)	0.15	0.09	
Kontrola	2.5 $\mu$ M B(a)P + 10 nM E2	0.59 (0.51-0.72)	0.09	0.05	<b>p=0.003</b>
Badana	2.5 $\mu$ M B(a)P + 10 nM E2	1 (0.94-1.05)	0.05	0.03	
Kontrola	10 nM E2	0.61 (0.57-0.63)	0.03	0.02	p>0.05
Badana	10 nM E2	0.57 (0.49-0.63)	0.06	0.03	



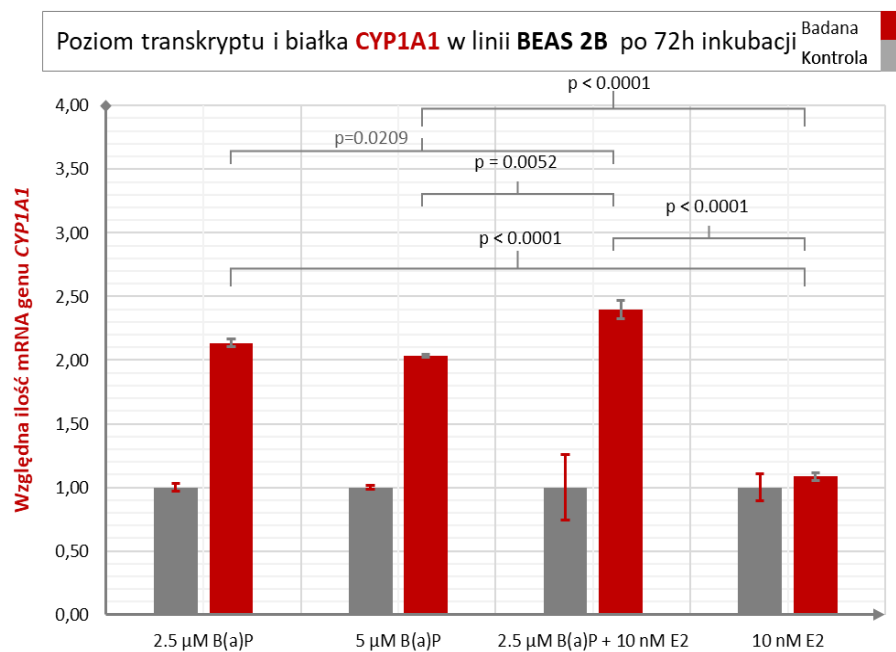
Ryc. 52 Poziom transkryptu i białka **CYP1A1** w linii komórkowej **Beas-2b** po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



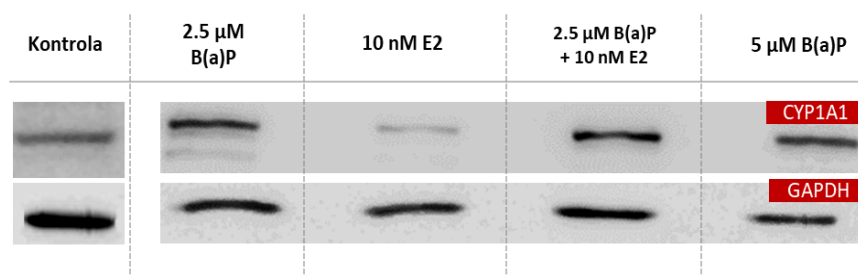
	Substancja	Średnia (Min-Maks)	SD	SEM	p-value
Kontrola	2.5 μM B(a)P	0.51 (0.47-0.53)	0.03	0.02	<b>P=0.0002</b>
Badana	2.5 μM B(a)P	1.09 (1.05-1.12)	0.03	0.02	
Kontrola	5 μM B(a)P	0.48 (0.47-0.49)	0.01	0.01	<b>p&lt;0.0001</b>
Badana	5 μM B(a)P	0.97 (0.96-0.98)	0.01	0.01	
Kontrola	2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	0.43 (0.28-0.59)	0.16	0.11	<b>p=0.003</b>
Badana	2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	1.04 (1-1.08)	0.04	0.03	
Kontrola	10 nM E2	0.55 (0.42-0.67)	0.10	0.06	p>0.05
Badana	10 nM E2	0.6 (0.56-0.63)	0.03	0.02	



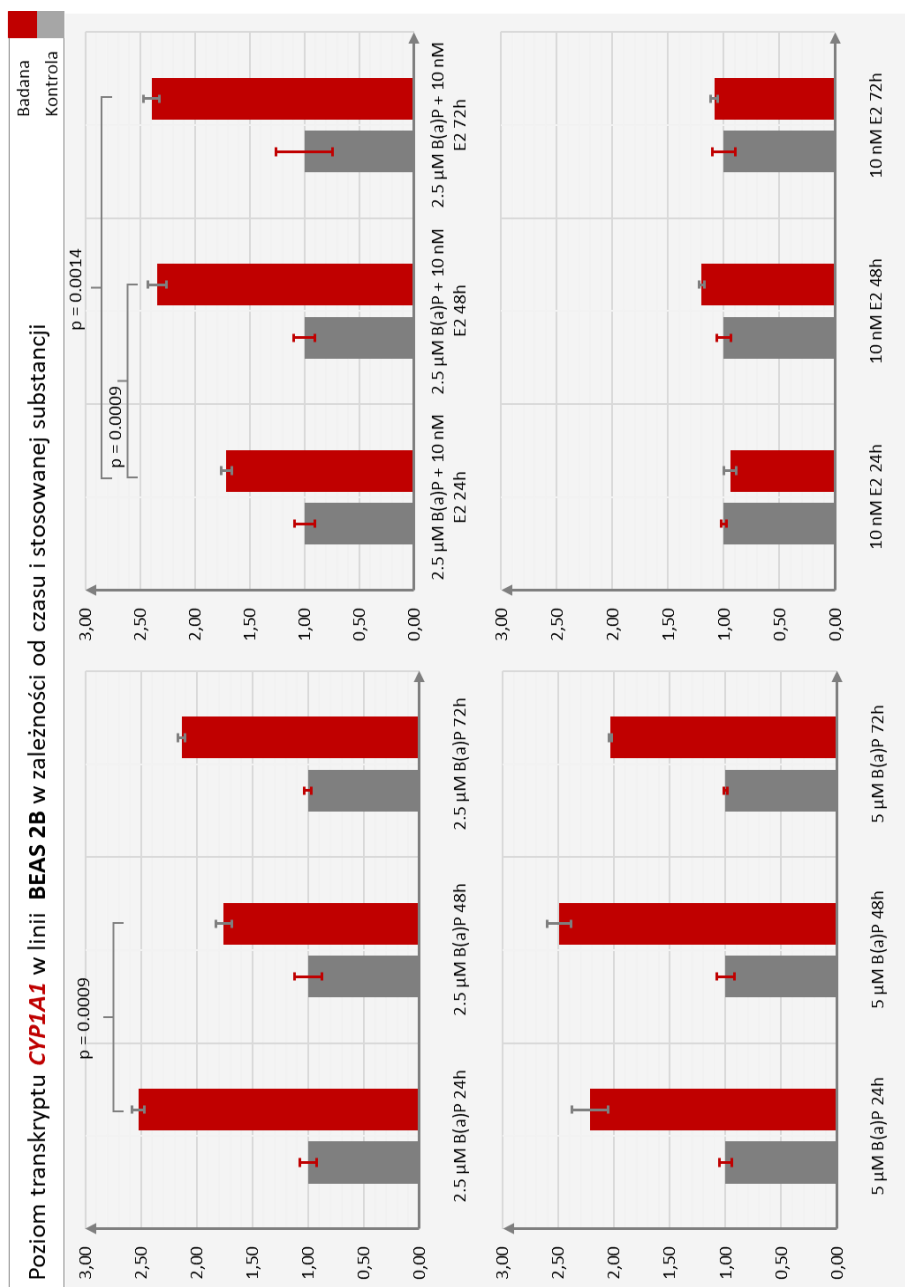
Ryc. 53 Poziom transkryptu i białka **CYP1A1** w linii komórkowej **Beas-2b** po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



	Substancja	Średnia (Min-Maks)	SD	SEM	p-value
Kontrola	2.5 μM B(a)P	0.59 (0.49-0.77)	0.13	0.07	<b>p&lt;0.0001</b>
Badana		1.05 (0.97-1.15)	0.07	0.04	
Kontrola	5 μM B(a)P	0.51 (0.42-0.59)	0.07	0.04	<b>P=0.0004</b>
Badana		1.28 (1.15-1.37)	0.09	0.05	
Kontrola	2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	0.57 (0.49-0.71)	0.10	0.06	<b>p&lt;0.0001</b>
Badana		1.34 (1.22-1.4)	0.08	0.05	
Kontrola	10 nM E2	0.49 (0.44-0.56)	0.05	0.03	p>0.05
Badana		0.59 (0.57-0.62)	0.02	0.01	

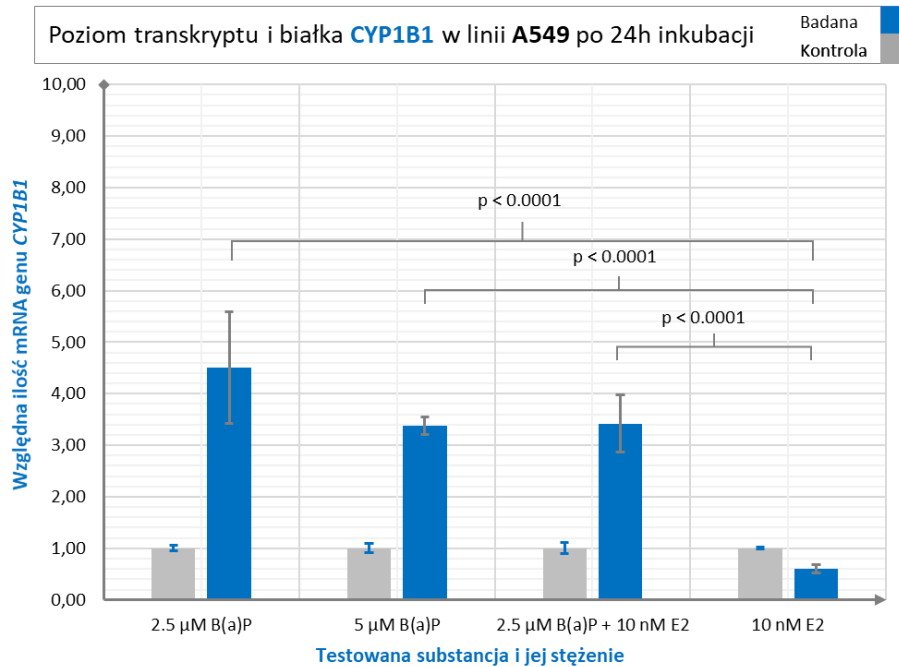


Ryc. 54 Poziom transkryptu i białka **CYP1A1** w linii komórkowej **Beas-2b** po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

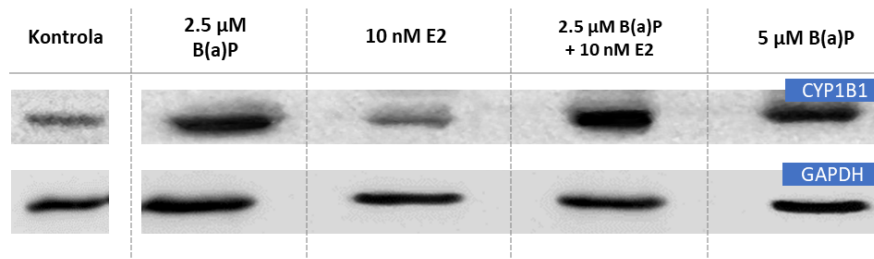


**Ryc. 55** Poziom transkryptu **CYP1A1** w linii komórkowej **Beas-2b** w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji

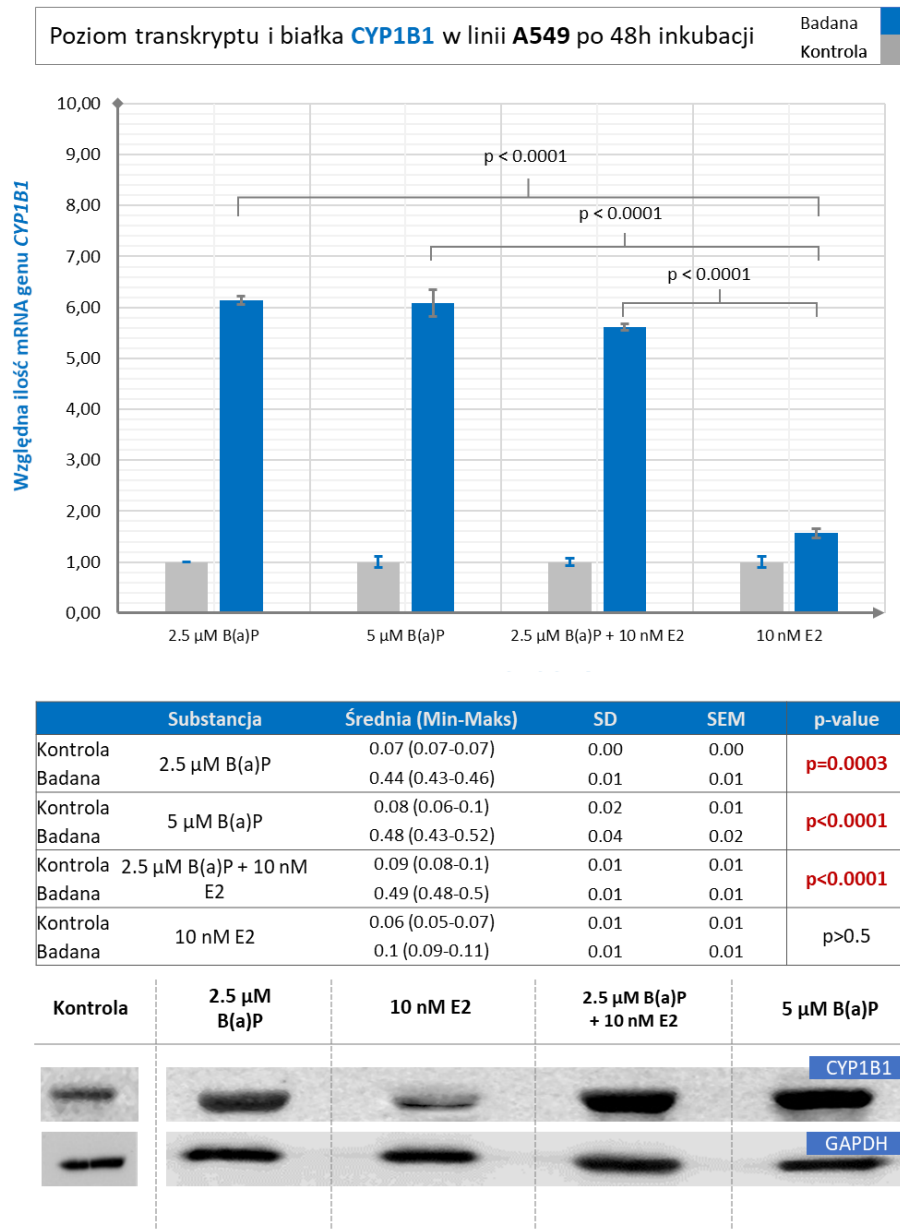




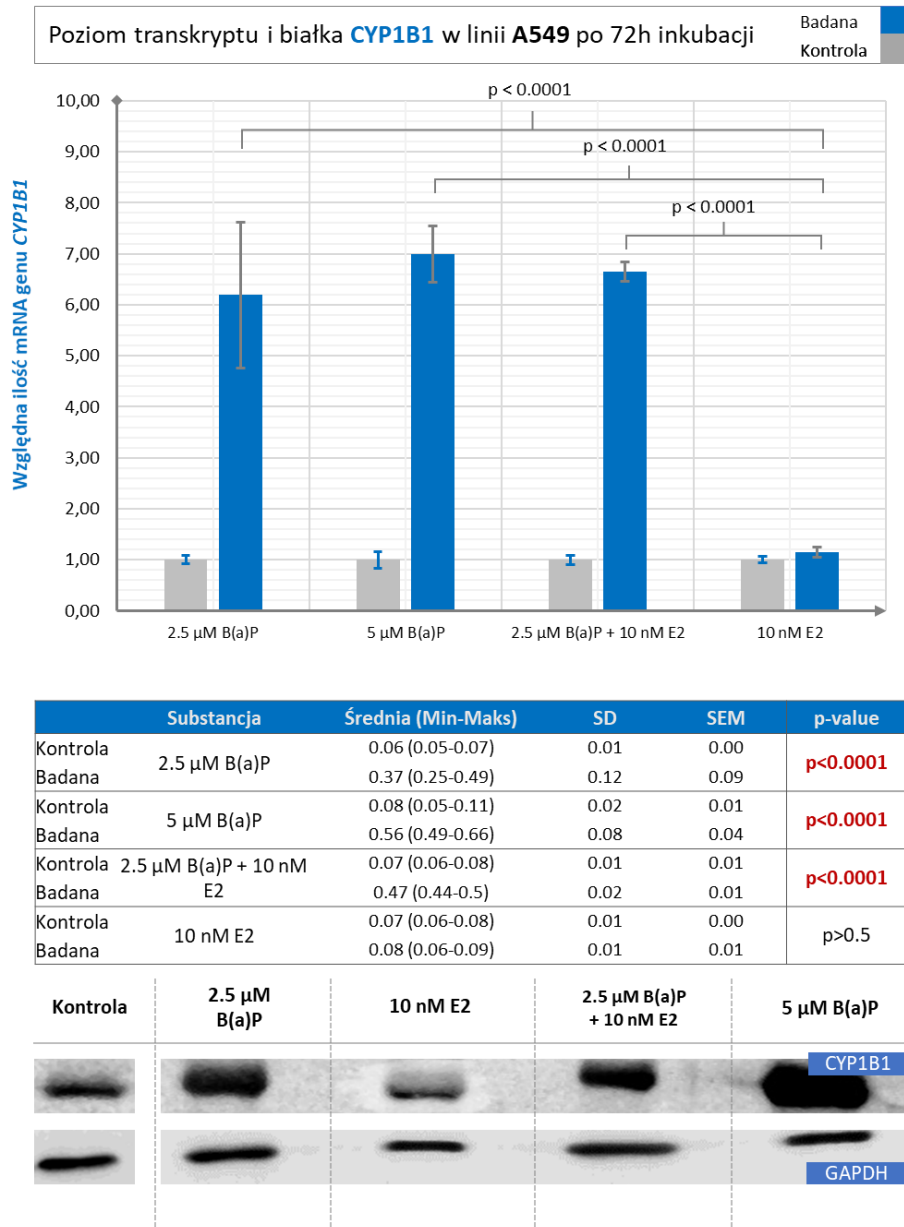
Substancja	SEM	p-value
Kontrola 2.5 μM B(a)P	0.06 (0.05-0.06)	0.01
Badana 2.5 μM B(a)P	0.26 (0.12-0.39)	0.11
Kontrola 5 μM B(a)P	0.08 (0.07-0.1)	0.01
Badana 5 μM B(a)P	0.28 (0.26-0.32)	0.02
Kontrola 2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	0.1 (0.08-0.12)	0.02
Badana 2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	0.33 (0.2-0.42)	0.09
Kontrola 10 nM E2	0.1 (0.09-0.1)	0.00
Badana 10 nM E2	0.06 (0.04-0.07)	0.01



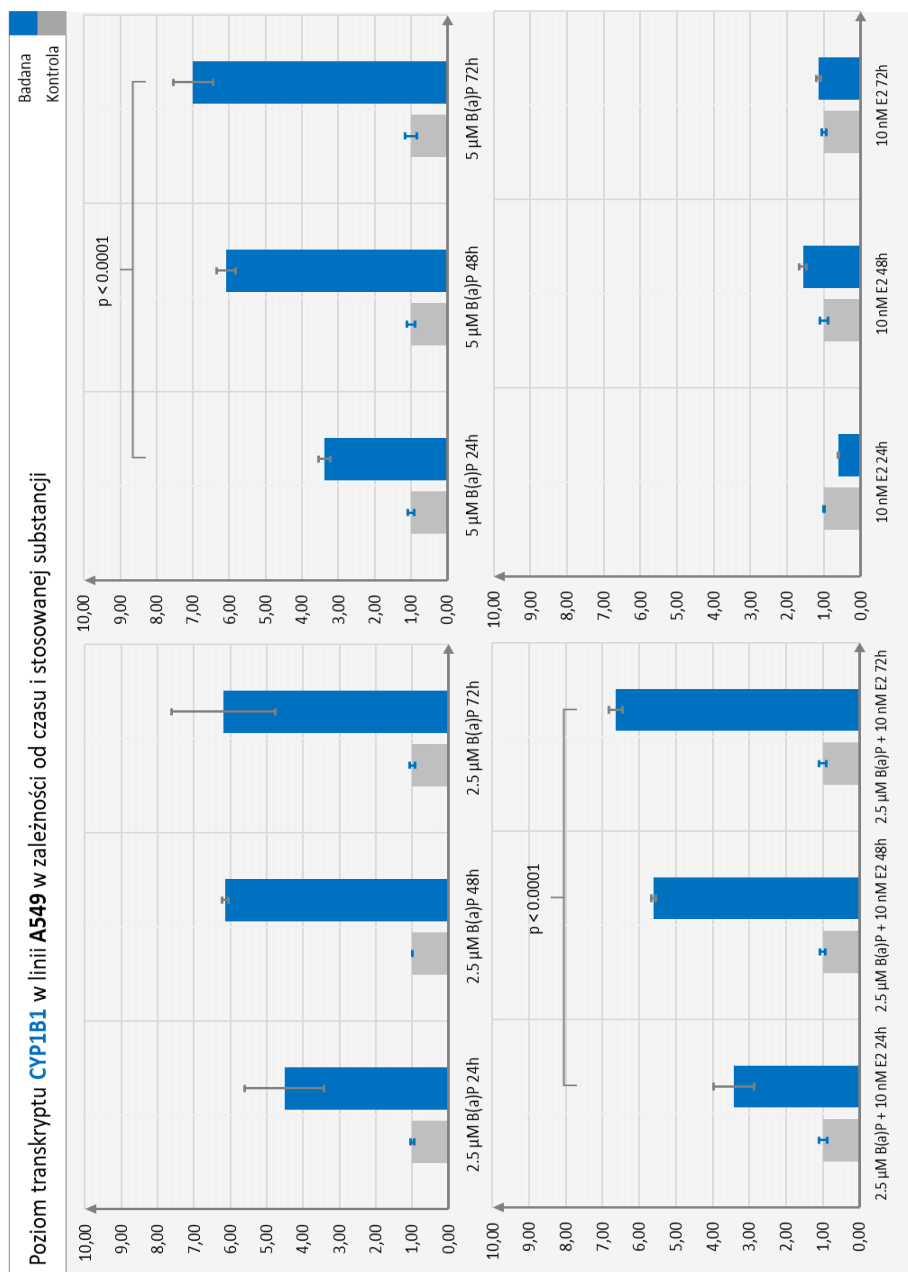
Ryc. 56 Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej A549 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



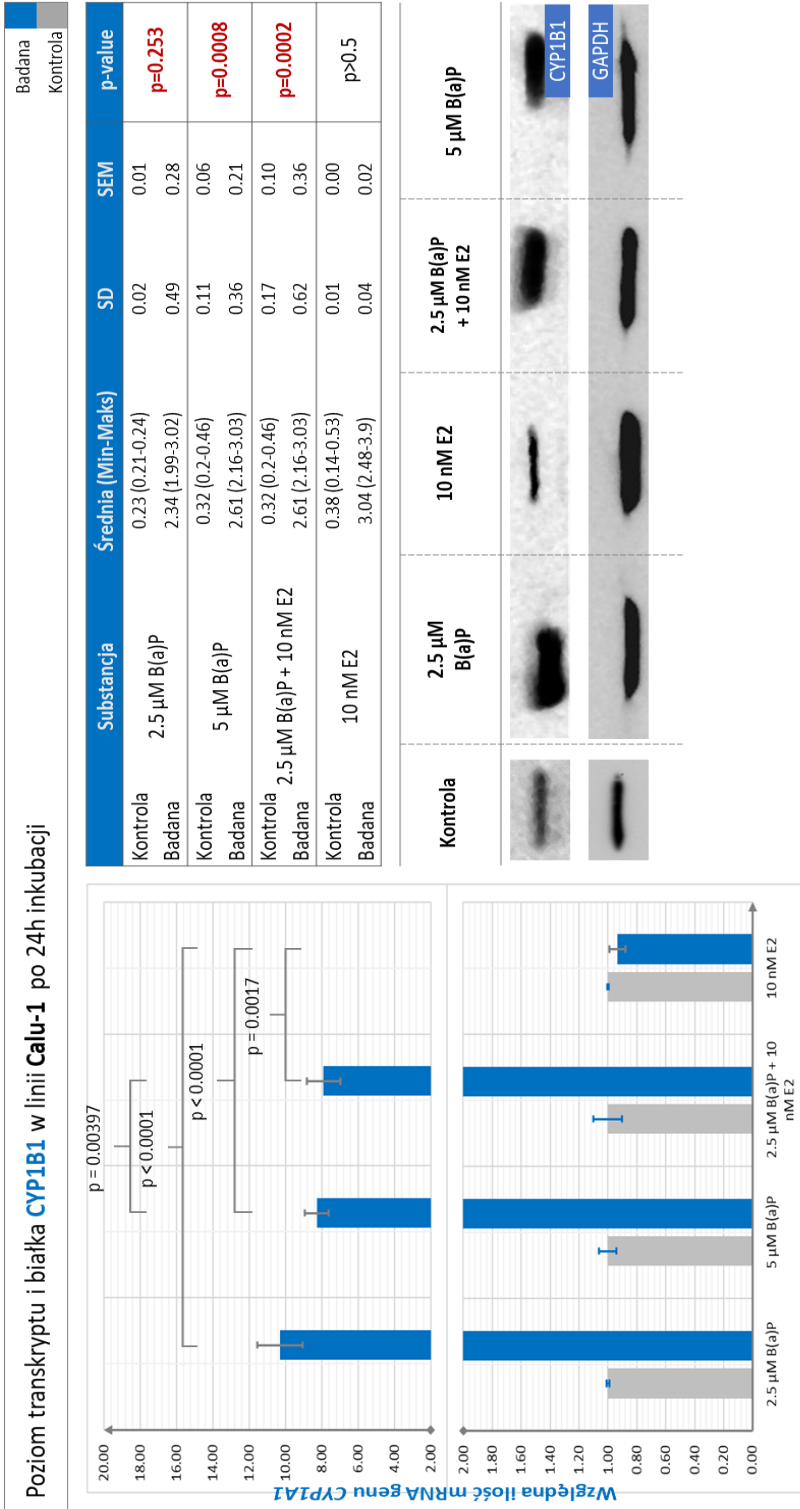
Ryc. 57 Poziom transkryptu i białka **CYP1B1** w linii komórkowej A549 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



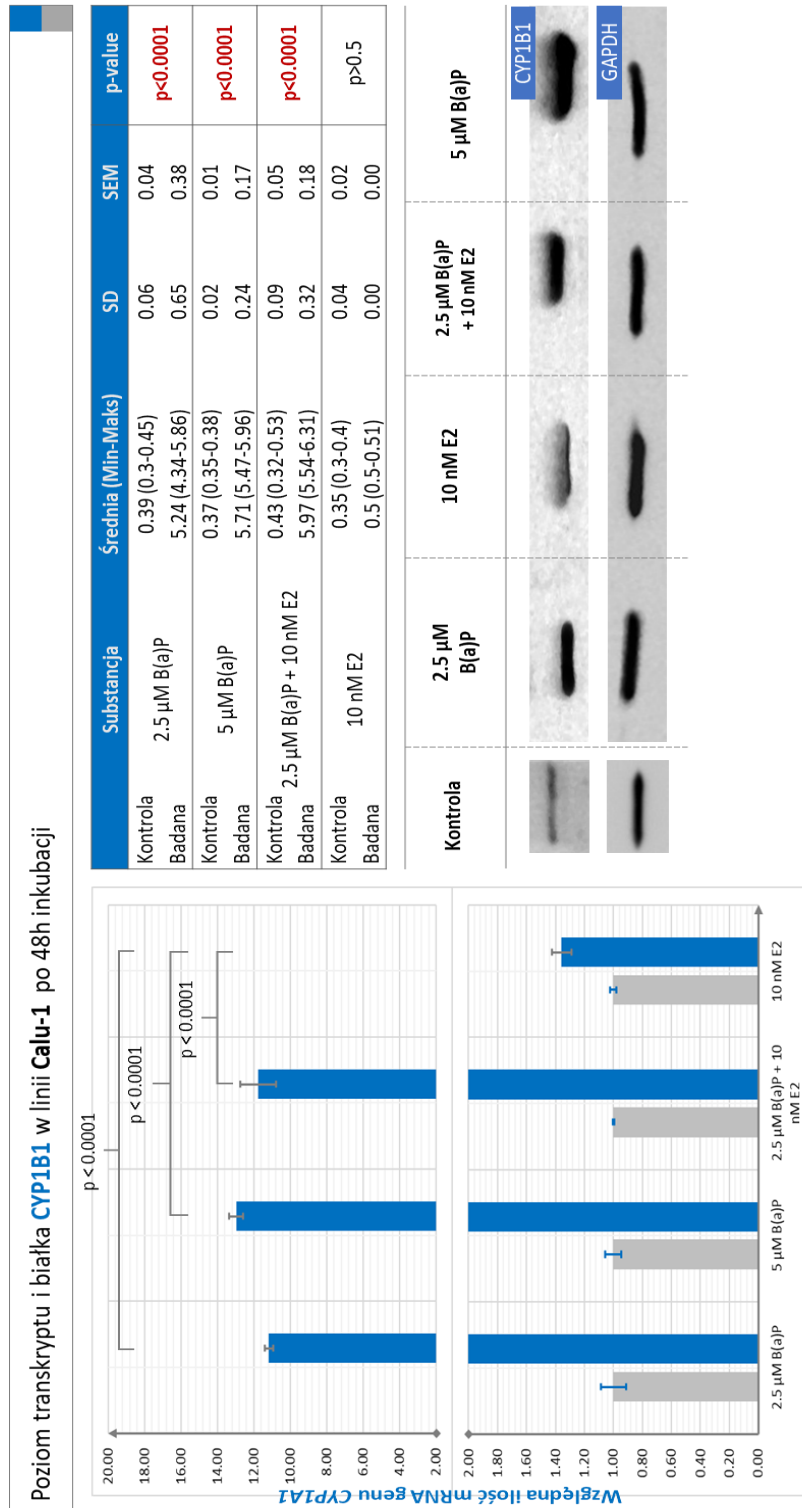
Ryc. 58 Poziom transkryptu i białka **CYP1B1** w linii komórkowej **A549** po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



Ryc. 59 Poziom transkryptu i *CYP1B1* w linii komórkowej A549 w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji

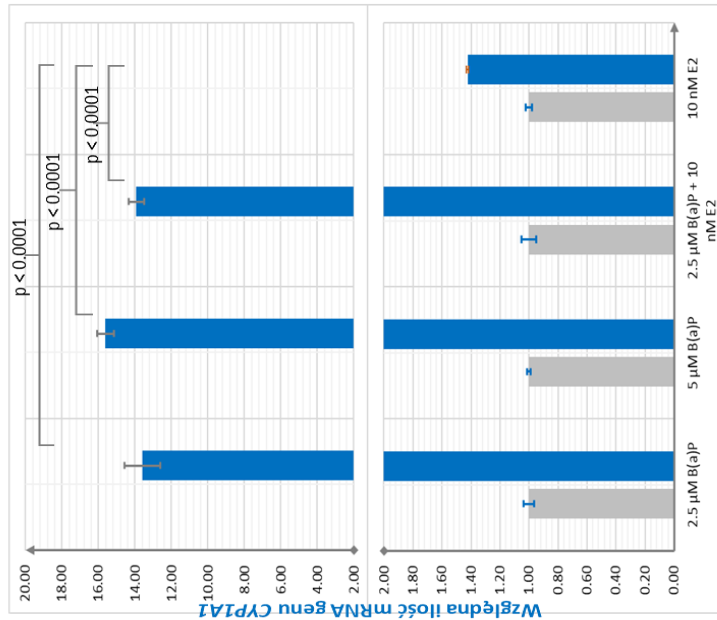


**Ryc. 60** Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

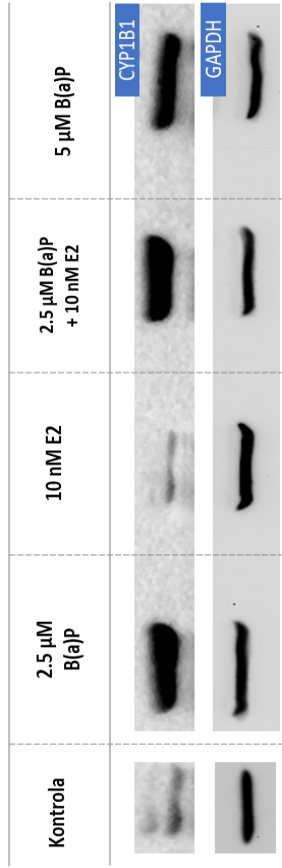


Ryc. 61 Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

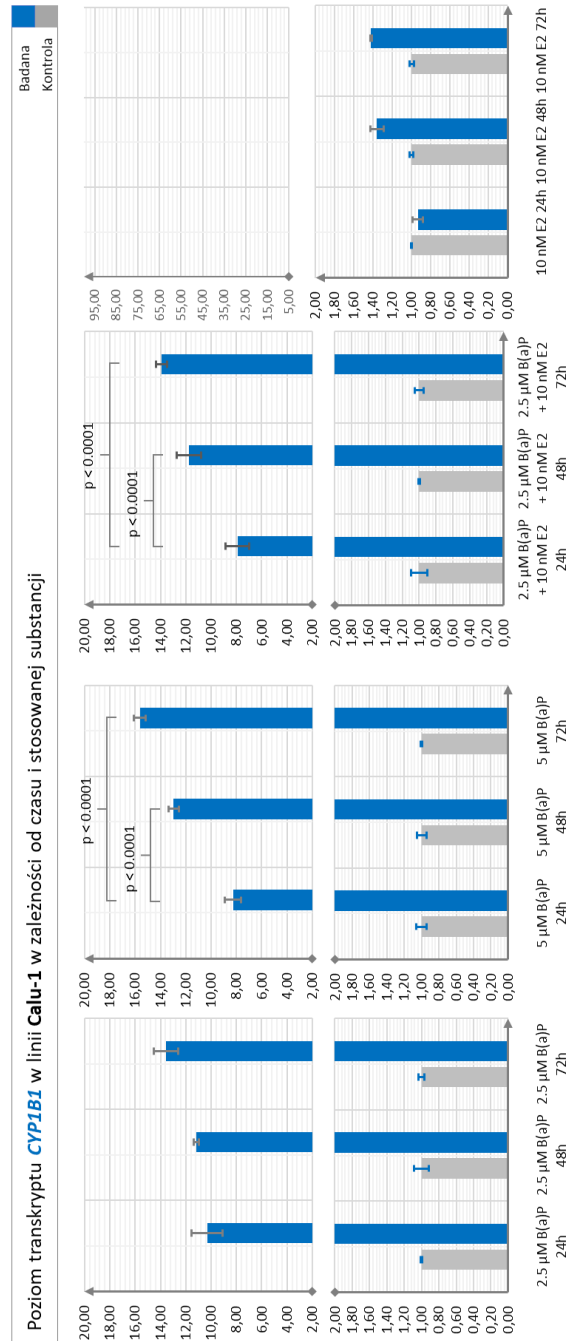
Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii Calu-1 po 72h inkubacji



Substancja	Średnia (Min-Maks)	SD	SEM	p-value
Kontrola	0.39 (0.3-0.45)	0.06	0.04	
Badana	5.24 (4.34-5.86)	0.65	0.38	<b>p&lt;0.0001</b>
Kontrola	0.37 (0.35-0.38)	0.02	0.01	
Badana	5.71 (5.47-5.96)	0.24	0.17	<b>p&lt;0.0001</b>
Kontrola	0.43 (0.32-0.53)	0.09	0.05	
Badana	5.97 (5.54-6.31)	0.32	0.18	<b>p&lt;0.0001</b>
Kontrola	0.35 (0.3-0.4)	0.04	0.02	
Badana	0.5 (0.5-0.51)	0.00	0.00	p>0.5

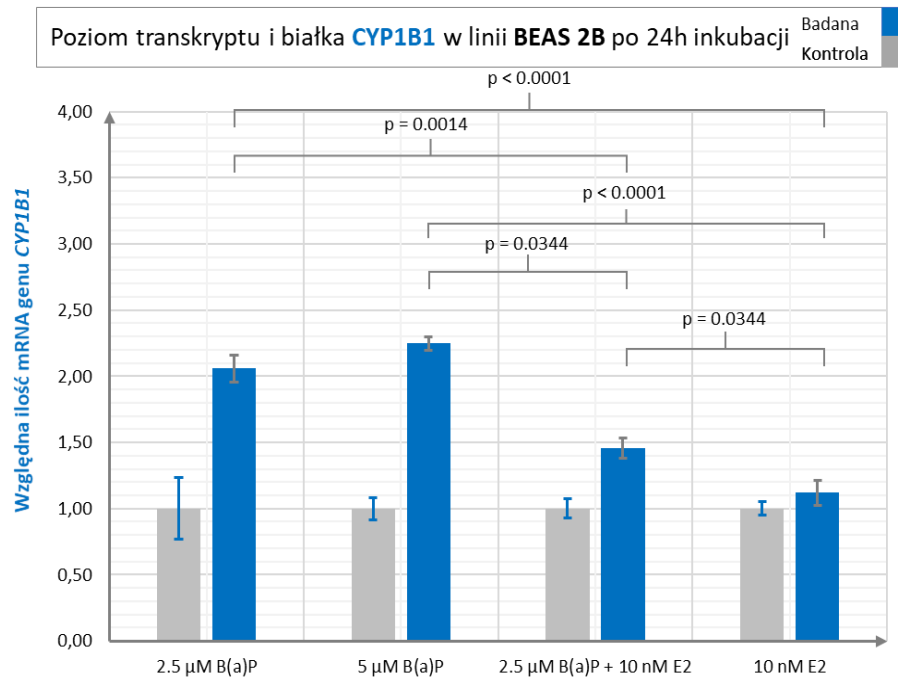


Ryc. 62 Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Calu-1 po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.

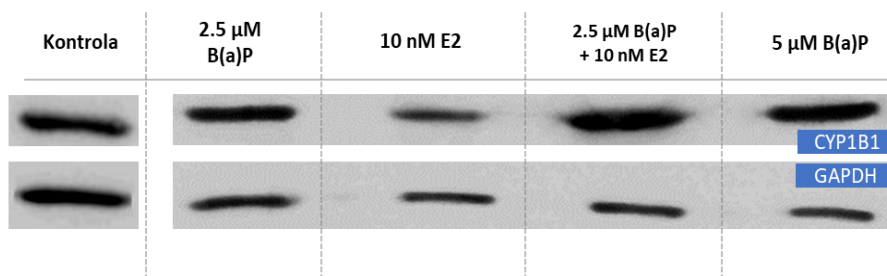


**Ryc. 63** Poziom transkryptu *CYP1B1* w linii komórkowej *Calu-1* w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji

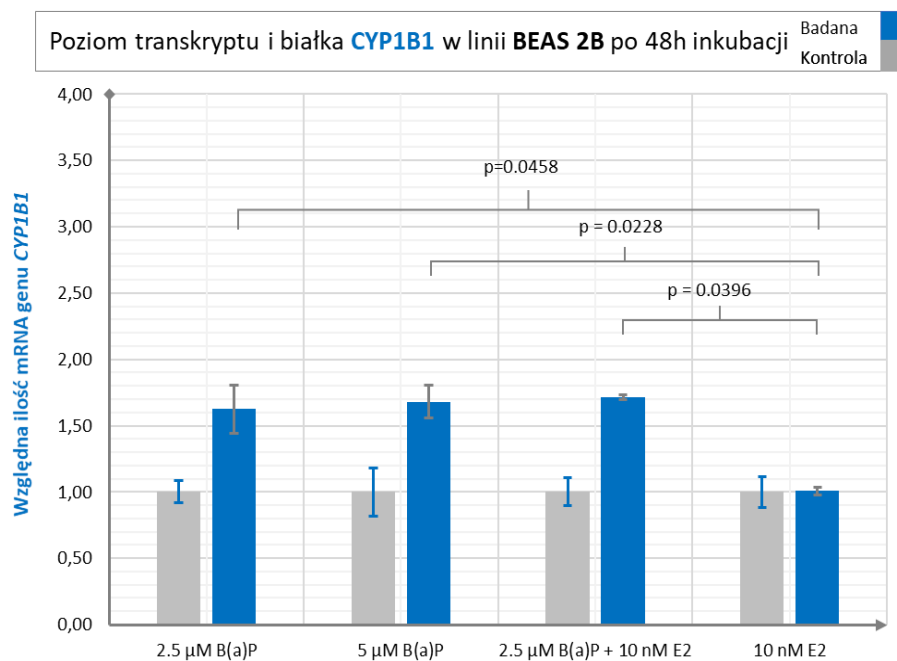




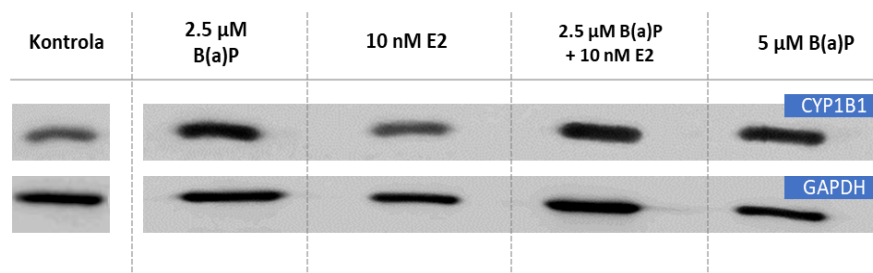
	Substancja	Średnia (Min-Maks)	SD	SEM	p-value
Kontrola	2.5 $\mu\text{M}$ B(a)P	0.67 (0.45-0.89)	0.22	0.16	<b>p=0.0003</b>
Badana	2.5 $\mu\text{M}$ B(a)P	1.39 (1.27-1.55)	0.12	0.07	
Kontrola	5 $\mu\text{M}$ B(a)P	0.66 (0.53-0.74)	0.09	0.05	<b>p&lt;0.0001</b>
Badana	5 $\mu\text{M}$ B(a)P	1.48 (1.43-1.56)	0.06	0.03	
Kontrola	2.5 $\mu\text{M}$ B(a)P + 10 nM E2	0.83 (0.7-0.95)	0.10	0.06	<b>p=0.0261</b>
Badana	2.5 $\mu\text{M}$ B(a)P + 10 nM E2	1.21 (1.05-1.3)	0.11	0.07	
Kontrola	10 nM E2	0.89 (0.82-1)	0.08	0.05	p>0.5
Badana	10 nM E2	1 (0.81-1.17)	0.15	0.08	



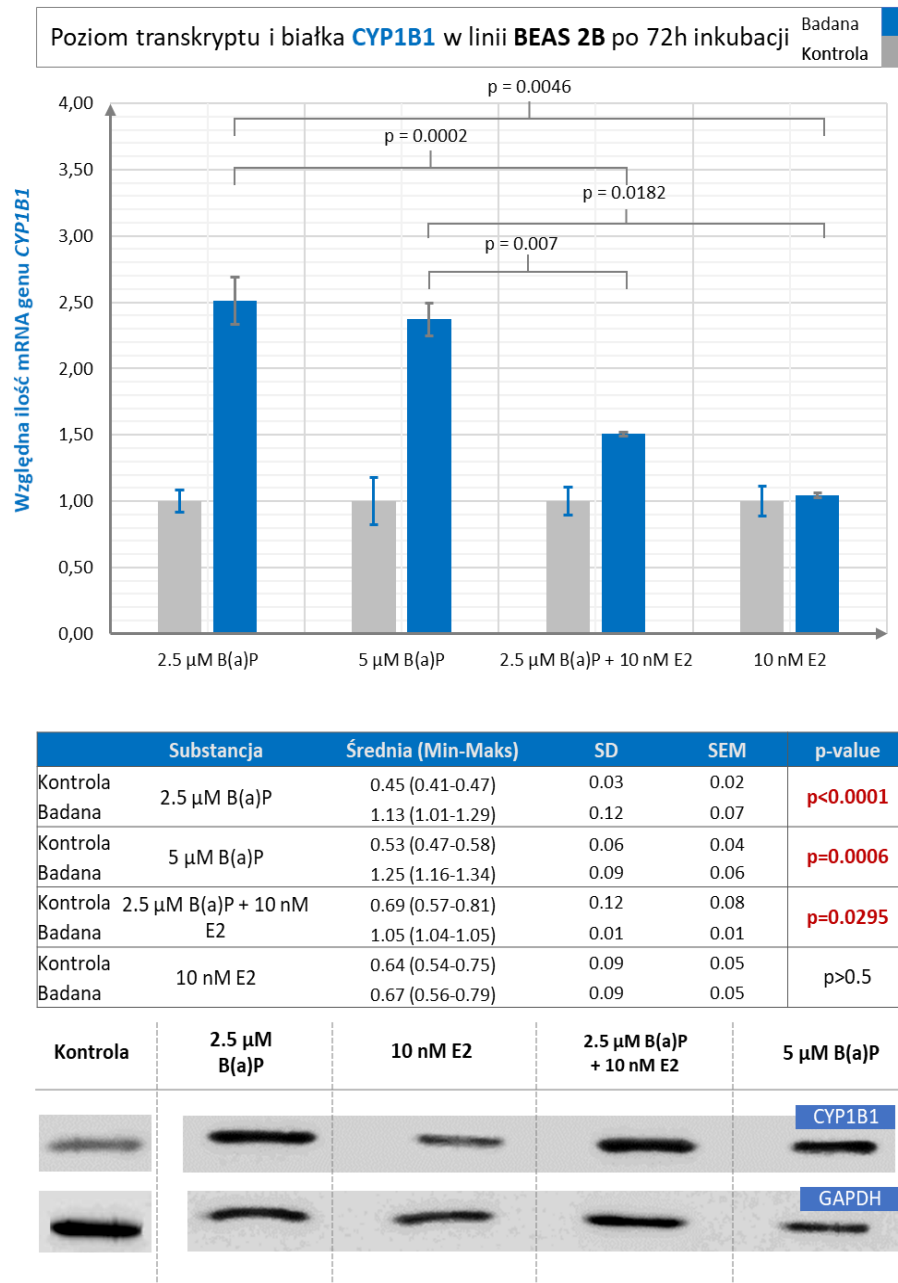
Ryc. 64 Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Beas-2b po 24 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



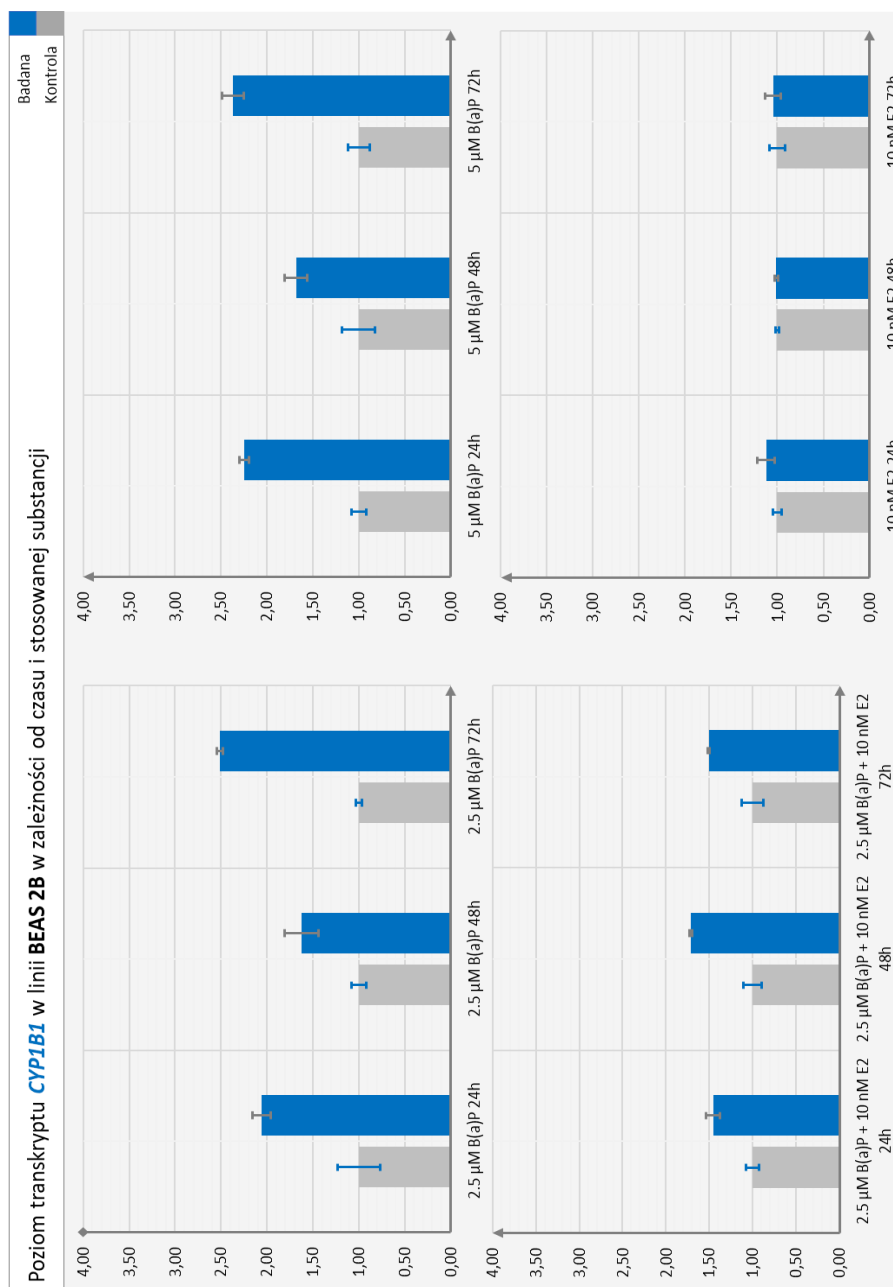
	Substancja	Średnia (Min-Maks)	SD	SEM	p-value
Kontrola	2.5 μM B(a)P	0.97 (0.86-1.17)	0.14	0.08	<b>p=0.0107</b>
Badana	2.5 μM B(a)P	1.57 (1.16-1.87)	0.30	0.17	
Kontrola	5 μM B(a)P	0.69 (0.39-0.88)	0.21	0.12	<b>p=0.049</b>
Badana	5 μM B(a)P	1.15 (0.95-1.3)	0.15	0.08	
Kontrola	2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	0.83 (0.71-1.04)	0.15	0.09	<b>p=0.0250</b>
Badana	2.5 μM B(a)P + 10 nM E2	1.04 (0.28-1.44)	0.54	0.31	
Kontrola	10 nM E2	0.49 (0.39-0.62)	0.10	0.06	p>0.5
Badana	10 nM E2	0.5 (0.47-0.51)	0.02	0.01	



Ryc. 65 Poziom transkryptu i białka CYP1B1 w linii komórkowej Beas-2b po 48 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



Ryc. 66 Poziom transkryptu i białka **CYP1B1** w linii komórkowej **Beas-2b** po 72 godzinach inkubacji z testowanymi substancjami.



**Ryc. 67** Poziom transkryptu *CYP1B1* w linii komórkowej **Beas-2b** w zależności od czasu inkubacji i rodzaju testowanej substancji

**Tabela 11.** Wyniki półilościowej analizy białek Western Blot. Wartości przedstawiają stosunek gęstości optycznej prążka białka badanego (CYP1A1, CYP1B1) do białka referencyjnego (GAPDH) jako wielokrotność kontroli dla danego czasu.

Calu-1	2.5 $\mu$ M B(a)P	5 $\mu$ M B(a)P	2.5 $\mu$ M B(a)P + 10 nM E2	10 nM E2
CYP1A1 24h	4.78	5.53	4.76	0.82
CYP1B1 24h	2.68	3.06	2.12	0.82
CYP1A1 48h	6.36	9.21	7.94	0.91
CYP1B1 48h	2.70	3.36	1.83	1.20
CYP1A1 72h	8.87	9.59	8.28	1.19
CYP1B1 72h	4.01	3.78	4.15	0.65

A549	2.5 $\mu$ M B(a)P	5 $\mu$ M B(a)P	2.5 $\mu$ M B(a)P + 10 nM E2	10 nM E2
CYP1A1 24h	2.50	3.87	3.22	1.28
CYP1B1 24h	2.37	2.33	2.52	1.07
CYP1A1 48h	1.85	3.02	1.87	1.18
CYP1B1 48h	2.40	3.88	2.51	0.75
CYP1A1 72h	3.36	3.84	3.77	1.74
CYP1B1 72h	2.34	3.25	2.28	0.95

Beas-2b	2.5 $\mu$ M B(a)P	5 $\mu$ M B(a)P	2.5 $\mu$ M B(a)P + 10 nM E2	10 nM E2
CYP1A1 24h	2.91	4.35	2.12	0.59
CYP1B1 24h	1.93	3.61	3.72	1.42
CYP1A1 48h	2.69	2.69	2.33	0.79
CYP1B1 48h	2.04	2.32	2.33	0.70
CYP1A1 72h	3.08	2.88	2.92	0.55
CYP1B1 72h	2.41	2.03	2.33	1.43



## 4.2 Wpływ B(a)P, E<sub>2</sub> oraz 4-OH E<sub>2</sub> i 2-OH E<sub>2</sub> na proliferację ustalonych linii komórkowych Calu-1, A549, Beas-2b

Szczegółowe wyniki statystyczne opisujące wpływ badanych substancji na proliferację poszczególnych linii komórkowych zebrano w Tabeli 11, w której zaprezentowano również wpływ poszczególnych zmiennych (czasu i użytej substancji) na proliferację komórek. Na rycinach 68-70 przedstawiono wykresy zależności ilości komórek od czasu trwania eksperymentu i obecności zastosowanej substancji. Poszczególne linie komórkowe różniły się odpowiedzią na stymulację badanymi związkami:

### Calu-1 (Ryc. 68)

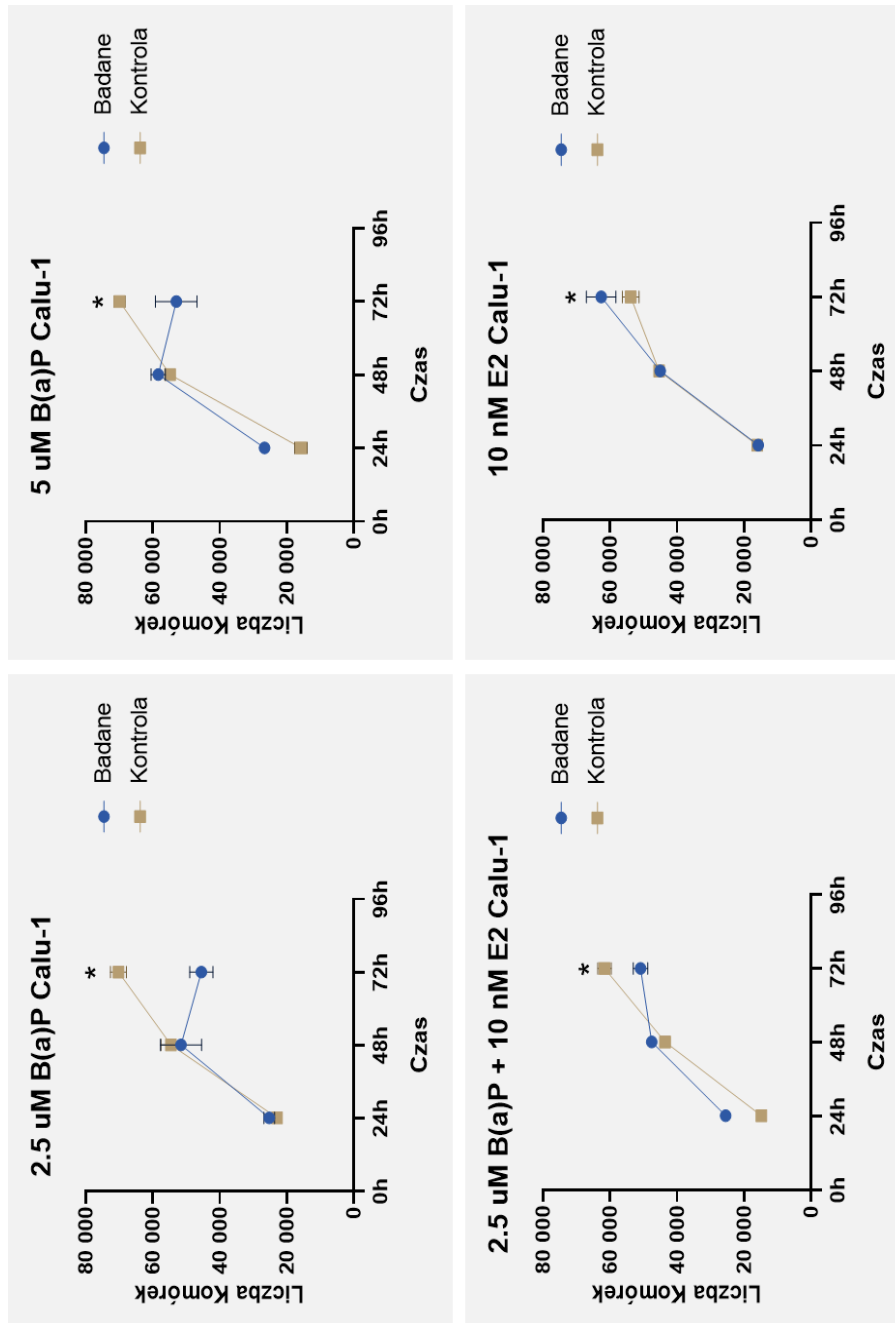
W linii Calu-1 zaobserwowano wyraźnie zahamowanie proliferacji (przechodzące w efekt cytotoksyczny) po podaniu B(a)P (niezależnie od zastosowanego stężenia 2.5 lub 5  $\mu$ M). Oddziaływanie to było znacznie łagodniejsze w przypadku równoczesnego zastosowania B(a)P i E<sub>2</sub>. Mogło być to spowodowane działaniem E<sub>2</sub>, który w wypadku linii Calu-1 okazał się mieć działanie stymulujące proliferację.

### A549 (Ryc. 69)

Hodowanie linii komórkowej A549 z B(a)P lub E<sub>2</sub> wykazało silnie stymulujący wpływ na dzielenie się komórek. Nie zaobserwowano podobnego zjawiska w przypadku jednoczesnego użycia B(a)P i E<sub>2</sub>. Zastosowanie katecholowych pochodnych E<sub>2</sub> wywarło zauważalny hamujący wpływ na proliferację A549, przy czym efekt ten był bardziej widoczny w przypadku 4-hydroksylowanej pochodnej.

### Beas-2b (Ryc. 70)

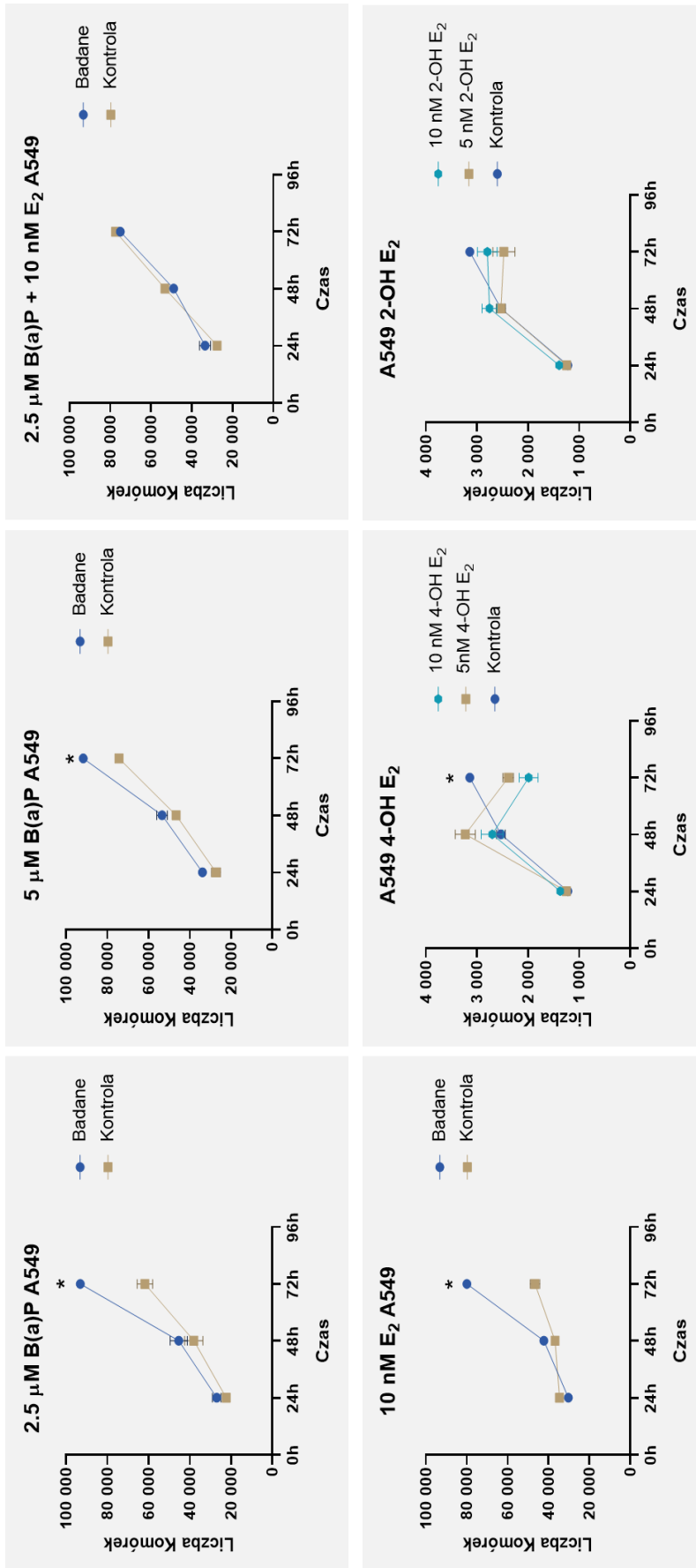
Zastosowanie analizowanych substancji na linii Beas-2b spowodowało podobną odpowiedź jak w przypadku linii Calu-1. Zauważono zahamowanie wzrostu komórek przy użyciu B(a)P, natomiast E<sub>2</sub> wykazał słabe działanie stymulujące podziały. Jednoczesne zastosowanie B(a)P i E<sub>2</sub>, podobnie jak w przypadku Calu1 wydawało się osłabiać hamujący wpływ B(a)P. Dodatkowo wykazano, że 10 nM 4-OH E<sub>2</sub> działał antyproliferacyjnie.



**Ryc. 68** Wpływ B(a)P lub/i E<sub>2</sub> na proliferację komórek linii Calu-1.

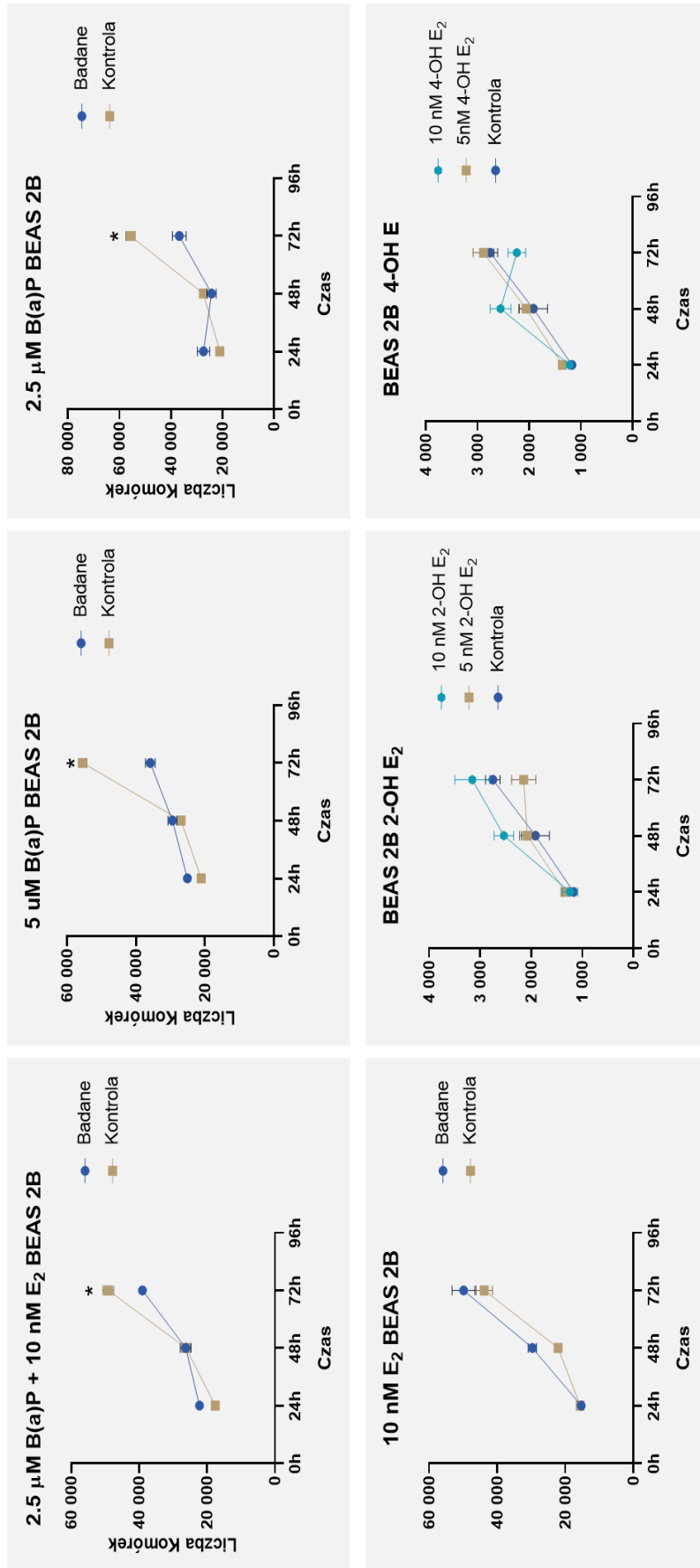
Wykres prezentuje zależność ilości komórek od czasu w obecności odpowiedniej substancji badanej. Eksperyment wykonany był zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale 3.5.2; gwiazdką (\*) oznaczono statystycznie istotne różnice w ilości komórek pomiędzy próbą badaną a próbą kontrolną dla czasu 72h





**Ryc. 69** Wpływ B(a)P lub/i E<sub>2</sub> oraz jego 2- i 4- hydroksylowanych pochodnych na proliferację komórek linii A549

Wykres prezentuje zależność ilości komórek od czasu w obecności odpowiedniej substancji badanej. Eksperyment wykonany był zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale 3.5.2; gwiazdką (\*) oznaczono statystycznie istotne różnice w ilości komórek pomiędzy próbą badaną a próbą kontrolną dla czasu 72h



**Ryc. 70 Wpływ B(a)P lub/i  $\text{E}_2$  oraz jego 2- i 4- hydroksylowanych pochodnych na proliferację komórek linii Beas-2b**

Wykres prezentuje zależność ilości komórek od czasu w obecności odpowiedniej substancji badanej. Eksperyment wykonany był zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale 3.5.2; gwiazdką (\*) oznaczono statystycznie istotne różnice w ilości komórek pomiędzy próbą badaną a próbą kontrolną dla czasu 72h

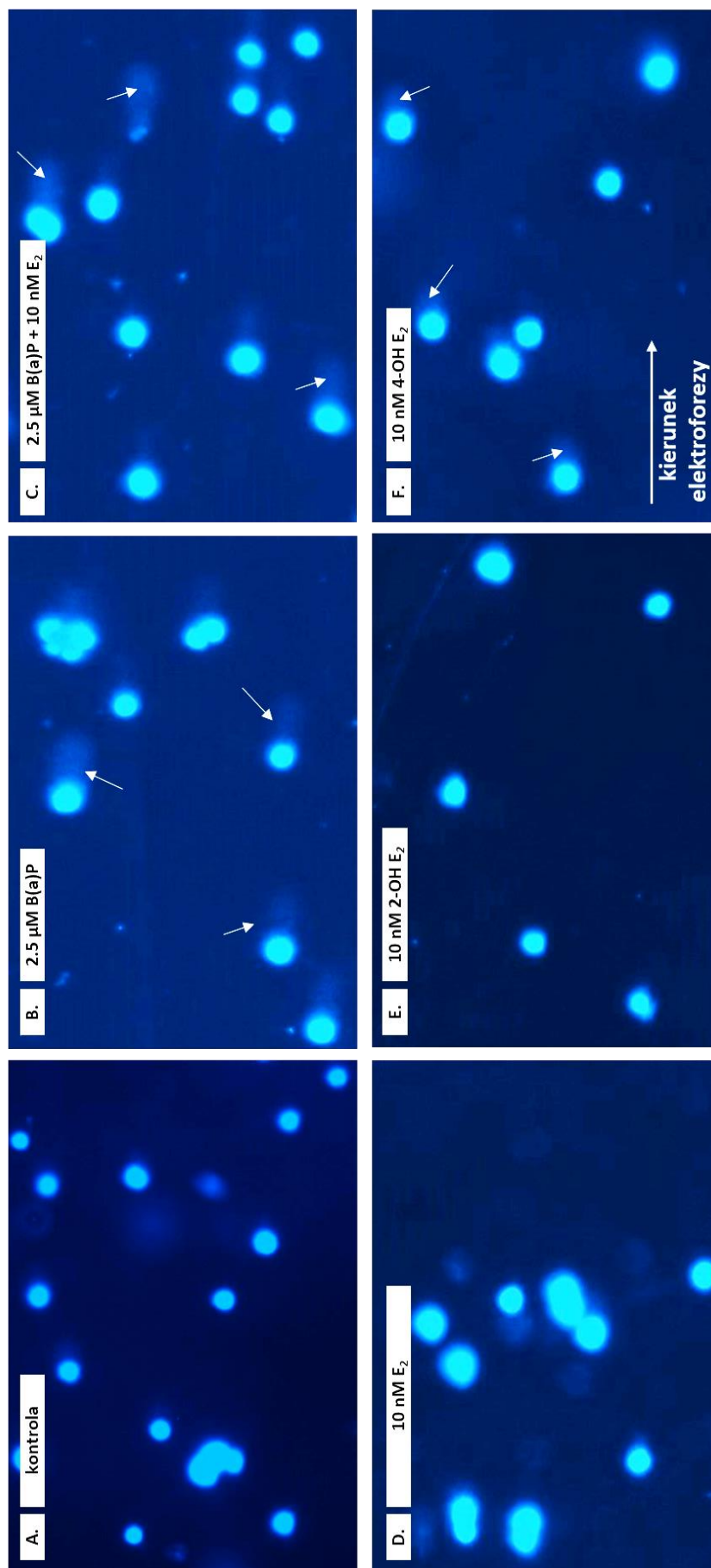
Tabela 12. Analiza statystyczna wpływu B(a)P, E2 oraz jego 2 – i 4- hydroksylowanych pochodnych na proliferację badanych linii komórkowych A549, Calu -1 i Beas-2b

Linia	Substancja	Kontrola vs. Badana (72h)	Wpływ substancji	Wpływ czasu	Wpływ czasu i substancji
<b>A549</b>	2.5 µM B(a)P	<0.0001	0.0058	<0.0001	0.0042
	5 µM B(a)P	0.0213	0.0025	<0.0001	0.0258
	2.5 µM B(a)P + 10nM E <sub>2</sub>	0.6369	0.7990	<0.0001	0.0594
	10 nM E <sub>2</sub>	0.0118	0.0029	<0.0001	<0.0001
	10 nM 4-OH E <sub>2</sub>	0.0013	0.0248	<0.0001	<0.0001
	5 nM 4-OH E <sub>2</sub>	0.0004			
	10 nM 2-OH E <sub>2</sub>	0.3138	0.1088	0.1088	0.0109
	5 nM 2-OH E <sub>2</sub>	0.0531			
<b>Calu-1</b>	2.5 µM B(a)P	0.0007	0.1018	<0.0001	0.0009
	5 µM B(a)P	0.0042	0.7257	<0.0001	0.0041
	2.5 µM B(a)P + 10nM E <sub>2</sub>	0.0472	0.3548	<0.0001	0.0113
	10 nM E <sub>2</sub>	0.0367	0.2196	<0.0001	0.0855
<b>Beas-2b</b>	2.5 µM B(a)P	0.0187	0.0948	<0.0001	<0.0001
	5 µM B(a)P	0.0015	0.0007	0.0001	<0.0001
	2.5 µM B(a)P + 10nM E <sub>2</sub>	0.0444	0.2042	0.0001	<0.0001
	10 nM E <sub>2</sub>	0.5290	0.0576	<0.0001	0.0946
	10 nM 4-OH E <sub>2</sub>	0.0658	0.4929	<0.0001	0.0081
	5 nM 4-OH E <sub>2</sub>	0.8224			
	10 nM 2-OH E <sub>2</sub>	0.4685	0.0960	<0.0001	0.0145
	5 nM 2-OH E <sub>2</sub>	0.0914			

### 4.3 Test kometkowy – analiza właściwości genotoksycznych B(a)P, E<sub>2</sub> oraz 4-OH E<sub>2</sub> w zależności od obecności ER $\beta$

Poniższe ryciny (Ryc. 71-74) przedstawiają rozdział elektroforetyczny pojedynczej komórki, która została wybarwiona barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342, w teście kometkowym. Na zdjęciach zaprezentowano efekt jaki wywierają badane substancje na DNA genomowe komórki, w zależności od obecności ER. Celem tego doświadczenia było sprawdzenie czy genotoksyczne katecholowe pochodne mogą być transportowane do jądra komórki za pośrednictwem ER $\beta$ . Charakterystyczne ogony komet (zaznaczone na obrazkach białymi strzałkami) świadczą o degradacji DNA, wynikającego z powstawania pęknięć nici. Struktury te możemy zaobserwować na wszystkich zdjęciach komórek, w których medium obecny był B(a)P. Podobny obraz odnotowano w przypadku zastosowania na komórkach 10 nM 4-OH E<sub>2</sub> (który ma znane działanie genotoksyczne). Efekt ten był o wiele bardziej intensywny w komórkach z powielonym genem kodującym ER $\beta$  (Ryc. 74) i znacznie słabszy w komórkach z wyciszonym receptorem (Ryc. 73), co sugeruje, że związek ten może być transportowany przez receptor. Nie zaobserwowano tworzenia się „ogonów” komet w komórkach inkubowanych z 10 nM E<sub>2</sub> lub 2-OH E<sub>2</sub>.

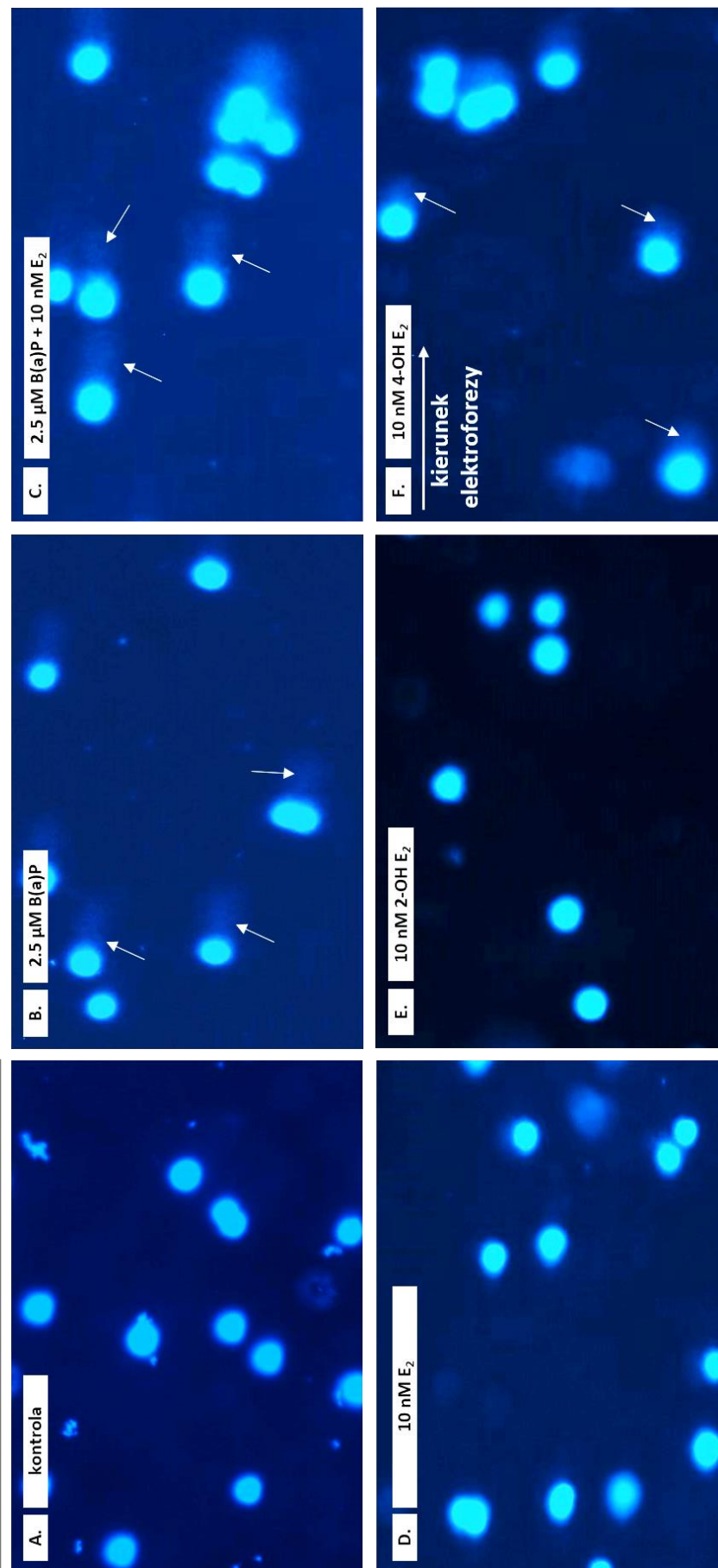
## A549 kontrola



Ryc. 71 Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na niemodyfikowanej linii A549, poddanej inkubacji z B(a)P;  $\text{E}_2$ ; 4- i 2-OH  $\text{E}_2$



## A549 kontrola transdukcji

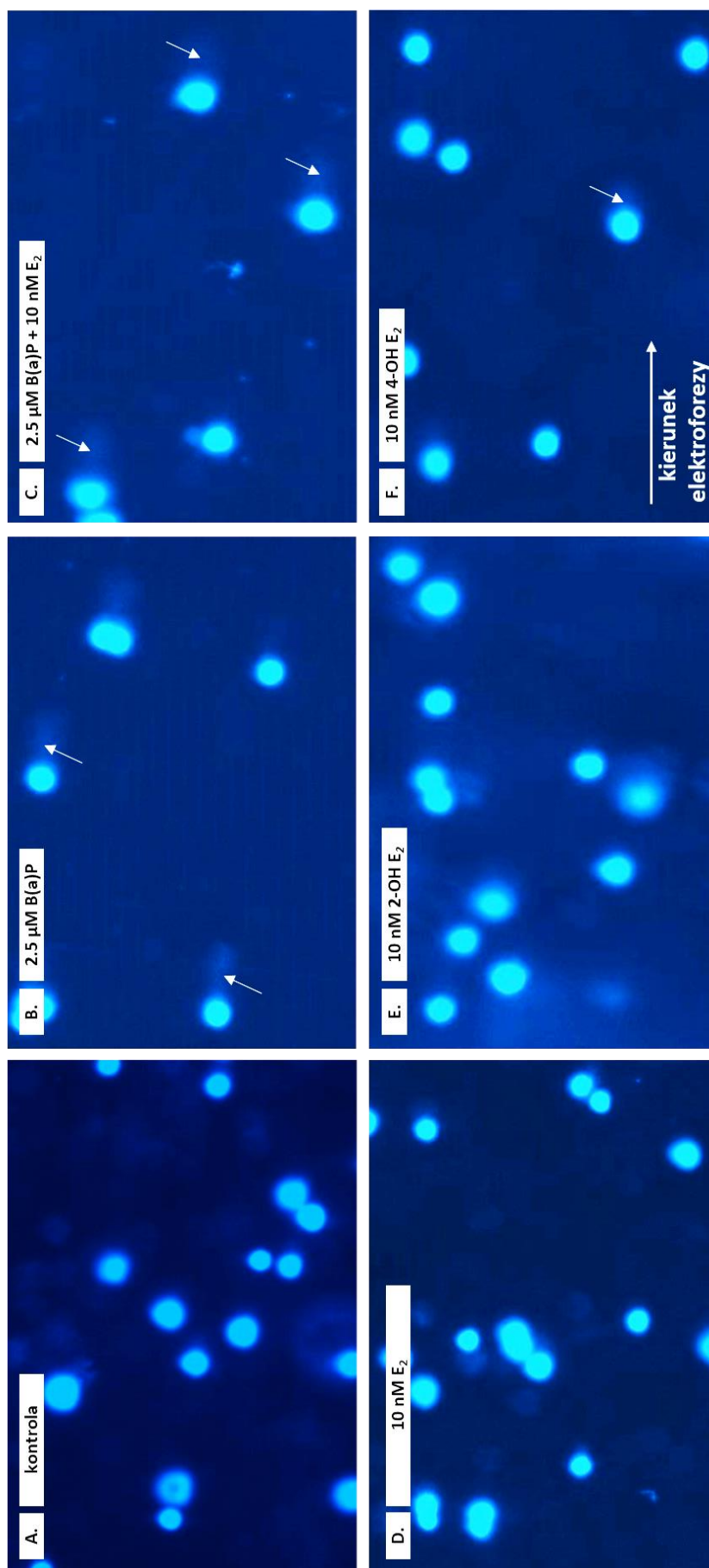


Ryc. 72 Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na ZA549 z wyciszonym genem lucyferazy (kontrola transdukcji), poddanej inkubacji z B(a)P;  $\text{E}_2$ ; 4- i 2-OH  $\text{E}_2$





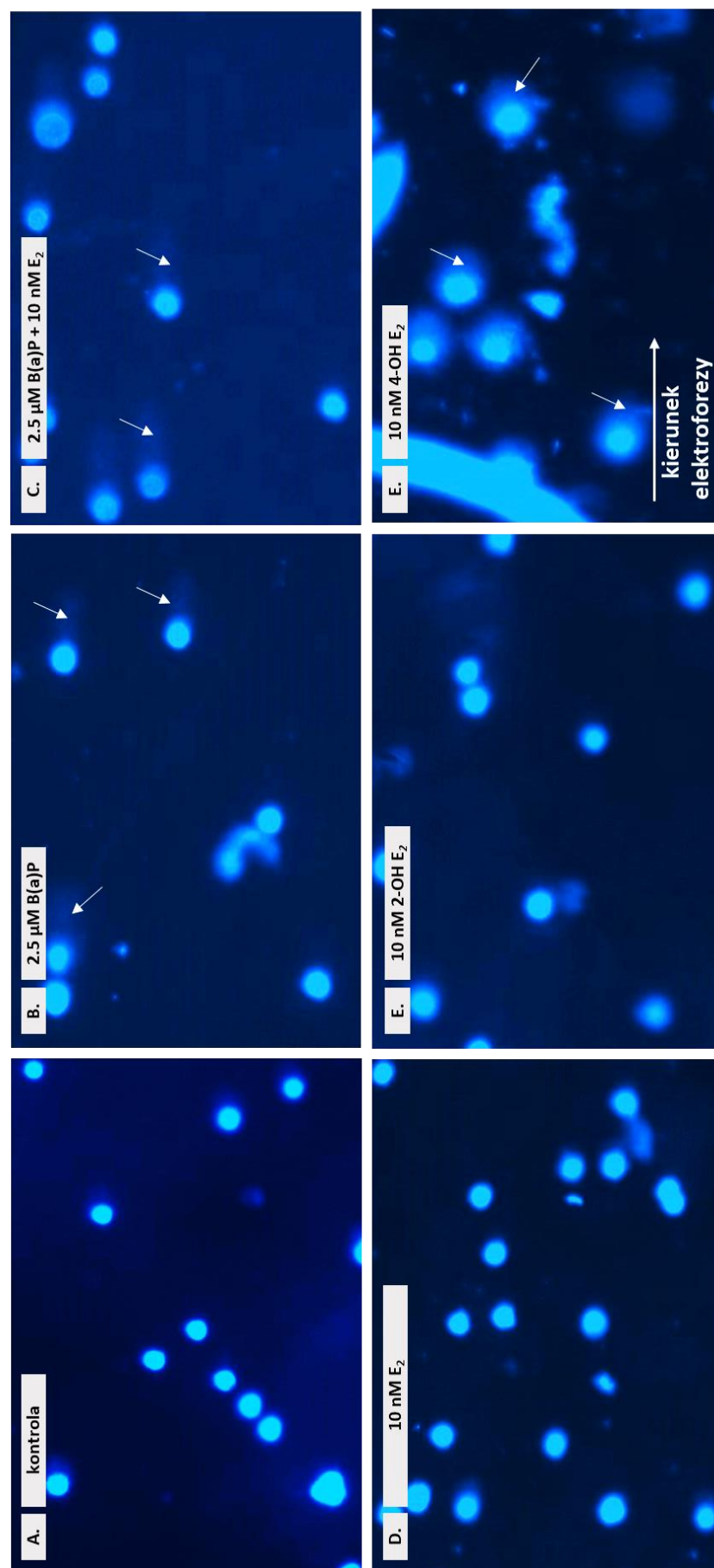
A549 ER(-)



Ryc. 73 Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na A549 z wyciszonym genem kodującym ERβ (kontrola transdukcji), poddanej inkubacji B(a)P; E<sub>2</sub>;4- i 2-OH E<sub>2</sub>



## A549 ER(+)



Ryc. 74 Zdjęcia rozdziału elektroforetycznego pojedynczej komórki w teście kometkowym przeprowadzonym na A549 z powielonym genem kodującym ER $\beta$  poddanej inkubacji z B(a)P;  $\text{E}_2$ ; 4- i 2-OH  $\text{E}_2$



#### 4.4 Analiza ilości transkryptu i białka w materiale tkankowym pochodzącym od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc

Szczegółowe dane statystyczne dla badanych genów przedstawiono w tabelach 13 i 14. Umieszczono w nich informacje odnośnie mediany względnej ilości mRNA badanych genów dla danych grup analizowanych tkanek, które podzielono pod względem danych klinicznych. Wszystkie pomiary zostały wykonane dla tkanki nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej. W tabeli podano wyniki analiz statystycznych porównujących poziom transkryptu lub białka PELP1, AHR, CYP1A1 oraz CYP1B1 w materiale neoplastycznym i niezmięzionym nowotworowo. Wyniki istotne oznaczono kolorem czerwonym. Na rycinach 75 – 77 pokazano graficzne przedstawienie wyników otrzymanych z porównania **A.** Ilości transkryptu w tkance nowotworowej (N) i histopatologicznie niezmięnionej (Z); **B.** Ilości transkryptu w tkance nowotworowej kobiet i mężczyzn; **C.** Ilości transkryptu w tkance nowotworowej u osób przed i po 60 roku życia, **D.** Ilości transkryptu w zależności od rozpoznania histopatologicznego; **E.** Ilości transkryptu w zależności od stadium choroby; **F.** Ilości białka w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej. Dodatkowo umieszczono reprezentatywne obrazy pochodzące z analizy Western Blot.

##### 4.4.1 PELP1 (Ryc. 77)

Wyniki analizy PELP1 wykazały jego istotnie statystycznie podwyższone ilości w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmięnionej (tabela 14), zarówno na poziomie transkryptu (p-value = 0.00001) jak i białka (p-value = 0.00001). Dokonano również analizy statystycznej pod kątem związku ilości transkryptu *PELP1* z wiekiem, płcią oraz innymi danymi klinicznymi. Podwyższony poziom mRNA (zarówno jak i białka) występował niezależnie od płci (mężczyźni p-value = 0.0001; kobiety p-value = 0.02), wieku ( $\geq 60$  p-value = 0.042;  $< 60$  p-value = 0.0001) czy głównego typu histopatologicznego nowotworu (rak gruczołowy p-value = 0.004; rak płaskonabłonkowy p-value = 0.0009). Wykazano również, że w porównaniu do tkanki zdrowej, zwiększona ilość transkryptu *PELP1* jest charakterystyczna dla późniejszych stadiów nowotworu, mimo to analiza statystyczna nie pokazała znaczących różnic (p=0.56) w poziomie analizowanego genu w tkankach nowotworowych.

#### 4.4.2 AHR (Ryc. 75)

Analiza transkryptu AhR w tkankach zmienionych nowotworowo wykazała jego obniżone ilości w postaci w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmięnionej ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). Trend ten był zachowany niezależnie od płci (mężczyźni  $p$ -value = 0.005; kobiety  $p$ -value  $< 0.0001$ ), wieku ( $\geq 60$   $p$ -value = 0.001;  $< 60$   $p$ -value = 0.0012) czy rozpoznania histopatologicznego nowotworu (rak gruczołowy  $p$ -value = 0.004; rak płaskonabłonkowy  $p$ -value=0.0008; wielkokomórkowy  $p$ -value = 0.0001). Analiza ilościowa mRNA w obrębie tkanek nowotworowych nie wykazała istotnie statystycznych wyników.

#### 4.4.3 CYP1A1 (Ryc. 75)

Zaobserwowano znacząco niższą ilość transkryptu w tkankach nowotworowych w porównaniu do tkanek zdrowych ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). Trend ten był widoczny niezależnie od płci czy grupy wiekowej. Analiza ilości *CYP1A1* w różnych podtypach histopatologicznych wykazała, że jego poziom (w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmięnionej) był obniżony tylko w przypadku raka gruczołowego ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). W grupie raka płaskonabłonkowego i wielkokomórkowego poziom istotności statystycznej nie osiągnął  $\alpha$  (0.05). Poziom badanego transkryptu był różny w zależności od stadium nowotworu, gdzie obniżony poziom zaobserwowano w stadium 1b ( $p$ -value = 0.03) oraz 3a ( $p$ -value = 0.010)

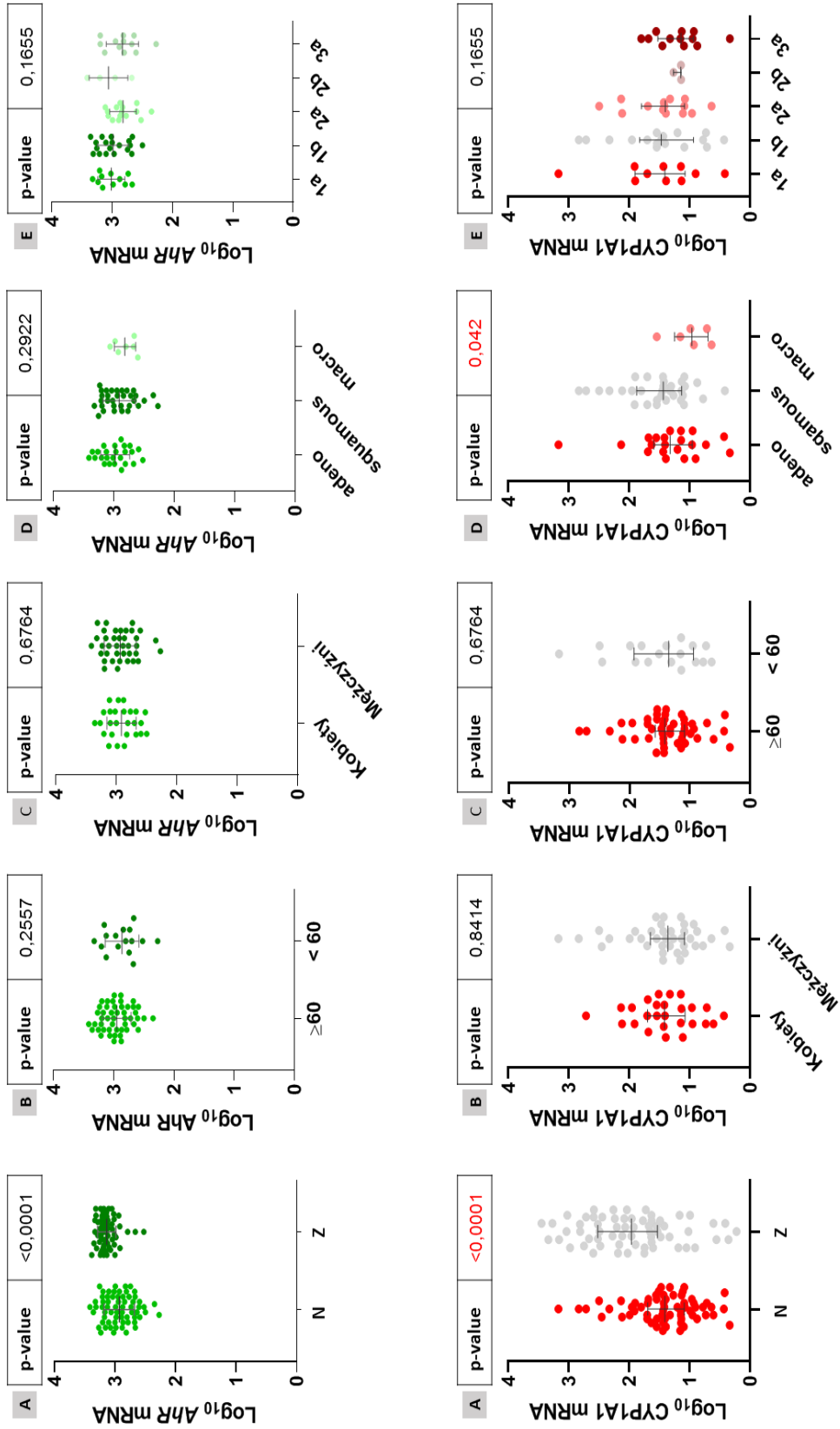
#### 4.4.4 CYP1B1 (Ryc. 76)

Dane uzyskane podczas tego badania, pozwoliły stwierdzić, że poziom transkryptu *CYP1B1* jest znacząco niższy ( $p < 0.0001$ ) w materiale nowotworowym, w porównaniu do odpowiednich tkanek histopatologicznie niezmięzonych, pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym NSCLC. Analiza western blot potwierdza ten wynik, jednak z powodu małych ilości materiału badanego nie można było przeprowadzić pełnej analizy statystycznej. Podczas oceny związku ilości *CYP1B1* z dostępnymi danymi klinicznymi pacjentów (wiek, płeć, rozpoznanie histopatologiczne) wykazano, że ilość mRNA genu jest obniżona niezależnie od analizowanych cech (wiek, płeć, typ histologiczny nowotworu, stadium nowotworu). Statystycznie istotny, obniżony poziom *CYP1B1* występował u obu płci (kobiety  $p$ -value  $< 0.0001$ ; mężczyźni  $p$ -value  $< 0.0001$ ),

w każdej grupie wiekowej ( $<60$  p-value  $< 0.0001$ ;  $\geq 60$  p-value  $< 0.0001$ ) i każdym typie histopatologicznym nowotworu (rak gruczołowy p-value  $< 0.0001$ ; rak płaskonabłonkowy p-value= $0.00001$ ). Ustalono także, że zmniejszona ilość mRNA może być powiązana ze stadium nowotworu – tkanki nowotworowe, pobrane od pacjentów z bardziej zaawansowanym stadium choroby charakteryzowały się mniejszym poziomem CYP1B1, w porównaniu do materiału histopatologicznie niezmiennego (stadium 1a p-value  $< 0.0001$ ; stadium 2a p-value  $< 0.0001$ ; stadium 2b p-value  $< 0.0001$ ). Wykonano również osobne analizy dla tkanki nowotworowej, aby sprawdzić czy któraś z badanych cech może wpływać na zmiany w ilości *CYP1B1*, ale żaden z wyników nie wykazał istotności statystycznej (tabela 12)

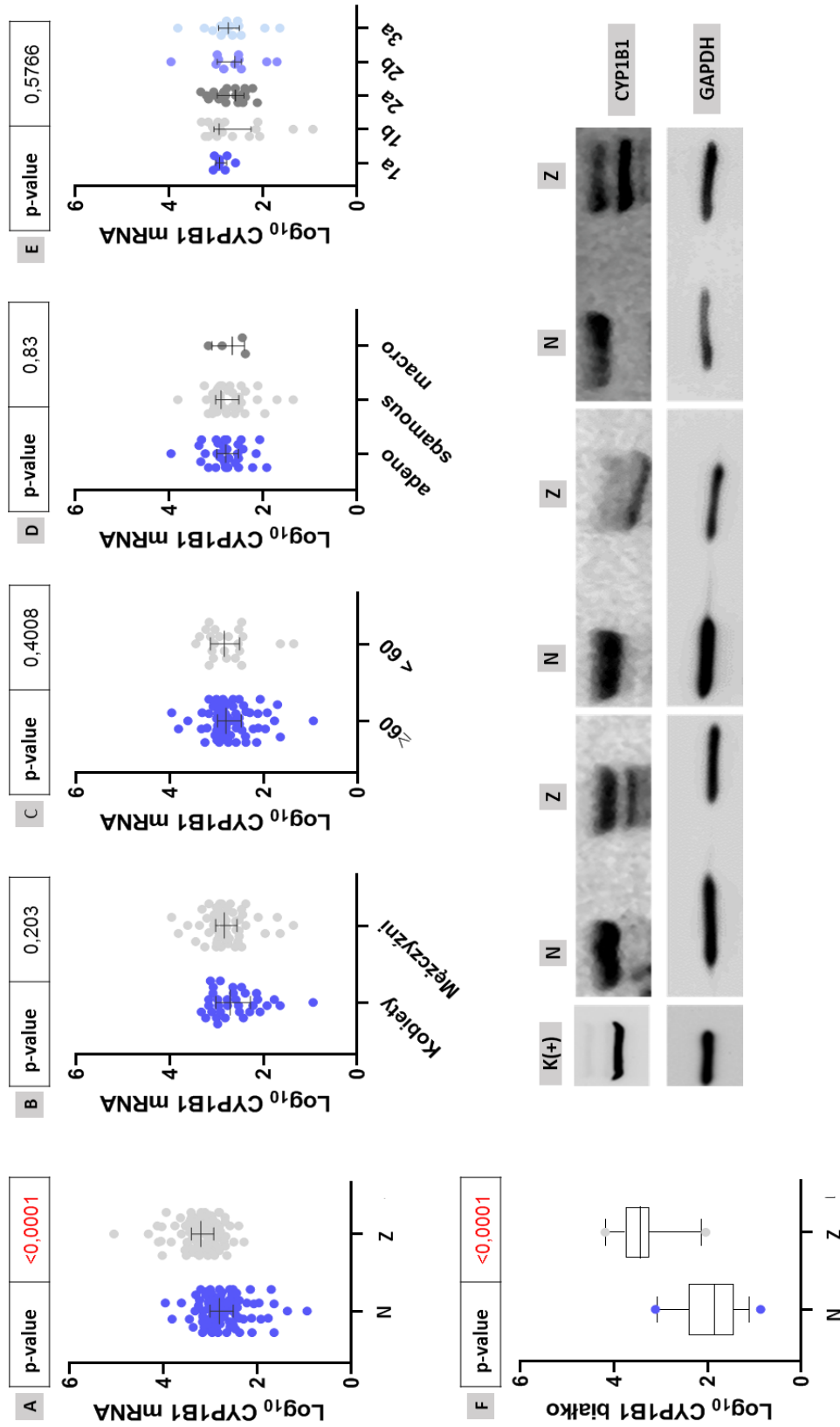






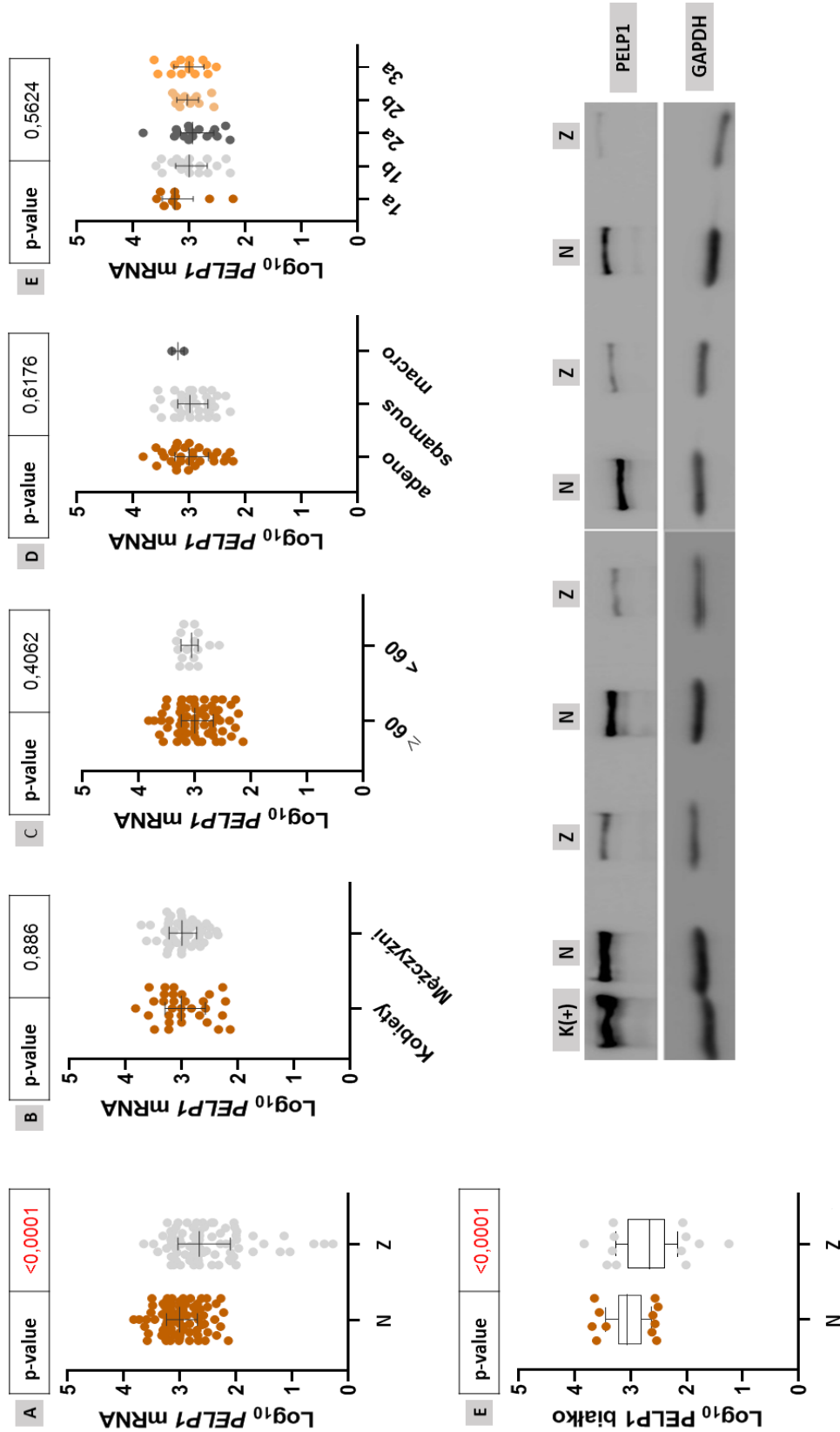
Ryc. 75 Porównanie ilości transkrypcji genów *AHR* i *CYP1A1* w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej. Analizy B – E dotyczą porównania ilości mRNA badanego genu w tkance nowotworowej dla danych cech klinicznych. B-Wiek; C-Płeć; D-typ nowotworu; E-stadium nowotworu. Skróty: N – tkanka nowotworowa; Z – tkanka histopatologicznie niezmięciona





Ryc. 76 Porównanie ilości transkryptu genu (A) i białka (F) CYP1B1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmiennionej. Analizy B – E dotyczą porównania ilości mRNA badanego genu w tkance nowotworowej dla danych cech klinicznych. B-Wiek; C-Płeć; D-typ nowotworu; E-stadium nowotworu. Skróty: N – tkanka nowotworowa; Z – tkanka histopatologicznie niezmienniona; K (+) – kontrola pozytywna





Ryc. 77 Porównanie ilości transkryptu genu (A) i białka (F) PELP1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej. Analizy B – E dotyczą porównania ilości mRNA badanego genu w tkance nowotworowej dla danych cech klinicznych. B-Wiek; C-Płeć; D-typ nowotworu; E-stadium nowotworu. Skróty: N – tkanka nowotworowa; Z – tkanka histopatologicznie niezmieniona; K (+)



Tabela 13 Analiza statystyczna transkryptów CYP1A1 oraz CYP1B1 w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej uwzględniająca dane kliniczne i histopatologiczne badanego materiału. Na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystyczne. Poziom transkryptu został wyrażony jako logarytm dziesiętny kopii cDNA danego genu. Wyniki oznaczone gwiazdką (\*) dotyczą badania danej cechy klinicznej w obrębie wyłącznie materiału nowotworowego.

Cecha	poziom CYP1A1 (log)		l.zm.	p	poziom CYP1B1 (log)		l.zm.	p
	Rak	Zdrowe			Rak	Zdrowe		
	1.41 (0.34-3.18)	1.97 (0.22-3.45)	64	<0.0001	2.818 (1.363-3.968)	3.215 (2.288-5.06)	76	<0.0001
	<b>Płeć</b>			<b>0.84*</b>				<b>0.203*</b>
<b>Mężczyźni</b>	1.36 (0.34-3.18)	2.12 (0.22-3.34)	38	<0.0001	2.841 (1.363-3.968)	3.207 (2.288-5.06)	50	<0.0001
<b>Kobiety</b>	1.42 (0.44-2.72)	1.91 (0.91-3.45)	26	<b>0.0041</b>	2.774 (1.771-3.334)	3.247 (2.586-3.763)	26	<0.0001
	<b>Wiek</b>			<b>0.67*</b>				<b>0.40*</b>
<b>≥ 60</b>	1.42 (0.34-2.84)	1.76 (0.36-3.28)	46	<0.0001	2.795 (1.363-3.370)	3.219 (2.685-4.325)	59	<0.0001
<b>&lt; 60</b>	1.35 (0.64-3.18)	2.28 (0.22-3.45)	18	<b>0.013</b>	2.824 (1.709-3.968)	3.211 (2.288-5.06)	17	<0.0001
	<b>Rozpoznanie histopatologiczne</b>			<b>0.29*</b>				<b>0.83*</b>
<b>rak gruczolowy</b>	1.33 (0.34-3.18)	2.33 (0.22-3.45)	24	<0.0001	2.802 (1.927-3.968)	3.176 (2.288-4.06)	33	<0.0001
<b>rak płaskonabłonkowy</b>	1.44 (0.42-2.84)	1.84 (0.36-3.28)	34	<b>0.084</b>	2.903 (1.363-3.823)	3.261 (2.401-5.060)	43	<0.0001
<b>macrocellulare</b>	0.96 (0.64-1.55)	1.59 (0.41-2.98)	6	<b>0.1282</b>	-	-		
	<b>Stadium nowotworu</b>			<b>0.16*</b>				<b>0.57</b>
<b>0</b>	1.64 (1.51-1.99)	2.03 (1.42-2.49)	3	<b>0.662</b>	2.745 (1.771-2.984)	2.744 (2.586-3.763)	4	<b>0.88</b>
<b>1a</b>	1.42 (0.42-3.18)	1.96 (1.06-2.6)	10	<b>0.130</b>	2.938 (2.771-3.067)	3.240 (2.717-3.641)	7	<b>0.159</b>
<b>1b</b>	1.46 (0.44-2.84)	1.95 (0.99-3.28)	18	<b>0.030</b>	2.958 (1.363-3.316)	3.333 (2.690-4.325)	19	<0.0001
<b>2a</b>	1.41 (0.64-2.5)	1.93 (0.36-3.45)	14	<b>0.093</b>	2.777 (2.126-3.334)	3.185 (2.677-4.060)	19	<0.0001
<b>2b</b>	1.15 (1.15-1.27)	2.64 (0.22-3.17)	4	<b>0.376</b>	2.609 (1.709-3.968)	3.284 (2.975-3.416)	10	<b>0.002</b>
<b>3a</b>	1.24 (0.34-2.46)	1.97 (0.41-3.34)	14	<b>0.010</b>	2.782 (1.968-3.823)	3.033 (2.288-5.060)	14	<b>0.09</b>

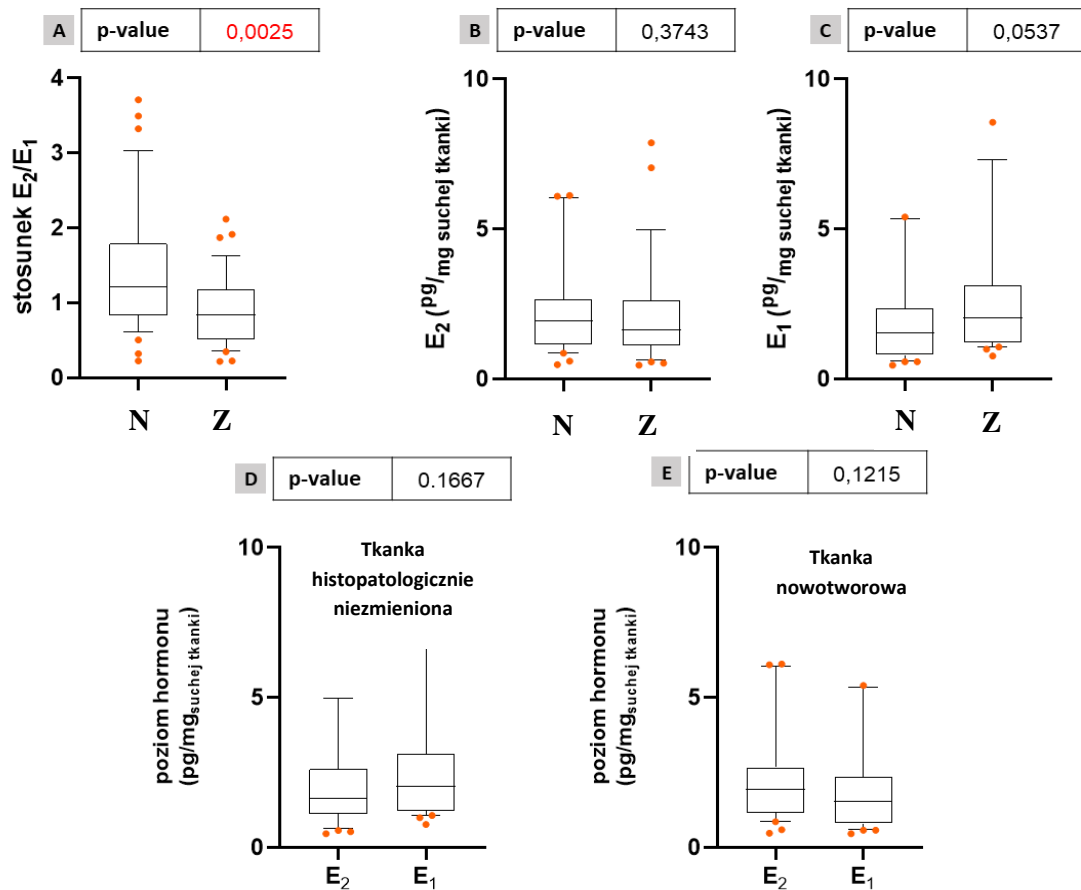
**Tabela 14** Analiza statystyczna transkryptów *PELP1* oraz *AhR* w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej uwzględniająca dane kliniczne i histopatologiczne badanego materiału. Na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystycznie. Poziom transkryptu został wyrażony jako logarytm dziesiętny kopii cDNA danego genu. Wyniki oznaczone gwiazdką (\*) dotyczą badania danej cechy klinicznej w obrębie wyłącznie materiału nowotworowego.

Cecha	poziom <i>PELP1</i> (log)		l.zm	p	poziom <i>AhR</i> (log)		l.zm	p
	Rak	Zdrowe			Rak	Zdrowe		
	3.013 (2.139-3.728)	2.65 (0.271-3.648)	73	<0.0001	2.91 (2.14-3.42)	3.14 (2.53-3.64)	69	<0.0001
	<b>Płeć</b>			<b>0.886*</b>				<b>0.255*</b>
<b>Mężczyźni</b>	3.003 (2.35-3.728)	2.667 (0.271-3.648)	44	<b>0.0003</b>	2.92 (2.28-3.42)	3.11 (2.53-3.45)	41	<b>0.0005</b>
<b>Kobiety</b>	3.089 (2.140-3.560)	2.654 (0.428-3.399)	29	<b>0.0005</b>	2.89 (2.14-3.36)	3.2 (2.94-3.64)	28	<0.0001
	<b>Wiek</b>			<b>0.40*</b>				<b>0.6764</b>
<b>≥ 60</b>	3.013 (2.139-3.728)	2.58 (0.271-3.474)	58	<0.0001	2.93 (2.14-3.42)	3.15 (2.53-3.39)	50	<0.001
<b>&lt; 60</b>	3.006 (2.566-3.301)	2.705 (1.752-3.648)	15	<b>0.042</b>	2.86 (2.28-3.33)	3.14 (2.67-3.64)	19	<b>0.0012</b>
	<b>Rozpoznanie histopatologiczne</b>			<b>0.61*</b>				<b>0.292*</b>
<b>rak gruczołowy</b>	3.089 (2.221-3.595)	2.683 (1.039-3.474)	25	<b>0.004</b>	2.98 (2.52-3.42)	3.16 (2.67-3.39)	25	<b>0.004</b>
<b>rak płaskonabłonkowy</b>	3.005 (2.632-3.694)	2.648 (0.271-3.306)	29	<b>0.0009</b>	2.92 (2.28-3.33)	3.11 (2.53-3.34)	32	<b>0.0008</b>
<b>macrocellulare</b>	-	-	-	-	2.82 (2.61-3.07)	3.21 (3.05-3.31)	7	<b>0.0001</b>
	<b>Stadium nowotworu</b>			<b>0.56*</b>				<b>0.165*</b>
<b>0</b>	2.734 (2.138-3.728)	2.401 (0.428-3.239)		0.16	2.85 (2.66-3)	3.45 (3.26-3.64)	3	<b>0.0168</b>
<b>1a</b>	3.252 (2.221-3.584)	2.996 (1.696-3.474)		<b>0.07</b>	3.02 (2.67-3.33)	3.18 (2.92-3.39)	11	<b>0.0558</b>
<b>1b</b>	3.008 (2.27-3.596)	2.294 (1.039-3.228)		<b>0.001</b>	2.95 (2.14-3.36)	3.16 (2.94-3.32)	20	<b>0.0063</b>
<b>2a</b>	2.947 (2.276-3.269)	2.584 (1.144-3.113)		<b>0.012</b>	2.82 (2.35-3.12)	3.13 (2.53-3.35)	15	<0.0001
<b>2b</b>	3.157 (2.566-3.300)	3.069 (0.271-3.157)		0.12	3.06 (2.68-3.42)	3.02 (2.67-3.23)	4	<b>0.819</b>
<b>3a</b>	3.006 (2.523-3.629)	2.705 (2.042-3.648)		<b>0.04</b>	2.81 (2.28-3.2)	3.09 (2.78-3.33)	14	<b>0.003</b>



#### 4.5 Oznaczenie wewnątrztkankowego poziomu E<sub>2</sub> i E<sub>1</sub>

Poziom wewnątrztkankowego E<sub>1</sub> oraz E<sub>2</sub> oznaczono w 35 tkankach nowotworowych i odpowiadających im tkankach histopatologicznie niezmiennych. Na poniższych wykresach zaprezentowano różnice pomiędzy: **A.** Stosunkiem E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub>; **B.** Poziomem E<sub>2</sub>; **C.** Poziomem E<sub>1</sub> **D.** Ilością E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub> w tkance histopatologicznie niezmiennych; **E.** Ilością E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> w tkance nowotworowej. Analiza statystyczna pokazała, że w tkance nowotworowej, w porównaniu do fragmentów niezmiennych chorobowo występuje podwyższony stosunek E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub> (p-value = 0.0025), co oznacza, że w komórce o wiele więcej jest aktywnego biologicznie E<sub>2</sub> niż słabszego E<sub>1</sub>. Pomimo braku istotności statystycznej, na wykresach D (p-value = 0.16) i E (p-value = 0.12), możemy zaobserwować pewną tendencję – tkanka nowotworowa charakteryzuje się większą ilością E<sub>2</sub> w porównaniu do E<sub>1</sub>, natomiast w tkance histopatologicznie niezmiennych sytuacja jest odwrotna, E<sub>2</sub> występuje w niższym stężeniu niż E<sub>1</sub>. Dodatkowo, zgodnie z wykresem C, mimo braku istotności statystycznej (p-value = 0.0537) zauważyć można pewien trend. E<sub>1</sub> osiąga wyższe stężenia w tkance prawidłowej niż w tkance nowotworowej.



Ryc. 78 Wykresy prezentujące wewnątrzkomórkowy poziom  $E_1$  oraz  $E_2$  w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmiennionej. Stężenie hormonów zostało podane w pg/mg suchej tkanki wykorzystanej do izolacji frakcji steroidowej N – tkanka nowotworowa; Z – tkanka histopatologicznie niezmiennona.

## 5. Dyskusja

Fakt, że powstawanie i rozwój RP są silnie powiązane z wdychaniem ksenobiotyków, w szczególności dymu tytoniowego, jest powszechnie znany i niepodważalny. Pomimo tego, istnieje wiele doniesień wymieniających inne czynniki, mogące przyczyniać się do bardziej agresywnego i szybszego wzrostu nowotworu płuc. Jednym z intensywniej badanych założeń jest hipoteza, dotycząca wpływu  $E_2$  na kancerogenezę płuc. Podłożem dla tej teorii była duża ilość badań, które wskazywały, że kobiety palące papierosy były bardziej narażone na chorobę nowotworową płuc niż palący mężczyźni. Mimo, że możemy znaleźć również przeciwstawne tej tezie założenia, to pewnym jest, że istnieje silny związek pomiędzy rozwojem RP, a działaniami estrogenu w ludzkich płucach [6], [103]–[105]. Potwierdzenie tego zjawiska można znaleźć w wielu najnowszych pracach, które udowadniają, że w tkance RP, w porównaniu do tkanek zdrowych, obserwuje się podwyższone ilości enzymów odpowiedzialnych za syntezę  $E_2$ , między innymi, aromatazy czy HSD17 $\beta$ 1 [11], [25], [26], [28]. Stan ten jest bezpośrednią przyczyną produkcji znacznie większych ilości wewnątrzkomórkowego  $E_2$ , co w konsekwencji prowadzi do wzrostu jego stężenia w komórce i jest powodem, między innymi, indukcji wzrostu wielu linii nowotworowych czy właściwych guzów płuc [16], [29], [106]–[108]. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy potwierdzają, że  $E_2$  jest w stanie stymulować proliferację komórek nowotworowych i może odgrywać znaczącą rolę w rozwoju guza. Widać to szczególnie dobrze na wynikach testu proliferacji (i aktywności metabolicznej) MTT. Zastosowanie  $E_2$  o stężeniu 10 nM spowodowało przyspieszony wzrost komórek nowotworowych, szczególnie po 72 godzinach inkubacji z  $E_2$ . Odnotowano statystycznie znaczące różnice w ilości komórek inkubowanymi  $E_2$  w porównaniu do kontroli. Opisany efekt można było zaobserwować zarówno w linii Calu – 1 z tą różnicą, że w przypadku A549, która jest ustaloną linią ludzkiego raka gruczołowego proliferacja była znacznie intensywniejsza. Co ciekawe, wynik niniejszej pracy zdaje się potwierdzać znacznie bardziej wymagające badanie, przeprowadzone na mysim modelu, przez *Hammouna et al.* z Katedry Położnictwa i Ginekologii, Uniwersytetu Medycznego w Indianapolis [107]. We wspomnianej pracy wykorzystano zmodyfikowane genetycznie myszy, u których zablokowano, między innymi wytwarzanie białka Tp53 – powszechnie znanego

„strażnika genomu” i czynnika przeciwnowotworowego. W badaniu wykorzystano stymulowane estrogenem samce oraz samice, u części których usunięto jajniki. Po pierwsze okazało się, że u samic z jajnikami pojawiło się dwa razy więcej zmian nowotworowych płuc niż u samców czy samic po owariektomii. Dodatkowo w porównaniu do myszy, których nie poddano stymulacji estrogenem, zaobserwowano znacząco niższą ilość i objętość guzów niż u osobników, którym podawano estrogen. Co ciekawe, rozpoznanie histopatologiczne wykazało, że głównym typem nowotworu, który powstał, był właśnie rak gruczołowy. Z kolei inne badanie, również przeprowadzone na mysim modelu zwierzęcym, przez *Jarzynkę et al.* Wykazało, że E<sub>2</sub> powodował znaczącą indukcję proliferacji ksenograftu z komórek A549 w mysich płucach [109].

W związku z opisanymi wcześniej, wykazanymi zmianami w poziomie enzymów odpowiedzialnych za steroidogenezę E<sub>2</sub> *in situ* w tkance nowotworowej, jednym z zadań niniejszej pracy było zbadanie wewnątrzkomórkowego poziomu E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> w tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmiętej. W tym celu wykorzystano wysokoczułą technikę chromatografii cieczowej/spektrometrii mas, która możliwa była dzięki Pracowni Spektrometrii Mas, z Europejskiego Centrum Bioinformatyki i Genomiki w Poznaniu. Do oceny statystycznej wykorzystano pomiary otrzymane z 35 oznaczeń. Mimo, że różnica w poziomie E<sub>2</sub> pomiędzy badanymi tkankami nie osiągnęła istotności statystycznej to średnia mediana była wyższa w przypadku tkanek nowotworowych (1.93 pg/mg vs 1.63 pg/mg). Podejrzewamy, że przy zwiększeniu grupy badanej różnica ta mogłaby się bardziej uwidocznić i osiągnąć istotność statystyczną, nad czym aktualnie pracujemy. Oprócz E<sub>2</sub>, należy również przeanalizować jego bezpośredni prekursor – E<sub>1</sub>. Okazało się, że jest go więcej w tkance histopatologicznie niezmiętej niż tkance nowotworowej. Wynik ten może być potwierdzony dzięki badaniom przedstawionym przez, między innymi *Drzewiecka et al.* [16], [25] oraz *Verma et al.* [28]. Zaprezentowane przez nich wyniki świadczą o tym, że komórki NSCLC są w stanie metabolizować E<sub>1</sub> do E<sub>2</sub>, oraz że w tkance nowotworowej podwyższony jest poziom enzymu HSD17β1 – białka odpowiedzialnego za przekształcenie E<sub>1</sub> do E<sub>2</sub>. Na wykresach umieszczonych na rycinie 78, zaprezentowano różnice w poziomie wspomnianych estrogenów pomiędzy tkankami. Pomimo, że wyniki nie osiągnęły istotności statystycznej, obserwujemy tendencję do tego, że w materiale nowotworowym E<sub>2</sub> występuje w wyższym niż E<sub>1</sub> stężeniu. Przekłada się to na zmiany w wewnątrzkomórkowym stosunku E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub>, który jest wielokrotnie wykorzystywanym

parametrem przy analizie estrogenozależnych zmian nowotworowych, gdyż współczynnik ten, w przypadku takich guzów, jest często nieprawidłowy [25]. Analizy przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy, pokazują, że stosunek ten istotnie różni się pomiędzy tkankami. Wyniki te sugerują, że  $E_2$  może być lokalnie produkowany z  $E_1$ , na potrzeby komórek nowotworowych i odgrywać ważną rolę we wzroście i rozwoju nowotworów. Zgodnie naszą wiedzą, niewiele jest prac, w których zmierzono wewnątrztkankowy poziom estrogenów w materiale niedrobnokomórkowego raka płuc. Jednym z nielicznych badań, na którym mogliśmy oprzeć nasze rozważania, było to przeprowadzone przez *Nikawę et al.* Wykazano w nim zaburzenia w wewnątrzkomórkowym poziomie  $E_2$  (niestety nie zmierzono  $E_1$ ), który był podwyższony w materiale guza [26]. Mimo, że w naszym przypadku nie odnotowaliśmy istotności statystycznej, to jak wcześniej wspomniano, mogliśmy zaobserwować pewne różnice w poziomie estrogenów (Ryc. 78). Rozbieżności w wynikach można tłumaczyć przede wszystkim dwoma przyczynami. Pierwszą jest ograniczona ilość analizowanych próbek. Drugą jest fakt, że badane tkanki często zawierały krew, w której krążą pewne ilości estrogenów (niezależnie od płci czy wieku), co mogło mieć wpływ na otrzymane wyniki [110].

Należy zaznaczyć, że  $E_2$  nie może oddziaływać z komórkami, nie posiadającymi odpowiednich białek receptorowych. Jednak jak opisano w rozdziale 1.3, w przypadku RP udowodniono obecność ER, zarówno izoformy  $\alpha$  jak i  $\beta$  – co sugeruje, że estrogeny mogą inicjować w nich ścieżki sygnalizacyjne [34]–[37]. Z kolei sam mechanizm przekazywania sygnału komórkowego jest skomplikowany i często wymaga zaangażowania dodatkowych koaktywatorów dla receptorów. Jednym z takich białek jest PELP1, który w prawdzie nie uczestniczy bezpośrednio w transkrypcji związanej z odpowiedzią na hormon, ale oddziałuje ze strukturami kompleksu transkrypcyjnego [37], [54]. Dzięki swojej charakterystycznej budowie PELP1 partycypuje w odpowiedzi na  $E_2$  poprzez dwa mechanizmy. W pierwszym łączy się z ER i wspomaga jego transport do jądra oraz wiązanie się go z ERE. W drugim, poprzez utworzenie kompleksu sygnalizacyjnego w cytoplazmie z ER, jest w stanie aktywować szereg komórkowych kinaz, które często są znanymi protoonkogenami (Ryc. 5) [55] [56]. Wyniki zamieszczone na łamach niniejszej rozprawy są zgodne z wieloma badaniami, które z racji jego możliwości molekularnych, opisują PELP1 jako potencjalny protoonkogen. W znaczącej ilości prac pokazano, że ulega on nadekspresji w wielu, zależnych

od estrogenów, typach nowotworów, między innymi jajnika, prostaty i endometrium [9], [57], [58], [60]. Zgodnie z naszą wiedzą, wyniki dotyczące PELP1 zawarte w tej pracy jako pierwsze opisują jego status w RP. Zgodnie z oczekiwaniami wykazano nadekspresję na poziomie białka jak i transkryptu w tkance nowotworowej, w porównaniu do histopatologicznie niezmięnionej. Co więcej, jego podwyższona ekspresja pojawia się w późniejszych stadiach nowotworu, co wydaje się potwierdzać praca *Habashy'ego et al.*, w której poziom PELP1 został skorelowany ze stopniem rozwoju guza i proliferacją komórek [111]. Należy jednak zaznaczyć, że praca *Habashy'ego* dotyczyła badania typowo estrogenozależnego nowotworu, jakim był rak piersi. Nieprawidłowa ilość PELP1 może również wynikać z dostępności E<sub>2</sub>, który jest uważany za jego regulator [112]. Świadczą między o tym prace *Vadlamundi et al.* oraz *Mishr'y et al.* W pierwszej z nich pokazano, że nieprawidłowa ilość PELP1 jest związana z podwyższonym poziomem aromatazy, enzymu, który bezpośrednio zaangażowany jest w powstawanie E<sub>2</sub> z testosteronu [60]. Z kolei w drugiej z nich, przedstawiony jest bezpośredni transkrypcyjny mechanizm regulacji ekspresji PELP1 przez E<sub>2</sub>. Udowodniono to poprzez wykonanie dwóch eksperymentów - bezpośrednią stymulację linii komórkowych przez E<sub>2</sub> oraz wprowadzenie do komórek konstruktów genowych PELP1-lucyferaza, którego działanie opiera się na emisji światła w momencie ekspresji badanego białka. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem linii raka piersi MCF-7 i odnotowano ponad 3 - krotne zwiększenie poziomu PELP1 pod wpływem E<sub>2</sub> [112]. Niestety, w przypadku eksperymentów przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy, nie udało się powtórzyć tego wyniku. W żadnej z badanych linii nie zaobserwowano bezpośredniego wpływu zarówno samego E<sub>2</sub> oraz jego mieszaniny z B(a)P, na ilość transkryptu PELP1 (Ryc. 20 – 31). Jednym z potencjalnych wyjaśnień mogą być podstawowe różnice w cytobiologii poszczególnych linii komórkowych. Pomimo, że każda z wykorzystanych w tej pracy linii komórkowych płuc charakteryzuje się udowodnioną ekspresją ER $\alpha$  i ER $\beta$  [113], [114], to nie jest to najprawdopodobniej ilość wystarczająca, aby wywołać efekt porównywalny do linii MCF-7. W celu potwierdzenia tego domniemanego mechanizmu planujemy w najbliższej przyszłości przeprowadzić eksperymenty z wykorzystaniem ER (+) i ER (-) ustalonych linii raka płuc. Kolejnym powodem braku efektu, wywieranego przez E<sub>2</sub>, na poziom mRNA *PELP1* jest możliwe użycie E<sub>2</sub> w nieodpowiednim stężeniu. Warto zaznaczyć, że w doborze dawki kierowaliśmy się wieloma publikacjami naukowymi, w których wykorzystywano ten związek. Niestety, we wcześniej przytoczonej pracy *Mishr'y et al.* nie zamieszczono

informacji na temat tego, ile wynosiła końcowa koncentracja E<sub>2</sub> użytego w eksperymencie. Przy okazji przeprowadzanych analiz, sprawdzono również wpływ B(a)P na poziom PELP1 – jednak nie odnotowano żadnych istotnych różnic pomiędzy kontrolami a komórkami inkubowanymi z B(a)P, niezależnie od jego dawki.

Jak wielokrotnie wspomniano główną przyczyną powstawania RP jest długotrwała ekspozycja na produkty spalania tytoniu. Mechanizm ten jest dodatkowo intensyfikowany przez zależne od receptora oddziaływanie estrogenów, które poza swoimi ścieżkami sygnalizacyjnymi, mogą być wewnątrzkomórkowo metabolizowane przez enzymy z rodziny cytochromów, w szczególności CYP1A1 oraz CYP1B1 [62]. Jak opisano w rozdziale 1.5, białka te są odpowiedzialne za szereg reakcji metabolicznych, w tym hydroksylację E<sub>2</sub> do jego katecholowych pochodnych – 2-OH E<sub>2</sub> oraz 4-OH E<sub>2</sub>. O ile 2-hydroksylowana pochodna, zgodnie z danymi literaturowymi [115] nie jest szkodliwa, to 4-OH E<sub>2</sub> wykazuje udowodnione działanie genotoksyczne [65]. W niniejszej pracy udało się potwierdzić, że za mechanizm ten może odpowiadać obecność ERβ. Przeprowadzając test kometkowy, a następnie fluorescencyjne barwienie barwnikiem Hoechst 33342, udało się pokazać, że 4-OH E<sub>2</sub> może wiązać się z ERβ, być transportowany do jądra komórkowego i oddziaływać z DNA. Świadczą o tym przede wszystkim ryciny 73 oraz 74, które prezentują barwienie komórek posiadających wyciszony lub powielony ERβ. Na rycinach 74F i 73F możemy zaobserwować znaczące różnice w wyglądzie komórek po elektroforezie – w komórkach, w których wyciszono ERβ, charakterystyczne dla wspomnianego testu, ogony komet są znacznie mniej intensywne (Ryc. 73) niż w przypadku komórek, które posiadały powielony gen *ERS2* (Ryc. 74). Dodatkowo, bardzo delikatną różnicę możemy zauważyć w wyglądzie komórek, które inkubowane były jednocześnie 2.5 μM B(a)P – znanym induktorem CYP1B1 – oraz 10 nM E<sub>2</sub>. W przypadku linii z wyciszonym genem, ogony wydają się być nieco mniej intensywne. Otrzymany wynik świadczy o tym, że 4-OH E<sub>2</sub> może wywierać działanie genotoksyczne poprzez interakcję z ERβ oraz że E<sub>2</sub> może być przekształcane przez CYP1B1 do 4-OH E<sub>2</sub> i następnie transportowane do jądra. Uzyskane rezultaty potwierdzają założenia zaprezentowane w pracach Peng'a *et al.*, Cavalieri'ego *et al.* oraz Roy'a *et al.* [10], [71]–[73]. W niniejszej pracy wykazano również, że (w szczególności) 4-hydroksylowana pochodna E<sub>2</sub> może wywierać hamujący wpływ na proliferację komórek (Ryc. 70; tab. 12) – powyższy efekt uzyskano dla linii Beas-2b, dla stężenia 10nM 4-OH E<sub>2</sub> oraz A549, dla stężenia 10 nM 4-OH E<sub>2</sub> i 5 nM 4-OH E<sub>2</sub>. Mimo,

że nie udało się nam znaleźć prac, opisujących podobne zjawisko na liniach które były używane przez nas, to w badaniach zaprezentowanych przez *Seeger et al.* [116] oraz *Capellino et al.* [117] pokazane jest, że w zależności od dawki, 4-OH E<sub>2</sub> może wykazywać działanie hamujące proliferację komórek. Eksperymenty wykonywane we wspomnianych badaniach były przeprowadzane na innych typach komórek. W eksperymentach *Capellino et al* użyto linii komórkowych monocytów ludzkich, natomiast u *Seeger'a et al.* wykorzystano linie raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB. Należałoby nadmienić, iż wykazano, że efekt antyproliferacyjny zapewniany przez 4-OH E<sub>2</sub> był tak silny jak w przypadku stosowania znanego leku o działaniu estrogenowym – tamoxifenu [116].

CYP1A1 oraz CYP1B1 – białka odpowiedzialne za syntezę katecholowych pochodnych są regulowane poprzez kontakt komórki ze związkami zawartymi w dymie tytoniowym, między innymi WWA, do których należy badany w tej pracy B(a)P [64], [80], [82], [118]. Zgodnie z oczekiwaniami wszystkie linie komórkowe po inkubacji z B(a)P, zareagowały zwiększeniem ilości, zarówno mRNA jak i białek CYP1A1 oraz CYP1B1. Komórki linii nowotworowych charakteryzowały się silną odpowiedzią, wykazując maksymalnie około 65-krotny (Calu-1) i 55-krotny (A549) wzrost *CYP1A1* oraz 17-krotny (Calu-1) i 7-krotny (A549) wzrost *CYP1B1*. Reakcje ze strony komórek BEAS – 2B była o wiele słabsza, lecz wciąż istotna i zauważalna. Zwiększenie ilości transkryptu, potwierdzone zostało zaobserwowaniem zwiększonej ilości białka. Mechanizm ten był wielokrotnie pokazywany z wykorzystaniem różnych typów komórek, szczególnie wątroby, gdzie CYP1A1 oraz CYP1B1 biorą udział w reakcjach I fazy metabolizmu ksenobiotyków [119], [120]. Warto zaznaczyć, że poziom tych białek często koreluje z intensywnością tworzenia się adduktów DNA, które pochodzą nie tylko z metabolizmu E<sub>2</sub>, ale również B(a)P, co może indukować zależną od WWA kancerogenezę i tworzenie się kolejnych mutacji [121], [122]. Jak zademonstrował, w swojej pracy *Tsuchiya et al.* CYP1B1, z racji ERE obecnych w jego sekwencji może być regulowany przez E<sub>2</sub> [62], [123]. Wyniki otrzymane w efekcie naszych eksperymentów nie wykazały wpływu E<sub>2</sub> na poziom zarówno genu jak i białka. Różnice mogą wynikać z opisanych wcześniej różnic pomiędzy liniami komórkowymi. Eksperymenty komórkowe w cytowanej pracy były wykonywane na ER (+) linii raka piersi MCF-7. Aby potwierdzić ten mechanizm w NSCLC, planowane jest



przeprowadzenie eksperymentów z modyfikowanymi ER (+) i ER (-) liniami komórkowymi.

Dzięki aktywności cytochromów p450, a w szczególności CYP1B1, środowisko estrogenowe może oddziaływać synergistycznie ze związkami dymu tytoniowego [9], [10]. Zgodnie z faktem, że większość materiału tkankowego użytego w niniejszych badaniach, była pozyskana od byłych lub obecnych palaczy z długą historią palenia, postanowiliśmy przeprowadzić badanie ilościowe transkryptu i białka CYP1A1 oraz CYP1B1 w materiale klinicznym. Oczekiwaliśmy odnotować zwiększony poziom obu enzymów we fragmentach tkanki nowotworowej (w porównaniu do tkanki niezmięnionej nowotworowo). Mimo to, po wykonaniu odpowiednich testów statystycznych, otrzymaliśmy zupełnie odwrotny wynik. W tkance guza, w porównaniu do odpowiadających próbek histopatologicznie niezmięzionych, zaobserwowano istotnie statystycznie obniżenie ilości transkryptu i białka CYP1B1 oraz transkryptu *CYP1A1*. Zgodnie z naszą wiedzą niewiele jest badań opisujących status powyższych genów i/lub białek w RP. Większość z nich skupia się przede wszystkim na analizie wpływu składników dymu tytoniowego na molekularne właściwości enzymów [10], [63], [64], [98], [124], różnicach w poziomie ich ekspresji w materiale pozyskanym od osób palących lub niepalących [125], [126] czy poszukiwaniu polimorfizmów związanych ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na RP [99], [127], [128]. Nie ma wątpliwości, że nadekspresja, w szczególności CYP1B1, dzięki jego umiejętności metabolizowania E<sub>2</sub> i B(a)P, może mieć prokancerogeny wpływ i odgrywać istotną rolę na początku procesu nowotworzenia i wczesnych fazach życia komórki nowotworowej [10], [64], [98]. Należy jednak podkreślić, że materiał kliniczny wykorzystany w tej pracy, pochodził od pacjentów, którzy byli wieloletnimi palaczami. W związku z długotrwałą i intensywną ekspozycją na dym tytoniowy mogło dojść do zmian w całkowitej metylacji genomu [129], [130]. Jest powszechnie wiadomym, że zaburzenia we wzorze metylacji DNA są często spotykanym zjawiskiem w wielu rodzajach nowotworu. Dotyczy to w szczególności genów supresorowych, których hipermetylacja prowadzi do ich wyciszenia, a co za tym idzie, sprzyja kancerogenezie [129], [130]. Wyniki badań przedstawione przez *Joehanes et al.* Pokazały, że dym tytoniowy silnie wpływa na metylację genomu, która może utrzymać się nawet do kilku lat po zaprzestaniu palenia [129]. Jako że CYP1B1 ma wiele wysp CpG w sekwencji swojego promotora, czyni go to potencjalnie wrażliwym celem do zależnego od metylacji wyciszania genów. *Habano et al.* potwierdził ten mechanizm w raku jelita grubego, pokazując, że ekspresja *CYP1B1*

może być hamowana na drodze hipermetylacji, w tym typie nowotworu [83]. Warto dodać, że obniżony poziom CYP1B1 zaobserwowano również w raku żołądka oraz endometrium [118], [131]. Należy nadmienić, że próbki kontrolne wykorzystane w analizach niniejszej pracy, zostały pobrane od tego samego pacjenta i nawet, jeżeli były niezmienione makroskopowo, pozostały dotknięte zmianami molekularnymi spowodowanymi przez dym tytoniowy, który dostawał się do płuc przez cały okres palenia. Z tego powodu przypuszczamy, że zwiększony poziom CYP1B1 może odgrywać kluczową rolę na początku rozwoju i wczesnych fazach raka, co zostało potwierdzone w pracy *Meireles et al*, natomiast później gen ten może być wyciszony, np. na drodze hipermetylacji [98]. Nasze analizy statystyczne obejmujące ocenę ekspresji w zależności od stadium nowotworu wydają się z tym zgadzać. We wczesnych etapach rozwoju, w tkance nowotworowej, ilość *CYP1B1* nie różni się istotnie od tkanki histopatologicznie niezmienionej. Spadek ekspresji transkryptu następuje dopiero w późniejszych stadiach. Wyniki zaprezentowane przez *Su et al.* sugerują również, że podwyższone ilości CYP1B1 są bardziej charakterystyczne dla 3 i 4 stadium rozwoju nowotworu [82]. Wyniki naszych analiz statystycznych wykazują podobny trend, jednak mimo niewystarczającej liczby przypadków, w niektórych grupach, badanie powinno być poszerzone o większą liczbę testowanych próbek.

Mimo, że 2-OH E<sub>2</sub>, za którego syntezę odpowiada CYP1A1 nie wykazuje znacznej genotoksyczności [65] - co wykazano testem kometkowym (Ryc. 71 – 74), to istnieją prace, które wskazują, że aktywność metaboliczna powyższego enzymu jest istotna również z powodu tworzenia się adduktów DNA, powstałych na skutek przemian WWA, które występowały liczniej w tkankach o wyższej ekspresji *CYP1A1* [126]. W związku z powyższym, należy podkreślić jego potencjalną rolę w kancerogenezie płuc. Wykonane analizy wykazały, że poziom *CYP1A1* (podobnie jak *CYP1B1*) okazał się być obniżony w tkance nowotworowej. Wynikać to z tego, że obydwa geny są regulowane w podobny sposób [95], [119]. Dodatkowo, według badań przeprowadzonych przez *McLemore et al.* poziom białka i transkryptu CYP1A1 bardzo szybko zmienia się pod wpływem dymu tytoniowego, co potwierdzone zostało również w niniejszej pracy, (Ryc. 44 – 55) i równie szybko spada do poziomu prawie niewykrywalnego po zaprzestaniu palenia [124]. Mechanizm ten może być przyczyną odnotowania tak niskiego poziomu mRNA badanego genu. Nie udało nam się jednak uzyskać informacji odnośnie tego, czy pacjenci przed zabiegiem operacyjnym na długo zaprzestali palenia. Innym, bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem są zmiany

w metylacji enhancera genu *CYP1A1*. *Tekpli et al.* w swojej pracy wykazał, że obniżona ekspresja *CYP1A1* w tkance nowotworowej, w porównaniu do histopatologicznie niezmięnionej, może być spowodowana przez zwiększoną metylację sekwencji DNA wspomnianego enhancera *CYP1A1*. Wskazuje to tym samym na potencjalnie większe znaczenie tego produktu tego genu na początku rozwoju nowotworu niż w późniejszych jego stadiach [132].

Poza wspomnianymi mechanizmami należy podkreślić, że głównym regulatorem ekspresji *CYP1A1* oraz *CYP1B1* pozostaje AhR. [63], [64], [74], [82], [98], [133]. Jako, że jest to białko pozbawione aktywności enzymatycznej, nie wiele jest informacji o tym jak regulowana jest jego ekspresja. Jak opisano w rozdziale 1.7, istnieją doniesienia na temat mechanizmów jego aktywacji [95] i inhibicji [89] czy możliwych interakcji z ER [94], jednak tylko pojedyncze prace opisują wpływ hormonów, między innymi glikokortykosteroidów [134] lub E<sub>2</sub> [135] na indukcję ekspresji AhR. Możliwa regulacja ilości AhR przez E<sub>2</sub> wydaje się być szczególnie interesująca ze względu na temat niniejszej pracy. *Kretzschmar et al.* wykorzystując szczury, pokazał że pod wpływem E<sub>2</sub> zwiększa się poziom receptora, szczególnie na poziomie białka [136]. Przeprowadzone przez nas eksperymenty pokazały, że jest to możliwe w komórkach linii nowotworowych A549 oraz Calu-1. W liniach tych odnotowano podwyższony poziom transkryptu *AhR*, we wszystkich czasach inkubacji w przypadku linii Calu-1 (Ryc. 34). Należy jednak podkreślić, że po pierwsze są to zmiany bardzo małe (1.2 – 1.3 razy więcej w porównaniu do kontroli), lecz istotne statystycznie. Warto jednak zaznaczyć, że eksperyment, do którego odniesiono się powyżej, był przeprowadzony na zupełnie innym modelu doświadczalnym, co stanowi powód, dla którego otrzymany przez nas wynik powinien być potwierdzony kolejnymi badaniami. Innym zaskakującym wynikiem było wykazanie, że *AHR* może być hamowany przez B(a)P w komórkach nowotworowych. Jednak jak się okazało, żadne dane literaturowe nie przytaczały podobnych przykładów ani na liniach komórkowych, ani modelu zwierzęcym. Długie poszukiwania zaowocowały jednak odnalezieniem potencjalnego wytłumaczenia tego zjawiska. *Zhang et al.* w swoich badaniach wykazał, że *AHR* na poziomie transkryptu może być hamowany na drodze interakcji DMSO z użytym stymulantem w komórkach gwieździstych wątroby [137]. Przedstawiona obserwacja jest potencjalnym wyjaśnieniem otrzymanego przez nas wyniku, gdyż DMSO zostało wykorzystane jako rozpuszczalnik dla B(a)P – należy jednak zaznaczyć, że jest to powszechnie stosowany, w takich badaniach, solvent i zgodnie z przyjętymi ogólnie standardami jego końcowe stężenie w medium

hodowlanym nie przekraczało 0.1 %. Mimo, że nie możemy potwierdzić regulacji ilości mRNA *AHR* przez B(a)P, to kontrola zarówno aktywności jak i ilości białka jest znana. Za cały proces odpowiada głównie AhRR. Jak opisano w rozdziale 1.7 (Ryc. 9), cząsteczki AhRR i AhR są do siebie strukturalnie podobne, ale mimo braku specyficznej domeny białkowej, AhRR nie jest zdolny do połączenia się z ligandem. Jego główną funkcją jest uniemożliwienie AhR utworzenie kompleksu z XRE, w związku z czym hamowana jest transkrypcja genów zależnych od AhR. Sam receptor jest następnie ubikwitynowany w cytoplazmie i degradowany w proteasomach. Ma to na celu chronić komórkę przed nadmiernym stymulowaniem przez jego agonistów i zapewnić czasową kontrolę nad przekazywaniem sygnału [86], [88], [89]. Uważamy, że udało nam się zaobserwować opisany mechanizm na liniach A549 i Calu-1 (Ryc. 47; Ryc. 51). W komórkach, które poddane były inkubacji z B(a)P, po 72h możemy zaobserwować niższy niż w przypadku 48h, poziom mRNA genu *CYP1A1*, którego głównym regulatorem transkrypcyjnym jest właśnie AhR.

Poziom transkryptu kodującego wspomniany receptor został przez nas zbadany również w materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów ze zdiagnozowanym NSCLC (Ryc. 75). Ze względu na pełnione przez AhR funkcje, sensownym było oczekiwać, że będzie go więcej w tkance guza. Mimo to wykazaliśmy, że w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmięnionej, w tkance nowotworowej poziom *AHR* jest niższy. Niestety niewiele jest badań, do których możemy się odnieść, jednak w pracy *Lin et al.* wykazano zwiększoną ilość AhR w ludzkich nowotworach płuc [138]. Obserwacja ta może wynikać z tego, że w przytoczonej pracy skupiono się głównie na badaniu białka. Jest to wynik całkowicie odwrotny od uzyskanego przez nas, zakładając, że poziom transkryptu musi odpowiadać ilości białka. Jednak istnieje wiele nie do końca poznanych mechanizmów, które mogą powodować takie rozbieżności. Między innymi modyfikacje posttranskrypcyjne, różny czas półtrwania białek, udział mikro RNA lub inne modyfikacje epigenetyczne [129], [139]. Obniżony poziomu transkryptu może być istotny z punktu diagnostyki bądź wyboru potencjalnego markera, podczas gdy poziom białka, które jest funkcjonalnym produktem genu może pomóc prognozować przeżycie lub dostosować strategię leczenia.

B(a)P, który jest jednym z bardziej znanych agonistów AhR, może mieć zróżnicowany wpływ na proliferację komórek. W naszych badaniach wykazaliśmy, że oddziaływanie tego związku może być różne w zależności od testowanej linii komórkowej. W komórkach A549 zaobserwowaliśmy indukcję proliferacji komórkowej,

natomiast w przypadku linii Beas-2b i Calu-1 jej zahamowanie, niezależnie od stężenia i sposobu podania B(a)P. Takie rozbieżności mogą wynikać z podstawowych różnic pomiędzy liniami komórkowymi. Ponadto podobne wyniki zademonstrowano w pracach *Wang'a et al.* [140], *Mao et al.*[141] oraz *Zhu et al.* [142].W dwóch pierwszych przytoczonych pracach pokazano wpływ B(a)P między innymi na proliferację linii komórkowej A549. W obu przypadkach wzrost komórek był szybszy w porównaniu do odpowiedniej kontroli. Wskazano, że za opisane zjawisko mogą być odpowiedzialne, wrażliwe na B(a)P, czynniki związane z remodelowaniem chromatyny – SMARC (ang. *The SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulators of chromatin*) [141] bądź czynniki transkrypcyjne Twist [140].W przytoczonych badaniach pokazano również, że B(a)P wpływa na migrację oraz inwazyjność komórek linii A549. U *Zhu et al.* natomiast testowany był wpływ kurkuminy oraz witaminy E na niekorzystne efekty wywoływane przez B(a)P. W powyższym badaniu udowodniono, co potwierdzają także wyniki naszych eksperymentów, że B(a)P może ograniczać wzrost i aktywność metaboliczną komórek [142].

W niniejszej pracy udało nam się wykazać możliwą synergię oddziaływania  $E_2$ , że składnikiem dymu tytoniowego jakim jest B(a)P. Pobudzona synteza cytochromów przyczynia się do zwiększonej produkcji 4-OH  $E_2$ , który wykazuje działanie genotoksyczne. Proces ten wydaje się być szczególnie istotny na początku kancerogenezy, gdyż może potęgować efekt wywierany przez addukty tworzone przez metabolity B(a)P i powodować liczne pęknięcia nici DNA. Sam  $E_2$ , który jest produkowany zarówno obwodowo jak i w komórkach nowotworowych może przyczyniać się do wzmożonej proliferacji i rozprzestrzeniania się choroby. Inne zaburzenia w ekspresji genów i białek odpowiedzialnych za odpowiedź komórkową związaną z  $E_2$  dodatkowo stymulują rozrost tkanki nowotworowej. Wiele badań wykonanych na rzecz niniejszej pracy zostało wykonanych po raz pierwszy i nie zostało dotąd opisanych. Mimo, że niektóre aspekty wymagają rozszerzeni to stanowią one dobre podstawy do dalszych działań. Zawarte w tej rozprawie informacje pozwalają pogłębić, wciąż niedostateczną wiedzę odnośnie molekularnych aspektów postawania i rozwoju RP. W przyszłości powyższe wyniki badań mogą zostać użyte do poprawy prognozowania, molekularnej diagnostyki i być może leczenia nowotworu płuc.



## 6. Wnioski

- Podwyższony stosunek  $E_2/E_1$  w tkankach nowotworowych może być wynikiem nieprawidłowej ilości enzymów odpowiedzialnych za syntezę estrogenów *in situ*;
- $E_2$  może na stymulować proliferację komórek nowotworowych, wykazując tym samym potencjalne znaczenie w progresji i agresywności nowotworów;
- $E_2$  może indukować wzrost ilości mRNA *AHR* w komórkach nowotworowych, co może wzmacniać odpowiedź komórkową związaną z B(a)P;
- CYP1A1 oraz CYP1B1 w liniach komórkowych raka płuc i prawidłowego nabłonka oddechowego mogą być regulowane za pośrednictwem AhR;
- Mniej intensywna odpowiedź na B(a)P ze strony prawidłowych komórek Beas-2b w porównaniu do A549 i Calu-1, sugeruje, że CYP1A1 i CYP1B1 pełnią bardziej istotną rolę po transformacji nowotworowej komórki, co potencjalnie może mieć wpływ na progresję nowotworu;
- Zarówno B(a)P jak i 4-OH  $E_2$  wywierają szkodliwy wpływ na materiał genetyczny komórek, prowadzący do powstawania pęknięć nici;
- Obecność Er $\beta$  może indukować genotoksyczność powodowaną przez 4-OH  $E_2$ ;
- 4-OH  $E_2$ , w zależności od stężenia może hamować proliferację komórek, zarówno nowotworowych jak prawidłowych, co może być związane z jego toksycznym wpływem;
- Niezależnie od obecności Er $\beta$ , 2-OH  $E_2$  nie wykazuje szkodliwego działania na materiał genetyczny komórki, co sugeruje, że nie jest związkiem genotoksycznym;
- Po transformacji nowotworowej dochodzi w tkankach do obniżenia ilości mRNA *AHR* oraz mRNA i białka CYP1B1 i CYP1A1;
- Po transformacji nowotworowej dochodzi w tkankach do zwiększenia ilości mRNA i białka PELP1;

## Streszczenie

Rak płuca jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie, zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Mimo nieustających postępów w diagnostyce molekularnej i wdrażaniu coraz nowocześniejszych strategii leczenia, co roku stanowi najczęstszą przyczynę śmierci spowodowanej chorobami nowotworowymi u obu płci. Złe rokowania i wysoka umieralność zmuszają do poznania procesów prowadzących do rozwoju tego nowotworu, co pozwoli na znalezienie lepszych metod diagnostycznych, prewencyjnych lub terapeutycznych. Rak płuca jest chorobą kompleksową. Jego powstawanie i rozwój zależą od wielu różnych czynników, zarówno molekularnych jak środowiskowych. Bezdyskusyjną kwestią jest, że główne czynniki zaangażowane we wzrost wspomnianego nowotworu, związane są z długotrwałą ekspozycją na dym tytoniowy lub ksenobiotyki obecne w powietrzu. Pomimo oczywistego, kancerogennego wpływu papierosów na płuca, najnowsze badania podkreślają również istotną rolę hormonów płciowych, w szczególności estrogenów, w postępowaniu tego procesu. W tkance nowotworowej płuca wykazano nieprawidłową ekspresję genów i białek zaangażowanych w syntezę estradiolu *in situ*, między innymi aromatazy i HSD17B1, co prowadziło do zwiększonego poziomu  $E_2$  w komórkach. Hormon ten w wielu liniach komórkowych, wykazujących ekspresję ER, powodował indukcję proliferacji i inwazyjności.  $E_2$  do swojego działania potrzebuje odpowiedniego receptora. Połączenie się  $E_2$  z białkiem skutkuje wywołaniem odpowiedzi komórkowej, związanej z transkrypcją odpowiednich genów i syntezą właściwych białek. Sam proces wspomagany jest przez szereg koaktywatorów, których rolą jest stabilizacja kompleksu transkrypcyjnego stworzonego z receptora i cząsteczki sygnałowej. Jednym z takich białek jest PELP1, który jest ostatnio intensywnie badany i często ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów estrogenozależnych. Sam  $E_2$  może być również metabolizowany przez enzymy z rodziny cytochromów, głównie przez CYP1A1 oraz CYP1B1, do katecholowych pochodnych, które mogą mieć działanie genotoksyczne, związane z tworzeniem się adduktów DNA lub generacją wolnych rodników. Same cytochromy, oprócz  $E_2$  odpowiadają za transformację WWA, związków powszechnie występujących w dymie tytoniowym. Odbywa się to w ramach I i II fazy reakcji detoksykacji. Warto nadmienić, że ilość wspomnianych cytochromów w komórce, zależy ściśle od jej kontaktu z WWA i odbywa się za pośrednictwem receptora AhR, który wiążąc się z XRE, kontroluje ekspresję wspomnianych enzymów. Celem pracy było



głównie zbadanie synergicznego efektu jaki może być wywoływany przez wspólne działanie  $E_2$  oraz powszechnie występującego w dymie tytoniowym B(a)P oraz analiza ekspresji genów i/lub białek CYP1A1, CYP1B1, PELP1, AhR, które niewątpliwie pełnią ważną rolę w tym procesie.

Cel pracy osiągnięto poprzez oznaczenie ilości transkryptu i/lub białka oraz poziomu  $E_1$  i  $E_2$  w materiale klinicznym, który obejmował tkanki nowotworowe oraz histopatologicznie niezmięcone pobrane od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc. Zbadano również genotoksyczność B(a)P,  $E_2$ , jego pochodnych 2-OH  $E_2$  i 4-OH  $E_2$  oraz ich wpływ na proliferację komórek. Sprawdzone także czy B(a)P i/lub  $E_2$  mają wpływ na ekspresję wybranych genów i/lub białek. Aby zrealizować te zadania, wykorzystano następujące metody: w celu określenia ekspresji genów i białek, przeprowadzono ilościowy PCR (qPCR, Real Time PCR), (który był poprzedzony reakcją odwrotnej transkrypcji) oraz western blot. Wpływ badanych substancji na proliferację komórek został oceniony dzięki spektrofotometrycznemu testowi aktywności metabolicznej MTT. Do analizy genotoksyczności wykorzystano test kometkowy, po którym następowało barwienie związkiem fluorescencyjnym Hoechst. Poziom estrogenów w materiale klinicznym został wykonany dzięki wysokosprawnej chromatografii cieczowej/spektrometrii mas, w ramach współpracy z Pracownią Spektrometrii Mas, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

W badaniach stwierdzono statystycznie istotny poziom stosunku  $E_2/E_1$  w tkance nowotworowej w porównaniu do histopatologicznie niezmięconej. Wykazano również stymulujący wpływ B(a)P (A549) oraz  $E_2$  (A549, Calu-1) na proliferację ustalonych linii komórkowych. Dodatkowo zaobserwowano hamujące oddziaływanie B(a)P (Calu-1, Beas-2b) oraz 4-OH- $E_2$  (A549, Beas-2b) na wzrost komórek. Jednym z najważniejszych osiągnięć niniejszej pracy było wykazanie, że genotoksyczność 4-OH  $E_2$  może być zależna od obecności Er $\beta$ . Potwierdzono, że B(a)P może indukować ekspresję CYP1A1 oraz CYP1B1 na poziomie transkryptu jak i białka w komórkach linii A549, Calu-1 i Beas-2b, oraz że mechanizm ten może być później hamowany. Wykazano potencjalny inkucyjny wpływ  $E_2$  na ekspresję *AHR* w liniach A549 oraz Calu -1. W materiale klinicznym, pochodzącym od pacjentów, udało się oznaczyć obniżenie ekspresji *CYP1A1*, *AhR* i CYP1B1 w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmięconej, co sugeruje obecność potencjalnego mechanizmu

inhibicji tych cząsteczek. Wykazano również zwiększenie ilości PELP1 we fragmentach zmienionych nowotworowo. Wszystkie uzyskane wyniki wydają się dowodzić synergii między paleniem papierosów, a przynajmniej oddziaływaniem B(a)P wraz z estrogenami, co niewątpliwie może sprzyjać rozwojowi nowotworu płuc.

## Abstract

Lung cancer is the most commonly diagnosed type of tumor in the world, both in men and women. Despite the ongoing improvements in molecular diagnostics and the implementation of more advanced treatment strategies, it remains the most common cause of cancer death in both sexes. Negative prognosis and high mortality rate force us to learn the processes leading to the development of this type of tumor. Lung cancer is a very complex disease. Its formation and further growth depend on many different molecular and environmental factors. The main threats involved in the origination of lung cancer are related to long-lasting exposition to tobacco smoke or other inhalable xenobiotic present in the air. Despite the visible, cancerogenic impact of cigarette smoke on the lungs, the recent research emphasizes the crucial role of estrogens in the proceeding of cancer formation. Many researchers have demonstrated alternated expression of genes and proteins, i.e., aromatase and HSD17B1, which are involved in the direct *in situ* synthesis of E<sub>2</sub>. This disturbance led to an increased level of E<sub>2</sub> in the cell. This hormone caused the induction of growth and invasiveness of many ER-positive cells. E<sub>2</sub> needs a proper receptor to exert its effect. Binding of the hormone with the protein triggers the molecular response connected with an expression of appropriate genes and proteins. The process is assisted by several coactivators, whose role is to stabilize the transcriptional complex composed of the receptor and E<sub>2</sub>. One of such coactivators is PELP1, which status has been intensively studied in recent times. It has been shown in many studies, that PELP1 is often overexpressed in many estrogen-dependent types of tumors.

Apart from acting in the ER pathway, the E<sub>2</sub> can be metabolized by the enzymes from the cytochrome family, mainly by CYP1A1 and CYP1B1. This process is followed by the synthesis of genotoxic derivatives whose metabolism is associated with the formation of the DNA adducts and free radicals' generation. The cytochromes that are mentioned, beside the E<sub>2</sub> metabolism, are responsible for the enzymatic transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). PAHs are commonly known toxic compounds present in the cigarette smoke. The level of CYP1A1 and CYP1B1 is strictly associated with PAHs interaction with the cell. This process is regulated by AhR. It bounds with XRE sequences which can control the expression of mentioned enzymes.

The main aim of this dissertation was to present the possible cellular impact of the mutual effect exerted by E<sub>2</sub> and B(a)P, which are the typical cigarette smoke compound.

Moreover, we intended to analyze the expression of genes and/or proteins of CYP1A1, CYP1B1, PELP1, and AhR which are crucial for this process.

The goal of the study was reached by analyzing the quantity of mRNA and/or proteins and the level of E1 and E2 in cancer or healthy tissue specimens which were taken from patients with diagnosed non-small cell lung cancer. We also examined the genotoxicity of B(a)P, E<sub>2</sub>, its derivatives 2-OH E<sub>2</sub> and 4-OH E<sub>2</sub> as well as their effect on the cell proliferation. We analyzed the influence of B(a)P and E<sub>2</sub> on the expression of mentioned genes and/or proteins. To accomplish these tasks, we used the following methods; The quantitative PCR (PCR, Real-Time PCR) and western blot reaction were used to analyze the quantity of mRNA and proteins. The influence of examined compounds on cell proliferation was assessed by the spectrophotometrical MTT assay. The comet assay, followed by the Hoechst staining, was performed to analyze the genotoxicity. The level of intracellular estrogens in the tissue material was examined by performing high-efficiency liquid chromatography/mass spectrometry in the Laboratory of Mass Spectrometry in the Institute of Bioorganic Chemistry of Polish Academy of Science.

We established the increased level of E<sub>2</sub>/E<sub>1</sub> ratio in the tumor tissue compared to the histopathologically unchanged material. We also demonstrated the inductive impact of B(a)P (A549) and E<sub>2</sub> (A549, Calu-1) on the proliferation of selected cell lines. Moreover, we showed inhibited growth of selected cells after the B(a)P (Calu-1, Beas-2b) and 4-OH E<sub>2</sub> (A549, Beas-2b) treatment. We also presented that 4-OH E<sub>2</sub>, can be transported by the ER $\beta$  to the nucleus, where it can cause severe DNA damage. We confirmed that B(a)P could enhance the expression of CYP1A1 and CYP1B1 on both transcript and protein level in every examined cell line. We also demonstrated potentially, the inductive impact of E<sub>2</sub> on the expression of *AHR* in the A549 and Calu-1 cells. We marked the decreased expression of *CYP1A1*, *AHR*, CYP1B1 and increased level of PELP1 in the cancer tissue specimens compared to neoplastically unchanged material. All obtained data clearly shows the possible interaction between estrogens and B(a)P which can play a crucial role in the growth and development of lung cancer

**Bibliografia**

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [2] J. Didkowska, U. Wojciechowska, and P. Olasek, “Nowotwory złośliwe w Polsce w 2015 roku Cancer in Poland in 2015,” *Cancer*, 2017.
- [3] M. Dylewska and M. Mikułowska, “Rak płuca w Polsce,” 2016.
- [4] A. G. Schwartz, G. M. Prysak, C. H. Bock, and M. L. Cote, “The molecular epidemiology of lung cancer,” *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 3, pp. 507–518, 2007.
- [5] C. S. Dela Cruz, L. T. Tanoue, and R. A. Matthay, “Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention,” *Clin. Chest Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 605–644, 2011.
- [6] J. H. Lubin and N. E. Caporaso, “Cigarette smoking and lung cancer: Modeling total exposure and intensity,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 15, no. 3, pp. 517–523, 2006.
- [7] R. Doll, “Mortality in relation to smoking: 50 years’ observations on male British doctors,” *Bmj*, vol. 328, no. 7455, pp. 1519–0, 2004.
- [8] S. Ocak, M. L. Sos, R. K. Thomas, and P. P. Massion, “High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications,” *Eur. Respir. J.*, vol. 34, no. 2, pp. 489–506, 2009.
- [9] J. Gasperino, “Gender is a risk factor for lung cancer,” *Med. Hypotheses*, vol. 76, no. 3, pp. 328–331, 2011.
- [10] J. Peng *et al.*, “Estrogen metabolism within the lung and its modulation by tobacco smoke,” *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 4, pp. 909–915, 2013.
- [11] M. K. Verma, Y. Miki, and H. Sasano, “Aromatase in human lung carcinoma,” *Steroids*, vol. 76, no. 8, pp. 759–764, 2011.
- [12] W. L. Miller and R. J. Auchus, “The molecular biology, biochemistry, and

- physiology of human steroidogenesis and its disorders,” *Endocr. Rev.*, vol. 32, no. 1, pp. 81–151, Feb. 2011.
- [13] E. Simpson *et al.*, “The Role of Local Estrogen Biosynthesis in Males and Females,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 11, no. 5, pp. 184–188, 2000.
- [14] “Sources of estrogen and their importance,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 86, no. 3, pp. 225–230, 2003.
- [15] A. A. Rawłuszko, K. Horbacka, P. Krokowicz, and P. Jagodziński, “Decreased expression of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is associated with DNA hypermethylation in colorectal cancer located in the proximal colon,” *BMC Cancer*, vol. 11, no. 1, p. 522, 2011.
- [16] H. Drzewiecka and P. P. Jagodzinski, “Conversion of estrone to 17-beta-estradiol in human non-small-cell lung cancer cells in vitro,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 66, no. 7, pp. 530–534, 2012.
- [17] K. Perżyło, B. Kulik-Rechberger, K. Gałczyński, T. Rechberger “Intrakrynologia a dehydroepiandrosteron – nowe spojrzenie na terapeutyczne zastosowanie androgenów w terapii substytucyjnej u kobiet w okresie menopauzy,” *G. Pol.*, no. 9, pp. 690–695, 2011.
- [18] T. Suzuki, Y. Miki, Y. Nakamura, K. Ito, and H. Sasano, “Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 340, no. 2, pp. 148–153, 2011.
- [19] J. M. Sigfried, L. P. Stabile, J. M. Siegfried, and L. P. Stabile, “Estrogenic steroid hormones in lung cancer,” *Semin Oncol*, vol. 41, no. 1, pp. 5–16, 2014.
- [20] M. K. Verma *et al.*, “Co-expression of estrogen receptor beta and aromatase in Japanese lung cancer patients: Gender-dependent clinical outcome,” *Life Sci.*, vol. 91, no. 15–16, pp. 800–808, 2012.
- [21] M. J. Reed, A. Purohit, L. W. L. Woo, S. P. Newman, and B. V. L. Potter, “Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation, and inhibition,” *Endocr. Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 171–202, 2005.

- [22] T. Utsumi, N. Yoshimura, S. Takeuchi, M. Maruta, K. Maeda, and N. Harada, "Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 73, no. 3–4, pp. 141–145, 2000.
- [23] S. Iida *et al.*, "Steroid sulphatase and oestrogen sulphotransferase in human non-small-cell lung carcinoma.," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 7, pp. 1415–24, 2013.
- [24] K. M. C. Cornel *et al.*, "Overexpression of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increases the exposure of endometrial cancer to 17 $\beta$ -estradiol," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 4, pp. 591–601, 2012.
- [25] H. Drzewiecka, B. Gałęcki, D. Jarmołowska-Jurczyszyn, A. Kluk, W. Dyszkiewicz, and P. P. Jagodziński, "Increased expression of 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in non-small cell lung cancer.," *Lung Cancer*, vol. 87, no. 2, pp. 107–16, 2015.
- [26] H. Niikawa *et al.*, "Intratumoral Estrogens and Estrogen Receptors in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 14, pp. 4417–4426, 2008.
- [27] V. Mah *et al.*, "Aromatase Expression Predicts Survival in Women with Early-Stage Non Small Cell Lung Cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 21, pp. 10484–10490, 2007.
- [28] M. K. Verma *et al.*, "Intratumoral localization and activity of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in non-small cell lung cancer: a potent prognostic factor.," *J. Transl. Med.*, vol. 11, no. 1, p. 167, 2013.
- [29] L. P. Stabile *et al.*, "Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and show biological responses to estrogen," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 7, pp. 2141–2150, 2002.
- [30] J. M. Siegfried, "Smoking out reproductive hormone actions in lung cancer.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 12, no. January, pp. 24–31, 2014.
- [31] N. Ramnath *et al.*, "Hormone replacement therapy as a risk factor for non-small cell lung cancer: results of a case-control study.," *Oncology*, vol. 73, no. 5–6, pp. 305–10, 2007.

- [32] O. Ayeni and A. Robinson, "Hormone replacement therapy and outcomes for women with non-small-cell lung cancer: can an association be confirmed?," *Curr. Oncol.*, vol. 16, no. 3, pp. 21–25, 2009.
- [33] R. T. Chlebowski *et al.*, "Oestrogen plus progestin and lung cancer in postmenopausal women (Women's Health Initiative trial): a post-hoc analysis of a randomised controlled trial," *Lancet*, vol. 374, no. 9697, pp. 1243–1251, 2009.
- [34] P. a Hershberger *et al.*, "Estrogen receptor beta (ERbeta) subtype-specific ligands increase transcription, p44/p42 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 116, no. 1–2, pp. 102–109, 2009.
- [35] K. Abe *et al.*, "Highly concordant coexpression of aromatase and estrogen receptor beta in non-small cell lung cancer.," *Hum. Pathol.*, vol. 41, no. 2, pp. 190–198, 2010.
- [36] V. Mah *et al.*, "Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 74, no. 2, pp. 318–325, 2011.
- [37] D. C. Márquez-Garbán, H.-W. Chen, M. C. Fishbein, L. Goodglick, and R. J. Pietras, "Estrogen receptor signaling pathways in human non-small cell lung cancer.," *Steroids*, vol. 72, pp. 135–143, 2007.
- [38] R. J. Pietras, D. C. Márquez, H.-W. Chen, E. Tsai, O. Weinberg, and M. Fishbein, "Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells.," *Steroids*, vol. 70, no. 5–7, pp. 372–381, 2005.
- [39] K. M. McNamara and H. Sasano, "The intracrinology of breast cancer," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 145, pp. 172–178, 2015.
- [40] T. Yamamoto *et al.*, "Estrogen productivity of endometrium and endometrial cancer tissue; influence of aromatase on proliferation of endometrial cancer cells," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 44, no. 4–6, pp. 463–468, 1993.
- [41] G. G. Chen, Q. Zeng, and G. M. K. Tse, "Estrogen and its receptors in cancer," *Med. Res. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 954–974, 2008.



- [42] C. Patrone *et al.*, “Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 23, pp. 8542–52, 2003.
- [43] A. Morani *et al.*, “Lung dysfunction causes systemic hypoxia in estrogen receptor beta knockout (ERbeta<sup>-/-</sup>) mice.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 18, pp. 7165–9, 2006.
- [44] H. Kawai *et al.*, “Combined overexpression of EGFR and estrogen receptor alpha correlates with a poor outcome in lung cancer.,” *Anticancer Res.*, vol. 25, pp. 4693–4698, 2005.
- [45] Z. Luo, R. Wu, Y. Jiang, Z. Qiu, W. Chen, and W. Li, “Overexpression of estrogen receptor beta is a prognostic marker in non-small cell lung cancer: A meta-analysis,” *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 6, pp. 8686–8697, 2015.
- [46] L. P. Stabile *et al.*, “Combined analysis of estrogen receptor  $\alpha$ -1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 154–164, 2011.
- [47] K. Zielniok, M. Gajewska, and T. Motyl, “Molekularne aspekty działania 17 $\beta$ -estradiolu i progesteronu w komórkowych szlakach sygnałowych.,” *Postepy Hig Med Dosw* pp. 777–792, 2014.
- [48] A. Lachowicz-Ochedalska, “Membrane receptors for estradiol--new way of biological action,” *Endokrynol. Pol.*, vol. 56, no. 3, pp. 322–326, 2005.
- [49] S. Safe and M. Abdelrahim, “Sp transcription factor family and its role in cancer.,” *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 16, pp. 2438–2448, Nov. 2005.
- [50] L. Bjornstrom and M. Sjoberg, “Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes.,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 19, no. 4, pp. 833–842, Apr. 2005.
- [51] T. Simoncini and A. R. Genazzani, “Non-genomic actions of sex steroid hormones,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 148, no. 3, pp. 281–292, 2003.
- [52] G. Q. Du, L. Zhou, X. Y. Chen, X. P. Wan, and Y. Y. He, “The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative and invasive effects induced by hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, vol. 420, no. 2, pp. 343–349, 2012.
- [53] D. C. Marquez-Garban *et al.*, “Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer,” *Steroids*, vol. 76, no. 9, pp. 910–920, 2011.
- [54] S. Balasenthil and R. K. Vadlamudi, “Functional interactions between the estrogen receptor coactivator PELP1/MNAR and retinoblastoma protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 24, pp. 22119–22127, 2003.
- [55] D. W. Brann, Q.-G. Zhang, R.-M. Wang, V. B. Mahesh, and R. K. Vadlamudi, “PELP1--a novel estrogen receptor-interacting protein.,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 290, no. 1–2, pp. 2–7, Aug. 2008.
- [56] B. J. Girard, A. R. Daniel, C. A. Lange, and J. H. Ostrander, “PELP1: A review of PELP1 interactions, signaling, and biology,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, no. 1, pp. 642–651, 2014.
- [57] C. Dimple *et al.*, “Role of PELP1/MNAR signaling in ovarian tumorigenesis.,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 12, pp. 4902–4909, Jun. 2008.
- [58] S. Nair and R. K. Vadlamudi, “Emerging significance of ER-coregulator PELP1/MNAR in cancer.,” *Histol. Histopathol.*, vol. 22, no. 1, pp. 91–96, Jan. 2007.
- [59] R. K. Vadlamudi *et al.*, “Functional implications of altered subcellular localization of PELP1 in breast cancer cells.,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 17, pp. 7724–7732, Sep. 2005.
- [60] R. K. Vadlamudi *et al.*, “Regulation of aromatase induction by nuclear receptor coregulator PELP1.,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 118, no. 4–5, pp. 211–218, Feb. 2010.
- [61] R. F. Service, “New Role for Estrogen in Cancer?,” *Science (80-. )*, vol. 279, no. 5357, pp. 1631 LP – 1633, Mar. 1998.
- [62] Y. Tsuchiya, M. Nakajima, and T. Yokoi, “Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human,” *Cancer Lett.*, vol. 227, no. 2, pp. 115–124, 2005.

- [63] L. C. Kuo, L. C. Cheng, C. J. Lin, and L. A. Li, "Dioxin and estrogen signaling in lung adenocarcinoma cells with different aryl hydrocarbon receptor/estrogen receptor  $\alpha$  phenotypes," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 49, no. 6, pp. 1064–1073, 2013.
- [64] J. L. Port *et al.*, "Tobacco smoke induces CYP1B1 in the aerodigestive tract," *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 11, pp. 2275–2281, 2004.
- [65] J. G. Liehr, F. Wan-Fen, D. A. Sirbasku, and A. Ari-Ulubelen, "Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters," *J. Steroid Biochem.*, vol. 24, no. 1, pp. 353–356, 1986.
- [66] J. J. Li and S. A. Li, "Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism," *Fed. Proc.*, vol. 46, no. 5, p. 1858—1863, 1987.
- [67] Z. Chen *et al.*, "Estrogen promotes benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenesis through oxidative stress damage and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathways in female mice," *Cancer Lett.*, vol. 308, no. 1, pp. 14–22, 2011.
- [68] N. Rajapakse, M. Butterworth, and A. Kortenkamp, "Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 45, no. 4, pp. 397–404, 2005.
- [69] A. R. Belous, D. L. Hachey, S. Dawling, N. Roodi, and F. F. Parl, "Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 812–817, 2007.
- [70] K. Oracz, "Hydroxyl radical – small molecule of a great importance in plant cell biology," *Postepy Biologii Komorki*, vol. 4, no. 4, pp. 707–726, 2015.
- [71] E. Cavalieri, K. Frenkel, J. G. Liehr, E. Rogan, and D. Roy, "Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations," *J Natl Cancer Inst Monogr*, no. 27, pp. 75–93, 2000.
- [72] D. Roy and J. G. Liehr, "Estrogen, DNA damage and mutations," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 424, no. 1–2, pp. 107–115, 1999.
- [73] E. Cavalieri *et al.*, "Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other

- human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1766, no. 1, pp. 63–78, 2006.
- [74] X. Yang *et al.*, “Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 104, no. 2, pp. 402–417, 2008.
- [75] G. Murray, W. Melvin, W. Greenlee and M. Burke  
“REGULATION, FUNCTION, AND TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF CYTOCHROME P450 CYP1B1” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001.  
41:297–316 vol. 60, no. 08, pp. 301–321, 2008.
- [76] A. SAPOTA, “Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne,” vol. 2, no. 2, pp. 179–206, 2002.
- [77] J. G. M. Van Rooij, E. M. A. Van Lieshout, M. M. Bodelier-Bade, and F. J. Jongeneelen, “Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons,” *Scand. J. Work. Environ. Heal.*, vol. 19, no. 3, pp. 200–207, 1993.
- [78] S. W. Ashurst and G. M. Cohen, “A benzo[a]pyrene -7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide is the major metabolite involved in the binding of benzo[a]pyrene to DNA in isolated viable rat hepatocytes,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 29, no. 1, pp. 117–127, 1980.
- [79] H. Jiang, S. L. Gelhaus, D. Mangal, R. G. Harvey, I. A. Blair, and T. M. Penning, “Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 20, no. 9, pp. 1331–1341, 2007.
- [80] J. T. Chang, H. Chang, P.-H. Chen, S.-L. Lin, and P. Lin, “Requirement of Aryl Hydrocarbon Receptor Overexpression for CYP1B1 Up-Regulation and Cell Growth in Human Lung Adenocarcinomas,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 38–45, 2007.
- [81] U. M. Zanger and M. Schwab, “Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic

- variation,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 138, no. 1, pp. 103–141, 2013.
- [82] J.-M. Su, P. Lin, C.-K. Wang, and H. Chang, “Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target,” *Anticancer Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 509–15, 2009.
- [83] W. Habano, T. Gamo, T. Sugai, K. Otsuka, G. Wakabayashi, and S. Ozawa, “CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers,” *Int. J. Oncol.*, vol. 34, no. 4, pp. 1085–91, Apr. 2009.
- [84] J. R. Petrusis and G. H. Perdew, “The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 141, no. 1–2, pp. 25–40, Sep. 2002.
- [85] E. V. Hestermann, J. J. Stegeman, and M. E. Hahn, “Relative contributions of affinity and intrinsic efficacy to aryl hydrocarbon receptor ligand potency,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 168, no. 2, pp. 160–172, 2000.
- [86] R. Noakes, “The aryl hydrocarbon receptor: a review of its role in the physiology and pathology of the integument and its relationship to the tryptophan metabolism,” *Int. J. Tryptophan Res.*, vol. 8, pp. 7–18, 2015.
- [87] L. Larigot, L. Juricek, J. Dairou, and X. Coumoul, “ScienceDirect AhR signaling pathways and regulatory functions,” *Biochim. Open*, vol. 7, pp. 1–9, 2018.
- [88] DW. Nebert, Timothy P. Dalton, Allan B. Okey, and Frank J. Gonzalez, “Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer,” *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 279, No. 23, Issue of June 4, pp. 23847–23850, 2004
- [89] B. R. Evans *et al.*, “Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 73, no. 2, pp. 387–398, Feb. 2008.
- [90] F. Matsumura, “The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 4, pp. 608–626, 2009.
- [91] L. Larigot, L. Juricek, J. Dairou, and X. Coumoul, “ScienceDirect AhR signaling

- pathways and regulatory functions,” *Biochim. Open*, vol. 7, pp. 1–9, 2018.
- [92] F. Matsumura, “The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 4, pp. 608–626, 2009.
- [93] S. Safe and M. Wormke, “Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 16, no. 7, pp. 807–816, Jul. 2003.
- [94] J. Matthews and J.-Åke Gustafsson, “Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways,” *Nuclear Receptor Signaling*, DOI:10.1621/nrs.04016, vol. 4, 2006.
- [95] J. Matthews, B. Wihlen, J. Thomsen, and J.-A. Gustafsson, “Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 13, pp. 5317–5328, Jul. 2005.
- [96] T. V Beischlag and G. H. Perdew, “ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 22, pp. 21607–21611, Jun. 2005.
- [97] J. C. Willey *et al.*, “2B7, Microsomal Epoxide Hydrolase, and NADPH Oxidoreductase Expression in Lung Cells of Smokers and Nonsmokers,” *Cell*, no. 1, 1997.
- [98] S. I. Meireles *et al.*, “Early changes in gene expression induced by tobacco smoke: Evidence for the importance of estrogen within lung tissue,” *Cancer Prev. Res.*, vol. 3, no. 6, pp. 707–717, 2010.
- [99] B. Chen *et al.*, “The CYP1B1 Leu432Val polymorphism contributes to lung cancer risk: Evidence from 6501 subjects,” *Lung Cancer*, vol. 70, no. 3, pp. 247–252, 2010.
- [100] A. Wrona and J. Jassem, “Nowa klasyfikacja TNM w raku płuca,” *Pneumonol. Alergol. Pol.*, vol. 78, no. 6, pp. 407–417, 2010.
- [101] P. Chomczynski and N. Sacchi, “Single-step method of RNA isolation by acid

- guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,” *Anal. Biochem.*, vol. 162, no. 1, pp. 156–159, Apr. 1987.
- [102] B. J. S. C. Olson and J. Markwell, “Assays for Determination of Protein Concentration,” *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 38, no. 1, p. A.3A.1-A.3A.29, 2007.
- [103] H. A. Powell, B. Iyen-Omofoman, R. B. Hubbard, D. R. Baldwin, and L. J. Tata, “The association between smoking quantity and lung cancer in men and women,” *Chest*, vol. 143, no. 1, pp. 123–129, 2013.
- [104] a Papadopoulos *et al.*, “Heavy smoking and lung cancer: are women at higher risk? Result of the ICARE study.,” *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 5, pp. 1385–91, 2014.
- [105] S. De Matteis *et al.*, “Are women who smoke at higher risk for lung cancer than men who smoke?,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 177, no. 7, pp. 601–612, 2013.
- [106] N. Kazmi *et al.*, “The role of estrogen, progesterone and aromatase in human non-small-cell lung cancer.,” *Lung Cancer Manag.*, vol. 1, no. 4, pp. 259–272, 2012.
- [107] Z. Hammoud, B. Tan, S. Badve, and R. M. Bigsby, “Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 15, no. 2, pp. 475–483, 2008.
- [108] S. M. Dougherty, “Gender difference in the activity but not expression of estrogen receptors and in human lung adenocarcinoma cells,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 13, no. 1, pp. 113–134, 2006.
- [109] M. J. Jarzynka, P. Guo, I. Bar-Joseph, B. Hu, and S.-Y. Cheng, “Estradiol and nicotine exposure enhances A549 bronchioloalveolar carcinoma xenograft growth in mice through the stimulation of angiogenesis.,” *Int. J. Oncol.*, vol. 28, no. 2, pp. 337–344, Feb. 2006.
- [110] E. Carmina, F. Z. Stanczyk, and R. A. Lobo, “Chapter 34 - Evaluation of Hormonal Status,” in *Yen and Jaffe’s Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*, Eighth Edi., J. F. Strauss and R. L. Barbieri, Eds. Philadelphia: Content

- Repository Only!, 2019, pp. 887-915.e4.
- [111] H. O. Habashy *et al.*, “The prognostic significance of PELP1 expression in invasive breast cancer with emphasis on the ER-positive luminal-like subtype,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 120, no. 3, pp. 603–612, 2010.
- [112] S. K. Mishra, S. Balasenthil, D. Nguyen, and R. K. Vadlamudi, “Cloning and functional characterization of PELP1/MNAR promoter,” *Gene*, vol. 330, pp. 115–122, 2004.
- [113] E. B. Garon *et al.*, “Antiestrogen Fulvestrant Enhances the Antiproliferative Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Human Non–Small-Cell Lung Cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 8, no. 3, pp. 270–278, 2013.
- [114] S. Mollerup, K. Jørgensen, G. Berge, and A. Haugen, “Expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in human lung tissue and cell lines,” *Lung Cancer*, vol. 37, no. 2, pp. 153–159, 2002.
- [115] B. T. Zhu and A. H. Conney, “Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives,” *Carcinogenesis*, vol. 19, no. 1, pp. 1–27, Jan. 1998.
- [116] H. Seeger, J. Huober, D. Wallwiener, and A. O. Mueck, “Inhibition of human breast cancer cell proliferation with estradiol metabolites is as effective as with tamoxifen,” *Horm. Metab. Res. = Horm. und Stoffwechselforsch. = Horm. Metab.*, vol. 36, no. 5, pp. 277–280, May 2004.
- [117] S. Capellino *et al.*, “Hydroxylated estrogen metabolites influence the proliferation of cultured human monocytes : possible role in synovial tissue hyperplasia,” *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2008; 26: 903-909
- [118] I. Spyrou *et al.*, “Expression profile of CYP1A1 and CYP1B1 enzymes in endometrial tumors,” *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 10, pp. 9549–9556, Oct. 2014.
- [119] S. D. Spivack, G. J. Hurteau, M. J. Fasco, and L. S. Kaminsky, “Phase I and II Carcinogen Metabolism Gene Expression in Human Lung Tissue and Tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 16 I, pp. 6002–6011, 2003.
- [120] J. A. Harrigan, B. P. McGarrigle, T. R. Sutter, and J. R. Olson, “Tissue specific



- induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene,” *Toxicol. Vitr.*, vol. 20, no. 4, pp. 426–438, 2006.
- [121] J. A. Harrigan *et al.*, “DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene,” *Toxicol. Sci.*, vol. 77, no. 2, pp. 307–314, Feb. 2004.
- [122] J. A. Harrigan, B. P. McGarrigle, T. R. Sutter, and J. R. Olson, “Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene,” *Toxicol. Vitr.*, vol. 20, no. 4, pp. 426–438, 2006.
- [123] Y. Tsuchiya, M. Nakajima, S. Kyo, T. Kanaya, M. Inoue, and T. Yokoi, “Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 9, pp. 3119–3125, May 2004.
- [124] T. L. McLemore *et al.*, “Expression of CYP1A1 Gene in Patients With Lung Cancer: Evidence for Cigarette Smoke-Induced Gene Expression in Normal Lung Tissue and for Altered Gene Regulation in Primary Pulmonary Carcinomas,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, no. 16, pp. 1333–1339, 1990.
- [125] S. D. Spivack, G. J. Hurteau, a a Reilly, K. M. Aldous, X. Ding, and L. S. Kaminsky, “CYP1B1 expression in human lung,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 29, no. 6, pp. 916–922, 2001.
- [126] S. Mollerup, D. Ryberg, A. Hewer, D. H. Phillips, and A. Haugen, “Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 14, pp. 3317–3320, 1999.
- [127] F. Li, S. Zhang, Q. Zhang, J. Li, S. Zhao, and C. Gu, “CYP1B1 G199T Polymorphism Affects Prognosis of NSCLC Patients with the Potential to Be an Indicator and Target for Precise Drug Intervention,” *BioMed Research International* vol. 2017,
- [128] Z. Chen *et al.*, “The effect of CYP1A1 polymorphisms on the risk of lung cancer: a global meta-analysis based on 71 case-control studies,” *Mutagenesis*, vol. 26, no. 3, pp. 437–446, May 2011.

- [129] R. Joehanes *et al.*, “Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking,” *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 9, no. 5, pp. 436–447, 2016.
- [130] S. Ambatipudi *et al.*, “Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study,” *Epigenomics*, vol. 8, no. 5, pp. 599–618, 2016.
- [131] G. H. Kang *et al.*, “DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis,” *Lab. Invest.*, vol. 88, no. 2, pp. 161–70, Feb. 2008.
- [132] X. Tekpli, S. Zienolddiny, V. Skaug, L. Stangeland, A. Haugen, and S. Mollerup, “DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung,” *Int. J. Cancer*, vol. 131, no. 7, pp. 1509–1516, 2012.
- [133] R. D. Bruno and V. C. O. Njar, “Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 15, no. 15, pp. 5047–5060, 2007.
- [134] K. A. Bielefeld, C. Lee, and D. S. Riddick, “Regulation of aryl hydrocarbon receptor expression and function by glucocorticoids in mouse hepatoma cells,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 36, no. 3, pp. 543–551, Mar. 2008.
- [135] G. Kretzschmar *et al.*, “Estradiol regulates aryl hydrocarbon receptor expression in the rat uterus,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 321, no. 2, pp. 253–257, 2010.
- [136] G. Kretzschmar *et al.*, “Estradiol regulates aryl hydrocarbon receptor expression in the rat uterus,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 321, no. 2, pp. 253–257, 2010.
- [137] H. F. Zhang *et al.*, “Regulation of the activity and expression of aryl hydrocarbon receptor by ethanol in mouse hepatic stellate cells,” *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 1873–1881, Nov. 2012.
- [138] Pinpin Lin *et al.*, “Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 31, no. 1, pp. 22–30, 2003.
- [139] D. Greenbaum, C. Colangelo, K. Williams, and M. Gerstein, “Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale,” *Genome Biol.*,

vol. 4, no. 9, p. 117, 2003.

- [140] Y. Wang, W. Zhai, H. Wang, X. Xia, and C. Zhang, “Benzo(a)pyrene promotes A549 cell migration and invasion through up-regulating Twist,” *Arch. Toxicol.*, vol. 89, no. 3, pp. 451–458, 2015.
- [141] C. Mao *et al.*, “Aryl hydrocarbon receptor activated by benzo (a) pyrene promotes SMARCA6 expression in NSCLC,” *Am. J. Cancer Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 1214–1227, 2018.
- [142] W. Zhu, M. M. Cromie, Q. Cai, T. Lv, K. Singh, and W. Gao, “Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzo[a]pyrene in lung epithelial cells,” *PLoS One*, vol. 9, no. 3, pp. 1–11, 2014.