



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

**Kamila Boszkiewicz**

**Wpływ wybranych ksenoestrogenów i hiperglikemii na aktywność  
inhibitorów aromatazy w badaniach modelowych *in vitro***

Effect of metalloestrogens and hyperglycemia on the effectiveness of  
aromatase inhibitors in a hormone-dependent breast cancer  
cell model

Rozprawa doktorska  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Promotor:

**prof. dr hab. Agnieszka Piwowar**

Katedra i Zakład Toksykologii

Wrocław 2023

## STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u kobiet, w 2020 roku zdiagnozowano go u ponad 2,3 miliona pacjentek na świecie i szacuje się, że liczba ta wzrośnie w 2040 roku do ponad 3 milionów. Nawet jedna trzecia pacjentek z rakiem piersi, choruje również na cukrzycę. Cukrzyca i hiperglikemia nie tylko zwiększają ryzyko rozwoju raka piersi, ale także wiążą się z wyższym o 40% ryzykiem zgonu w porównaniu do pacjentek bez cukrzycy. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem, dotychczas uznane czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi, m.in. genetyczne, hormonalne, ekspozycja na promieniowanie jonizujące, czy wspomniana już cukrzyca, odpowiadają za niecałe 37% przypadków nowotworów piersi, co skłania do dalszych badań nad rolą innych czynników, np. zanieczyszczeń środowiska, czy ksenoestrogenów w jego patogenezie. Ksenoestrogeny to substancje egzogenne, które mogą naśladować działanie estrogenów. W leczeniu hormonozależnego raka piersi, który jest najczęściej diagnozowanym podtypem, podstawą leczenia jest hormonoterapia mająca na celu wyeliminowanie pobudzającego działania estrogenów na komórki nowotworowe. Jednocześnie pacjentki stosujące terapię endokrynną (np. inhibitorami aromatazy) narażone są na występujące powszechnie w codziennym środowisku życia ksenoestrogeny, których wpływ na skuteczność leków stosowanych w hormonoterapii w dużej mierze pozostaje nieznany.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena wpływu wybranych ksenoestrogenów – jonów metali  $Cr^{3+}$  i  $Al^{3+}$ , obecnych m.in. w suplementach diety (chrom), czy antyperspirantach (glin) na skuteczność inhibitorów aromatazy (letrozolu i eksemestanu), podstawowej grupy leków stosowanych w hormonoterapii raka piersi u pacjentek po menopauzie. Dodatkowo oceniono, czy ewentualna interakcja pomiędzy lekami a metaloestrogenami różni się w zależności od panujących w modelu komórkowym warunków, odzwierciedlających normo- i hiperglikemię. Poddano również ocenie profil bezpieczeństwa inhibitorów aromatazy, ze szczególnym uwzględnieniem występowania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (np. hiperglikemii) oraz ze strony układu sercowo-naczyniowego.

W ramach pracy wykonano badania na modelu komórkowym hormonozależnego raka piersi - liniach komórkowych MCF-7 oraz MCF-7/DOX (linia oporna na doksorubicynę), eksponowanych na wybrane metaloestrogeny, leki oraz ich kombinacje w warunkach normo- i hiperglikemii. Skuteczność inhibitorów aromatazy stosowanych pojedynczo, bądź łącznie z metaloestrogenami, oceniono wykonując test żywotności komórek, cytometryczną ocenę apoptozy, nekrozy, analizę cyklu komórkowego oraz ilościowy pomiar stężeń białek

zaangażowanych w proces apoptozy (Bcl-2, BAX) i angiogenezy (VEGF-A). Profil bezpieczeństwa inhibitorów aromatazy oceniono wykonując przegląd systematyczny i metaanalizę działań niepożądanych raportowanych w badaniach klinicznych.

Przeprowadzone badania wykazały, że w warunkach odzwierciedlających normoglikemię, kombinacja inhibitorów aromatazy z metaloestrogenami, w obu liniach komórkowych, może prowadzić do zmniejszenia aktywności leków, co obserwowano jako zwiększenie żywotności komórek nowotworowych, zmniejszenie liczby komórek ulegających apoptozie i nekrozie, wzrost stężenia białka antyapoptotycznego Bcl-2 (co skutkowało wzrostem współczynnika Bcl-2/BAX), a także wzrost stężenia VEGF-A. Wykazano ponadto, że zmniejszenie aktywności inhibitorów aromatazy pod wpływem metaloestrogenów, nie było związane z ich wpływem na cykl komórkowy. W warunkach hiperglikemii, w obu liniach komórkowych, jednoczesna ekspozycja na metaloestrogeny i inhibitory aromatazy nie zmniejszała istotnie działania leków (nie zwiększała żywotności komórek nowotworowych, nie zmniejszała odsetka komórek ulegających apoptozie/nekrozie, nie zwiększała współczynnika Bcl-2/BAX). Jednocześnie obserwowano znacznie mniejszą aktywność leków przy wysokim stężeniu glukozy panującym w modelu komórkowym. Bezpośrednie porównanie wyników otrzymanych w warunkach normo- i hiperglikemii wskazuje, iż na efektywność inhibitorów aromatazy większy wpływ ma wysokie stężenie glukozy obecne w modelu komórkowym, niż ich kombinacja z metaloestrogenami. Wyniki wykonanego przeglądu systematycznego i metaanalizy dostarczyły natomiast dowodów na zwiększone ryzyko występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych, a także na możliwe występowanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej (hiperglikemii, cukrzycy) w czasie leczenia inhibitorami aromatazy.

Uzyskane wyniki wskazują, że obecne w codziennym środowisku życia człowieka metaloestrogeny, mogą w warunkach normoglikemii negatywnie wpływać na skuteczność leków stosowanych w hormonoterapii. Potrzebne są dalsze badania, aby w pełni wyjaśnić wykazane interakcje i móc im skutecznie zapobiegać. Otrzymane wyniki wskazują również na kluczową rolę hiperglikemii w obniżaniu efektywności inhibitorów aromatazy. Stale rosnąca liczba chorych na cukrzycę, a co za tym idzie także wzrost liczby pacjentek jednocześnie zmagających się z cukrzycą i nowotworem piersi sprawia, że leczenie raka piersi u takich pacjentek staje się sporym wyzwaniem klinicznym. Biorąc pod uwagę fakt, że główną grupą pacjentek stosującą inhibitory aromatazy są pacjentki po menopauzie oraz uzyskane w badaniach wyniki, wydaje się, że systematyczne monitorowanie glikemii w trakcie hormonoterapii może być jednym ze sposobów na kontrolowanie jej skuteczności.

## SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer diagnosed among women, in 2020 it was diagnosed in over 2.3 million patients worldwide and it is estimated that this number will increase to over 3 million in 2040. Up to one-third of breast cancer patients also have diabetes. Diabetes and hyperglycemia not only increase the risk of developing breast cancer, but are also associated with a 40% higher risk of death compared to patients without diabetes. According to the International Agency for Research on Cancer, previously recognized risk factors for breast cancer, including genetic, hormonal, exposure to ionizing radiation, or the aforementioned diabetes, are responsible for less than 37% of breast cancer cases, which prompts further research into the role of other factors, such as environmental pollution or xenoestrogens, in its pathogenesis. Xenoestrogens are exogenous substances that can mimic the action of estrogens. In the treatment of hormone-dependent breast cancer, which is the most frequently diagnosed subtype of breast cancer, the basis of treatment is hormone therapy the purpose of which is to eliminate the stimulating effect of estrogens on cancer cells. At the same time, patients using endocrine therapy (e.g. aromatase inhibitors) are exposed to xenoestrogens, commonly found in the everyday environment, whose impact on the effectiveness of drugs used in hormone therapy remains largely unknown.

The aim of this doctoral dissertation was to assess the impact of selected xenoestrogens - metal ions  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ , present, among others, in dietary supplements (chromium) or antiperspirants (aluminum) on the effectiveness of aromatase inhibitors (letrozole and exemestane), the basic group of drugs used in hormone therapy of breast cancer in postmenopausal patients. In addition, it was assessed whether the possible interaction between drugs and metalloestrogens differs depending on the conditions prevailing in the cell model, reflecting normo- and hyperglycemia. The safety profile of aromatase inhibitors was also assessed, with particular emphasis on the occurrence of carbohydrate metabolism disorders (e.g. hyperglycemia) and cardiovascular system disorders.

Studies were performed on a cellular model of hormone-dependent breast cancer - MCF-7 and MCF-7/DOX cell lines (doxorubicin-resistant line), exposed to selected metalloestrogens, drugs and their combinations in conditions of normo- and hyperglycemia. The effectiveness of aromatase inhibitors used alone or in combination with metalloestrogens was assessed by performing a cell viability test, cytometric assessment of apoptosis, necrosis, cell cycle analysis and quantitative measurement of the concentration of proteins involved in the process of apoptosis (Bcl-2, BAX) and angiogenesis (VEGF-A). The safety profile of aromatase inhibitors

was assessed by performing a systematic review and meta-analysis of adverse events reported in clinical trials.

The conducted studies have shown that under conditions reflecting normoglycemia, the combination of aromatase inhibitors with metalloestrogens in both cell lines may lead to a decrease in drug activity, which was observed as an increase in the viability of cancer cells, a decrease in the number of cells undergoing apoptosis and necrosis, an increase in the concentration of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (resulting in an increase in the Bcl-2/BAX ratio), as well as an increase in VEGF-A concentration. It was also shown that the decrease in the activity of aromatase inhibitors under the influence of metalloestrogens was not related to their effect on the cell cycle. Under hyperglycemic conditions, in both cell lines, simultaneous exposure to metalloestrogens and aromatase inhibitors did not significantly reduce the effect of drugs (it did not increase the viability of cancer cells, did not reduce the percentage of cells undergoing apoptosis/necrosis, did not increase the Bcl-2/BAX ratio). At the same time, significantly lower drug activity was observed at high glucose concentrations prevailing in the cellular model. A direct comparison of the results obtained in the conditions of normo- and hyperglycemia indicates that the effectiveness of aromatase inhibitors is more influenced by the high concentration of glucose present in the cellular model than their combination with metalloestrogens. The results of the systematic review and meta-analysis provided evidence of an increased risk of cardiovascular events, as well as the possible occurrence of carbohydrate metabolism disorders (hyperglycemia, diabetes) during treatment with aromatase inhibitors.

The obtained results indicate that metalloestrogens present in the everyday environment of human life may negatively affect the effectiveness of drugs used in hormone therapy in conditions of normoglycemia. Further research is needed to fully explain the interactions shown and to be able to effectively prevent them. The obtained results also indicate the crucial role of hyperglycemia in reducing the effectiveness of aromatase inhibitors. The constantly growing number of patients with diabetes, and thus also the increase in the number of patients suffering from diabetes and breast cancer at the same time, makes the treatment of breast cancer in such patients a clinical challenge. Taking into account the fact that the main group of patients using aromatase inhibitors are post-menopausal patients and the results obtained in the studies, it seems that systematic monitoring of glycaemia during hormonal therapy may be one of the ways to control its effectiveness.