



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie Genetyki Molekularnej
Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Olga Kuźmycz

NUMER ALBUMU: 5972

**Udział mikrobioty w nasilaniu zmian
pronowotworowych w obrębie
ludzkiego endometrium
oraz potencjał nowych pochodnych
niesterydowych leków
przeciwzapalnych w zapobieganiu
tym procesom**

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Mikrobiologii
Molekularnej
Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii
i Immunologii

Promotor:

dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ

Involvement of the microbiota in enhancing pro-neoplastic changes in the human endometrium and the potential of new derivatives of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in preventing these processes

*“Najtrudniejsza jest decyzja, by działać, reszta to jedynie wytrwałość.
Lęki to papierowe tygrysy. Możesz robić wszystko, na co się zdecydujesz.
Możesz działać, aby zmieniać i kontrolować swoje życie, a sam proces
jest nagrodą.”*

- Amelia Mary Earhart, pierwsza kobieta-pilot

Pracę dedykuję mojej ukochanej córce Amelii oraz mojemu życiowemu partnerowi
Pawłowi, którzy napełniają każdy mój dzień miłością i sensem.

Pragnę także ogromnie podziękować moim Rodzicom za wsparcie i niezachwianą wiarę
we mnie.

Serdeczne podziękowania kieruję do mojego Promotora, dr hab. Pawła Stączka prof.UŁ,
za zaufanie, którym mnie obdarzył, umożliwiając podjęcie nowatorskiego dla Katedry
tematu badań oraz realizację moich naukowych pomysłów.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam dr Aleksandrze Kowalczyk za gotowość do
wspólnego podejmowania wyzwań, nieocenioną współpracę i atmosferę wzajemnego
wsparcia, która towarzyszyła w naszej pracy w laboratorium.

Dziękuję także Pracownikom i Doktorantom Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i
Immunologii za pomoc, wsparcie i życzliwość, które zawsze mogłam odczuć w trakcie
wykonywania pracy.

Spis treści

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej	6
Współpraca	7
.....	7
I. Wstęp.....	8
I. 1. Nowotwór endometrium – ogólny stan wiedzy na temat przyczyn choroby	8
I. 2. Mikrobota endometrium niezmiennego nowotworowo	9
I. 3. Zmiany mikrobioty endometrium jako czynnik rakotwórczy	11
I. 4. Patogeny dróg rodnych <i>Gardnerella vaginalis</i> , oraz jego potencjalny wpływ na inicjację choroby nowotworowej	13
I. 5. Niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) w prewencji i terapii raka endometrium	14
II. Cele pracy:.....	15
III. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej	16
III.1. Publikacja 1 [P1].....	17
III.2. Publikacja 2 [P2].....	19
III.3. Publikacja 3 [P3].....	23
IV. Wyniki niepublikowane.....	25
IV.1. Założenia oraz podstawy teoretyczne badań	25
IV.2. Materiał i metody.....	27
IV.2.1. Hodowla linii komórek ludzkich.....	27
IV.2.2. Hodowla bakterii.....	27
IV.2.3. Optymalizacja MOI	28
IV.2.4. Ocena stopnia adhezji szczepów do badanych linii komórek ludzkich	28
IV.2.5. Analiza aktywności protekcyjnej <i>L. jensenii</i> wobec infekcji <i>G. vaginalis</i>	29

IV.2.6. Ocena zmian poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) linii komórek ludzkich po koinkubacji z badanymi szczepami.....	29
IV. 2.7. Ocena zmian aktywności mitochondriów linii komórek ludzkich po kohodowli z badanymi szczepami.....	30
IV.2.8. Analiza zmian tempa podziałów komórkowych.....	30
IV.2.8.1. Ocena zmian tempa podziałów za pomocą testu klonogennego.....	30
IV.2.8.2. Ocena zmian tempa podziału za pomocą testu BrdU	31
IV.2.9. Analiza stężenia wybranych cytokin/chemokin prozapalnych za pomocą multitestu Bio-Plex (Bio-Rad)	32
IV.2.9.1 Przygotowanie supernatantu pohodowlanego.....	32
IV.2.9.2 Bezpośrednia analiza poziomu cytokin/chemokin za pomocą multitestu Bio-Plex (Bio-Rad).....	32
IV.2.10. Statystyka.....	33
IV.3. Wyniki	33
IV.3.1. Ocena stopnia adhezji <i>L. jensenii</i> oraz <i>G. vaginalis</i> do badanych linii komórek endometrium.....	33
IV.3.2. Ocena aktywności protekcyjnej <i>L. jensenii</i> w stosunku do badanych ludzkich linii komórek endometrium wobec infekcji <i>G. vaginalis</i>	34
IV.3.3. Ocena zmian poziomu RFT komórek linii HUF, Ishikawa oraz HEC-1A po infekcji badanymi szczepami bakterii z użyciem sondy H ₂ DCF-DA.....	37
IV.3.4. Analiza porównawcza zmian aktywności mitochondriów komórek linii HUF, Ishikawa i HEC-1A po kohodowli z <i>G. vaginalis</i> oraz szczepem fizjologicznym <i>L. jensenii</i>	38

IV.3.5. Ocena zmian tempa podziałów komórkowych w wyniku ekspozycji ludzkich komórek endometrium na badane szczepy.....	40
IV.3.5.1. Ocena zmian tempa podziału komórek endometrium za pomocą zmodyfikowanej metody testu klonogenego	40
IV.3.5.2. Ocena zmian tempa podziału komórek endometrium za pomocą testu BrdU	43
IV.3.6 Ocena profilu odpowiedzi immunologicznej linii komórek endometrium po koinkubacji z <i>G. vaginalis</i> lub <i>L. jensenii</i> za pomocą multitestu Bio-Plex (Bio-Rad)	45
V. Dyskusja	47
VI. Podsumowanie.....	59
VII. Wnioski.....	61
VIII. Streszczenie	62
IX. Abstract.....	64
X. Dorobek naukowy.....	66
X.1. Publikacje nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	66
X.2. Czynny udział w konferencji	66
X.2.1. Prezentacja posteru.....	66
X.2.2. Prezentacja ustna	67
X.3. Szkolenia.....	67
X.4. Staż naukowy	67
Kopie publikacji wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	68
XII. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	112
XII. Literatura.....	126

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej

Grant Narodowego Centrum Nauki (NCN) Sonata 17, projekt *Genotypowanie „ECbiomu” i określenie jego wpływu na rozwój raka endometrium*. Numer projektu: 2021/43/D/NZ7/01386. Kierownik projektu: dr Aleksandra Kowalczyk. Współautor i główny wykonawca: Olga Kuźmycz.



Doktoranckie Granty Badawcze – wewnętrzny konkurs grantowy Uniwersytetu Łódzkiego. Projekt *Ocena udziału wybranych patogennych szczepów mikrobiomu dróg rodnych kobiet w rozwoju raka endometrium*. Kod projektu: 26/DGB/IDUB/2022. Kierownik projektu: Olga Kuźmycz. Opiekun naukowy projektu: dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ.



Współpraca



Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego



Katedra Ginekologii i Położnictwa, Instytut Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

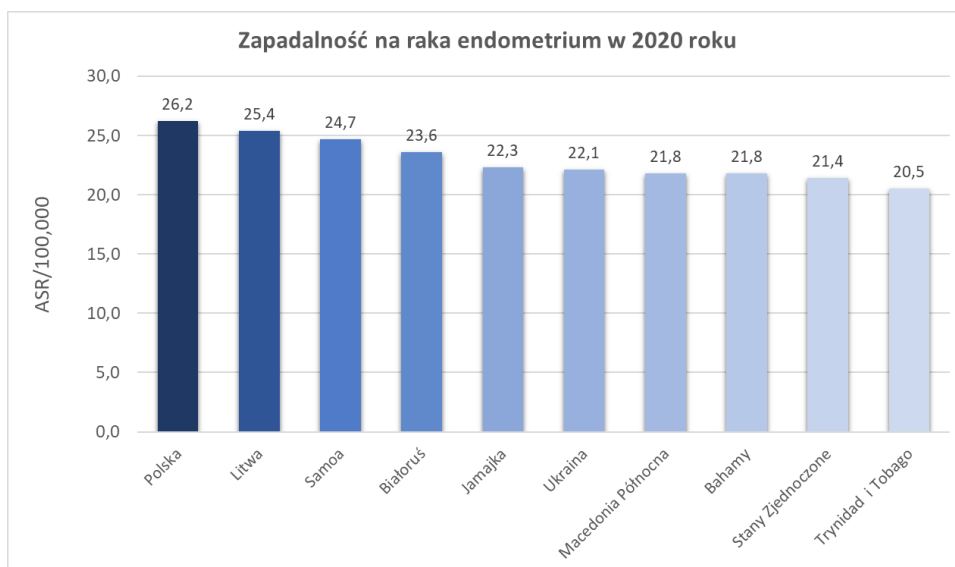


Klinika Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa, Uniwersytecki Szpital

Kliniczny im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie

I. Wstęp

Głębsze zrozumienie molekularnych podstaw inicjacji i progresji raka endometrium stanowi wyjątkowe wyzwanie, kluczowe dla kształtowania nowych strategii prewencyjnych i terapeutycznych. Według statystyk Międzynarodowego Funduszu Badań nad Rakiem (World Cancer Research Fund International), w 2020 roku rak trzonu macicy zajmował szóstą pozycję wśród najczęstszych nowotworów kobiet, zarejestrowano ponad 417,000 nowych przypadków. W Polsce w tym samym roku stwierdzono 9,869 nowych przypadków, co plasuje kraj na czele europejskich statystyk (World Cancer Research Found International, Ryc.1). Aktualne dane statystyczne dla Polski niestety są niedostępne. Analizy Amerykańskiego Stowarzyszenia Badań nad Nowotworem sugerują, że w Stanach Zjednoczonych w 2024 roku przewiduje się około 67,880 nowych przypadków raka endometrium, a około 13,250 kobiet umrze z powodu tej choroby (American Cancer Society).



Rycina 1. Zapadalność na raka endometrium w 2020 roku, na podstawie danych World Cancer Research Found International (<https://www.wcrf.org/cancer-trends/endometrial-cancer-statistics/>)

I. 1. Nowotwór endometrium – ogólny stan wiedzy na temat przyczyn choroby

Wśród czynników ryzyka przyczyniających się do inicjacji raka endometrium wymienia się status menopauzalny, występowanie cukrzycy, otyłość, nadciśnienie oraz zaburzenia hormonalne (Wojciechowska i in., 2018). Nowotwór ten podzielony jest na dwa typy. Typ I, częściej występujący u kobiet w wieku okołomenopauzalnym lub

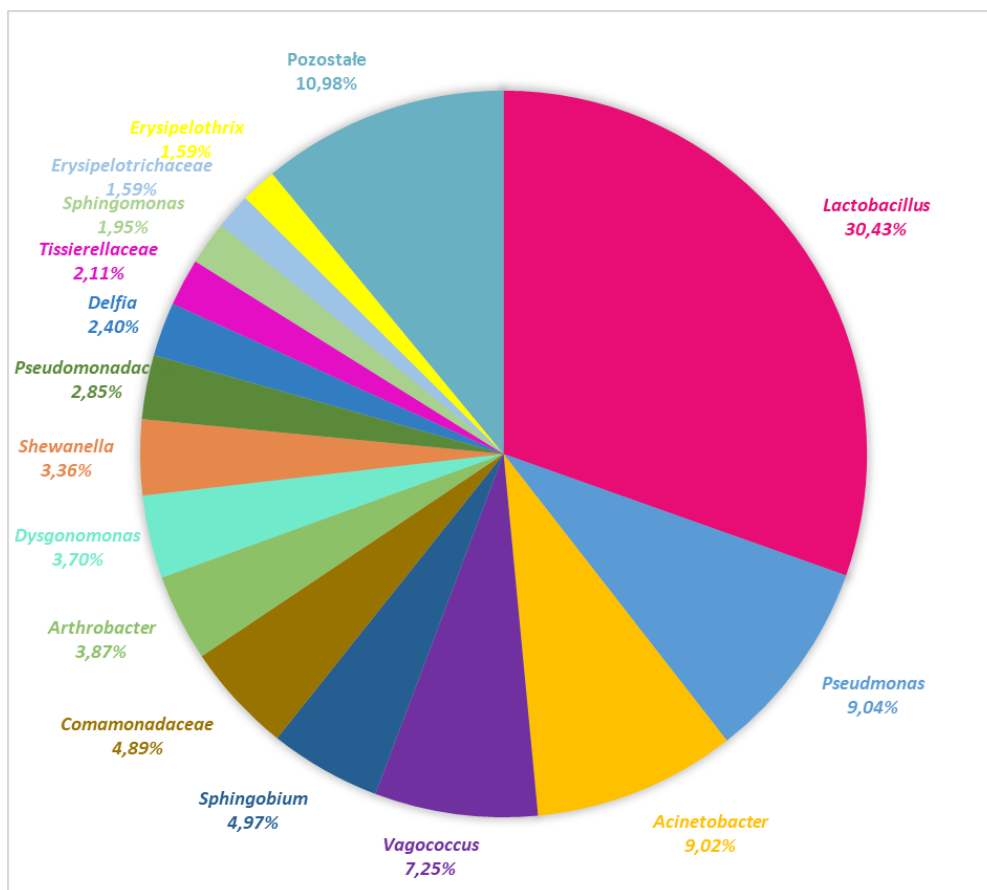
z anowulacją, jest estrogenozależny. Wykazuje się obecnością mutacji w sekwencji kodującej supresor nowotworu PTEN lub obniżeniem ekspresji tego genu. Typ II, zazwyczaj diagnozowany u starszych kobiet po menopauzie, jest estrogenoniezależny i związany z mutacjami w obrębie genu *tp53*, kodującego białko p53, nazywane "strażnikiem genomu" (Leslie i in., 2012). Obie formy nowotworu charakteryzują się nadmierną aktywnością COX-2, enzymu regulującego procesy proliferacji i inwazji komórek nowotworowych, a także pełniącego rolę mediatora stanu zapalnego i istotną funkcję w szlakach sygnałowych (Gandhi i in., 2017).

I. 2. Mikrobiota endometrium niezmiennego nowotworowo

Projekt poznania mikrobiomu ludzkiego (ang. *Human Microbiome Project*), zainicjowany przez Narodowe Instytuty Zdrowia USA (NIH), umożliwił głębsze zrozumienie składu mikrobiomu oraz dynamicznych zmian w jego obrębie w kontekście różnych stanów, takich jak ciąża, poród przedwczesny, choroby zapalne jelit oraz stan przedcukrzycowy. Analiza dziesięcioletnich badań projektu wykazała istotny wpływ zmian składu mikrobiomu na badane parametry. Ponadto, badania te przyczyniły się do rozwinięcia nowych strategii badawczych i dostarczyły podstaw do poszerzenia zakresu badań poprzez współpracę z innymi jednostkami („The Integrative Human Microbiome Project”, 2019). Obecnie mikrobiota trzonu macicy jest intensywnie badana. Początkowo uważano, że narząd ten jest pozbawiony mikroorganizmów (Baker i in., 2018), jednak badania sugerują, że bakterie mogą docierać do górnych dróg rodnych z pochwy i/lub krwi (Salerian, 2020). Teoria transmisji bakterii do jamy macicy przez tzw. "maciczną pompę perystaltyczną", czyli zespołu ruchów mięśniówki górnej części szyjki macicy, również jest brana pod uwagę (Molina i in., 2020). Mimo to, dokładny skład mikrobioty endometrium wciąż pozostaje nieznany. Badania wskazują na obecność czterech głównych typów bakterii - *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Dominacja przedstawicieli *Lactobacillus* spp., powszechnie uznawana za wskaźnik zdrowej mikroflory pochwy (Baker i in., 2018), jest obserwowana także w przypadku endometrium.

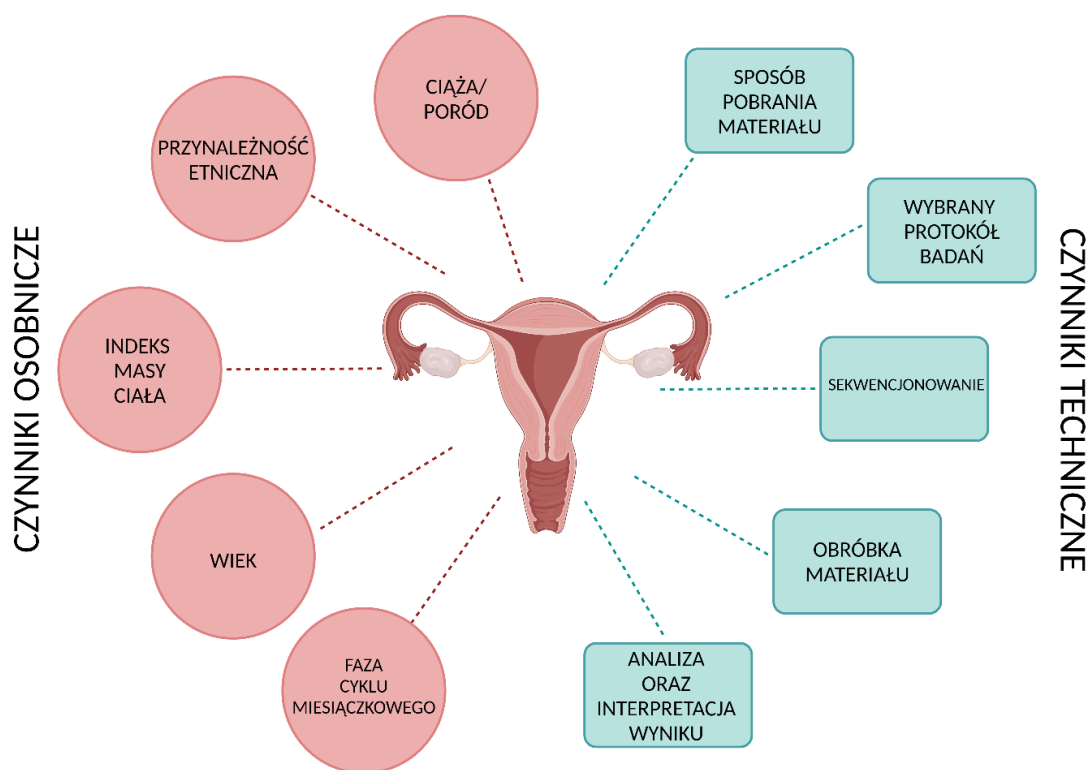
Z kolei mikrobiota pochwy jest dobrze zbadana, a jego skład może być istotny także w kontekście mikrobioty endometrium. Prawidłowa mikrobiota pochwy jest podzielona na sześć typów CST (ang. *community state type*), z dominacją *L. crispatus*, *L. gasseri* oraz *L. inners* w CST I, II i III, odpowiednio (Lewis i in., 2017). Badania nad mikrobiotą waginalną kobiet w Polsce przeprowadzone przez Pytkę i współpracowników (2019) identyfikują dominujące szczepy *Lactobacillus* spp., takie jak *L. acidophilus* (35%), *L. plantarum* (30%)

i *L. fermentum* (30%), oraz w mniejszym stopniu *L. delbrueckii* (5%), *L. rhamnosus* (5%) i *L. casei* (<1%). Badania przeprowadzone przez Mitchell i współpracowników (2015) wskazują na dominację *Prevotella* spp. (76%), *L. iners* (61%) i *L. crispatus* (56%) w pochwie, oraz *L. iners* (45%), *L. crispatus* (33%) i *Prevotella* spp. (33%) w próbach endocerykalnych i endometrium łącznie. Zaproponowano dominację *Lactobacilli* w wyższych partiach narządu rodnych kobiet. Natomiast badania Chen i in. (2017) nie potwierdzają pełnej dominacji *Lactobacillus* ssp., a wskazują na zwiększoną liczebność bakterii z rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vagococcus* i *Sphingobium* (Ryc.2). Ważne jest uwzględnienie, że sposób pobrania materiału od kobiet może wpływać na częstość identyfikacji *Lactobacillus*. Inne badania przeprowadzone przez Winters i współpracowników (2019), wskazują na *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Comamonadaceae*, oraz *Cloacibacterium* jako dominujących przedstawicieli mikrobioty endometrium.



Rycina 2. Skład mikrobioty endometrium niezmięconej nowotworowo. Na podstawie Chen i in. 2017.

Ponadto, skład mikrobioty endometrium może być zróżnicowany w zależności od wieku kobiety, fazy cyklu miesięczkowego, indeksu masy ciała, diety, a nawet przynależności etnicznej (Ryc. 3) (Molina i in., 2020).



Rycina 3. Wybrane czynniki osobnicze oraz metodyczne mające wpływ na wynik genotypowania bakterii z materiału pochodzącego z górnych dróg rodnych kobiet. Na podstawie Molina i in. 2020, utworzono przy użyciu Biorender.com.

I. 3. Zmiany mikrobioty endometrium jako czynnik rakotwórczy

Dysbioza mikrobioty endometrialnej może być związana z powstaniem zmian patofizjologicznych, obejmujących: (1) destabilizację stabilności genomowej komórek nabłonka macicy poprzez modulację czynników transkrypcyjnych, zmiany epigenetyczne i mutacje genów; (2) zaburzenia integralności bariery nabłonkowej; oraz (3) aktywację TLR (receptory toll-podobne; ang. *toll-like receptors*) poprzez metabolity niektórych bakterii, głównie o charakterze patogennym (Baker i in., 2018). Szacuje się, że około 15% wszystkich nowotworów może mieć podłoże mikrobiologiczne (Shahanavaj i in., 2015). Doniesienia literaturowe na temat wytypowanych gatunków w materiale biologicznym pochodzącym od kobiet z nowotworem endometrium mocno się różnią. Grupa badawcza Walther-António (2016) przeprowadziła analizę porównawczą składu mikrobioty od pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrium oraz pacjentek zdrowych. Sugerowano,

iż dominującymi mogą się okazać przedstawiciele rodzaju *Gardnerella* w próbach pochodzących od kobiet z nowotworem. Natomiast badania jednoznacznie wskazały, że gatunkami różnicującymi obydwie badane grupy są *Atopobium vaginae* i *Porphyromonas somerae*, co potencjalnie może wskazywać na ich istotną rolę w nowotworzeniu w obrębie endometrium. Z kolei Walsh i współpracownicy (2019) przeprowadzając podobne badania zidentyfikowali *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cloacibacterium*, *Comamonadaceae* i *Escherichia* jako dominujące taksony w materiale pochodzącym od pacjentek z nowotworem endometrium po hysterektomii. Badania Wang i in. (2022) wskazują na przewagę *Lactobacillus* i *Gardnerella* zarówno w tkankach macicy kobiet ze stwierdzonym nowotworem endometrium, jak i w tkankach bez zmian nowotworowych. Z kolei większą częstość występowania *Prevotella*, *Atopobium*, *Anaerococcus*, *Dialister*, *Porphyromonas* oraz *Peptoniphilus* odnotowano w obrębie endometrium kobiet z rakiem. W materiale pochodzącym od kobiet, u których stwierdzono zmiany patologiczne w obrębie narządów rodnych metodą hybrydyzacji *in situ*, wykazano obecność *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Enterobacter* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* oraz *Enterococcus faecalis* (Benner i in., 2018a). W przypadku stanu przedrakowego szyjki macicy (ang. *cervical intraepithelial neoplasia*, CIN), dominującymi gatunkami były *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, *G. vaginalis* oraz rodzaj *Fusobacterium* (Champer i in., 2018). Badania Lu i innych (2021) jednoznacznie wskazują na pozytywną korelację między obecnością przedstawicieli rodzaju *Micrococcus*, a IL-6 oraz IL-17 w endometrium kobiet zmienionych nowotworowo. Barczyński i współpracownicy (2023) wykazują, iż najczęściej występującymi gatunkami bakterii w wymazach pochwy i szyjki macicy kobiet populacji Polskiej z nowotworem endometrium były *G. vaginalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Mobiluncus curtisii*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. crispatus*. Z kolei częstość występowania *M. curtisii* oraz *Dialister pneumosintes* była istotnie wyższa w wymazach pochodzących z pochwy, co potencjalnie może posłużyć jako narzędzie diagnostyczne choroby.

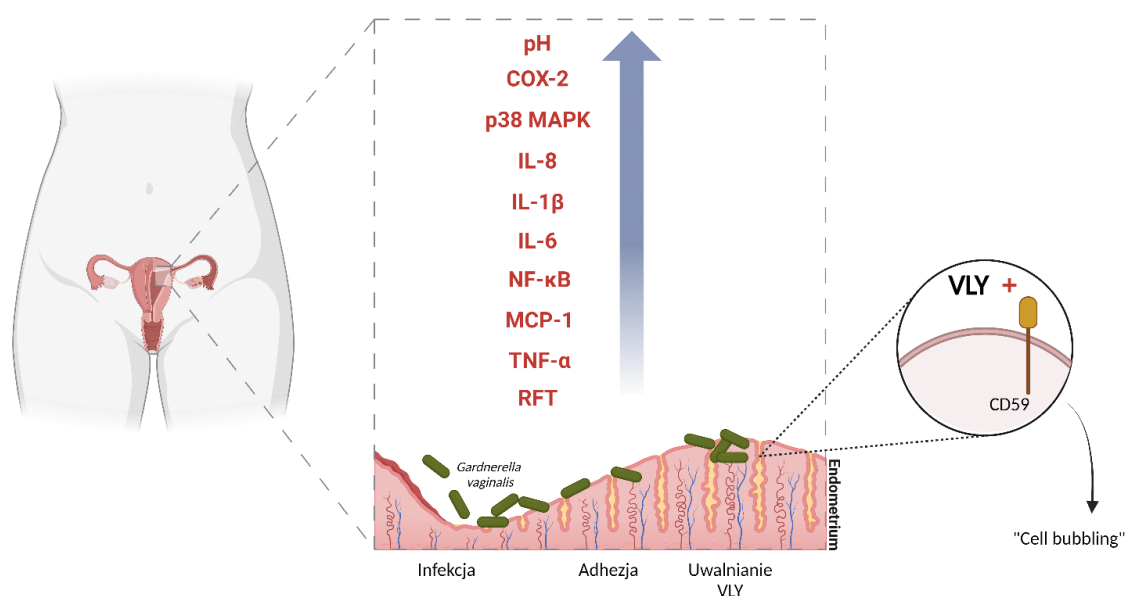
W uzyskaniu precyzyjnych wyników dotyczących składu mikrobioty trzonu macicy, kluczową rolę odgrywa staranne zaprojektowanie badań oraz metoda pobierania i analizy próbek. Istnieje ograniczenie w możliwości pobierania próbek z jamy macicy od zdrowych kobiet, dlatego często jako grupę kontrolną wykorzystuje się materiał pochodzący od kobiet z innymi schorzeniami ginekologicznymi, co istotnie wpływa na jakość analizy porównawczej wyników (Walsh i in., 2019a). Pobieranie wymazów z dystalnej części kanału

szyjki macicy często wiąże się z ryzykiem kontaminacji bakteriami z pochwy, w związku z czym istotne jest dokładne zaplanowanie kontroli eksperymentalnych. Wybór starterów i platformy sekwencjonowania stanowi istotny aspekt tego procesu. W związku z powyższym, mimo licznych doniesień, jednoznaczne określenie mikrobioty trzonu macicy ze zmianami nowotworowymi wydaje się być bardzo trudnym zadaniem (Yuan i in., 2024).

I. 4. Patogeny dróg rodnych *Gardnerella vaginalis*, oraz jego potencjalny wpływ na inicjację choroby nowotworowej

Infekcje patogenem gatunkiem *G. vaginalis* są jednymi z najczęstszych przyczyn wizyt kobiet u ginekologa. Nadmierny rozrost przedstawicieli tego gatunku w połączeniu z redukcją liczby *lactobacilli* oraz z nadmiernym wzrostem *A. vaginae* i *Prevotella bivia*, stanowią wyznacznik waginozy bakteryjnej. Kobiety dotknięte tą chorobą są bardziej narażone na zwiększone ryzyko przedwczesnego porodu, zakażeń przenoszonych drogą płciową, w tym zakażeń wirusem HIV, zapaleniem przydatków oraz powikłań pooperacyjnych (np. zapalenie tkanki łącznej pochwy) (Abbe i Mitchell, 2023). Bakteria ta wytwarza cholesterolozależną cytolizynę – waginolizynę (ang. *vaginolysine*, VLY), która należy do grupy toksyn tworzących pory (ang. *pore forming toxin*). VLY ma istotny wpływ na aktywację szlaku p38 MAPK, co sugeruje ważną rolę gatunku w niektórych rodzajach nowotworów, takich jak rak gruczołu krokowego, piersi, pęcherza, wątroby oraz płuc. Wyniki badań Gelbera i in. (2008) pokazały, że VLY łączy się pośrednio z cholesterolem, angażując w proces białko hCD59, jako receptor. Następnie VLY oddziałuje z błonowym białkiem regulacyjnym układu dopełniacza (mCRP), aby zainicjować tworzenie pory w błonie komórkowej (tzw. „*cell bubbling*”). Ponadto, gatunek ten występuje jako wspólny mianownik w ocenie ryzyka inicjacji nowotworów ginekologicznych kobiet (Champer i in., 2018; Lin i in., 2022; L. Wang i in., 2022). Odnotowano wysoką aktywność adhezyjną izolatów *G. vaginalis* od kobiet z waginozą bakteryjną, w warunkach kohodowli *in vitro* z komórkami linii HeLa oraz ME-180. Badania wskazują także, iż w wybranych warunkach, *G. vaginalis* może zakłócać warstwę ochronną *lactobacilli* i działać cytotoksycznie na badane komórki ludzkie (Castro i in., 2015a; Patterson i in., 2010a). Patterson i współpracownicy (2010) donieśli również o dużym potencjale adhezyjnym *G. vaginalis* do komórek linii ME-180, który wynosił około 75%. Dodatkowo, autorzy wskazują na silny efekt cytotoksyczny badanego patogenu w stosunku do komórek po 24 godzinnej kohodowli. Badania nad adhezją *G. vaginalis* do komórek linii raka endometrium HEC-1A, hodowanych w modelu 3D, wykazały na silny stopień przylegania komórek bakteryjnych

do komórek ludzkich, co zostało zobrazowane za pomocą mikroskopii elektronowej (Łaniewski i in., 2017). Inne doniesienia wskazują na potencjalny wpływ *G. vaginalis* na inicjację i rozwój nowotworu szyjki macicy oraz endometrium, co może być związane z bezpośrednim wpływem bakterii i/lub jej metabolitów na regulację ekspresji *cox-2*. Wspominany wcześniej enzym COX-2, bierze udział w szlakach sygnałowych, proliferacji, angiogenezie i apoptozie komórek ludzkich, czyli szlaków będących kamieniami milowymi na drodze zapoczątkowania choroby nowotworowej (Kuźmycz i Stączek, 2020). Potencjalne zmiany w obrębie endometrium w wyniku infekcji *G. vaginalis* przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Zmiany w obrębie endometrium w wyniku infekcji patogennym szczepem *G. vaginalis*. Na podstawie Alcendor, 2016; Kuźmycz i Stączek, 2020; Shvartsman i in., 2023. Utworzono przy użyciu Biorender.com.

I. 5. Niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) w prewencji i terapii raka endometrium

Wiedza na temat molekularnych podstaw rozwoju raka endometrium skłoniła do poszukiwania nowych strategii prewencji i leczenia choroby. Nadprodukcja białka COX-2, co jest charakterystycznym zjawiskiem dla tego typu nowotworu, wiąże się także z procesami zapalnymi, hamowaniem apoptozy, angiogenezą i przerzutowaniem. Ze względu na to, zwrócono uwagę na inhibitory COX-2, jako wspomaganie terapii nowotworowej. W dodatku odnotowano, że NLPZ wykazują działanie hamujące wzrost

niektórych bakterii, a zatem mogą działać na mikrobiotę narządu (Kuźmycz & Stączek, 2020a).

Z drugiej strony, terapia NLPZ u ludzi i zwierząt może prowadzić do zmian mikrobioty jelitowej w kierunku dysbiozy, co pośrednio może mieć wpływ na rozwój wielu chorób (Wan i in., 2021). Mechanizmy prowadzące do dysbiozy poprzez NLPZ możemy podzielić na dwie grupy: zmiany w środowisku bakteryjnym jelit wywołane poprzez NLPZ (np. zmiany pH, wpływ na metabolom jelit) oraz bezpośrednie działanie przeciwbakteryjne NLPZ (Maseda i Ricciotti, 2020; Zádori i in., 2023). Co ciekawe, dysbioza indukowana poprzez NLPZ zazwyczaj przejawia się jako przesunięcie równowagi w stronę bakterii Gram-ujemnych. Szczególnie duże zmiany zachodzą w obrębie taksonów *Bacteroidetes* (w tym, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Barnesiella*, *Rikenellaceae*), *Proteobacteria* (w tym *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Alphaproteobacteria*), *Enterococcaceae* oraz *Akkermansia* (X. Wang i in., 2021; Zádori i in., 2023b). Niemniej jednak maksymalne stężenia plazmatyczne diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofenu, deksketoprofenu, flurbiprofenu i kwasu acetylosalicylowego w trakcie terapii u ludzi są znacznie niższe, aniżeli poziomy hamujące wzrost bakterii, a głównie bakterii kwasu mlekowego. Sugeruje to, że tylko długoterminowe użycie leku może mieć wpływ na zmiany w obrębie mikrobioty (Kruszewska i in., 2023).

II. Cele pracy:

Celem przewodnim niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wybranych drobnoustrojów na zmiany w obrębie ludzkich komórek endometrium oraz ocena aktywności biologicznej nowosyntetyzowanych renowych pochodnych niesterydowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) wobec komórek nowotworowych endometrium.

Aby osiągnąć ogólny cel badawczy, nakreślono następujące cele szczegółowe:

1. Analiza danych literaturowych dotyczących tematyki związanej z rolą mikrobioty endometrium w inicjacji i progresji zmian nowotworowych, oraz potencjału stosowania NLPZ jako leków o charakterze przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym;
2. Analiza aktywności przeciwnowotworowej nowosyntetyzowanych renowych pochodnych NLPZ wobec komórek raka endometrium;

3. Sekwencjonowanie materiału biologicznego pochodzącego od kobiet z nowotworem endometrium oraz kobiet grupy kontrolnej;
4. Wstępna ocena wirulencji szczepu *Anaerococcus vaginalis* wobec komórek prawidłowych endometrium;
5. Ocena wirulencji patogenego szczepu dróg rodnych kobiet *Gardnerella vaginalis* wobec komórek linii ludzkiego raka endometrium oraz komórek prawidłowych endometrium.

III. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

Niniejsza praca doktorska opisana jest w formie hybrydowej i składa się z jednej pracy przeglądowej (Publikacja 1 [P1]) oraz dwóch prac oryginalnych z których jedna została opublikowana (Publikacja 2 [P2]) a druga znajduje się w fazie recenzji (Publikacja 3 [P3]). Całość została uzupełniona o wyniki, które nie zostały jeszcze opracowane w formie publikacji (opisane są w Rozdziale IV dysertacji).

[P1] Kuźmycz O, Stączek P. Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome. *Cancer Biol Ther.* 2020; 21(6):486-494. doi: 10.1080/15384047.2020.1736483

IF₂₀₂₃ = 4.4; IF_{5-letni} = 4.4; MEiN₂₀₂₃ = 100

[P2] Kuźmycz O, Kowalczyk A, Stączek P. Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)] and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(19), 11568; <https://doi.org/10.3390/ijms231911568>

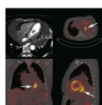
IF₂₀₂₃ = 4.9; IF_{5-letni} = 5.6; MEiN₂₀₂₃ = 140

[P3] Kuźmycz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T, Stączek P. A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients – identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor. - manuskrypt przyjęty do recenzji czasopisma *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

IF₂₀₂₃ = 4.6; IF_{5-letni} = - ; MEiN₂₀₂₃ = 100

III.1. Publikacja 1 [P1]

cancer biology & therapy



Cancer Biology & Therapy

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ISSN 1538-4047 (Print) 1555-8576 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/kcvt20>



ISSN: 1538-4047 (Print) 1555-8576 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/kcvt20>

Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome

Olga Kuźmycz & Paweł Stączek

Obecnie rak endometrium jest jednym z najczęściej występujących typów raka u kobiet, a molekularne podstawy inicjacji i progresji tej choroby nie są w pełni poznane. Odnotowuje się wysoki poziom ekspresji COX-2, enzym procesu zapalnego, w nowotworach tego typu, co sugeruje próbę wykorzystania tego białka, jako celu terapeutycznego i prewencyjnego choroby. Zauważono, że poziom COX-2 może służyć do określenia stadium zaawansowania nowotworu wg. norm FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), a poziom enzymu może służyć jako czynnik prognostyczny leczenia i wskazuje na stopień inwazji guza w myometrium (Lambropoulou i in., 2005). Badania także wskazują na pozytywną korelację białka COX-2 z innymi białkami, których wysoki poziom ekspresji odnotowano w przypadku raka trzonu macicy, i są to GLUT-1 (transporter glukozy 1; ang. *glucose transporter 1*), VEGF (czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego; ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz HIF-1 α (podjednostka alfa czynnika indukowanego hipoksją 1; ang. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*) (Huang i in., 2005; Ma i in., 2015). Nadekspresja COX-2 może także blokować apoptozę komórek poprzez zwiększenie produkcji białka antyapoptycznego Bcl-2, i odwrotnie, odnotowano, że inhibitory COX-2 przywracają proces apoptozy.

Te doniesienia zwróciły uwagę na potencjał NLPZ, które są szeroko stosowane w terapii przeciwbólowej i przeciwzapalnej, jako leków o charakterze przeciwnowotworowym. Dodatkowo, leki te posiadają aktywność przeciwdrobnoustrojową, a w kontekście trzonu macicy, aktywność tę wykazują wobec patogennych gatunków dróg narządu rodnych kobiet. Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego NLPZ nie jest

w pełni wyjaśniony, ale sugeruje się, że NLPZ blokują interakcje białko-białko, replikację i naprawę DNA u bakterii (Yin i in., 2014).

Niniejsza publikacja przedstawia podwójną rolę NLPZ w leczeniu nowotworu endometrium oraz wpływ tych leków na patogenne gatunki mikrobioty macicy. Zwrócono uwagę na nadekspresję COX-2, którego hamowanie przez NLPZ może wpłynąć na procesy takie, jak angiogeneza, proliferacja i apoptoza komórek endometrium, a także omówiono potencjalny wpływ wybranych szczepów patogennych na nadekspresję tego genu. Omówiono także związek między patogennymi bakteriami, np. jak *Gardnerella vaginalis* i *Atopobium vaginae*, a stanami zapalnymi, które mogą przyczyniać się do progresji raka endometrium.

III.2. Publikacja 2 [P2]



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)] and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer Cells

Olga Kuźmycz , Aleksandra Kowalczyk and Paweł Stączek *

NLPZ stanowią obszerną klasę leków o charakterze przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym, które są szeroko i rutynowo stosowane na całym świecie. Mechanizm działania tych leków jest dobrze znany, i obejmuje hamowanie aktywności cyklooksygenaz (COX) – COX-1 i/lub COX-2, gdzie zwłaszcza hamowanie aktywności drugiego z tych enzymów może być szczególnie istotne z perspektywy prewencji i wspomagania terapii nowotworu, ponieważ stwierdzono, że jest on ściśle związany z procesami stanu zapalnego w obrębie guza (de Leval i in., 2000). Zestawienie poszczególnych szeroko stosowanych NLPZ oraz ich selektywność wobec COX-1/COX-2 przedstawiono w Tabeli X. Aktywność związków wobec enzymów badano za pomocą testów z użyciem krwi ludzkiej, płytek krwi oraz monocytów krwi ludzkiej, stymulowanych LPS (lipopolisacharyd, ang. *lipopolysaccharide*).

Tabela 1. Selektywność wybranych NLPZ wobec enzymów COX-1 i COX-2.

Nazwa NLPZ	IC ₅₀ COX-1 (μM)	IC ₅₀ COX-2 (μM)	Stosunek COX-2/COX-1*	Preferencja wobec enzymu
Meloksykam	2,24	0,16	0,07	COX-2
Nimesulid	1,61	0,03	0,017	COX-2
Etodolak	1,5	0,14	0,09	COX-2
Flosulid	18	0,36	0,02	COX-2
Diclofenac	0,12	0,06	0,5	COX-2
Indometacyna	0,60	1,4	2,3	COX-1
Ibuprofen	2,26	15,7	7	COX-1
NS-398	7,7	0,004	0,0005	COX-2
Piroksykam	2,03	0,6	0,3	COX-2
Aspiryna	4,45	13,88	3,12	COX-1
Naproksen	28,19	32,01	1,14	nieselektywny

*stosunek COX-2/COX-1 oznacza stopień selektywności wobec danego enzymu, gdzie wynik wynoszący < 1 oznacza preferencję wobec COX-2, ~ 1 – nieselektywność (hamuje oba enzymy w równym stopniu, > 1 – preferencja wobec COX-1. IC₅₀ (ang. *Inhibitory Concentration 50%*) – stężenie leku hamujące vitalność komórek o 50%. Tabelę sporządzono na podstawie Cryer i Feldman, 1998; Pairet i in., 1998.

Mimo obiecujących wyników niektórych badań, istnieje poważny problem związany z powikłaniami wynikającymi z długoterminowego stosowania tego typu leków. Skutki uboczne NLPZ (zwłaszcza tych, które hamują aktywność COX-1) mogą prowadzić do inicjacji krwawienia z żołądka, dwunastnicy i owrzodzeń, dlatego skupiono się na poszukiwaniu modyfikacji leku, niwelującą te efekty niepożądane. Niektóre z tych modyfikacji, takie jak dodanie tlenku azotu (NO), siarkowodoru (H₂S), lipidów i kompleksów metali do cząsteczki leku, skutkowało poprawą i wzbogaceniem aktywności biologicznej tych związków. Ponadto, kompleksowanie NLPZ z niektórymi metalami, takimi jak miedź lub cynk, zmniejszała skuteczną dawkę „natywnego leku” (Dillon i in., 2003; Lim i in., 2009; Sostres i in., 2013).

Badania przeprowadzano na syntetyzowanych na Katedrze Chemii Organicznej UŁ NLPZ - naproksen (**373a**), aspiryna (**375a**), ibuprofen (**376a**), indometacyna (**377a**) oraz ich renowych pochodnych (odpowiednio, **373**, **375**, **376**, **377**). Wstępne badania wykazały

selektywną aktywność renowych pochodnych NLPZ wobec komórek nowotworowych HeLa, gdzie potencjalnym mechanizmem hamującym aktywność biologiczną komórek był duży wzrost poziomu reaktywnych form tlenu komórek nowotworowych. Określono IC_{50} cytotoksycznych wobec komórek HeLa i L929 renowych pochodnych indometacyny i aspiryny. **375** oraz **377** były bardziej aktywne wobec komórek nowotworowych HeLa aniżeli nienowotworowych L929, z wartościami IC_{50} 36 μM i 158 μM odpowiednio. Wartości IC_{50} dla **375a** i **377a** dla komórek HeLa były znacznie większe i wynosiły 2819 μM i 326 μM odpowiednio (Skiba i in., 2019). Poszerzono analizę o linie nowotworowe endometrium Ishikawa i HEC-A. Badania jednoznacznie wskazują, że **375a**, **377a**, oraz ich renowe pochodne **375** i **377** miały istotny wpływ na żywotność badanych endometrialnych komórek nowotworowych. Co ciekawe, odnotowano, że cytotoksyczny efekt renowych pochodnych po czasie się nasila, tymczasem w przypadku oryginalnych NLPZ – maleje, co sugeruje bardziej skuteczne działanie renowych pochodnych wobec badanych komórek. Dodatkowo, wartości IC_{50} dla **375** oraz **377** w przypadku zarówno linii komórek Ishikawa (*Table 1* w publikacji P2), jak i HEC-1A (*Table 2* w publikacji P2) były niższe, niż w przypadku **375a** oraz **377a**, co wskazuje na zmniejszenie dawki efektywnej leku po kompleksacji z renem.

Kolejnym etapem badan było określenie zmian proliferacji komórek w wyniku inkubacji z badanymi związkami. Wyniki wykonanego testu wskazały na większą czułość komórek HEC-1A na badane związki w stężeniu IC_{50} , niż komórek Ishikawa. Z kolei komórki linii Ishikawa były bardziej wrażliwe na działanie hamujące proliferację tylko względem związków **377** oraz **377a**. W przypadku obu linii komórkowych efekt antyproliferacyjny badanych związków wzrósł po 72-godzinnej inkubacji (*Figure 2a* w publikacji P2). Zmiany tempa proliferacji komórek badano także dla stężenia $\frac{1}{2} IC_{50}$ i $\frac{1}{4} IC_{50}$, (*Table 3* i *Table 4* w publikacji P2). W przypadku niższych stężeń tylko **375a** hamował proliferację obu badanych linii komórek raka (* = $p < 0.05$ dla $\frac{1}{2} IC_{50}$ i $\frac{1}{4} IC_{50}$). Obserwacja ta jest zgodna z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na pozytywne efekty rutynowego stosowania niskich dawek aspiryny na przeżywalność kobiet z nowotworami ginekologicznymi (Kuźmycz i Stączek, 2020b; J. Li i in., 2018).

W badaniach nad NLPZ wykazano, że ich stosowanie prowadzi do zwiększonej produkcji RFT, co jest uznawane za mechanizm wywołujący efekty uboczne, szczególnie w układzie pokarmowym. Jednakże ten mechanizm może również być wykorzystywany do niszczenia komórek rakowych poprzez inhibicję wzrostu komórek, zaburzenia

metabolizmu oraz zakłócenia szlaków sygnalizacyjnych. Zwiększone poziomy RFT prowadzą do zakłócenia homeostazy komórkowej, co skutkuje uszkodzeniami komórek i inicjacją apoptozy (Kolawole i Kashfi, 2022; Sun i in., 2011). W naszych poprzednich badaniach zaproponowano, że indukcja wysokich poziomów RFT może stanowić pozytywny mechanizm działania pochodnych renowych NLPZ w stosunku do komórek raka, co wykazano w przypadku komórek HeLa. Zjawisko to nie występowało w przypadku fibroblastów L-929. Ponadto zaobserwowano, że komórki rakowe charakteryzują się znacząco wyższą zdolnością do gromadzenia pochodnych renu w mitochondriach, co może przekładać się na wzrost poziomu mitochondrialnych RFT (Skiba i in., 2019). W badaniach nad komórkami Ishikawa stwierdzono zwiększoną produkcję RFT w cytozolu po inkubacji zarówno z oryginalnymi NLPZ, jak i ich renowymi pochodnymi. Ponadto, zarówno NLPZ, jak i ich renowe pochodne miały istotny wpływ na poziom RFT w komórkach HEC-1A przy stężeniach odpowiadających połowie wartości IC_{50} , co może wynikać z lepszego przenikania tych związków przez błony komórkowe. Odnotowano, że stężenia $\frac{1}{2} IC_{50}$ renowych pochodnych (**375** i **377**) były znacznie niższe, niż stężenia odpowiadające połowie IC_{50} oryginalnych NLPZ (**375a** i **377a**), co wskazuje na wyższą skuteczność indukcji RFT przez pochodne renu przy niższych stężeniach. Różnice w poziomach RFT w mitochondriach i cytozolu wskazują na zróżnicowany sposób interakcji tych związków z badanymi komórkami. Najwyższy poziom mitochondrialnych RFT w obu liniach komórkowych związany był z inkubacją badanych komórek w obecności **377**. W przypadku komórek linii Ishikawa istotny poziom mitochondrialnych RFT odnotowano także w obecności z **375**, ale nie tak znacząco, jak w odpowiedzi na obecność związku **377** (*Figure 5a* publikacji P2).

Badania dotyczące renowych pochodne NLPZ wskazują na ich wysoki potencjał jako leków w prewencji raka trzonu macicy, a być może także wspomagających jego terapię, jednak głębsze poznanie ich aktywności biologicznej jest niezbędne i wymaga dalszych badań. Wymagane jest dokładniejsze zbadanie ich mechanizmów działania na głębszym poziomie molekularnym.

III.3. Publikacja 3 [P3]



A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients - identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor

¹ Olga Kuźmycz¹, Aleksandra Kowalczyk^{1*}, Aleksandra Bolanowska², Anna Drozdowska²,
² Jakub Lach^{1,3}, Wiktoria Wierzbńska^{1,4}, Tomasz Kluz^{2,5}, and Paweł Stączek¹

Postęp technik sekwencjonowania przyczynił się do poznania mikrobiomu człowieka w obrębie poszczególnych narządów, a także tego, jaki skład mikrobioty może być potencjalną przyczyną rozwoju choroby, w tym nowotworu. Szacuje się, że efekt pronowotworowy wywoływany przez mikroorganizmy dotyczy około 20% przypadków raka, a takie drobnoustroje określane są mianem „onkobakterii”. Do drugiej połowy XX wieku jamę macicy uznawano za wolną od drobnoustrojów, jednak najnowsze doniesienia wskazują na unikatowy skład mikrobioty narządów rodnych kobiet, który jest zmienny w zależności od stanu zdrowia kobiety (Benner i in., 2018b; Toson i in., 2022).

Dotychczasowe badania skupiały się głównie na zidentyfikowaniu składu taksonomicznego endometrium zarówno w stanie zdrowym, jak i w przypadku zmian nowotworowych (Moreno i in., 2022; Tao i in., 2017; Walsh i in., 2019b; Walther-António i in., 2016b). Jednakże, pomimo licznych prac, brakuje wystarczających danych literaturowych dotyczących identyfikacji odrębnych taksonów w wymazach z kanału szyjki macicy u kobiet, które mogłyby stanowić narzędzie wstępnego wykrywania nowotworu endometrium. W odpowiedzi na tę lukę, nasza grupa badawcza podjęła próbę przeprowadzenia szczegółowej identyfikacji taksonów w wymazach dystalnej części kanału szyjki macicy, celem opracowania potencjalnego narzędzia diagnostycznego w wykrywaniu nowotworów endometrium. W przeprowadzonych przez nas badaniach zidentyfikowaliśmy mikrobiotę dystalnej części kanału szyjki macicy u 29 pacjentek z nowotworem endometrium (NE) lub mięśniakiem macicy (MM). Skład taksonomiczny prób w obu grupach różnił się od siebie. Zaobserwowaliśmy, że próbki z grupy MM charakteryzowały się jednorodną mikrobiotą, zdominowaną przez *Lactobacillus*, podczas gdy w grupie NE występowała wyższa różnorodność mikroorganizmów. Nasze obserwacje są zgodne z badaniami Mitchell i in. (Mitchell i in., 2015b), którzy stwierdzili, że najczęściej

wykrywany taksonem w grupie 58 kobiet, które przeszły histerektomię z powodu wskazań nienowotworowych, był rodzaj *Lactobacillus*. Dodatkowo, nasze badania wskazują, że próbki pobrane od pacjentek z rakiem były wzbogacone o pewne taksony zawierające drobnoustroje patogenne, takie jak *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus* oraz *Porphyromonas* (Figure 7 publikacji P3).

Ponadto, wyniki naszych badań jednoznacznie wskazują na *Anaerococcus*, jako takson różnicujący grupę NE od MM, tak więc rodzaj ten może być istotny w inicjacji i progresji nowotworu trzonu macicy. W oparciu o tę obserwację, wybraliśmy *Anaerococcus vaginalis* jako reprezentanta taksonu różnicującego, i przeprowadziliśmy dodatkowe testy dotyczące zdolności tych bakterii do adhezji ludzkich fibroblastów macicy oraz indukcji RFT. *Lactobacillus jensenii* został użyty jako przedstawiciel mikroflory fizjologicznej i stanowił kontrolę. Obie badane bakterie wykazały wysoką zdolność adhezji do fibroblastów endometrium, co oznacza, że mogą skutecznie kolonizować endometrium (Figure 8 publikacji P3). Potencjalnie, zaburzenia równowagi pomiędzy *lactobacilli*, a *A. vaginalis* może prowadzić do dysbiozy, co może stanowić kamień milowy procesu zapoczątkowania transformacji nowotworowej. W naszych badaniach także wykazaliśmy, że *A. vaginalis* indukuje RFT na istotnym poziomie, znacznie wyższym niż *L. jensenii*. Wysoki poziom RFT może prowadzić do uszkodzenia białek, lipidów, błon komórkowych oraz organelli komórek ludzkich. Onkogenna rola RFT jest związana z indukcją oksydacyjnych uszkodzeń DNA, w tym pęknięć podwójnej nici oraz tworzenia 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG). Utleniona guanozyna powoduje transwersję guanozyny na tyminę, co jest główną przyczyną spontanicznej mutagenazy i może prowadzić do karcynogenezy (Nakamura & Takada, 2021; Valavanidis i in., 2009).

Zidentyfikowanie rodzaju *Anaerococcus* jako taksonu różnicującego mikrobiotę endometrium zmienionego nowotworowo otwiera także możliwości opracowania nowych strategii diagnostycznych w zakresie raka endometrium. Wymaga to jednak potwierdzenia roli tego taksonu jako markera rozwoju nowotworu trzonu macicy poprzez przeprowadzenie dalszych badań z wykorzystaniem większej liczby zróżnicowanych geograficznie próbek, pochodzących dodatkowo od kobiet z różnymi stadiami zaawansowania nowotworu. Jeśli wyniki te zostałyby potwierdzone na tak znacząco poszerzonej grupie pacjentek, badanie mikrobioty pozyskanej w formie wymazów dystalnej części kanału szyjki macicy mogłoby stanowić podstawę prostej, mało inwazyjnej, mikrobiologicznej diagnozy raka

endometrium i miałyby istotne znaczenie w wykrywaniu tej choroby, być może już na jej wczesnych etapach.

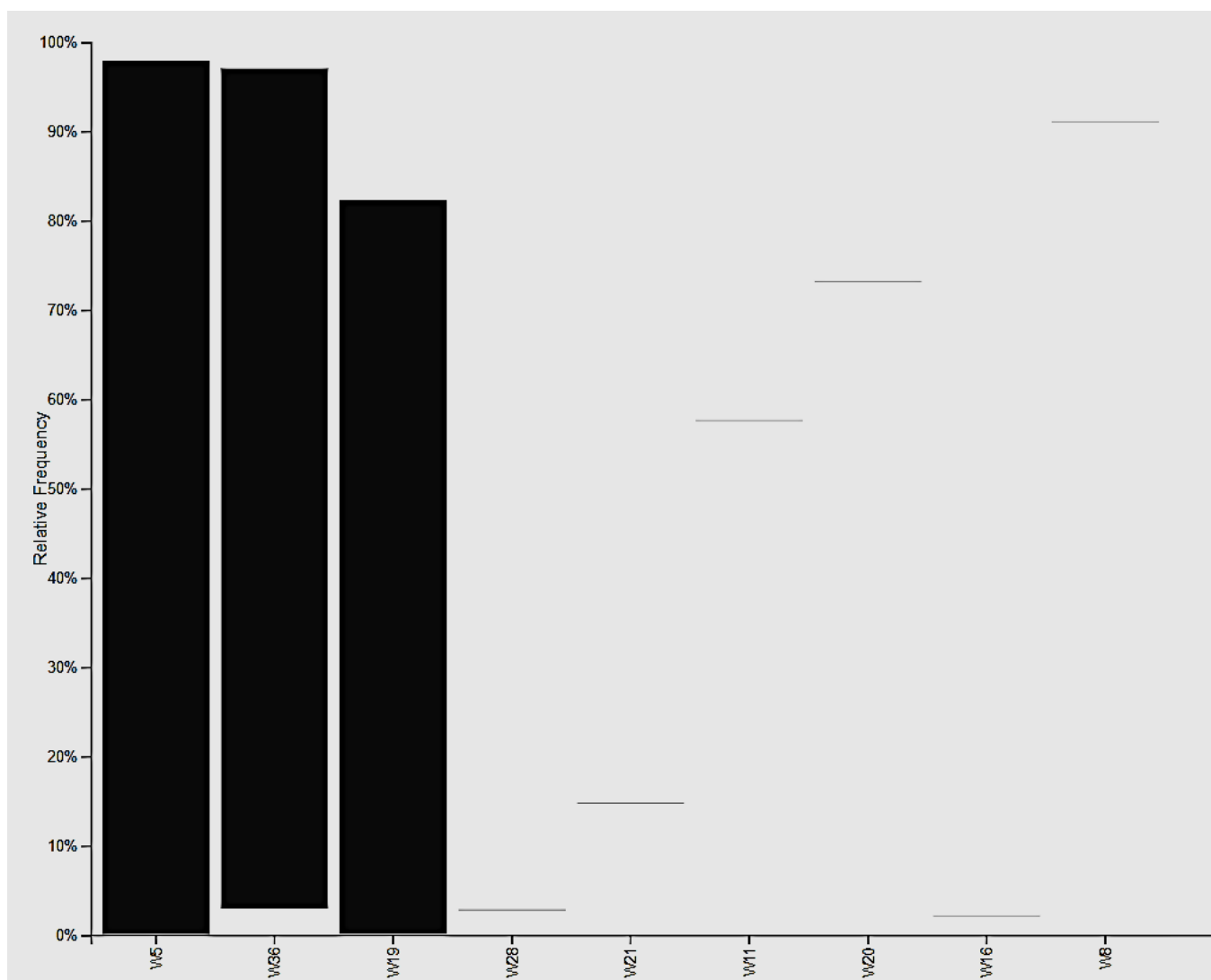
IV. Wyniki niepublikowane

Wyniki części rozprawy, realizowane w ramach funduszy Doktoranckich Grantów Badawczych (IDUB DGB, projekt pt. "Ocena udziału wybranych patogennych szczepów mikrobioty dróg rodnych kobiet w rozwoju raka endometrium") nie zostały jeszcze opublikowane. Na ich podstawie jest przygotowywany manuskrypt w języku angielskim, który wkrótce zostanie wysłany do recenzji. Poniżej przedstawiono główne założenia wykonanych badań, materiały, metody, wyniki oraz ich podsumowanie.

IV.1. Założenia oraz podstawy teoretyczne badań

Nadmierny rozrost *Gardnerella vaginalis* związany jest z manifestacją stanów patologicznych. Obecność tego gatunku jest związana z jednostką chorobową określaną jako przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy, gdzie odnotowuje się obniżenie liczebności przedstawicieli rodzaju *Lactobacillus*, a zwiększenie częstości występowania takich rodzajów, jak *Dialister*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Gardnerella*, oraz *Anaerococcus* (Liu i in., 2019). W badaniach dotyczących pacjentek z problemami z zajściem w ciążę stwierdzono, że dominacja bakterii z rodzajów *Atopobium sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Gardnerella sp.*, *Haemophilus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Neisseria sp.*, *Staphylococcus sp.* i *Streptococcus sp.*, w mikrobiocie endometrium była związana z nieudanymi ciążami i niskim wskaźnikiem żywych urodzeń (Moreno i in., 2022). Badania przeprowadzone przez Castro i in. (Castro i in., 2020) wykazały, że mikroorganizmy takie jak *Atopobium vaginae* i *Gardnerella vaginalis* są głównymi patogenami bakteryjnymi, związanymi z zapaleniem pochwy i są odpowiedzialne za stymulowanie wzmożonej odpowiedzi immunologicznej komórek nabłonka pochwy. Co więcej wykazano, że komórki nabłonka pochwy wydzielają IL-6 i IL-8 w odpowiedzi na obecność tych patogenów, ale nie na obecność *Lactobacillus crispatus* (Anton i in., 2022; Libby i in., 2008). Badania Lozano i in. (2023) wskazują na wzmożoną częstość występowania rodzajów *Gardnerella*, *Prevotella* oraz *Ralstonia* w próbkach endometrium kobiet z nawracającym zapaleniem błony śluzowej macicy. Co ciekawe, badania wskazują na możliwy związek wzmożonego wzrostu *Gardnerella* z występowaniem śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN), która odnosi się do zmian przednowotworowych szyjki macicy. Badania wskazują, że rozrost *G. vaginalis* wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju CIN2 i CIN3,

czyli dysplacji średniego i dużego stopnia odpowiednio (So i in., 2020). Z kolei badania przeprowadzone przez nasz zespół wskazują na większą częstość występowania *Gardnerella* w wymazach dystalnej części kanału szyjki macicy kobiet z nowotworem endometrium (Ryc.5). Odnotowano obecność *G. vaginalis* w sześciu próbach wymazów pochodzących od kobiet ze stwierdzonym nowotworem endometrium, a w trzech był to szczep dominujący [P3]. Może to wskazywać na istotną rolę tego rodzaju w patogenezie nowotworu.



Rycina 5. Względna częstość występowania (ang. *Relative Frequency*) rodzaju *Gardnerella* w wyniku genotypowania wymazów dystalnej części kanału szyjki macicy kobiet z mięśniakiem macicy (MM) oraz z nowotworem endometrium (NE). Gatunek *Gardnerella* został zidentyfikowany w 6/16 prób NE oraz 3/13 prób MM, a w 3/16 NE był gatunkiem dominującym (wizualizację wykonano przy użyciu narzędzia QIIME 2 View). W5, W36, W19, W21, W20, W8 – NE, W28, W11, W16 – MM.

Celem tego etapu pracy była weryfikacja hipotezy, dotyczącej związku pomiędzy obecnością *G. vaginalis* a patogenezą nowotworu endometrium, oraz ocena wpływu tego szczepu na rozwój nowotworu endometrium. W badaniach oceniano stopień adhezji szczepu w stosunku do ludzkich komórek endometrium oraz aktywność protekcyjną *Lactobacillus jensenii* w tym procesie, zmiany poziomu wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz aktywności metabolicznej mitochondriów linii komórek endometrialnych w obecności patogenu *G. vaginalis*, wpływ badanego szczepu na tempo podziałów komórkowych oraz na poziom wydzielanych przez nie cytokin i chemokin prozapalnych.

IV.2. Materiał i metody

IV.2.1. Hodowla linii komórek ludzkich

W ramach niniejszych badań wykorzystano trzy linie ludzkich komórek, w tym dwie linie nowotworowe endometrium (Ishikawa ECACC 99040201 i HEC-1A ATCC HTB-112) oraz jedną linię fibroblastów ściany jamy wewnętrznej macicy, która nie uległa transformacji nowotworowej (HUF, PromoCell C-12385). Komórki nowotworowe były rutynowo hodowane w podłożu DMEM-F12 (Biowest, Francja), uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS; Cytogen, Polska). Z kolei komórki fibroblastów były hodowane w podłożu do hodowli fibroblastów 2 (FGM2; Promocell, Niemcy), zawierającym czynniki wzrostu oraz 2% FBS (PromoCell, Niemcy). Proces hodowli przeprowadzano w inkubatorze Galaxy 48R (New Brunswick, Niemcy), w standardowych warunkach hodowli komórek, utrzymując temperaturę 37°C i stężenie CO₂ na poziomie 5%. Z uwagi na prowadzenie hodowli komórek ludzkich w obecności bakterii, w trakcie eksperymentów stosowano środowisko pozbawione antybiotyków.

IV.2.2. Hodowla bakterii

Bakterie *Gardnerella vaginalis* (ATCC 140180) oraz *Lactobacillus jensenii* (ATCC 25258) były hodowane w pożywce tryptozowo-sojowej (TSB; Biomaxima, Polska), wzbogaconej ekstraktem drożdżowym w stężeniu 0.0005 g/L, witaminą K1 (Thermo Fisher Scientific, USA) o stężeniu 0.005 g/L Haemin (Thermo Fisher Scientific, USA) oraz 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS; Cytogen, Polska). Proces hodowli prowadzono w warunkach ograniczonego dostępu tlenu - przy temperaturze 37°C i stężeniu CO₂ wynoszącym 5%, przez okres 24 godzin.

Przed wprowadzeniem bakterii do hodowli komórek ludzkich, zawiesinę poddawano wirowaniu (przy 10.000 rpm przez 10 minut), po czym osad bakteryjny zawieszano w pożywce DMEM-F12 z dodatkiem 10% FBS lub w uzupełnionym podłożu do hodowli fibroblastów 2 (FGM2).

IV.2.3. Optymalizacja MOI

Komórki ludzkie, o gęstości 1×10^5 hodowano na szalce do hodowli o średnicy 60 mm, przez okres 24 godzin. Po tym czasie do szalek dodawano zawiesinę bakteryjną o odpowiedniej gęstości tak, by stosunek MOI wynosił od 0.1 do 20. Obliczenia MOI (współczynnik zakażenia; ang. *multiplicity of infection*), czyli stosunku liczby bakterii do liczby komórek ludzkich w hodowli, przeprowadzano zgodnie z poniższym wzorem:

$$MOI = \frac{\text{Liczba komórek bakteryjnych}}{\text{Liczba komórek ludzkich}}$$

Hodowlę prowadzono przez kolejne 24 godziny w standardowych warunkach. Po upływie tego czasu komórki były zbierane poprzez wirowanie przy prędkości 3 600 rpm przez 5 minut i zliczane za pomocą komory Bürckera, gdzie uwzględniano zarówno komórki żywe, jak i martwe. Komórki martwe uwidaczniano za pomocą barwienia błękitem trypanu (Thermo). Za wynik pozytywny uznawano obecność nie więcej niż 30% martwych komórek ludzkich po koinkubacji z badanymi bakteriami. W przypadku przekroczenia tej wartości, próbki o stosunku MOI powyżej tej granicy były wykluczane z dalszej analizy. Ustalono, że stosunek MOI wynoszący 0.5 jest optymalnym parametrem gęstości do koinkubacji z komórkami ludzkimi.

IV.2.4. Ocena stopnia adhezji szczepów do badanych linii komórek ludzkich

Komórki ludzkie zostały wysiane na odpowiednie płytki 6-dołkowe (Nest, Chiny) i hodowane do osiągnięcia stanu konfluencji na poziomie 70-80%. Następnie, po fazie wstępnej hodowli, do komórek dodawano zawiesinę bakteryjną, wcześniej znakowaną barwnikiem fluorescencyjnym *BacLight Green* (Invitrogen, USA), przy współczynniku MOI wynoszącym 0.5. Wspólną hodowlę prowadzono przez 24 godziny.

Po okresie hodowli, komórki były poddawane trypsynizacji, a następnie zbierane i poddane wirowaniu (przy prędkości 3.600 rpm przez 5 minut). Ostatecznie komórki były zawieszane w roztworze DPBS i przenoszone na płytki z czarnym dnem. Odczyt fluorescencji był prowadzony za pomocą czytnika płytek SpectraMAX i3 (Molecular Devices, USA), przy długościach fal Ex/Em = 480/561 nm.

IV.2.5. Analiza aktywności protekcyjnej *L. jensenii* wobec infekcji *G. vaginalis*

Komórki ludzkie zostały przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.2.4. Następnie, do komórek dodawano zawiesinę bakteryjną *L. jensenii* w stosunku 10 MOI i inkubowano przez 3 godziny. Po tym okresie usuwano medium nad komórkami, a do komórek dodawano zawiesinę *G. vaginalis*, również w stosunku 10 MOI, znakowaną fluorescencyjnym barwnikiem. Przeprowadzano kolejną 3-godziną koinkubację.

Po zakończeniu inkubacji komórki ludzkie były trypsynizowane, poddawane wirowaniu (przy prędkości 3.600 rpm przez 5 minut), a następnie zawieszane w roztworze DPBS. Ostatecznie komórki zostały przeniesione na płytkę z czarnym dnem w celu odczytu fluorescencji. Odczyt ten przeprowadzono za pomocą czytnika SpectraMAX i3, przy długościach fal Ex/Em = 480/561 nm.

IV.2.6. Ocena zmian poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) linii komórek ludzkich po koinkubacji z badanymi szczepami

Ludzkie komórki zostały przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.2.4. Po okresie wstępnej hodowli, do poszczególnych dołków płytek dodano *L. jensenii* i *G. vaginalis* w stosunku 0.5 MOI. Płytki, przygotowane w ten sposób, zostały poddane inkubacji przez 24 godziny.

Po zakończeniu inkubacji, komórki zostały wyznakowane sondą H₂DCF-DA (Thermo,...) w stężeniu końcowym 5 µM. Zgodnie z zaleceniami producenta, inkubacja z sondą została przeprowadzona w warunkach ograniczonego oświetlenia oraz w medium pozbawionym FBS przez 40 minut. Sonda ta, reagując z reaktywnymi formami tlenu (RFT), przekształcała się w 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF), związek fluorescencyjny, którego ilość jest proporcjonalna do ilości wytworzonych reaktywnych form tlenu. Następnie przeprowadzono trypsynizację komórek, zebranie i wirowanie, a uzyskane osady

zawieszono w roztworze DPBS i przeniesiono na płytkę z czarnym dnem. 15 minut przed odczytem do komórek nie zawierającym bakterie dodano nadtlenek wodoru (H_2O_2) w stężeniu 0.5%, co stanowiło kontrolę pozytywną sondy. Odczyt fluorescencji płytki został dokonany przy użyciu czytnika SpectraMAX i3, przy długościach fal Ex/Em = 492/527 nm.

IV. 2.7. Ocena zmian aktywności mitochondriów linii komórek ludzkich po kohodowli z badanymi szczepami

Do oceny zmian aktywności mitochondriów w komórkach ludzkich zastosowano fluorescencyjny znacznik MitoTracker Red FM (Invitrogen). Komórki były wstępnie hodowane w standardowych warunkach, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.2.4. Po fazie wstępnej hodowli, nanoszono świeże podłoże zawierające 0.5 MOI *L. jenseni* lub 0.5 MOI *G. vaginalis*, po czym komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji, podłoże zostało usunięte, a komórki zostały oplukane z bakterii roztworem DPBS. Następnie komórki były znakowane zgodnie z instrukcjami producenta w podłożu wolnym od płodowej surowicy bydlęcej, zawierającym 50 nM znacznika, przez 15 minut. Po znakowaniu przeprowadzono trypsynizację komórek, zebrano je poprzez wirowanie, a uzyskane osady zawieszono w roztworze DPBS i przeniesiono na płytkę o czarnym dnie. Odczyt fluorescencji płytki został wykonany przy użyciu czytnika SpectraMAX i3, przy długościach fal Ex/Em = 581/644 nm.

IV.2.8. Analiza zmian tempa podziałów komórkowych

IV.2.8.1. Ocena zmian tempa podziałów za pomocą testu klonogenego

W celu wstępnej oceny zmian tempa podziału badanych komórek, posłużono się standardową procedurą testu klonogenego, która została poddana modyfikacjom. Proces rozpoczęto od wysiewania komórek ludzkich na szalki o średnicy 60 mm, przeznaczone do hodowli komórek ludzkich (Nest). Gęstość wysiewanych komórek wyniosła $2,5 \times 10^5$ komórek/szalkę, a hodowla prowadzona była w warunkach standardowych do osiągnięcia stanu konfluencji na poziomie 70-80%. W kolejnym etapie, w drugim dniu hodowli, do każdej szalki dodano 0.5 MOI zawiesiny poszczególnych bakterii, po czym inkubowano je przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji komórki zostały dwukrotnie płukane roztworem DPBS, poddane trypsynizacji, a następnie określono ich gęstość po traktowaniu za pomocą komory Bürckera. Na świeże szalki 6-dołkowe

wysiewano jednakową liczbę komórek ludzkich (5×10^3), pozostawiając je w hodowli przez kolejne 10 dni w celu uformowania kolonii. Po tym okresie komórki zostały utrwalone w mieszaninie metanolu i kwasu octowego w stosunku 3:1, a następnie poddane barwieniu 0.5% roztworem fioletu krystalicznego. Zliczono wybarwione kolonie i obliczono frakcję przeżywającą przy użyciu wzoru:

$$\text{Frakcja przeżywająca} = \frac{\text{Liczba wysianych komórek}}{\text{Liczba sformowanych kolonii}} \times 100\%$$

Dodatkowo, ze względu na morfologię komórek linii HUF, wybarwione fioletem krystalicznym komórki zostały zawieszone w 33% kwasie octowym, co ma na celu ekstrakcję barwnika z kolonii by umożliwić ilościową ocenę intensywności wybarwienia za pomocą pomiaru absorbancji roztworu przy długości fali 550 nm za pomocą czytnika płytek SpectraMAX i3. Pomiar ten miał na celu ocenę gęstości komórek tworzących kolonię na podstawie intensywności wybarwienia.

IV.2.8.2. Ocena zmian tempa podziału za pomocą testu BrdU

W celu oceny zmian tempa podziału komórek linii HUF po hodowli z 0.5 MOI *G. vaginalis* i 0.5 MOI *L. jensenii*, zastosowano test oparty na zestawie komercyjnym BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Abcam, ab287841). Procedurę analizy przeprowadzono zgodnie z wytycznymi producenta tego zestawu.

W pierwszym etapie próbki inkubowano w obecności BrdU o końcowym stężeniu 1X, zgodnie z protokołem producenta. BrdU jest syntetycznym analogiem tyminy, który inkorporuje się do nowo syntetyzowanego DNA komórek dzielących się. Następnie komórki dwukrotnie przepłukano roztworem PBS w celu usunięcia niezwiązanego BrdU. Wykorzystano odczynniki dostarczone w zestawie: przeciwciało pierwotne anti-BrdU, wtórne przeciwciało sprzężone z HRP (ang. *horseradish peroxidase*; peroksydaza chrzanowa) oraz substrat TMB (ang. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*; 3,3',5,5'-tetrametylbenzydina). Po dodaniu TMB odczyt absorbancji przeprowadzono początkowo przez 30 minut przy długości fal 650 nm, a następnie, po dodaniu roztworu hamującego reakcję, przy długości fali 450 nm. Pomiar absorbancji pozwala na ocenę aktywności podziałowej komórek na podstawie ilości wbudowanego BrdU.

IV.2.9. Analiza stężenia wybranych cytokin/chemokin prozapalnych za pomocą multitestu Bio-Plex (Bio-Rad)

IV.2.9.1 Przygotowanie supernatantu pohodowlanego

Komórki ludzkie hodowano do osiągnięcia stanu konfluencji na poziomie 70-80% na szalkach do hodowli adherentnej 60 mm (Nest), stosując jako inokulum zawiesinę o gęstości 5×10^5 komórek na szalkę. Następnie dodawano zawiesinę bakteryjną odpowiadającą 0.5 MOI i hodowano wspólnie przez 24 godziny w warunkach standardowych. Po zakończeniu hodowli zbierano podłoże pohodowlane, a następnie próbki poddano wirowaniu przy przyspieszeniu $1,000 \times g$ przez 15 min w 4°C. Po wirowaniu podłoże wolne od komórek przenoszono do czystych probówek typu Falcon i filtrowano przez sterylne filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,20 μm . Tak przygotowane supernatanty wolne od komórek przechowywano w -80°C do momentu pomiaru.

IV.2.9.2 Bezpośrednia analiza poziomu cytokin/chemokin za pomocą multitestu Bio-Plex (Bio-Rad)

Do oznaczenia stężeń wybranych cytokin (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , VEGF) zastosowano test Bio-Plex Pro Cytokine assay (Bio-Rad), zgodnie z instrukcją producenta. Przygotowano standardy kalibracyjne, kulki magnetyczne opłaszczane przeciwciałami, odczyniki do znakowania oraz bufony zgodnie z instrukcją załączoną do zestawu. Supernatant wolny od komórek bakteryjnych, przygotowany zgodnie z procedurą w opisie IV.2.10.1, inkubowano wraz z kulkami magnetycznymi na płycie czarnej 96-dółkowej na podstawce magnetycznej przez 1 godzinę w warunkach wytrząsania (850 ± 50 rpm). Kolejno dodawano przeciwciało detekcyjne i ponownie inkubowano przez 30 min w warunkach wytrząsania. Po tym czasie dodawano streptawidynę – PE i inkubowano kolejne 10 min z wytrząsaniem. Następnie dołki przepłukiwano trzykrotnie buforem płuczącym załączonym w zestawie, a kulki zawieszano w 125 μl buforu do odczytu. Odczyt płytki przeprowadzano za pomocą platformy Bio-Plex® Magpix™ Multiplex Reader (Bio-Rad).

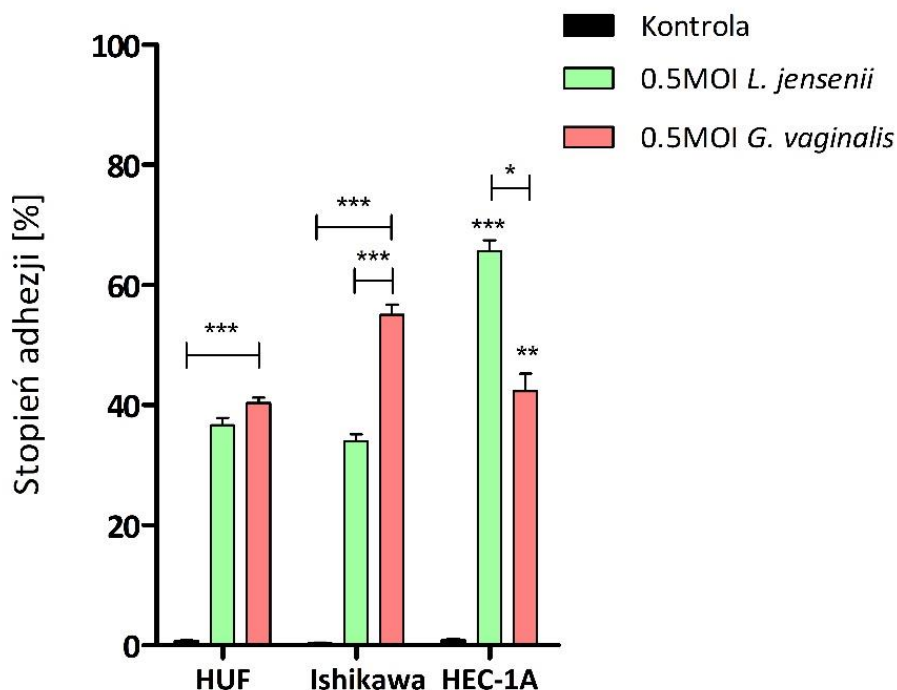
IV.2.10. Statystyka

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Analizę danych przeprowadzono z użyciem testu One-way ANOVA. Za istotny statystycznie uznano wynik $p \leq 0,05$. W celu dokonania obliczeń i wizualizacji wyników wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism w wersji 7.0.1 (GraphPad Software, USA).

IV.3. Wyniki

IV.3.1. Ocena stopnia adhezji *L. jensenii* oraz *G. vaginalis* do badanych linii komórek endometrium

Poziom adhezji, wyrażony w procentach, badanych szczepów drobnoustrojów w określonym współczynniku zakażenia (0.5 MOI) w stosunku do linii komórkowych HUF, Ishikawa i HEC-1A, został zobrazowany na Rycinie 6. Pomiar ten został przeprowadzony po 24-godzinnej koinkubacji bakterii wraz z komórkami badanych linii ludzkich w warunkach standardowych. Stwierdzono znaczną zdolność adhezji zarówno *G. vaginalis*, jak i *L. jensenii* do wszystkich analizowanych linii komórek ludzkich, na poziomie 40-60 procent, w zależności od typu linii komórkowej. Istotne różnice zaobserwowano w porównaniu stopnia adhezji pomiędzy fizjologicznym szczepem *L. jensenii*, a patogennym *G. vaginalis* w stosunku do komórek nowotworowych linii Ishikawa, gdzie poziom adhezji tych szczepów wyniósł, odpowiednio, 34 ± 2 i 55 ± 3 procent. Odwrotne zjawisko zaobserwowano w przypadku komórek nowotworowych linii HEC-1A, gdzie poziom adhezji *L. jensenii* osiągnął $65,67 \pm 3,06$ procent, a szczepu *G. vaginalis* - $42,33 \pm 5,03$ procent. Znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy poziomem adhezji *L. jensenii*, jak i *G. vaginalis* nie zanotowano w komórkach linii HUF, gdzie proces ten zachodził na poziomie około 40 procent w obu przypadkach.



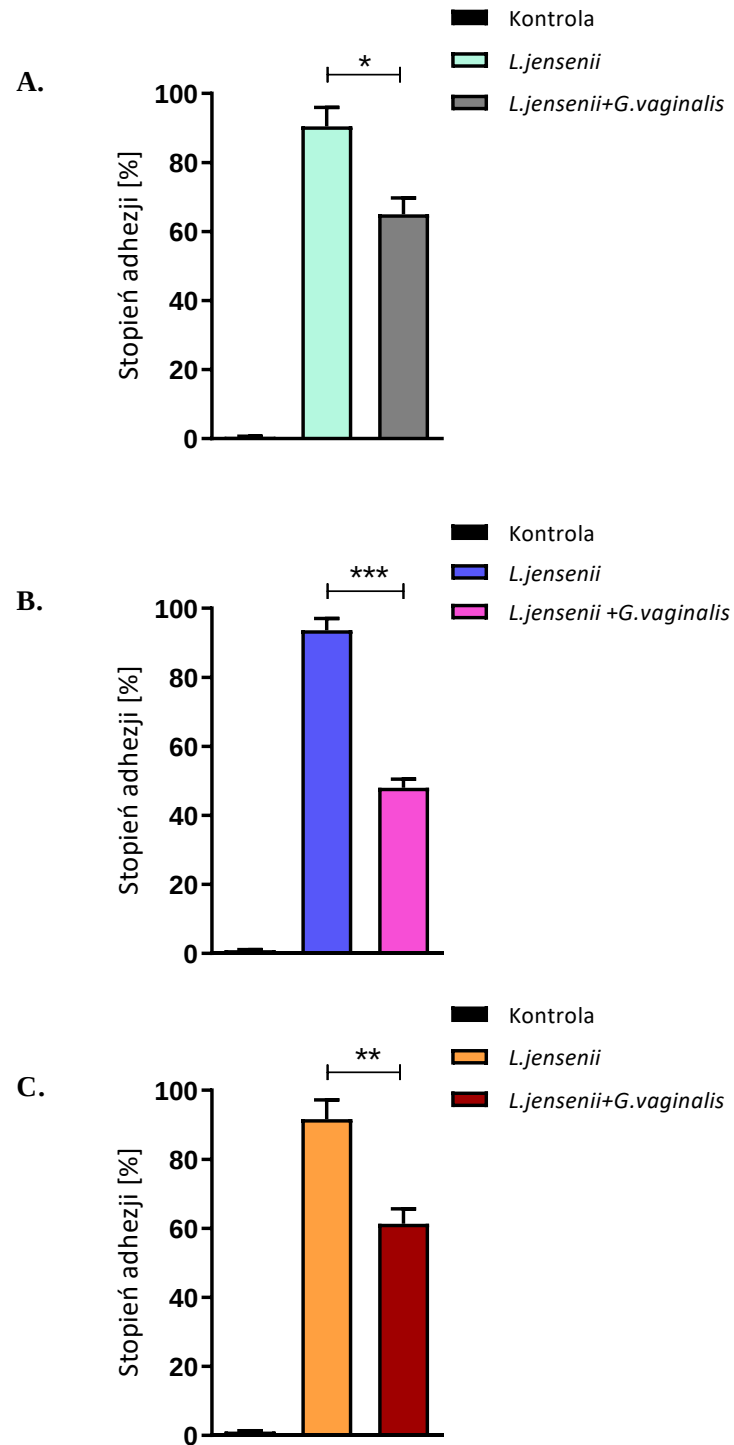
Rycina 6. Poziom adhezji (%) badanych szczepów *L. jensenii* oraz *G. vaginalis* w stosunku do komórek endometrium linii ludzkich HUF, Ishikawa i HEC-1A. Badania przeprowadzono używając współczynnika MOI wynoszącego 0,5. Czas koinkubacji wynosił 24 godziny w warunkach standardowych hodowli. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

IV.3.2. Ocena aktywności protekcyjnej *L. jensenii* w stosunku do badanych ludzkich linii komórek endometrium wobec infekcji *G. vaginalis*

Wyniki testu wykazały, że obecność *G. vaginalis* istotnie wpływa na zdolność adhezji *L. jensenii* do badanych linii komórek endometrium. Najmniejszy spadek adhezji zaobserwowano w linii HUF, gdzie po koinkubacji stopień adhezji wyniósł $65 \pm 8,19$ % (* $p < 0,05$). W przypadku linii HEC-1A obniżenie było bardziej znaczące i wynosiło $61,34 \pm 7,51$ % (** $p < 0,01$). Największy wpływ *G. vaginalis* na adhezję *L. jensenii* odnotowano w linii Ishikawa, gdzie stopień adhezji *L. jensenii* spadł do $48 \pm 4,36$ % (*** $p < 0,001$). Wyniki, przedstawione na Rycinie 7 wskazują, że *L. jensenii* wykazuje zróżnicowaną aktywność protekcyjną w zależności od linii komórkowej.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* pełnią kluczową rolę w utrzymywaniu zdrowia żeńskich narządów rodnych, tworząc barierę ochronną i utrzymując prawidłowe

pH środowiska (3,8-4,5). W kontekście infekcji patogenami, takimi jak *G. vaginalis*, integralność tej bariery jest kluczowa dla zapobiegania kolonizacji patogennej (Garcia-Grau i in., 2019). Celem niniejszego eksperymentu była ocena zdolności adhezji *L. jensenii* do komórek endometrium oraz jego potencjalnej roli ochronnej wobec infekcji *G. vaginalis*. Badanie przeprowadzono poprzez najpierw inkubację komórek endometrium z *L. jensenii* (10 MOI) przez 3 godziny, a następnie ekspozycję na *G. vaginalis* (również 10 MOI) przez kolejne 3 godziny. Po zakończeniu koinkubacji, oceniono stopień adhezji przy użyciu technik fluorescencyjnych.

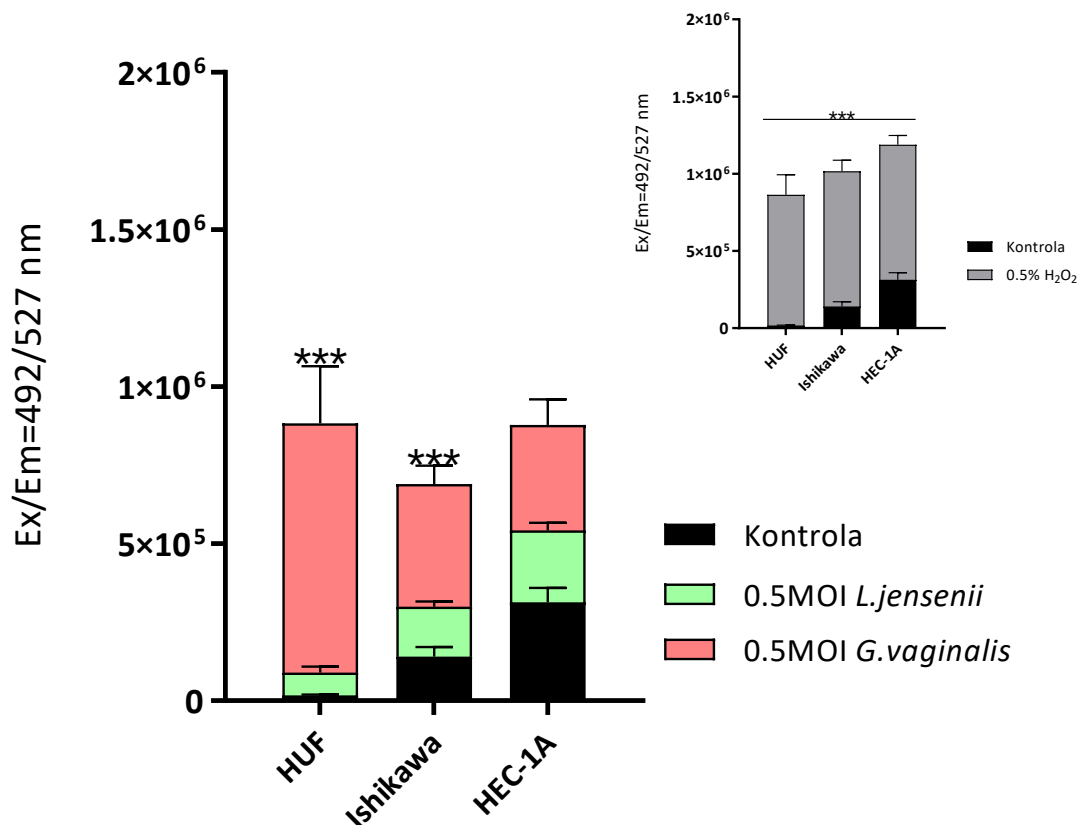


Rycina 7. Stopień adhezji fizjologicznego szczepu *L. jensenii* do komórek linii HUF (A.), Ishikawa (B.) i HEC-1A (C.) został wyrażony w procentach przed i po koinkubacją z równą objętością patogenego szczepu *G. vaginalis*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV.3.3. Ocena zmian poziomu RFT komórek linii HUF, Ishikawa oraz HEC-1A po infekcji badanymi szczepami bakterii z użyciem sondy H₂DCF-DA

Istotność udziału RFT w rozwoju nowotworu wynika ich zdolności w utrzymywaniu mikrośrodowiska zapalnego, co sprzyja nasilonej proliferacji komórek guza. Dodatkowo RFT ma wpływ na onkogenne szlaki sygnałowe komórki, poprzez zaburzanie struktury i aktywności elementów wrażliwych na utlenienie (m.in. receptorów, kinaz białkowych czynników transkrypcyjnych) (Hong i in., 2024).

Analiza zmian poziomu RFT w odpowiedzi na obecność bakterii została przeprowadzona dla linii HUF, Ishikawa i HEC-1A (Rycina 8). W komórkach nienowotworowych linii HUF patogenne bakterie *G. vaginalis* powodowały istotny wzrost poziomu RFT po 24 godzinach koinkubacji przy współczynniku MOI = 0,5 (** $p < 0,001$). Natomiast fizjologiczne bakterie *L. jensenii* nie miały takiego efektu — poziom RFT pozostał niezmienny. Podobne zależności zaobserwowano w linii komórek nowotworowych Ishikawa, gdzie koinkubacja z *G. vaginalis* prowadziła do znacznego wzrostu poziomu RFT (** $p < 0,001$), podczas gdy obecność *L. jensenii* nie wpłynęło istotnie na odpowiedź oksydacyjną komórek. W przypadku komórek linii HEC-1A nie odnotowano istotnych zmian poziomu RFT po koinkubacji z *G. vaginalis*, co może wynikać z innej natury tych komórek oraz odmiennego tempa ich metabolizmu. Odnotowano istotny wzrost poziomu RFT (** $p < 0,001$) po inkubowaniu komórek w środowisku 0.5% H₂O₂ przez 15 min, co stanowiło kontrolę pozytywną sondy.

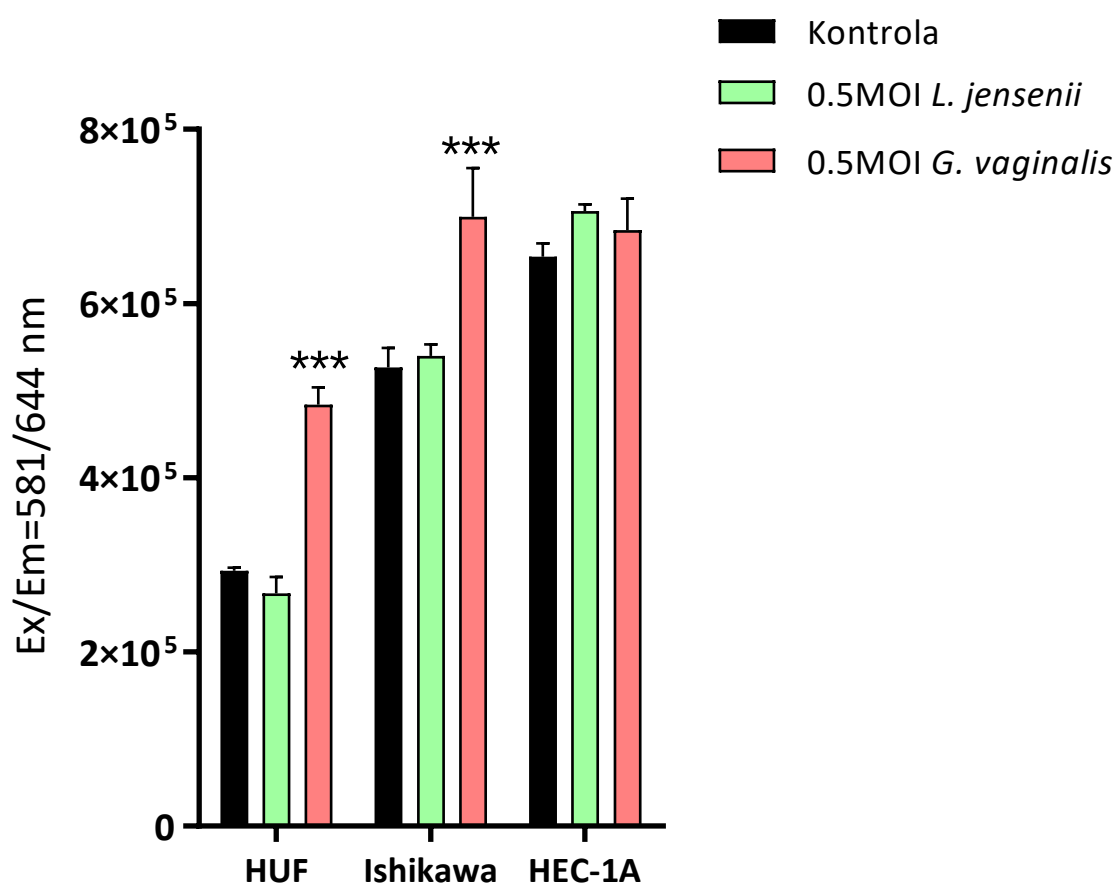


Rycina 8. Zmiany poziomu RFT komórek linii HUF, Ishikawa oraz HEC-1A po koinkubacji z 0.5 MOI *L. jensenii* oraz 0.5 MOI *G. vaginalis* w warunkach standardowych. Pomiar fluorescencji przy długościach fal Ex/Em = 492/527 nm przeprowadzono po 24-godzinnej koinkubacji z badanymi szczepami bakterii. W celu sprawdzenia prawidłowej aktywności sondy H₂DCF-DA (kontrola pozytywna testu) wykorzystano dodatkowo inkubację komórek ludzkich niezawierających bakterie, z 0.5% H₂O₂ przez 15 minut. *** p<0,001.

IV.3.4. Analiza porównawcza zmian aktywności mitochondriów komórek linii HUF, Ishikawa i HEC-1A po kohodowli z *G. vaginalis* oraz szczepem fizjologicznym *L. jensenii*

Analizę zmian aktywności mitochondriów badanych linii komórek endometrium przeprowadzono za pomocą sondy Mitotracker Red FM (Invitrogen), która wnika tylko do aktywnych metabolicznie mitochondriów (Rycina 9). W wyniku przeprowadzonego testu zaobserwowano istotny wzrost aktywności mitochondriów komórek linii HUF

oraz Ishikawa po koinkubacji z patogennym szczepem *G. vaginalis* (***) $p < 0,001$). Nie odnotowano podobnego wpływu *G. vaginalis* w stosunku do komórek linii HEC-1A. Koinkubacja z przedstawicielem flory fizjologicznej *L. jensenii* także nie miała istotnego wpływu na zmianę poziomu aktywności mitochondriów.



Rycina 9. Analiza zmian aktywności mitochondriów komórek linii HUF, Ishikawa oraz HEC-1A po koinkubacji z 0.5 MOI *L. jensenii* oraz 0.5 MOI *G. vaginalis* przez 24 godziny w warunkach standardowych. Test przeprowadzono z użyciem sondy Mitotracker Red FM (Invitrogen, USA), pomiar fluorescencji wykonano przy długości fal Ex/Em = 581/644 nm. *** $p < 0,001$.

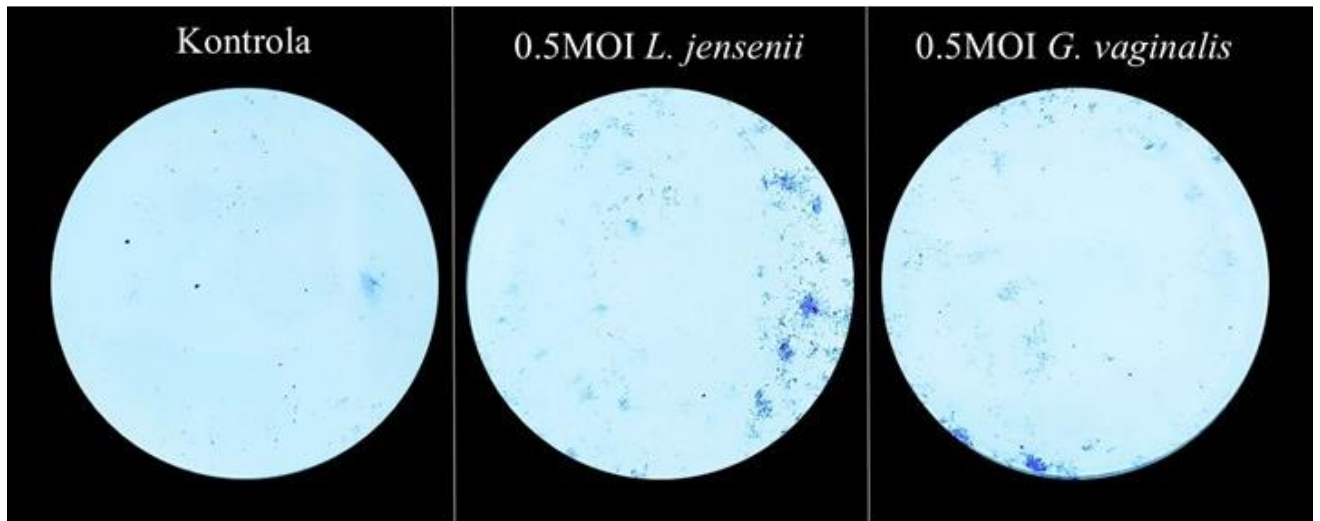
IV.3.5. Ocena zmian tempa podziałów komórkowych w wyniku ekspozycji ludzkich komórek endometrium na badane szczepy

Badania tempa podziałów komórkowych w obecności bakterii, takich jak *G. vaginalis* i *L. jensenii*, pozwala na ocenę wpływu mikroorganizmów na proliferację komórek endometrium. Analiza ta jest istotna, ponieważ nieprawidłowe tempo podziałów komórkowych może wskazywać na procesy patologiczne, takie jak przewlekły stan zapalny lub zmiany nowotworowe. Przewlekłe infekcje bakteryjne mogą prowadzić do utrzymującego się stanu zapalnego oraz odpowiedzi immunologicznych, które z czasem zmieniają normalne wzorce proliferacji komórek. Próby kontrolowania wzrostu bakterii przez układ odpornościowy mogą skutkować przebudową tkanek oraz zmianami w lokalnym środowisku komórkowym, co dodatkowo wpływa na tempo podziałów komórkowych (Soni i in., 2024). Ocena wpływu bakterii na proliferację komórek dostarcza więc ważnych informacji o potencjalnych mechanizmach oddziaływania drobnoustrojów na środowisko endometrium oraz ich roli w zdrowiu i chorobach układu rozrodczego.

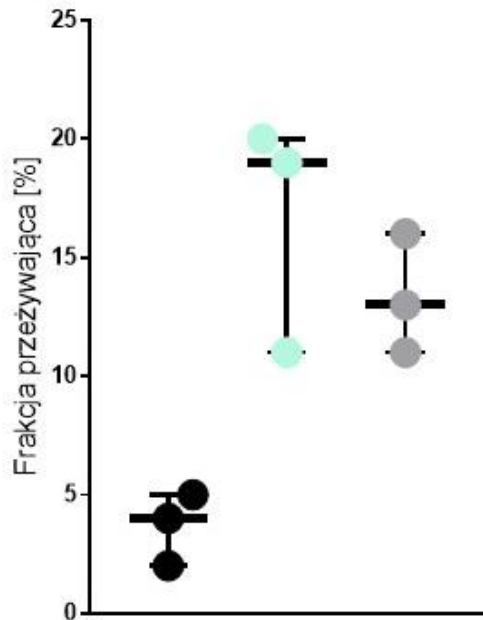
IV.3.5.1. Ocena zmian tempa podziału komórek endometrium za pomocą zmodyfikowanej metody testu klonogenego

Metoda testu klonogenego służy do oceny zdolności komórek do proliferacji oraz tworzenia kolonii, co odzwierciedla ich długoterminowy potencjał przeżycia. Wyniki testu klonogenego przeprowadzonego na liniach komórkowych Ishikawa, HEC-1A oraz HUF wykazały istotne zmiany w tempie podziałów komórkowych w wyniku ekspozycji na *L. jensenii* oraz *G. vaginalis* przy wybranym MOI. W przypadku komórek nienowotworowych endometrium HUF, po rozpuszczeniu 33% kwasie octowym, odnotowano istotny wzrost liczby kolonii zarówno po koinkubacji z 0.5 MOI *L. jensenii*, jak i 0.5MOI *G. vaginalis* (** $p < 0.001$). Klasyczna metoda zliczania kolonii nie wykazała bezpośrednio tego efektu, lecz jedynie tendencję, co może być związane z różnorodnością morfologiczną fibroblastów w porównaniu z pozostałymi badanymi komórkami. W przypadku komórek linii Ishikawa nie zaobserwowano istotnych zmian w tempie podziałów komórkowych po koinkubacji z badanymi szczepami bakterii. Natomiast w komórkach linii HEC-1A stwierdzono zmniejszoną zdolność do tworzenia kolonii zarówno po kohodowli z *L. jensenii*, jak i *G. vaginalis* (** $p < 0,01$). Wyniki przedstawiono na Rycinie 10 A , B i C dla komórek linii HUF oraz 11 A i B dla komórek Ishikawa i HEC1A.

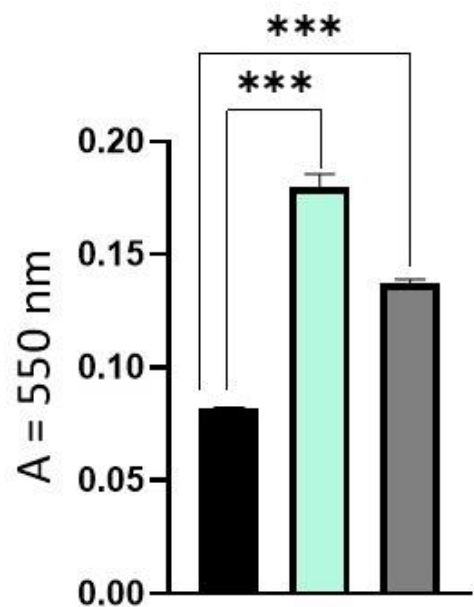
A.



B.



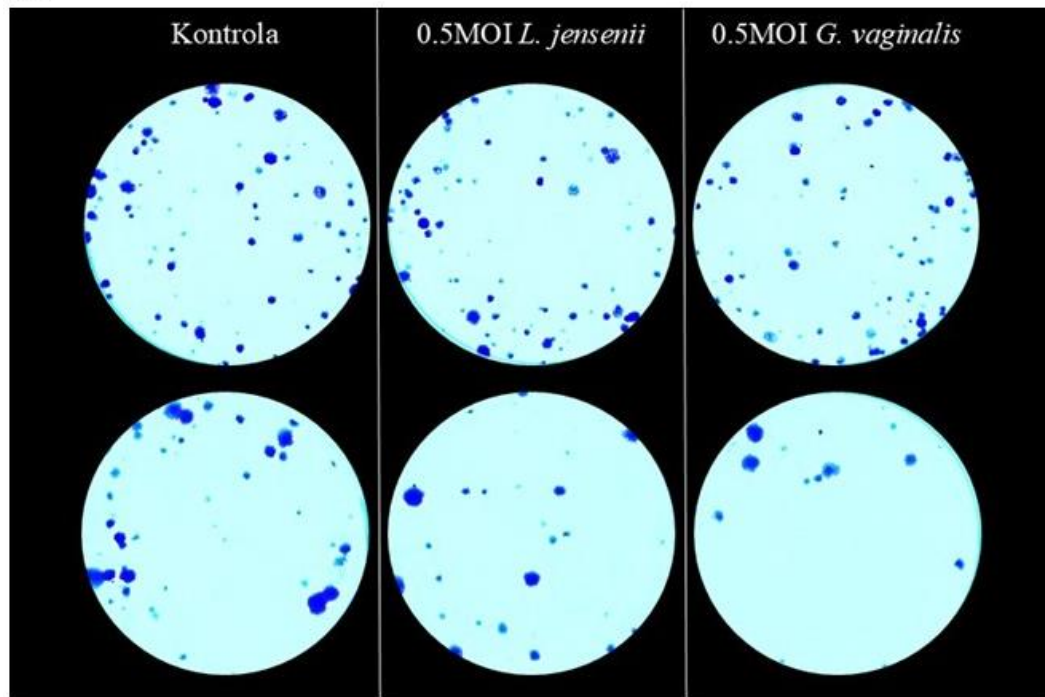
C.



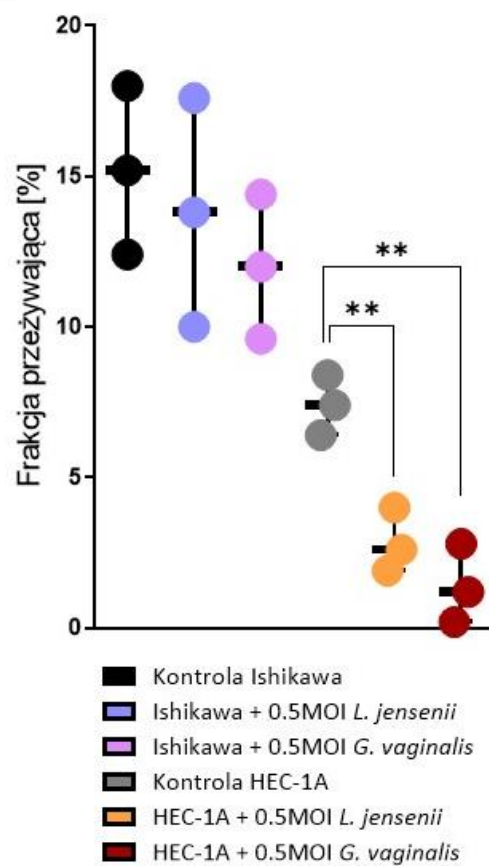
■ Kontrola
■ 0.5MOI *L. jensenii*
■ 0.5MOI *G. vaginalis*

Rycina 10. Wyniki testu klonogenego dla komórek linii HUF po koinkubacji z 0.5 MOI *L. jensenii* oraz 0.5MOI *G. vaginalis* przez 24 godziny. A - obraz kolonii utworzonych przez komórki ludzkie po ekspozycji na badane szczepy bakterii; B - analiza zmian aktywności koloniotwórczej komórek po koinkubacji z badanymi szczepami bakterii, przeprowadzona na podstawie obliczeń frakcji przeżywającej. C – ocena zmian liczebności utworzonych kolonii po ich rozpuszczeniu w 33% kwasie octowym. *** $p < 0,001$.

A.



B.



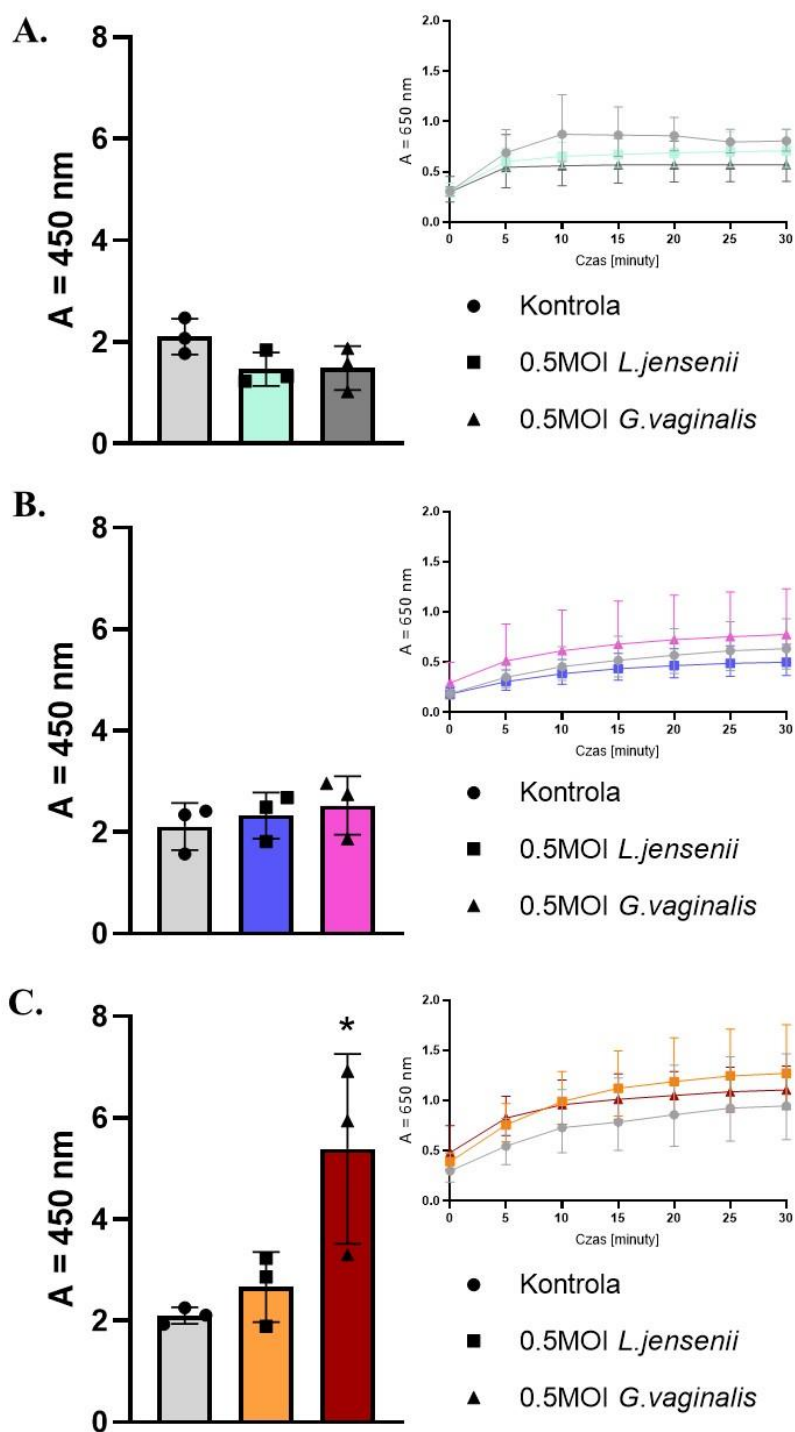
Rycina 11. Wyniki testu klonogenego dla komórek Ishikawa i HEC-1A, po koinkubacji z 0.5MOI *L. jensenii* oraz 0.5MOI *G. vaginalis* przez 24 godziny. A - obraz

kolonii utworzonych przez komórki ludzkie po ekspozycji na badane szczepy bakterii; B - analiza zmian aktywności koloniotwórczej ludzkich komórek po koinkubacji z badanymi szczepami bakterii, przeprowadzona na podstawie obliczeń frakcji przeżywającej. $**p<0,01$.

IV.3.5.2. Ocena zmian tempa podziału komórek endometrium za pomocą testu BrdU

Test z wykorzystaniem BrdU (bromodeoksyurydyny) służy do wykrywania komórek aktywnie proliferujących. Po 24-godzinnej ekspozycji linii HEC-1A na 0,5 MOI *G. vaginalis*, zaobserwowano istotne (* $p<0.05$) zwiększenie aktywności proliferacyjnej komórek ludzkich. Z kolei w przypadku komórek nienowotworowych linii HUF oraz nowotworowych linii Ishikawa nie zaobserwowano znaczących zmian proliferacji. Wyniki te sugerują, że efekt stymulujący proliferację może być specyficzny dla określonych typów komórek nowotworowych.

Zasada testu polega na inkorporacji BrdU, który jest syntetycznym analogiem tyminy, do DNA podczas jego syntezy w fazie S cyklu komórkowego. Po inkorporacji BrdU, DNA jest denaturowany, co umożliwia specyficznym przeciwciałom wiązanie się z BrdU. Następnie, detekcja za pomocą reakcji immunoenzymatycznej, pozwala na ilościowe określenie poziomu proliferacji komórek. Co ciekawe, efekty przeprowadzonego testu z użyciem BrdU są odmienne od wyników dotyczących oznaczenia zmian tempa podziałów komórkowych za pomocą testu klonogenego, przedstawionego w punkcie V.5.1. Wyniki przedstawiono na Rycinie 12.



Rycina 12. Ocena zmian aktywności proliferacyjnej komórek linii HUF (A), Ishikawa (B) oraz HEC-1A (C), po koinkubacji z 0.5MOI *L. jensenii* i 0.5MOI *G. vaginalis* przez 24 godziny. Analizę przeprowadzono z użyciem testu komercyjnego BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Abcam, ab287841). * $p < 0,05$.

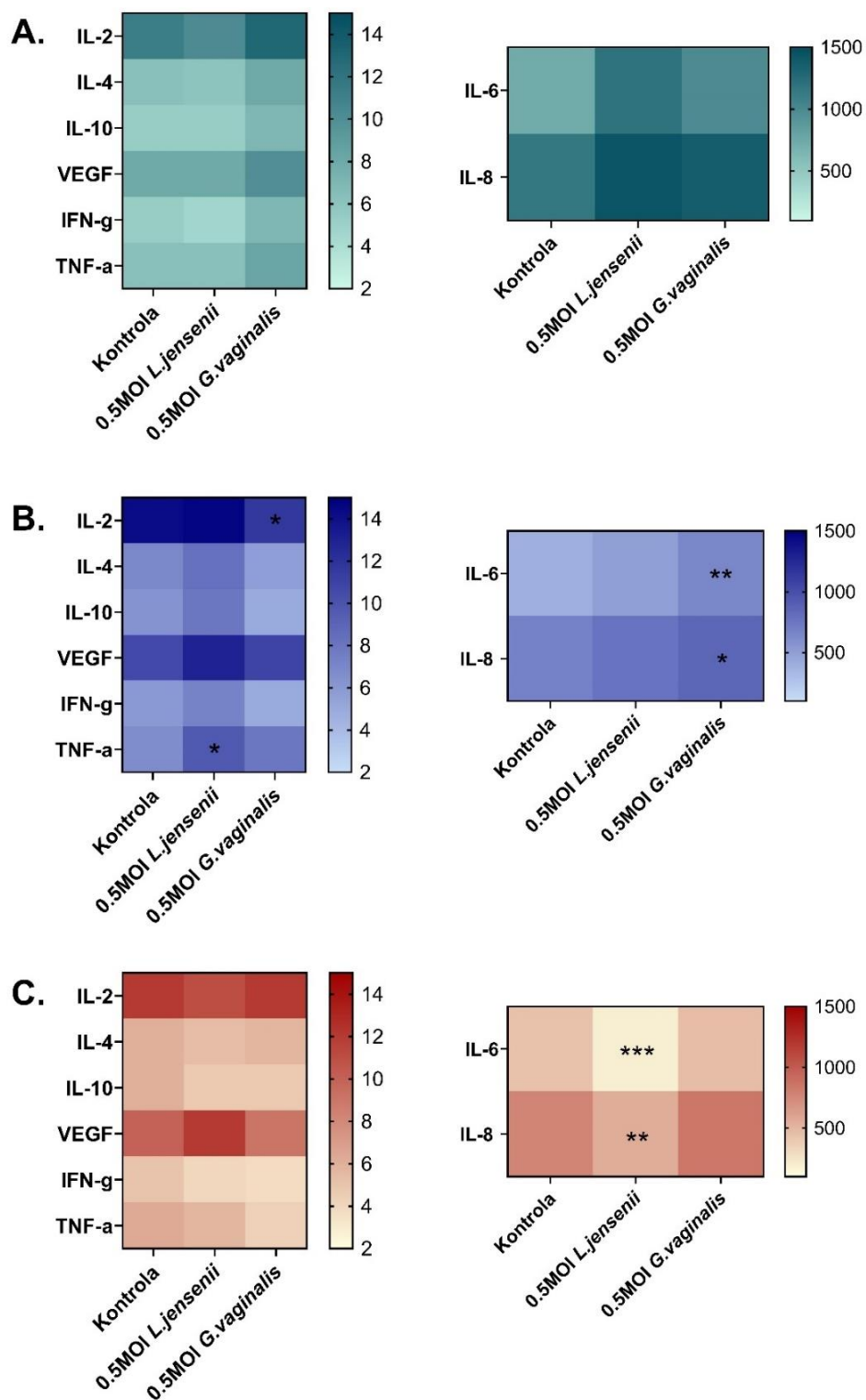
IV.3.6 Ocena profilu odpowiedzi immunologicznej linii komórek endometrium po koinkubacji z *G. vaginalis* lub *L. jensenii* za pomocą multitestu Bio-Plex (Bio-Rad)

Wyniki eksperymentu pokazują zróżnicowane zmiany w poziomach cytokin w trzech liniach komórkowych endometrium po koinkubacji z *G. vaginalis* lub *L. jensenii*. W linii komórkowej Ishikawa, po koinkubacji z *G. vaginalis*, zaobserwowano istotne obniżenie poziomu IL-2 (* = $p < 0.05$) oraz wzrost ekspresji IL-6 (** = $p < 0.01$) i IL-8 (* = $p < 0.05$), co wskazuje na silną reakcję prozapalną, która może sprzyjać progresji nowotworu. Natomiast koinkubacja tej samej linii komórkowej z *L. jensenii* spowodowała istotny wzrost poziomu TNF- α (* = $p < 0.05$), co sugeruje działanie immunomodulacyjne tego szczepu.

W linii komórkowej HEC-1A koinkubacja z *L. jensenii* doprowadziła do istotnego obniżenia poziomu IL-6 (***) = $p < 0.001$) i IL-8 (** = $p < 0.01$) oraz wykazała tendencję do obniżenia IL-2, przy jednoczesnym wzroście VEGF. Może to sugerować zmniejszenie stanu zapalnego w tych komórkach, jednak z jednoczesnym potencjalnym wsparciem procesów angiogenezy.

W przypadku linii nienowotworowej HUF koinkubacja z *G. vaginalis* wykazała tendencję do wzrostu poziomu IL-2 i VEGF, co może świadczyć o umiarkowanej reakcji zapalnej i aktywacji procesów naprawczych. Z kolei koinkubacja tych komórek z *L. jensenii* spowodowała tendencję do wzrostu poziomu IL-6 oraz IL-8, co może sugerować łagodną reakcję prozapalną.

Porównanie wyników wskazuje, że odpowiedź komórek endometrium na bakterie patogenne *G. vaginalis* różni się istotnie od odpowiedzi na bakterie fizjologiczne *L. jensenii*, co może mieć kluczowe znaczenie w kontekście zrozumienia mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej w środowisku endometrium. Zestawienie wyników przedstawiono na Rycinie 13.



Rycina 13. Zmiany poziomu wybranych cytokin prozapalnych komórek linii HUF (A), Ishikawa (B) oraz HEC-1A (C) po kohodowli z 0.5 MOI *L. jensenii* oraz 0.5 MOI *G. vaginalis* przez 24 godziny. Wizualizację zmian przedstawiono za pomocą tzw. *heatmap*.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

V. Dyskusja

Endometrium jest dynamicznie rozwijającą się częścią układu rozrodczego, podlegającą procesom proliferacji i różnicowania podczas cyklu miesięczkowego, w odpowiedzi na zmiany poziomu steroidowych hormonów płciowych, takich jak estrogen i progesteron (Boutriqu i in., 2021). Przeprowadzone badania dotyczące mikrobioty układu rozrodczego kobiet konsekwentnie wskazują na dominację bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Na przykład badania Mitchella i in. (2015) wykazały, że u 95% kobiet poddanych histeroktomii z powodów nienowotworowych w wymazach górnych dróg rodnych dominowały *Lactobacillus iners*, *Prevotella spp.* oraz *L. crispatus*. Podobne obserwacje były dokonywane w badaniach Moreno i in. (2016), gdzie mikrobiota próbek płynu endometrialnego od 13 kobiet w wieku rozrodczym była zdominowana przez *Lactobacillus*, z dodatkową obecnością takich bakterii, jak *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Prevotella* i *Streptococcus*. Z kolei Tao i współpracownicy (2017) stwierdzili obecność *Lactobacillus* u wszystkich 70 badanych pacjentek, analizując próbki płynu z cewników transferowych, a u połowy z nich *Lactobacillus* stanowił ponad 90% mikrobioty.

Kolejne badania, przeprowadzone przez Kyono i in. (2018) oraz Carosso i in. (2020), również potwierdziły dominację *Lactobacillus* w płynie endometrialnym. Jednak inne badania, takie jak te prowadzone przez Li i in. (2018) oraz Winters i in. (2019), wykazały niższą obfitość *Lactobacillus*, w mikrobiocie endometrium, co może wynikać z różnych metod pobierania próbek. Różnice te mogą wpływać na wyniki, podkreślając ich zróżnicowanie w zależności od metodyki badawczej. Na skład mikrobiomu endometrium wpływają także zmiany hormonalne. Wykazano, że egzogenne progestyny zmniejszają różnorodność filotypów *Lactobacillus spp.*, co potwierdzają badania dotyczące zmian mikrobioty po kontrolowanej stymulacji jajników i podawaniu progesteronu. W efekcie zwiększa się różnorodność mikrobioty zarówno w pochwie, jak i w endometrium, przy jednoczesnym spadku liczebności *Lactobacillus*, a wzroście liczby bakterii takich rodzajów, jak *Atopobium* i *Prevotella* (Carosso i in., 2020; Pelzer i in., 2018).

Mikrobiom endometrium podlega dynamicznym zmianom w trakcie cyklu menstruacyjnego, co skutkuje niestabilnością i regularną wymianą gatunków bakterii zarówno w pochwie, jak i w endometrium. W fazie proliferacyjnej obserwuje się wzrost liczebności *Prevotella spp.*, natomiast w fazie wydzielniczej dominują bakterie z rodzaju *Sneathia spp.* (Gajer i in., 2012; Pelzer i in., 2018). Zmiany dotyczą także innych bakterii,

takich jak *Propionibacterium*, *Pseudomonas* i *Sphingobium*, których liczebność różni się w poszczególnych fazach cyklu. Wzrost ich populacji w fazie proliferacyjnej może być związany z intensywnymi procesami metabolicznymi, w tym ze zwiększoną syntezą peptydoglikanu i aminoacylo-tRNA (Chen i in., 2017). Autorzy podkreślają jednak, że te czynniki są tylko jedynymi z elementów składających się na złożoną regulację wzrostu bakterii, a pełen mechanizm tego zjawiska wymaga dalszych badań. Z kolei liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest niska po menstruacji, ale stopniowo wzrasta podczas rozwoju pęcherzyków, osiągając najwyższy poziom w fazie lutealnej (Kadogami i in., 2020). Co ciekawe, zmienia się także liczebność wirusów i archeonów w różnych fazach cyklu menstruacyjnego (Sola-Leyva i in., 2021).

Zwiększona częstość występowania nowotworu endometrium, zarówno w Stanach Zjednoczonych, jak i w Europie, jest powiązana z wysokim wskaźnikiem otyłości oraz innymi czynnikami ryzyka, takimi jak starszy wiek, wczesne pojawienie się pierwszej miesiączki, późna menopauza, brak ciąż oraz stosowanie terapii hormonalnej w czasie menopauzy (Clarke i in., 2018). Bokhman jako pierwszy w 1983 roku zaproponował podział raka endometrium na dwa główne typy histologiczne: typ I i typ II. Typ I, rak endometrioidalny, rozwija się w kontekście rozrostu endometrium, z ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych, co jest związane z zaburzeniami hormonalnymi. Najczęstsze mutacje w typie I obejmują geny *pten*, *pik3ca* oraz *kras*, a także mutacje dezaktywujące *msh6*, które związane są z niestabilnością mikrosatelitarną (Boutiriq i in., 2021). Z kolei typ II, rak nieendometrioidalny, jest rzadziej występującą, ale bardziej agresywną formą nowotworu, rozwijającą się w zanikowym endometrium. Charakteryzuje się niskim stopniem zróżnicowania oraz częstymi przerzutami. W typie II raka dominują mutacje w genie supresorowym *tp53*, a także nadaktywność receptora kinazy tyrozynowej HER2 (Bansal i in., 2009; Boutiriq i in., 2021; Van Nyen i in., 2018).

Pomimo tego klasycznego podziału, coraz częściej zauważa się, że podział raka endometrium na typ I i II traci na znaczeniu z uwagi na podobieństwa w klinicznym obrazie tych dwóch typów. Przykładowo, otyłość i cukrzyca, które są czynnikami ryzyka związanymi z nadmierną ekspozycją na estrogeny, występują zarówno u kobiet z NE typu I, jak i u tych z typem II, niezależnym od estrogenów. Z tego względu wprowadzono molekularną klasyfikację raka endometrium w oparciu o dane The Cancer Genome Atlas (TCGA), dzieląc nowotwory na cztery podtypy: podtyp ultrazmutowany z mutacją

polimerazy epsilon (POLE), podtyp związany z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI), podtyp niskokopijny (CNL) oraz podtyp wysokokopijny (CNH). Każdy z tych podtypów charakteryzuje się odmiennymi rokowaniami (American Cancer Society.; Burkett i in., 2023)

Zarówno I jak i II typ NE wiąże się ze zwiększoną aktywnością enzymu COX-2, co zwróciło uwagę naukowców jako potencjalne narzędzie terapeutyczne i prewencyjne nowotworu. Doniesienia wskazują, że nadekspresja *cox-2* w mikrośrodowisku guza sprzyja angiogenezie i pośrednio ma wpływ na regulację komórek supresorowych pochodzenia szpikowego i aktywność limfocytów, co prowadzi do unikania odpowiedzi odpornościowej (Soni i in., 2024). Zauważono działanie NLPZ jako leków o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym. Ten drugi aspekt w kontekście mikrobioty endometrium wydaje się być korzystnym ze względu na możliwość podtrzymywania prawidłowej flory bakteryjnej narządu, a prewencji rozrostu bakterii oportunistycznych, mających potencjalny wpływ na rozwój choroby nowotworowej (Kuźmycz i Stączek, 2020b). NLPZ, takie jak kwas acetylosalicylowy (aspiryna), diklofenak i ibuprofen, wskazują aktywność obniżającą tworzenie biofilmu przez szczepy kliniczne *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Wykazano, że aspiryna zakłóca prawidłowe działanie mechanizmu quorum sensing, co uniemożliwia prawidłowe uformowanie biofilmu poprzez *Pseudomonas aeruginosa* (Dumitrascu i in., 2023; Paes Leme & da Silva, 2021). Niektóre badania wskazują, że NLPZ mogą zwiększać skuteczność niektórych antybiotyków. NLPZ znacząco obniżały minimalne stężenie hamujące antybiotyków wobec różnych szczepów bakteryjnych, co sugeruje efekt synergistyczny mogący poprawić wyniki leczenia infekcji (Bhattacharya i in., 2017). Brak jest wystarczających danych dotyczących efektów NLPZ wobec bakterii występujących w obrębie narządu rodnych kobiet. Wiadomo, że ibuprofen wykazał zdolność do zakłócania adhezji *G. vaginalis* do komórek nabłonka pochwy. Mechanizm ten ma istotne znaczenie, ponieważ stanowi kluczowy etap w patogenezie waginozy bakteryjnej. Odnotowano, że ibuprofen w postaci izobutanoloamoniowej, może zwiększać skuteczność terapii przeciwgrzybiczych wobec *Candida albicans*, co może odgrywać istotną rolę w leczeniu koinfekcji, często występującej w przypadku waginozy bakteryjnej (Milani i Iacobelli, 2012).

Pomimo pozytywnych wyników niektórych badań nad zastosowaniem NLPZ w prewencji i leczeniu raka endometrium, długoterminowe stosowanie tych leków wiąże się z poważnymi efektami ubocznymi, szczególnie w kontekście uszkodzeń przewodu

pokarmowego (Brasky i in., 2017; Danforth i in., 2009). Dlatego poszukiwane są modyfikacje strukturalne NLPZ, które zachowują ich aktywność terapeutyczną, jednocześnie minimalizując działanie niepożądane (Bindu i in., 2020). Badania nad nowymi pochodnymi NLPZ, szczególnie tymi, które są skompleksowane z metalami, takimi jak miedź czy cynk, wskazują na ich potencjał w zmniejszeniu efektywnej dawki leku, co może przyczynić się do poprawy profilaktyki i leczenia nowotworów (Kuźmycz i in., 2022; Santos i in., 2022). Wstępne analizy renowych pochodnych aspiryny (**375**) i indometacyny (**377**) wykazały obiecujące efekty cytotoksyczne wobec komórek raka endometrium, takich jak Ishikawa i HEC-1A. Te pochodne okazały się bardziej aktywne w niszczeniu komórek nowotworowych, w porównaniu do oryginalnych NLPZ, co sugeruje ich potencjał jako bardziej skutecznych środków w terapii nowotworowej. Ponadto, badania wskazują, że renowe pochodne NLPZ wykazują wyższą skuteczność w indukcji produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach rakowych, co jest uznawane za mechanizm przyczyniający się do ich cytotoksyczności. W szczególności, pochodne te wykazują zwiększoną produkcję RFT w mitochondriach i cytozolu, co prowadzi do zakłócenia homeostazy komórkowej, uszkodzenia komórek i inicjacji apoptozy. Ponadto, zmniejszona dawka efektywna pochodnych renowych w porównaniu do oryginalnych NLPZ wskazuje na wyższą bioaktywność tych modyfikacji, co może mieć istotne znaczenie w leczeniu nowotworów endometrium (Kuźmycz i in., 2022). Choć wyniki tych badań są obiecujące, konieczne jest dalsze zgłębianie mechanizmów molekularnych i klinicznych, które mogą umożliwić skuteczne zastosowanie tych leków w prewencji i leczeniu raka trzonu macicy.

Coraz więcej badań wskazuje, że mikroorganizmy odgrywają istotną rolę w modulacji mikrośrodowiska guza. Ich obecność może wpływać na zdolność komórek nowotworowych do unikania odpowiedzi immunologicznej, odporność na apoptozę oraz procesy inwazji i przerzutowania (Garrett, 2015). Badania porównawcze mikrobiomu różnych typów nowotworów wykazały, że każdy z nich charakteryzuje się unikalnym składem drobnoustrojów. Przykładowo, w raku płuc zaobserwowano związek między składem mikrobiomu a statusem palenia, co sugeruje, że palenie może wpływać na specyficzne zmiany mikroflory w tym typie nowotworu. Z kolei w raku piersi stwierdzono korelację między aktywnością receptorów estrogenowych a profilem mikrobiomu (Lennard i in., 2016; Nejman i in., 2020). Te obserwacje sugerują, że istnieje potencjalna współzależność między mikrobiomem a rozwojem i progresją nowotworów.

Mechanizmy tej interakcji wymagają jednak dalszych badań, aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób mikroorganizmy mogą wpływać na różne etapy powstawania i rozwoju nowotworów, takie jak inicjacja, wzrost guza oraz tworzenie przerzutów.

Wpływ mikrobioty na karcynogenezę w obrębie endometrium nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony, jednak najnowsze badania Lu i współpracowników (2021) wykazują, że obecność specyficznych bakterii w jamie macicy jest związana z poziomem prozapalnych cytokin, takich jak IL-6, IL-8 i IL-17, które modulują lokalne środowisko i wspierają rozwój nowotworów (Lu i in., 2021). Podobne mechanizmy zaobserwowano w raku jelita grubego, gdzie obecność *Fusobacterium nucleatum* aktywowała szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina, odgrywający istotną rolę w proliferacji komórek (Kiewisz i in., 2015; Rubinstein i in., 2019). Podczas gdy dwa z powiązanych badań zidentyfikowały zmiany w składzie mikrobioty u kobiet z nowotworem endometrium w kierunku *Porphyromonas somerae* i *Atopobium vaginae* (Walsh i in., 2019; Walther-António i in., 2016), nowsze badania Gressela i współpracowników (2021) wykazały znaczne zmniejszenie liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz wzrost obecności *Pseudomonas* u pacjentek z surowiczym rakiem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te wskazują, że zmiany mikrobiologiczne mogą odgrywać ważną rolę w progresji tego nowotworu. Badania te są spójne z wcześniejszymi doniesieniami na temat roli mikrobioty w różnych nowotworach układu rozrodczego, wskazując na potencjalną współzależność między zmienionym mikrośrodowiskiem bakteryjnym a procesami nowotworowymi (Gressel i in., 2021). Najnowsze badania Leoni i innych (2024) wskazują na zwiększoną częstotliwość występowania bakterii z rodzajów *Escherichia-Shigella* oraz *Hydrogenophaga* u pacjentek z nowotworem endometrium. Te mikroorganizmy, które są zazwyczaj kojarzone z infekcjami przewodu pokarmowego i środowiskami beztlenowymi, mogą pełnić rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej lub wspierać procesy nowotworowe poprzez indukcję stanów zapalnych w endometrium. Badania te sugerują, że zmiany w mikrobiocie endometrium mogą być zarówno skutkiem, jak i przyczyną rozwoju nowotworów, co czyni mikrobiotę potencjalnym biomarkerem chorób nowotworowych (Leoni i in., 2024). Z kolei badania Li i współautorów (2021) dostarczyły dowodów na związek obciążenia nowotworowego z obecnością specyficznej mikrobioty endometrium, charakteryzującej się zwiększoną liczebnością bakterii z rodzajów *Pelomonas* i *Prevotella* u pacjentek z rakiem endometrium. *Prevotella* okazała się być dodatnio skorelowana z podwyższonym poziomem D-dimerów (DD) i produktów degradacji fibryny (FDP) w surowicy pacjentek,

co może sugerować, że te bakterie wspierają procesy koagulacyjne i prozapalne, sprzyjające rozwojowi nowotworów. Dalsze analizy transkryptomu endometrium wykazały, że *Prevotella* wpływa na ekspresję genów związanych z degradacją fibryny, co wskazuje na mechanizm molekularny, za pomocą którego dysbiotyczna mikrobiota może wspierać rozwój nowotworów poprzez modulację procesów zapalnych i hemostatycznych (Li i in., 2021).

Jednym z głównych kierunków przyszłych badań jest wykorzystanie wiedzy na temat mikrobiomu pochwy i kanału szyjki macicy u kobiet obciążonych nowotworem endometrium jako narzędzia diagnostycznego. Na przykład, badania Barczyńskiego i współpracowników (2023) wykazały istotną dominację bakterii takich jak *Mobiluncus curtisii* oraz *Fusobacterium nucleatum* w pochwie i kanale szyjki macicy u kobiet z nowotworem endometrium. Z kolei u kobiet zdrowych dominowały bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, w tym *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* oraz *G. vaginalis* (Barczyński i in., 2023). Wyniki te sugerują, że zmiany w mikrobiocie pochwy mogą być wczesnym wskaźnikiem rozwoju nowotworów endometrium, co ma ogromny potencjał w diagnostyce oraz monitorowaniu pacjentek. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań oparto na analizie mikrobioty wymazów pobranych z dystalnej części kanału szyjki macicy od 29 pacjentek z NE lub MM. Zauważono, że wymazy od pacjentek z NE charakteryzowały się znacznym wzbogaceniem w patogenne taksony, takie jak *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella* czy *Peptoniphilus*, podczas gdy w wymazach pacjentek z MM mikrobiota była bardziej jednorodna, z dominacją bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Ponadto, *Anaerococcus* w badaniach statystycznych występował jako takson różnicujący NE od MM, a zatem potencjalnie może kandydować na marker mikrobiologiczny rozwoju choroby. Dodatkowo przeprowadzono badania *in vitro*, mające na celu ocenę adhezji szczepu *Anaerococcus vaginalis* do fibroblastów tronu macicy niezmienionego nowotworowo HUF, oraz wpływu szczepu na generowanie RFT tych komórek ludzkich. Jako reprezentanta mikroflory fizjologicznej użyto *L. jensenii*. Zarówno patogeny, jak i fizjologiczny szczep wykazały zdolność do kolonizacji fibroblastów, jednak *A. vaginalis* indukował istotnie wyższy poziom RFT. Może to wskazywać na istotność szczepu w nasileniu stanu zapalnego, który może się przyczynić do rozwoju raka.

Mimo że *G. vaginalis* jest głównie znana jako patogen odpowiedzialny za rozwój waginozy bakteryjnej, coraz częściej jest wspominana w kontekście nowotworów narządu rozrodczego, w tym raka endometrium. Mitchell i in. (2015) porównali mikrobiotę pochwy

z mikrobiotą macicy i zaobserwowali, że endometrium charakteryzuje się obecnością bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a także *Gardnerella*, *Prevotella*, *Atopobium* i *Sneathia*. W innych badaniach, Moreno i współpracownicy (2022) wykazali, że obecność *Lactobacillus* jest negatywnie skorelowana z bakteriami takimi jak *Gardnerella*, *Bifidobacterium* oraz *Atopobium*, natomiast pozytywnie związana z *Clostridium* i *Streptomyces*. To zjawisko współzależności między różnymi gatunkami bakterii zostało również zaobserwowane w próbkach pochwowych w trakcie cyklu menstruacyjnego (Gajer i in., 2012), co wskazuje, że zmiany mikrobioty mogą być dynamiczne i zależne od zmian hormonalnych, a nie tylko od stanu patologicznego.

Adhezja jest ważnym czynnikiem wirulencji bakterii. Powierzchnia bakterii jest wysoko wyspecjalizowaną strukturą, której jednym z kluczowych zadań jest ułatwianie adhezji do komórek gospodarza. Procesy te są regulowane przez zmiany w metabolizmie bakterii, zjawiska quorum sensing oraz produkcję czynników wirulencji, co prowadzi do formowania biofilmów bakteryjnych, które są trudne do zwalczenia (Stones i Krachler, 2016). W kontekście *G. vaginalis*, jednym z głównych czynników wirulencji jest produkcja sialidazy oraz waginolizyny (ang. *vaginolysin*, VLY). Sialidaza rozkłada ochronną warstwę śluzową nabłonka, co ułatwia adhezję bakterii do nabłonka pochwy (Ma i in., 2022), a VLY jest toksyną tworzącą pory, co sprzyja lizie komórek docelowych, takich jak komórki nabłonka pochwy (Gelber i in., 2008).

Badania przeprowadzone przez Pattersona i współpracowników (2010) potwierdzają silną adhezję *G. vaginalis* do komórek nabłonka pochwy ME-180, a także wykazały tendencję tych bakterii do tworzenia skupisk na powierzchni komórek pochwy. Te obserwacje zostały potwierdzone przez Machado i współpracowników (2013), którzy stwierdzili, że różne szczepy *Lactobacillus* mogą hamować adhezję *G. vaginalis*. Przykładowo, *L. crispatus* wykazywał działanie hamujące, podczas gdy *L. iners* zwiększał adhezję patogenu. Wyniki tych badań potwierdzają, że balans w składzie mikrobioty ma znaczący wpływ na zdolności adhezyjne patogenów oraz ich rolę w infekcjach i stanach patologicznych. Przedstawione wyniki naszych badań nad oceną adhezji *G. vaginalis* oraz *L. jensenii* do komórek nowotworowych endometrium, takich jak linie Ishikawa i HEC-1A, dostarczyły nowych dowodów na silną zdolność patogenów do adhezji. W przypadku linii komórkowych Ishikawa, adhezja *G. vaginalis* wynosiła 55%, natomiast w linii HEC-1A – 42,33%, co wskazuje na wysoką podatność komórek nowotworowych na kolonizację przez ten patogen. Wyniki te sugerują, że komórki nowotworowe są bardziej

poddatne na infekcje bakteryjne, co może mieć związek z ich zmienioną fizjologią oraz strukturą. Adhezja *L. jensenii* była mniejsza w porównaniu z *G. vaginalis* w linii Ishikawa (34%), ale w linii HEC-1A wynosiła 65%, co może sugerować, że adhezja badanych bakterii różni się w zależności od typów komórek. Kolejne badania Castro i współpracowników (2015) również wskazują na wysoki stopień adhezji klinicznych izolatów *G. vaginalis* do komórek linii HeLa oraz na ich zdolność do wypierania *L. crispatus* ze środowiska komórek HeLa. Wyniki te sugerują, że *G. vaginalis* ma zdolność do eliminacji ochronnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co może sprzyjać rozwojowi infekcji i nowotworów.

Reaktywne formy tlenu (RFT) pełniąc kluczowe funkcje w odpowiedzi immunologicznej, w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe i regulację szlaków sygnalizacyjnych poprzez mechanizmy redoks. RFT są również zaangażowane w aktywację inflammasomu i procesy fagocytozy, jak wykazano w badaniach nad patogenami takimi jak *Listeria monocytogenes*, gdzie Nox2 (NADPH oksydaza 2, ang. *NADPH oxidase 2*) generuje RFT, które pośredniczą w aktywacji LC3-zależnej fagocytozy (LAP), wzmacniając działanie antybakteryjne makrofagów (Herb i in., 2020; Herb i Schramm, 2021). Choć istnieje niewiele danych dotyczących wpływu *G. vaginalis* na produkcję RFT w komórkach gospodarza, badania przedstawione w niniejszej pracy dostarczają nowych informacji na ten temat. Wyniki koinkubacji komórek linii HUF oraz Ishikawa z patogennym szczepem *G. vaginalis* wykazały istotny wzrost poziomu produkowanych przez nie RFT ($p < 0,001$). Wynik ten potwierdza potencjał tego patogenu do promowania odpowiedzi oksydacyjnej w specyficznych liniach komórkowych. Jest to zgodne z badaniami Xiang i współpracowników (2021), którzy stwierdzili, że *G. vaginalis* indukuje produkcję RFT w monocytach linii THP-1, co prowadzi do aktywacji inflammasomu NLRP3 (receptor rodziny NOD-podobnej, zawierającej domenę pyrynową 3, ang. *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) i pyroptozy. Interesujące, że w przypadku komórek linii HEC-1A, *G. vaginalis* nie wywołała istotnych zmian w poziomie RFT. Może to sugerować, że różnice metaboliczne lub specyficzna charakterystyka tych komórek sprawiają, że ich odpowiedź na stres oksydacyjny różni się od reakcji komórek HUF i Ishikawa, co wymaga dalszych badań, aby dokładniej zrozumieć te mechanizmy. Co więcej, nie zaobserwowano znaczących zmian poziomu RFT po koinkubacji komórek z fizjologicznym szczepem *L. jensenii*. Jest to zgodne z wiedzą na temat ochronnej roli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w mikrobiomie pochwy, które nie wywołują nadmiernej odpowiedzi oksydacyjnej (Rocha-Ramírez i in., 2021; Wells, 2011). Ciekawym aspektem jest jednak tendencja do obniżenia

poziomu RFT w komórkach linii HEC-1A po koinkubacji z *L. jensenii*, co może sugerować działanie antyoksydacyjne tego szczepu. Wyniki te mogą wskazywać na potencjalną rolę *L. jensenii* w łagodzeniu stresu oksydacyjnego w określonych komórkach, co również zasługuje na dalsze badania.

Apoptoza może być generowana w komórkach ludzkich poprzez bezpośrednie działanie *G. vaginalis*. Nadmierny rozrost szczepu patogennego może prowadzić do aktywacji kaspazy-1 w makrofagach oraz komórkach THP-1 (Xiang i in., 2021). Dodatkowo, obecność *G. vaginalis* może aktywować kaspazę-3 w komórkach nabłonka pochwy, co może prowadzić do przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej i stanowi kluczowy etap na drodze apoptozy (Roselletti i in., 2020). Wyniki przeprowadzonych i przedstawionych w niniejszej pracy badań wskazują na istotny wpływ *G. vaginalis* na aktywność mitochondriów w badanych liniach komórek endometrium. W wyniku koinkubacji z *G. vaginalis* zaobserwowano istotny wzrost aktywności mitochondriów w komórkach linii HUF oraz Ishikawa ($p < 0,001$), co sugeruje zwiększenie aktywności metabolicznej tych komórek. Natomiast w komórkach linii HEC-1A nie odnotowano podobnej zależności. Dodatkowo, koinkubacja z przedstawicielem mikrobioty fizjologicznej - *L. jensenii*, nie miała istotnego wpływu na poziom aktywności mitochondriów w żadnej z badanych linii komórkowych. Wyniki te wskazują, że *G. vaginalis* może indukować specyficzne zmiany w aktywności mitochondriów, które zależą zarówno od rodzaju komórek, jak i gatunku bakterii.

Zmiany aktywności mitochondriów w komórkach ludzkich można także wykryć poprzez monitorowanie potencjału błony wewnętrznej mitochondriów. Efekt ten może się różnić w zależności od gatunku bakterii, oraz postępu infekcji (Maurice i Sadikot, 2023). Przykładowo, niektóre szczepy *Staphylococcus aureus* powodowały znaczący spadek potencjału mitochondrialnego w mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*, *BMMSC*). Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* wykazywały szybki wzrost i szybko wpływały na funkcję mitochondriów w BMMSC, natomiast *Staphylococcus epidermidis* wywierał istotny wpływ na aktywność mitochondriów dopiero po 24-godzinnej koinkubacji z komórkami szpiku kostnego (Pietilä i in., 2012). Niektóre bakterie zmieniają metabolizm komórek gospodarza, co wpływa na funkcję mitochondriów. Na przykład *Legionella pneumophila*, *Brucella abortus* i *Mycobacterium tuberculosis* promują przejście na glikolizę, podczas gdy *Chlamydia trachomatis* wzmacnia fosforylację oksydacyjną (OXPHOS), aby zwiększyć

produkcję ATP (Maurice i Sadikot, 2023). Pewne cząsteczki bakteryjne, takie jak 3-oxo-C12-homoseryna, autoindukcyjny lakton z *P. aeruginosa*, mogą powodować fragmentację sieci mitochondrialnej i zmieniać strukturę grzebieni (Borbolis i in., 2023).

Dane literaturowe wskazują, że obecność *G. vaginalis* w znacząco wpływa na vitalność komórek ludzkich. Udowodniono, że *Gardnerella* znacząco obniża żywotność komórek HeLa i wywiera cytotoksyczne działanie na komórki nabłonka szyjki macicy (Anton i in., 2022). Jednym z głównych czynników cytotoksyczności *G. vaginalis* jest waginolizyna, toksyna tworząca pory w błonach komórek gospodarza i specyficznie oddziałująca na ludzkie komórki nabłonkowe, prowadząc do ich śmierci. Istnieje kilka typów tej toksyny (1A, 1B, 1C, 2 i 3), przy czym typ 1A wykazuje wyższą cytotoksyczność w porównaniu do typu 2, nawet przy podwyższonej ekspresji CD59, białka chroniącego komórki przed uszkodzeniami (Shvartsman i in., 2023). Jednym z mechanizmów ochrony przed cytotoksycznym działaniem *G. vaginalis* może być obecność bakterii rodzaju *Lactobacillus*. Dowiedziono, że *L. crispatus* może redukować aktywność cytotoksyczną *G. vaginalis* w warunkach *in vitro* (Castro i in., 2018). Cytotoksyczność *G. vaginalis* wiąże się także z odpowiedzią immunologiczną komórek gospodarza, obejmującą aktywację NF-κB i wydzielania cytokin prozapalnych, co często zależy od receptorów TLR2 (Shvartsman i in., 2023b). TLR2 z kolei odgrywa kluczową rolę w rozpoznaniu wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*; *PAMP*), inicjując kaskadę sygnalizacyjną odpowiedzi wrodzonej oraz aktywację odporności adaptacyjnej (Oliveira-Nascimento i in., 2012). Zwiększony wzrost *G. vaginalis* stymuluje wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 oraz IL-8 (Anton i in., 2022). W przeciwieństwie do patogenów, *Lactobacillus*, a w szczególności *L. crispatus* i *L. jensenii*, oddziałuje na receptory TLR2 i TLR4, aktywując szlaki NF-κB oraz wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 (Anton i in., 2022; Valenti i in., 2018). Obecność *Lactobacillus* ogranicza produkcję cytokin prozapalnych i zwiększa antonsekrecję immunoglobuliny A (sIgA), kluczowej dla zapobiegania adhezji patogenów do nabłonka (Rastogi i Singh, 2022).

Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy, oraz dotyczących aktywności protekcyjnej warstwy *lactobacilli* w obecności badanego patogenu wskazują na wysoki stopień zjadliwości patogenu w stosunku do ochronnej warstwy *L. jensenii*. Obecność *G. vaginalis* miała wpływ na około 40% obniżenie warstwy ochronnej *L. jensenii* w przypadku wszystkich badanych komórek endometrium. W szczególności odnotowano to

w przypadku komórek linii Ishikawa, gdzie obecność *G. vaginalis* miała największy wpływ na ochronną warstwę *lactobacilli* (48%). W przypadku komórek linii HUF i HEC-1A odnotowano podobne wyniki (65% i 61,34 % odpowiednio). Te oraz poprzednio przedstawione efekty obecności *Gardnerella* w środowisku komórek endometrium mogą mieć istotny wpływ na ich proliferację. Brak jest danych literaturowych dotyczących bezpośredniej analizy proliferacji komórek ludzkich po koinkubacji z *G. vaginalis*, niemniej jednak wiadomo, że w porównaniu do *L. crispatus*, obecność patogenu prowadzi do znaczących zmian żywotności komórek nabłonka pochwy oraz istotnego wzrostu cytokin prozapalnych (Anton i in., 2022), o których mowa będzie w kolejnym akapicie. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych w niniejszej pracy wskazują na istotne zmiany w tempie podziałów komórek nowotworowych oraz nienowotworowych endometrium w obecności badanego drobnoustroju patogenego. Wyniki testu klonogenego, którego zadaniem jest sprawdzenie zdolności tworzenia kolonii przez ludzkie komórki poddane ekspozycji na patogeny wskazują, iż w komórkach nienowotworowych linii HUF odnotowano zwiększoną ilość kolonii po koinkubacji zarówno z *L. jensenii*, jak i z *G. vaginalis* ($p < 0,001$). Co ciekawe, obecność *L. jenseni* powodowała większą częstość wystąpienia kolonii komórek linii HUF, aniżeli szczep patogenny. W przypadku komórek linii HEC-1A zdolność do tworzenia kolonii uległa zmniejszeniu po koinkubacji z badanymi drobnoustrojami ($p < 0,01$), a w koloniach linii Ishikawa nie zaobserwowano istotnych różnic. Zaskakujące, ale w przypadku testu BrdU, który służy do wykrywania komórek aktywnie proliferujących, istotne zmiany odnotowano tylko w przypadku komórek linii HEC-1A, gdzie po koinkubacji z *G. vaginalis* zauważono wzrost aktywności proliferacyjnej komórek ($p < 0,05$). Można zakładać, że może być to związane z różnicami długoterminowego efektu ekspozycji komórek gospodarza na obecność patogena, gdyż test BrdU wykonywano bezpośrednio po 24-godzinnej inkubacji, a tworzenie kolonii w przypadku testu klonogenego wynosiło 10 dni.

Wyniki przedstawionych w niniejszej pracy badań wskazują na różnice w odpowiedzi immunologicznej na obecność *G. vaginalis* i *L. jensenii* badanych komórek ludzkich. W tkankach nowotworowych obecność *Gardnerella* może prowadzić do supresji odpowiedzi immunologicznej poprzez mechanizm zwiększonego wydzielania rozpuszczalnego ligandu Fas (sFasL), należącego do rodziny TNF. Proporcja pomiędzy formą membranową FasL (mFasL) a sFasL może wpływać na odpowiedź immunologiczną, przy czym wyższe poziomy sFasL potencjalnie prowadzą do zmniejszonej apoptozy

komórek nowotworowych i zwiększonej przeżywalności komórek złośliwych (Contreras-Ochoa i in., 2022; Maarsingh i in., 2022). Dodatkowo, badany drobnoustrój patogenny może tworzyć silny biofilm, który może być szczególnie problematyczny w tkankach nowotworowych, ponieważ zmniejsza skuteczność odpowiedzi immunologicznej poprzez zapobieganie skutecznej internalizacji przez komórki dendrytyczne (DC) i inne komórki prezentujące antygen (APC) (Bertran i in., 2016). W przypadku linii komórkowej HUF, nie zauważono istotnych zmian w produkcji cytokin po koinkubacji z *G. vaginalis*, ani z *L. jensenii*, mimo że zauważono tendencję do wzrostu stężenia IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-8 oraz IL-6. Wyniki sugerują, że dłuższy czas koinkubacji mógłby być konieczny do wskazania pełnej odpowiedzi immunologicznej. Z kolei istotne zmiany zauważono w przypadku komórek nowotworowych Ishikawa, gdzie obserwowano istotne zwiększenie aktywności IL-6 ($p < 0,01$) oraz IL-8 ($p < 0,05$) po koinkubacji z *G. vaginalis*. Dodatkowo, koinkubacja z ww. patogenem skutkowała obniżeniem aktywności IL-2 ($p < 0,05$), co w sumie może świadczyć o silnej odpowiedzi prozapalnej komórek, przy jednoczesnej supresji dalszej odpowiedzi immunologicznej. Z danych literaturowych wynika, że IL-2 jest kluczowy dla proliferacji i funkcjonowania komórek T, a jego aktywność jest często związana z występowaniem przewlekłych stanów zapalnych. Wysoki poziom IL-6 może prowadzić do hamowania produkcji IL-2, tym samym pośrednio osłabiając działanie komórek T. Mechanizm ten zauważono w środowisku nowotworu, gdzie IL-6 promuje immunosupresję, co sprzyja wzrostowi guza, a jednocześnie hamuje skuteczną odpowiedź przeciwnowotworową (Ren i in., 2023; Vilotić i in., 2022). Co ciekawe, zaobserwowano także istotne zwiększenie aktywności TNF- α ($p < 0,05$) komórek linii Ishikawa po koinkubacji z *L. jensenii*. Badania dotyczące *L. acidophilus* wskazują, że szczep probiotyczny może indukować apoptozę w komórkach nowotworowych poprzez zwiększenie produkcji czynników proapoptotycznych, takich jak Bax, wraz z TNF- α . Tak więc wzrost aktywności TNF- α w odpowiedzi na obecność lactobacilli potencjalnie może przyczyniać się do apoptozy komórek nowotworowych (Sankarapandian i in., 2022). W przypadku linii HEC-1A nie odnotowano istotnych zmian po koinkubacji z *G. vaginalis*, ale zauważono istotne obniżenie poziomu IL-6 ($p < 0,001$) oraz IL-8 ($p < 0,01$) po koinkubacji z *L. jensenii*. Zjawisko to nie jest jeszcze w pełni zbadane, niemniej jednak odnotowano podobne efekty w przypadku stosowania probiotyków przy nowotworze jelita grubego, gdzie stosowanie probiotyków powodowało zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych i aktywację cytokin przeciwzapalnych (Śliżewska i in., 2020).

VI. Podsumowanie

Wyniki przedstawionych badań dostarczają istotnych informacji na temat składu mikrobiomu endometrium zmienionego nowotworowo, jego istotne zmiany w porównaniu do mikrobiomu narządu bez zmian nowotworowych, a także potencjalne skutki obecności wybranych patogenów w środowisku komórek endometrium oraz mechanizmu, poprzez który bakterie te mogą wpływać na patogenezę choroby. Dodatkowo, przedstawione badania dotyczące wpływu nowosyntetyzowanych renowych pochodnych NLPZ wskazują na ich wysoką aktywność wobec badanych komórek nowotworowych endometrium, co może także mieć potencjał terapeutyczny i prewencyjny choroby. Zatem podsumowując:

- Renowe pochodne aspiryny oraz indometacyny działają cytotoksycznie wobec komórek raka endometrium Ishikawa i HEC-1A. Odnotowano wyższą aktywność cytotoksyczną tych związków wobec badanych komórek endometrium, w porównaniu do oryginalnych NLPZ, a także ich większy wpływ na wzrost poziomu RFT wytwarzanych przez badane komórki, co może stanowić potencjalny mechanizm prowadzący do eliminacji komórek nowotworowych;
- Na podstawie analizy porównawczej składu mikrobiomu wymazów dystalnej części kanału szyjki macicy kobiet ze stwierdzonym nowotworem endometrium względem próbek od kobiet bez nowotworu, odnotowuje się zmianę równowagi *lactobacilli*. Wymazy pochodzące od kobiet z nowotworem endometrium cechowały się istotnym obniżeniem liczebności przedstawicieli rodzaju *Lactobacillus*, co potencjalnie wskazuje na dyzbiozę. Dodatkowo, w wymazach kobiet z nowotworem endometrium odnotowano zwiększoną obecność *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus*, oraz *Porphyromonas*, co może wskazywać na istotność przedstawicieli tych rodzajów w patogenezie choroby;
- Na podstawie analizy sekwencji wymazów dystalnej części kanału szyjki macicy kobiet z nowotworem i bez nowotworu endometrium po raz pierwszy zidentyfikowano takson różnicujący – *Anaerococcus*. Wynik ten czyni *Anaerococcus* potencjalnym markerem mikrobiologicznym nowotworu, co może ułatwić diagnostykę choroby. W dalszych badaniach *in vitro* z wykorzystaniem *Anaerococcus vaginalis*, odnotowując jego wysoki potencjał adhezyjny do komórek linii endometrium HUF, a także zdolność do indukowania produkcji RFT komórek ludzkich;

- Zaobserwowano większą częstość występowania *G. vaginalis* w wymazach dystalnej części szyjki macicy kobiet z nowotworem endometrium, w porównaniu do kobiet bez nowotworu;
- *G. vaginalis* oraz *L. jensenii* wykazują duży potencjał adhezyjny do komórek nowotworowych i nienowotworowych endometrium, a obecność *G. vaginalis* istotnie obniża aktywność protekcyjną *L. jensenii*;
- Odnotowano istotny wzrost poziomu RFT komórek linii HUF oraz Ishikawa po koinkubacji z *G. vaginalis*, oraz istotnie zwiększoną aktywność mitochondriów ww. komórek ludzkich, ale nie HEC-1A. Obecność *G. vaginalis* wywołuje istotne zmiany w aktywności metabolicznej i potencjalnie aktywuje szlaki sygnalizacyjne związane z apoptozą komórek endometrium;
- Zaobserwowano zmiany w tempie podziałów komórek endometrium po koinkubacji zarówno z *G. vaginalis*, jak i *L. jensenii*. Wyniki wskazują na istotne zmiany w mechanizmach proliferacji komórek ludzkich endometrium zarówno po długim czasie ich ekspozycji na badane gatunki bakterii, jak i po 24-godzinnej inkubacji;
- Obecność *G. vaginalis* ma istotny wpływ na wzrost uwalniania cytokin prozapalnych, a w szczególności IL-6 i IL-8, z jednoczesnym obniżeniem aktywności IL-2, co może być także związane z immunosupresją i osłabieniem odpowiedzi przeciwnowotworowej;
- Obserwacje dotyczące *L. jensenii*, wskazują na wpływ przeciwzapalny przedstawiciela flory fizjologicznej pochwy wobec komórek nowotworowych endometrium i potencjalna aktywacja szlaków sygnałowych prowadzących do śmierci komórkowej, na co wskazuje istotne obniżenie aktywności IL-6 i IL-8, oraz wzrost aktywności TNF- α . Wyniki te mogą wskazywać na potencjalną rolę *L. jensenii* jako szczepu probiotycznego w prewencji i wspomagania terapii nowotworu endometrium, a obserwacje te wymagają głębszych badań.
- Przytoczone wyniki mają wysoki potencjał do dalszych badań, zagłębiających poznanie mechanizmów interakcji szczepów patogennych i fizjologicznych układu rozrodczego kobiet w kontekście patogenezy, diagnostyki i prewencji choroby nowotworowej narządu rodnych kobiet.

VII. Wnioski

- Zmiany w składzie mikrobiomu endometrium u kobiet z nowotworem mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie raka endometrium, co wskazuje na potencjalny wpływ mikroflory bakteryjnej na rozwój choroby;
- Renowe pochodne NLPZ wykazują cytotoksyczność wobec komórek raka endometrium, co sugeruje ich potencjał terapeutyczny w leczeniu tego typu nowotworu;
- Rodzaj *Anaerococcus* może potencjalnie stanowić marker mikrobiologiczny nowotworu endometrium, a także stanowić czynnik przyczyniający się do rozwoju choroby;
- Obecność *G. vaginalis* ma wpływ na zmiany metaboliczne i immunologiczne komórek endometrium niezmienionych i zmienionych nowotworowo, podczas gdy *L. jensenii* wykazuje potencjalne działanie łagodzące stan zapalny komórek nowotworowych endometrium.

VIII. Streszczenie

Nowotwór trzonu macicy jest jednym z najczęściej występujących nowotworów żeńskich narządów rodnych na świecie, a zgłębienie wiedzy na temat przyczyn choroby stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Według danych Światowego Funduszu Badań nad Rakiem, w 2020 odnotowano około 417,000 nowych przypadków tego typu nowotworu, a w Polsce liczba zachorowań wynosiła 9,869 przypadków, co czyni nasz kraj jednym z liderów europejskich statystyk. Rak endometrium dzieli się na dwa główne typy – estrogenozależny typ I, który dominujący w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym lub z anowulacją i często związany jest z mutacjami genu *pten*, oraz typ II, bardziej agresywny, związany z mutacjami w genie *tp53*. Obie formy nowotworu wykazują nadaktywność COX-2, enzymu kluczowego w procesach zapalnych i nowotworowych. Ta właściwość nowotworu endometrium powoduje, że enzym ten może być atrakcyjnym celem pod kątem postępowania terapeutycznego, ale także w prewencji inicjacji procesu chorobowego. W tym celu mogą być wykorzystywane niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ), które hamują aktywność ww. enzymu. Ponadto, oprócz działania przeciwnowotworowego, odnotowano aktywność tych związków jako substancji bakteriobójczych, w tym eliminujący wzrost patogennych gatunków narządu rodnych kobiet. Tak więc związki te mogą stanowić czynnik przyczyniający się do utrzymania prawidłowej równowagi mikrobiomu narządu. Niestety długotrwałe stosowanie NLPZ związane jest z ryzykiem efektów ubocznych, związanych głównie z układem pokarmowym, zatem istotnym jest poszukiwanie nowych modyfikacji leków. Modyfikacją taką może być wprowadzenie atomu metalu do struktury chemicznej NLPZ, co może mieć efekt wzmacniający aktywność cytotoksyczną takich związków wobec komórek nowotworowych. W wyniku takich modyfikacji uzyskano renowe pochodne NLPZ, gdzie renowe pochodne indometacyny i aspiryny wykazały silną aktywność wobec komórek nowotworowych endometrium. Wyniki niniejszej pracy wskazują na istotnie wyższą aktywność pochodnych NLPZ wobec ludzkich komórek raka endometrium w porównaniu z oryginalnymi NLPZ, a także na ich istotny wpływ na produkcję reaktywnych form tlenu komórek nowotworowych, co może potencjalnie stanowić mechanizm pośrednio inicjujący śmierć komórek raka.

W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się mikrobiomowi endometrium. Jeszcze do 2007 roku uważano, że endometrium jest środowiskiem wolnym od drobnoustrojów. Dane literaturowe wskazują na obecność w mikrobiomie kobiet

zdrowych takich typów bakterii, jak *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, przy jednoczesnej dominacji *Lactobacillus* spp., co jest uznawane za wskaźnik zdrowego mikrośrodowiska. Niestety najnowsze doniesienia tylko podkreślają, że precyzyjnie nie udało się określić składu mikrobiomu trzonu macicy, co jest związane z różnymi istotnymi czynnikami, np. sposobem pobrania materiału, indeksem masy ciała kobiet, ilością porodów, fazą cyklu miesięczkowego, wybraną metodą obróbki materiału i sekwencjonowania, itd. Z drugiej strony, zauważono istotne zmiany równowagi mikrobiomu endometrium w różnych stanach patologicznych, w tym w przypadku nowotworu. Zmiany składu mikrobiomu mogą prowadzić do dysbiozy, co może mieć potencjalny wpływ na patogenezę raka endometrium poprzez destabilizację genomu komórek gospodarza, zaburzenie integralności bariery nabłonkowej oraz aktywację receptorów toll-podobnych przez bakteryjne metabolity. W wyniku przeprowadzonych przez nas badań dotyczących analizy porównawczej wymazów dystalnej części kanału szyjki macicy kobiet ze stwierdzonym nowotworem endometrium oraz kobiet z grupy kontrolnej odnotowano zwiększenie częstości występowania taksonów *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus*, oraz *Porphyromonas* w przypadku kobiet z nowotworem endometrium. Bakterie z gatunku *Gardnerella vaginalis* wykorzystano do dalszych badań mających na celu sprawdzenie potencjalnych efektów ekspozycji komórek nowotworowych oraz nienowotworowych endometrium na drobnoustrój patogenną. Co ciekawe, gatunek ten jest powszechnie znany ze zdolności do promowania bakteryjnego zapalenia pochwy (waginozy bakteryjnej) oraz jest uznawany za wysoce zjadliwy ze względu na możliwość produkcji toksyny – waginolizyny, której produkcja jest zależna od obecności cholesterolu w środowisku oraz enzymu sialidazy. Wyniki wykonanych badań wskazują na duży poziom adhezji badanego szczepu do komórek nowotworowych oraz nienowotworowych endometrium oraz istotny wpływ obecności tych bakterii na zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu, aktywności mitochondriów oraz poziom cytokin prozapalnych IL-6 oraz IL-8. Dodatkowo pozyskane wyniki wskazują na możliwą rolę *Lactobacillus jensenii* w łagodzeniu stanu zapalnego komórek nowotworowych, co wymaga dalszych badań tych bakterii w kontekście wykorzystania jako potencjalnego probiotyku we wspomaganiu terapii nowotworowej.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy mają szerokie implikacje. Badania nad mikrobiomem endometrium, a w szczególności nad patogennym wpływem *G. vaginalis*, dostarczają istotnych danych dla zrozumienia mechanizmów patogenezы raka trzonu

macy. Ponadto, przedstawione wyniki mogą się przyczynić do powstania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych tego typu nowotworu.

IX. Abstract

Endometrial cancer is one of the most common cancers of the female reproductive organs worldwide, and understanding the cause of the disease is a major challenge for modern medicine. According to the World Cancer Fund, in 2020 there were approximately 417,000 new cases of this type cancer, and in Poland the incidence was 9,869 cases, making our country one of the leaders in European statistics. Endometrial cancer can be divided into two main types- estrogen-dependent type I, which predominated in perimenopausal or anovulatory women and is often associated with mutations in the pten gene, and type II, a more aggressive type associated with mutations in the tp53 gene. Both types show overactivity of COX-2, an enzyme that plays a key role in inflammatory and neoplastic processes. This singularity of endometrial cancer makes this enzyme an attractive therapeutic and preventive target for the development and progression of the disease. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can be used to inhibit the activity of this enzyme. In addition to their anticancer effects, these compounds have also been reported to have bactericidal activity, including inhibition of the growth of pathogenic species of the female reproductive organs. These compounds may therefore be a factor in maintaining a normal balance of the organ microbiome and normal levels of COX-2. Unfortunately, long-term use of NSAIDs is associated with the risk of side effects, particularly in the gastrointestinal tract, so it is important to look for new drug modifications. Such modifications may include the introduction of a metal atom into the chemical structure of NSAIDs, which may have the effect of increasing the cytotoxic activity of such compounds against cancer cells. As a result of such modifications, rhenium derivatives of NSAIDs have been synthesized, where rhenium indomethacin and rhenium aspirin showed the potent activity against endometrial cancer cells. The results of the present study indicate significantly higher activity of NSAIDs derivatives against human endometrial cancer cells compared to the original NSAIDs, as well as their significant effect on reactive oxygen species of tumor cells, which may potentially represent a mechanism of indirect induction of cancer cell death.

In recent years, increasing attention has been paid to the endometrial microbiome, which until 2007 was considered to be the microbial-free part of the organ.

The literature indicates the presence of taxons, such as *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* in the microbiome of healthy women, with a predominance of *Lactobacillus* spp., which considered an indicator of healthy microenvironment. Unfortunately, recent reports only emphasize that the exact composition of the endometrial microbiome could not be determined, which can be related with various relevant factors (method of material collection, body mass index of woman, number of deliveries phase of the menstrual cycle, chosen method of material processing and sequencing, etc.) In turn, significant changes in the balance of the endometrial microbiome have been found in various pathological conditions, including cancer. Changes in the composition of the microbiome can lead to dysbiosis, which may have a potential impact on the pathogenesis of endometrial cancer by the host cell genome destabilization, the epithelial barrier integrity disruption, and activation of toll-like receptors by bacterial metabolites. Our study of comprehensive analysis of smears from the distal part of the cervical canal of women with endometrial cancer and control reported an increased frequency of *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus* and *Porphyromonas* taxa in women with endometrial cancer. *Gardnerella vaginalis* was used for further studies to test the potential effects of exposure of cancerous and nono-cancerous endometrial cells to the pathogenic strain. Interestingly, this species is well known for its ability to promote bacterial vaginosis and is considered highly virulent due to its ability to produce the toxins – vaginolysin, whose production is dependent on the presence of cholesterol in the environment, and sialidase. The results of the study indicate a high level of adhesion of the tested strain to cancerous and non-neoplastic endometrial cells, and a significant effect of the strain presence on increasing levels of reactive oxygen species, mitochondrial activity and levels for the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. In addition, the obtained results suggest a possible role for *Lactobacillus jensenii* in inflammation relieve of cancer cells, which calls for further studies of the strain in the context of a potential probiotic to support cancer therapy.

In conclusion, the results of the present study have broad implications. The study of the endometrial microbiome, and in particular the pathogenic effect of *G. vaginalis*, provides important data for understanding the mechanisms of endometrial cancer pathogenesis. In addition, the results presented may contribute to new diagnostic and therapeutic strategies for this type of cancer.

X. Dorobek naukowy

X.1. Publikacje nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

- Mikrobiom endometrium, pochodzenie i rola w karcynogenezie. Marek Szczepaniak, **Olga Kuźmycz**. *Studenckie czasopismo naukowe Eureka!* 2021
- Acridine/Acridone–Carborane Conjugates as Strong DNA-Binding Agents with Anticancer Potential. Daria Różycka, Aleksandra Kowalczyk, Marta Denel-Bobrowska, **Olga Kuźmycz**, Magdalena Gapińska, Paweł Stączek, Agnieszka B Olejniczak. *ChemMedChem*. 2023. doi: 10.1002/cmdc.202200666
- Probiotics as a potential tool for gynecological cancers prevention and therapy support. **Olga Kuźmycz**, Wiktoria Wierzbńska. *Folia Biologica et Oecologica*. 2024. doi: 10.18778/1730-2366.18.12
- Potential role of bacterial pathogens in the immunopathogenesis of ovarian cancer. Wiktoria Wierzbńska, **Olga Kuźmycz**. *Folia Biologica et Oecologica*. 2024. doi: 10.18778/1730-2366.18.15

X.2. Czynny udział w konferencji

X.2.1. Prezentacja posteru

- *Anticancer activity of fac-[Re(CO)3(phen)(aspirin)] and fac-[Re(CO)3(phen)(indomethacin)] complexes against endometrial cancer cell line.* **Olga Kuźmycz**, Aleksandra Kowalczyk, Joanna Skiba, Konrad Kowalski, and Paweł Stączek. 5th International Conference of Cell Biology, 10-12 maja 2019, Kraków;
- *Anticancer activity of fac-[Re(CO)3(phen)(aspirin)] and fac-[Re(CO)3(phen)(indomethain)] complexes against HEC-1A cancer cell line.* **Olga Kuźmycz**, Aleksandra Kowalczyk, Joanna Skiba, Konrad Kowalski, and Paweł Stączek. 8th International Weigl Conference, 26-28 czerwca 2019, Łódź;
- *Ocena wpływu Gardnerella vaginalis na zmiany molekularne komórek nowotworowych endometrium Ishikawa i HEC-1A.* **Olga Kuźmycz**, Paweł Stączek. IX Forum Młodych Naukowców, 10 września 2022, Lublin;
- *Ocena wirulencji patogennego szczepu dróg rodnych Gardnerella vaginalis w stosunku do komórek prawidłowych endometrium.* **Olga Kuźmycz**. IX Ogólnopolska Konferencja Biologii Molekularnej, 14-15 marca 2024, Łódź;

- *Preliminary Assessment of Virulence of Gardnerella vaginalis Against Normal and Cancerous Endometrial Cells. Olga Kuźmycz.* 9Th International Weigl Conference, 27-29 czerwca 2024, Rzeszów.

X.2.2. Prezentacja ustna

- „ECbiom” *dotychczasowa wiedza i dalsze perspektywy badań.* IX Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, 11-12 kwietnia 2024, Łódź.

X.3. Szkolenia

- Ukończenia szkoleń pt. ”Podstawy programowania w języku Python dla biologów”.

X.4. Staż naukowy

- Uniwersytet Medyczny w Graz (Austria), Instytut Diagnostyczno-Badawczy Higieny, Mikrobiologii i Medycyny Środowiskowej (Diagnostic and Research Institute of Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine, Medical University of Graz), opiekun stażu Univ. – Prof. Dr. Christine Moissl-Eichinger (09.09.2024 – 23.10.2024).

XI. Kopie publikacji wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

REVIEW

OPEN ACCESS Check for updates

Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome

Olga Kuźmierz and Paweł Stąćzek

Department of Microbial Genetics, Institute of Microbiology, Biotechnology, and Immunology, Faculty of Biology, University of Łódź, Łódź, Poland

ABSTRACT

Many types of cancers, including endometrial cancer, were found to have cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression. Because this enzyme belongs to the group of pro-inflammatory enzymes, so-called NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) directly inhibit its activity. An increasing number of reports on COX-2 involvement in cancer, as well as on the role of microbiota in abnormal metabolism and signaling of cells, forces the development of new NSAID types. Besides, NSAIDs can affect some bacteria, which are vaginal/endometrial microbiome members. The overgrowth of those species was found to be a major cause of some uterine diseases. Those infections can lead to chronic inflammatory response and suppress anti-tumorigenic cell pathways. The purpose of this review is to highlight the COX-2 enzyme role in endometrial cancer, the potential effect of the endometrial microbiome on COX-2 enzyme overexpression, and the prospects of NSAIDs use in terms of this type of cancer.

ARTICLE HISTORY

Received 2 September 2019
Revised 11 February 2020
Accepted 20 February 2020

KEYWORDS

NSAIDs; COX-2; endometrial cancer; uterine microbiome; cancer treatment

Introduction

Cyclooxygenases, COX-1 and COX-2 isoforms particularly, are extremely important for essential and accurate cellular prostaglandin (PG) production. However, from the perspective of tumor progression, prostaglandin E₂ (PGE₂), synthesized in the result of COX-2-activated arachidonic acid transformation seems to be crucial. Production of PGE₂ initiates signaling cascade, leading to the intensification of various metabolic processes and apoptosis inhibition or prevention. Hence, the overexpression of COX-2 can play a key role not only in inflammatory processes but also in misbalance of cell division, apoptosis, normal metabolism, and angiogenesis, in turn leading to cancer formation.¹

Endometrial cancer (EC), one of the most common types of cancer among women, may be induced by various initiation factors, but the molecular base of these processes is still poorly understood. Reports, including those on the overexpression of COX-2 in EC, are controversial but indicate the dependency of enzyme expression and stage of women's lifetime (pre-menopausal or post-menopausal period of life). The results of Jeon et al. demonstrated the overexpression of COX-2 in the post-menopausal period, however, according to the authors, this phenomenon was not associated with malignancy of tumors.^{2,3} In contrast, Lambropoulou et al. noticed a positive correlation between COX-2 expression and cancer FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stage. Besides, they suggested that the enzyme level may serve as a prognostic factor of treatment and indicates the degree of myometrial invasion.⁴ COX-2 overexpression in endometrial cancer tissue samples was confirmed in other studies. Ma et al.⁵ based their notes on

observations of correlated up-regulation of COX-2, glucose transporter GLUT-1, common for EC, and metastasis factor VEGF (vascular endothelial growth factor), which biosynthesis is PGE₂-dependent. These studies demonstrated also the dependency of COX-2 transcription on HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) induction, as observed in the case of GLUT-1 and VEGF overexpression.⁶⁻⁸ Moreover, Huang et al.⁹ presented the possible contribution of COX-2/PGE₂/HIF-1 α /VEGF pathway to the process of tumor angiogenesis in gastric carcinoma. *In vitro* studies showed that the reduced PGE₂ levels effectively suppressed HIF-1 α protein accumulation, which resulted in a similar inhibitory effect on VEGF production. This mechanism may be possible also in the case of endometrial cancer.

Apoptosis blockage and neoplastic transformation can be caused by COX-2. As it was identified, the exposure of cancer cells on selective COX-2 inhibitors led to apoptosis induction by anti-apoptotic Bcl-2 protein down-regulation. Vice versa, the overexpression of COX-2 led to increased production of Bcl-2, which signifies the importance of Bcl-2 and COX-2 cross-talk in pathological conditions. Moreover, COX-2 may affect Akt signaling regulation, increasing the pathological effect. Linked with excessive activity of kinase phosphorylation, COX-2 indirectly leads to NF- κ B overexpression, which is an essential apoptotic suppressor. As reported by St-Germain et al. COX-2 silencing in EC cell lines (HEC-1-A, RL 95-2, and Ishikawa) inhibits NF- κ B activity and restore apoptosis sensitivity. A growing body of evidence confirms the impact of COX-2 on tumor progression.^{10,11}

It is well known that COX-2-induced NF- κ B expression may significantly increase the intracellular NO production. NF- κ B regulates expression of nitric oxide synthase (iNOS),

CONTACT Paweł Stąćzek pawel.staczek@biol.uni.lodz.pl Department of Microbial Genetics, Institute of Microbiology, Biotechnology, and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Poland

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

by catalyzing the NO production, which serves as a signal molecule of cellular pathways, such as angiogenesis, apoptosis, immunological, and anti-inflammatory response. High-level expression of iNOS is common for increased ROS (reactive oxygen species) environment, related to almost all types of cancer.¹² Furthermore, Li et al.¹³ observed the significant correlation between COX-2 and iNOS levels in endometrial cancer. Results suggest the combined COX-2 and iNOS modulation of angiogenesis, caused by local NO overproduction. Those interactions were investigated further, in the presence of provoking factors. Hussain et al.¹⁴ presented the example of induced chronic inflammation (defined by COX-2 overexpression) in a murine model, showing the effect of increased NO levels after *Cryptosporidium parvum* infection. The level of Ki-67 protein, a marker of most cancer types, was significantly enhanced. Poljakovic et al.¹⁵ studies revealed the correlation between iNOS and COX-2 levels in mouse kidney cells. Initial infection by *Escherichia coli* AD 110 strain was leading to spontaneous DNA mutations. This defines the importance of the inflammatory state induced by a cell environment in uncontrolled cancer development.

MMPs (extracellular matrix metalloproteinases), became a subject of interest in terms of their pathological role in cancer cell metabolism, including invasion and metastasis. Studies of Byun et al.¹⁶ proved the correlation between COX-2 and MMP-2 expression in the human lung A549 cancer cell line. Following studies by Pan et al.¹⁷ indicated the reduction of MMP-2 gene expression after the treatment of the mentioned cells with COX-2 inhibitors. MMP-2, belonging to Zn-dependent endoproteases, seems to play a crucial role in metastasis development of endometrial cancer. The meta-analysis carried out by Liu et al.¹⁸ confirmed other reports – overexpression degree of MMP-2 in endometrial cancer samples was the independent indicating factor of disease malignancy. It may also help to assess the effectiveness of treatment. Besides, an increased MMP-2 level and pathological angiogenesis are associated with ovarian endometriosis. Historical biochemical data reported a high level of PGE₂, COX-2, and VEGF in the case of disease, suggesting the relationship between those units.¹⁹

Potential role of microbiome in endometrial cancer initiation

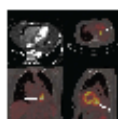
The coexisting microbiome and its role in cancer initiation and progression grow in interest. Well-studied *Helicobacter pylori*, which infection promotes the development of MALT lymphoma and gastric adenocarcinoma, has been known as carcinogen factor for many years.²⁰ About 60% of intestinal-type gastric cancers are associated with *H. pylori* infections. These bacteria down-regulate the host immune responses driving the immunity toward tolerance rather than to the protective response. Moreover, during the acute phase of colonization *H. pylori* resists the oxidative stress caused by an inflammatory response and in the chronic phase of infection. Also, it was shown that due to the oxidative stress, damage of the DNA of epithelial cells increases during *H. pylori* infection. Colonization by these bacteria led to genomic instability and inhibition of the DNA mismatch

repair (MMR) system protein expression. In consequence, the accumulation of numerous DNA mutations of gastric epithelial cells, activation of oncogenes and/or inactivation of tumor suppressor genes occurs, which promotes the development of gastric cancer.²¹ Chronic inflammation, caused by *Helicobacter* colonization, can induce abnormal Wnt/ β -catenin signaling pathway activation, which plays a critical role in cell differentiation, proliferation, growth, and survival.^{22,23} *Fusobacterium nucleatum* exists in the oral cavity of healthy people, however, it may also promote human colorectal adenomas and carcinomas (CRCs) tissue development. Using the similar carcinogenic mechanism as *H. pylori*, this species is associated with CRC risk.^{24,25} It was also noted that Wnt/ β -catenin signaling down-regulated inflammatory response, by pro-inflammatory cytokine production, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α , as well as repression of NF- κ B activity.²⁶ Nuñez et al.²⁷ reported the role of Wnt/ β -catenin signaling as an enhancer of COX-2 gene expression in gastric cancer. This fact indicates the possibility of the indirect role of COX-2 in cancer progression caused by bacterial colonization.

Another bacterial species, which can stimulate cancer progression but also may support cancer therapy, is *Salmonella* spp. On one hand, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is well known as a cancer promoter and a possible cause of hepatobiliary cancer in the case of chronic infection.²⁸ On the other hand, attenuated strains of *S. enterica* ser. Typhimurium, which are opportunistic bacterial pathogens, have the potential as a cancer therapy tool – inflammasome activation caused by those strains resulted in tumor growth suppression.²⁹ Thus, bacteria may be considered as double-edged agents in cancer initiation and progression.

The role of endometrial and uterine microbiome in pathophysiological processes is still unclear. The empowerment of metagenomics and the improvement of sequencing methods create the opportunity to find the answers to those questions. The microbiome of a normal uterine tract of healthy women is dominated by *Lactobacillus* species – *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, and/or *L. jensenii*. The major role of those bacteria is to support normal pH (3.8–4.5) by lactic acid production and inhibit the growth of pathogenic species.³⁰ Moreover, *Lactobacillus* prevents cervical cancer and the development of HPV-related diseases. The desired quantity of those species and their metabolites effectively inhibit the growth of cervical cancer cells, mainly by immunological mechanisms involved in the regulation of cancer-related genes. Additionally, *Lactobacilli* representatives can be used as a tool to construct the HPV-related protein vaccine, which can also provide anti-cancer effects. *Lactobacillus* displays the signal peptide of S-layer on a cell membrane monolayer, which is easy to combine with exogenous target proteins. This determines those bacteria as the desired vector for recombinant protein vaccine and potential candidates as gene therapy and target therapies vector.³¹ As a natural barrier to defense pathological uterus species, *Lactobacilli* were found to inhibit the growth of pathological vaginal species (eg. *Candida albicans*), exhibited probiotic and anti-cancer properties, induce apoptosis and inhibit proliferation of cancer cells, and be involved in cell immunological anti-inflammatory responses.^{32–34}

Based on 16 S rDNA sequencing of endometrial cancer samples, a low cell count of *Lactobacillus* spp. was detected,



Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome

Olga Kuźmycz & Paweł Stączek

To cite this article: Olga Kuźmycz & Paweł Stączek (2020): Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome, *Cancer Biology & Therapy*, DOI: [10.1080/15384047.2020.1736483](https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1736483)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1736483>



© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



Published online: 15 Mar 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

REVIEW

OPEN ACCESS Check for updates

Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome

Olga Kuźmierz and Paweł Stączek

Department of Microbial Genetics, Institute of Microbiology, Biotechnology, and Immunology, Faculty of Biology, University of Łódź, Łódź, Poland

ABSTRACT

Many types of cancers, including endometrial cancer, were found to have cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression. Because this enzyme belongs to the group of pro-inflammatory enzymes, so-called NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) directly inhibit its activity. An increasing number of reports on COX-2 involvement in cancer, as well as on the role of microbiota in abnormal metabolism and signaling of cells, forces the development of new NSAID types. Besides, NSAIDs can affect some bacteria, which are vaginal/endometrial microbiome members. The overgrowth of those species was found to be a major cause of some uterus diseases. Those infections can lead to chronic inflammatory response and suppress anti-tumorigenic cell pathways. The purpose of this review is to highlight the COX-2 enzyme role in endometrial cancer, the potential effect of the endometrial microbiome on COX-2 enzyme overexpression, and the prospects of NSAIDs use in terms of this type of cancer.

ARTICLE HISTORY

Received 2 September 2019
Revised 11 February 2020
Accepted 20 February 2020

KEYWORDS

NSAIDs; COX-2; endometrial cancer; uterine microbiome; cancer treatment

Introduction

Cyclooxygenases, COX-1 and COX-2 isoforms particularly, are extremely important for essential and accurate cellular prostaglandin (PG) production. However, from the perspective of tumor progression, prostaglandin E₂ (PGE₂), synthesized in the result of COX-2-activated arachidonic acid transformation seems to be crucial. Production of PGE₂ initiates signaling cascade, leading to the intensification of various metabolic processes and apoptosis inhibition or prevention. Hence, the overexpression of COX-2 can play a key role not only in inflammatory processes but also in misbalance of cell division, apoptosis, normal metabolism, and angiogenesis, in turn leading to cancer formation.¹

Endometrial cancer (EC), one of the most common types of cancer among women, may be induced by various initiation factors, but the molecular base of these processes is still poorly understood. Reports, including those on the overexpression of COX-2 in EC, are controversial but indicate the dependency of enzyme expression and stage of women's lifetime (pre-menopausal or post-menopausal period of life). The results of Jeon et al. demonstrated the overexpression of COX-2 in the post-menopausal period, however, according to the authors, this phenomenon was not associated with malignancy of tumors.^{2,3} In contrast, Lambropoulou et al. noticed a positive correlation between COX-2 expression and cancer FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stage. Besides, they suggested that the enzyme level may serve as a prognostic factor of treatment and indicates the degree of myometrial invasion.⁴ COX-2 overexpression in endometrial cancer tissue samples was confirmed in other studies. Ma et al.⁵ based their notes on

observations of correlated up-regulation of COX-2, glucose transporter GLUT-1, common for EC, and metastasis factor VEGF (vascular endothelial growth factor), which biosynthesis is PGE₂-dependent. These studies demonstrated also the dependency of COX-2 transcription on HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) induction, as observed in the case of GLUT-1 and VEGF overexpression.⁶⁻⁸ Moreover, Huang et al.⁹ presented the possible contribution of COX-2/PGE₂/HIF-1 α /VEGF pathway to the process of tumor angiogenesis in gastric carcinoma. *In vitro* studies showed that the reduced PGE₂ levels effectively suppressed HIF-1 α protein accumulation, which resulted in a similar inhibitory effect on VEGF production. This mechanism may be possible also in the case of endometrial cancer.

Apoptosis blockage and neoplastic transformation can be caused by COX-2. As it was identified, the exposure of cancer cells on selective COX-2 inhibitors led to apoptosis induction by anti-apoptotic Bcl-2 protein down-regulation. Vice versa, the overexpression of COX-2 led to increased production of Bcl-2, which signifies the importance of Bcl-2 and COX-2 cross-talk in pathological conditions. Moreover, COX-2 may affect Akt signaling regulation, increasing the pathological effect. Linked with excessive activity of kinase phosphorylation, COX-2 indirectly leads to NF- κ B overexpression, which is an essential apoptotic suppressor. As reported by St-Germain et al. COX-2 silencing in EC cell lines (HEC-1-A, RL 95-2, and Ishikawa) inhibits NF- κ B activity and restore apoptosis sensitivity. A growing body of evidence confirms the impact of COX-2 on tumor progression.^{10,11}

It is well known that COX-2-induced NF- κ B expression may significantly increase the intracellular NO production. NF- κ B regulates expression of nitric oxide synthase (iNOS),

CONTACT Paweł Stączek pawel.staczek@biol.uni.lodz.pl Department of Microbial Genetics, Institute of Microbiology, Biotechnology, and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Poland

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

by catalyzing the NO production, which serves as a signal molecule of cellular pathways, such as angiogenesis, apoptosis, immunological, and anti-inflammatory response. High-level expression of iNOS is common for increased ROS (reactive oxygen species) environment, related to almost all types of cancer.¹² Furthermore, Li et al.¹³ observed the significant correlation between COX-2 and iNOS levels in endometrial cancer. Results suggest the combined COX-2 and iNOS modulation of angiogenesis, caused by local NO overproduction. Those interactions were investigated further, in the presence of provoking factors. Hussain et al.¹⁴ presented the example of induced chronic inflammation (defined by COX-2 overexpression) in a murine model, showing the effect of increased NO levels after *Cryptosporidium parvum* infection. The level of Ki-67 protein, a marker of most cancer types, was significantly enhanced. Poljakovic et al.¹⁵ studies revealed the correlation between iNOS and COX-2 levels in mouse kidney cells. Initial infection by *Escherichia coli* AD 110 strain was leading to spontaneous DNA mutations. This defines the importance of the inflammatory state induced by a cell environment in uncontrolled cancer development.

MMPs (extracellular matrix metalloproteinases), became a subject of interest in terms of their pathological role in cancer cell metabolism, including invasion and metastasis. Studies of Byun et al.¹⁶ proved the correlation between COX-2 and MMP-2 expression in the human lung A549 cancer cell line. Following studies by Pan et al.¹⁷ indicated the reduction of MMP-2 gene expression after the treatment of the mentioned cells with COX-2 inhibitors. MMP-2, belonging to Zn-dependent endoproteases, seems to play a crucial role in metastasis development of endometrial cancer. The meta-analysis carried out by Liu et al.¹⁸ confirmed other reports – overexpression degree of MMP-2 in endometrial cancer samples was the independent indicating factor of disease malignancy. It may also help to assess the effectiveness of treatment. Besides, an increased MMP-2 level and pathological angiogenesis are associated with ovarian endometriosis. Historical biochemical data reported a high level of PGE₂, COX-2, and VEGF in the case of disease, suggesting the relationship between those units.¹⁹

Potential role of microbiome in endometrial cancer initiation

The coexisting microbiome and its role in cancer initiation and progression grow in interest. Well-studied *Helicobacter pylori*, which infection promotes the development of MALT lymphoma and gastric adenocarcinoma, has been known as carcinogen factor for many years.²⁰ About 60% of intestinal-type gastric cancers are associated with *H. pylori* infections. These bacteria down-regulate the host immune responses driving the immunity toward tolerance rather than to the protective response. Moreover, during the acute phase of colonization *H. pylori* resists the oxidative stress caused by an inflammatory response and in the chronic phase of infection. Also, it was shown that due to the oxidative stress, damage of the DNA of epithelial cells increases during *H. pylori* infection. Colonization by these bacteria led to genomic instability and inhibition of the DNA mismatch

repair (MMR) system protein expression. In consequence, the accumulation of numerous DNA mutations of gastric epithelial cells, activation of oncogenes and/or inactivation of tumor suppressor genes occurs, which promotes the development of gastric cancer.²¹ Chronic inflammation, caused by *Helicobacter* colonization, can induce abnormal Wnt/ β -catenin signaling pathway activation, which plays a critical role in cell differentiation, proliferation, growth, and survival.^{22,23} *Fusobacterium nucleatum* exists in the oral cavity of healthy people, however, it may also promote human colorectal adenomas and carcinomas (CRCs) tissue development. Using the similar carcinogenic mechanism as *H. pylori*, this species is associated with CRC risk.^{24,25} It was also noted that Wnt/ β -catenin signaling down-regulated inflammatory response, by pro-inflammatory cytokine production, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α , as well as repression of NF- κ B activity.²⁶ Nuñez et al.²⁷ reported the role of Wnt/ β -catenin signaling as an enhancer of COX-2 gene expression in gastric cancer. This fact indicates the possibility of the indirect role of COX-2 in cancer progression caused by bacterial colonization.

Another bacterial species, which can stimulate cancer progression but also may support cancer therapy, is *Salmonella* spp. On one hand, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is well known as a cancer promoter and a possible cause of hepatobiliary cancer in the case of chronic infection.²⁸ On the other hand, attenuated strains of *S. enterica* ser. Typhimurium, which are opportunistic bacterial pathogens, have the potential as a cancer therapy tool – inflammasome activation caused by those strains resulted in tumor growth suppression.²⁹ Thus, bacteria may be considered as double-edged agents in cancer initiation and progression.

The role of endometrial and uterine microbiome in pathophysiological processes is still unclear. The empowerment of metagenomics and the improvement of sequencing methods create the opportunity to find the answers to those questions. The microbiome of a normal uterine tract of healthy women is dominated by *Lactobacillus* species – *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, and/or *L. jensenii*. The major role of those bacteria is to support normal pH (3.8–4.5) by lactic acid production and inhibit the growth of pathogenic species.³⁰ Moreover, *Lactobacillus* prevents cervical cancer and the development of HPV-related diseases. The desired quantity of those species and their metabolites effectively inhibit the growth of cervical cancer cells, mainly by immunological mechanisms involved in the regulation of cancer-related genes. Additionally, *Lactobacilli* representatives can be used as a tool to construct the HPV-related protein vaccine, which can also provide anti-cancer effects. *Lactobacillus* displays the signal peptide of S-layer on a cell membrane monolayer, which is easy to combine with exogenous target proteins. This determines those bacteria as the desired vector for recombinant protein vaccine and potential candidates as gene therapy and target therapies vector.³¹ As a natural barrier to defense pathological uterus species, *Lactobacilli* were found to inhibit the growth of pathological vaginal species (eg. *Candida albicans*), exhibited probiotic and anti-cancer properties, induce apoptosis and inhibit proliferation of cancer cells, and be involved in cell immunological anti-inflammatory responses.^{32–34}

Based on 16 S rDNA sequencing of endometrial cancer samples, a low cell count of *Lactobacillus* spp. was detected,

which also correlated with an increased vaginal pH (>4.5). Moreover, the results suggested that the detection of *Atopobium vaginae* and *Porphyromonas* sp. (90% match to *P. somerae*, a pathogen present in bone infections) in the gynecologic tract is statistically associated with EC. At the same time, the *in situ* hybridization method showed the presence of *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Enterobacter* sp., *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, and *Enterococcus faecalis* in women group with uterine pathologies. In the case of CIN (cervical intraepithelial neoplasia) *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, *G. vaginalis*, and *Fusobacterium* were dominating.³⁵⁻³⁷ Moreover, differences between microbial profiles of healthy women group vs. women with endometrial polyps and chronic endometritis were reported. The latter ones were characterized by increased abundance of *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Alteromonas*, and *Prevotella*.³⁸ The most common pathological bacterial species – *A. vaginae* and *G. vaginalis*, are also associated with a risk of preterm labor, which underlines the importance of those species in pathological conditions.^{39,40} The proportion of those bacterial strains in BV-positive vaginal smear slides was 54.1% and 82.0%, respectively, suggesting the synergistic role of bacteria in a biofilm formation. Data published by Brooks et al.⁴¹ presented the significant reduction of BV-associated bacteria in a group of women using oral hormonal contraception. Additionally, women using that kind of contraceptives were more likely to be colonized by *Lactobacillus* species compared with women using condoms. This can mean the impact of the sex hormone synthesis process on women's microbiome balance.⁴² EC is associated with aberrant estrogen synthesis, which overproduction causes mitotic activity in endometrial cells, thus increasing the risk of malignant transformation as well.⁴³ This information suggests the potential role of the endometrial and vaginal microbiome in endometrial cancer initiation and progression. Furthermore, *G. vaginalis* mentioned previously as a marker of BV produces cholesterol-dependent cytotoxin (CDC) called vaginolysin (VLY), the representative of pore-forming toxin (PFT) group.⁴⁴ CDCs were identified in 23 taxonomically related species of gram-positive representatives. Structurally these toxins are antigenically related proteins, of about 50–60 kDa. Some of them, eg. listeriolysin O, pneumolysin, perfringolysin, and pyolysin, are the major virulence factors of their producers.⁴⁵

VLY activates p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases), which suggests its important role in some cancer types (prostate, breast, bladder, liver, lung cancers). In addition, VLY induces pro-inflammatory signaling, by IL-8 production in human epithelial cells.^{44,46,47} Bacterial VLY, like most of CDCs, uses cholesterol from the cholesterol-rich membrane for integration and recognizes specifically 3- β -hydroxy group by threonine/leucine pair of cholesterol recognition motif, located in the 1st loop.⁴⁸ Results of Gelber et al.⁴⁴ showed that VLY binds indirectly to cholesterol, involving hCD59 protein as the receptor. Then VLY recruits membrane complement regulatory proteins (mCRPs) to initiate the pore formation in a cell membrane. Cholesterol supports and stabilizes toxin-receptor binding. As mentioned, CD59 is overexpressed in many types of tumors, including breast cancer.⁴⁹ Abdelmaksoud et al.⁵⁰ observed a dose-dependent reduction of *G. vaginalis* and normalizing the level of *Lactobacillus* spp.

in vaginal flora after treatment with statins, known as lipid-decreasing mediators. Statins affect plasma membrane cholesterol content, preventing pore formation by bacteria. Moreover, BV-isolated *G. vaginalis* strains demonstrated high adherence activity during cultivation *in vitro* with HeLa and ME-180 vaginal epithelium cells. As the co-culture method showed, under these conditions BV-associated bacteria were able to disrupt the protective layer of *Lactobacilli*, causing the cytotoxic effect.^{51,52} Patterson et al.⁵² also reported the ability of *G. vaginalis* and *A. vaginae* BV-isolates to adhere to the ME-180 cell line. Quantitative estimation was ascertained by confocal microscopy. The adherence score was about 75% and 25% for mentioned strains respectively. At the same time, *A. vaginae* did not show the cytotoxic effect against this type of cells, when *G. vaginalis* strains were strongly affecting cell viability after 24-hour incubation. Adherence activity was presented on the human 3-dimensional endometrial epithelial cell model (EEC) as well. Construct of 3D EEC was based on the HEC-1A human endometrial carcinoma cell line, which additionally suggests the potential contribution of presented bacterial species with endometrial cancer. In this case, *G. vaginalis* was able to form clusters of bacterial cells attached to the surface of the cell aggregates, as it was clearly demonstrated by SEM (scanning electron micrographs) images.⁵³

Generally, bacterial toxins are known to be involved in cancer initiation and progression. Pro-tumorigenic toxin activity is typical for some types of *Escherichia coli* species. So-called *E. coli* pks⁺, harboring the *pks* genomic island was found to be highly enriched in colon cancer patients. The *pks* encoded colibactin toxin attaches to colon epithelial cells, causing inflammation and host-cell DNA damage such as double-strand breaks, chromosomal aberrations, and G2/M cell cycle arrest.⁵⁴⁻⁵⁶ Another example of the virulence effect caused by *E. coli* colonization is the cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) toxin. This toxin binds the epithelial cells and leads to increased cell proliferation, inflammation, and host DNA damage. CNF1 activates the Rho GTPase family proteins, involved in the actin cytoskeleton organization. In the first stage, NF- κ B is activated and then CNF1 increases the level of anti-apoptotic proteins, immortalizing the damaged cell, which potentially leads to cancer development.^{57,58}

Bacterial dysbiosis can also induce endometriosis – estrogen-dependent inflammatory disease, characterized by the ectopic growth of endometrial glands stroma outside the uterine cavity. Endometriosis is associated with pH changes and the reduction of the abundance of *Lactobacillus* spp. as well as the increase of the number of specific gram-negative and facultatively anaerobic bacterial species, particularly *A. vaginae* and *G. vaginalis*. Moreover, the disease is related to high estrogen receptor (ER)-positive EC risk. This type of cancer is characterized by increased estrogen production and COX-2 overexpression. In this case, COX-2 up-regulation was caused by pro-inflammatory mediators (IL-1 β and TNF- α) activation of HIF-1 α and NF- κ B pathways.⁵⁹⁻⁶¹ Evaluation of intra-uterine microbial colonization revealed an increased number of pathogens, such as *Gardnerella*, *Streptococci*, *Enterococci*, and *E. coli* in women with endometriosis, in comparison with healthy individuals. A similar shift was also observed in GnRH α (gonadotropin-releasing hormone

agonist) treated women, regardless of whether they had endometriosis or not.⁶² Besides, *Gardnerella* is one of the main causes of chronic endometritis, which characterizes by the persistent inflammatory state, and found to be a risk factor of endometriosis occurrence.^{63,64}

Bacterial infections could be also involved in the regulation of host cell epigenetic mechanisms, affecting chromatin structure and transcriptional programming. In recent years, the involvement of bacterial pathogens and their toxins in acetylation, methylation, and mimicking host's chromatin-regulatory factors was found. For example, *Mycobacterium tuberculosis*, *H. pylori*, *Listeria monocytogenes*, and their metabolites are manipulating the expression of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), leading to suppression of transcription of host defense genes through epigenetic changes in histone acetylation marks.⁶⁵ Uropathogenic *E. coli* affects DNA methylation and down-regulates the *CDKN2A* gene expression, which plays a key role in coding tumor suppressor proteins.⁶⁶ *Bacillus anthracis* is known as MAPK kinase inhibitor and *IL-8* gene down-regulator.^{67,68} Moreover, the permanent exposition to bacterial toxins could provide tolerance, repressing *TNF-α* and *IL-1β* gene expression. This phenomenon relies on a change of composition of NF-κB transcription factor in the proximal promoters of the mentioned genes.⁶⁹ Interestingly, bacterial toxins and metabolites found to be affecting host epigenetics in a specific manner. As was observed by Draisma et al.⁷⁰ in clinical trials based on the administration of LPS, tolerance was demonstrated by the attenuated release of pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor (*TNF-α*), but not transforming growth factor β (*TGF-β*). This could lead to undergo cell proliferation without an efficient immunological response.

Potentially, a disorder of epigenetic regulation in EC may be tied to bacterial pathogens' presence. For example, the down-regulation of a tumor suppressor gene encoding human mismatch repair hMLH1 protein was found in sporadic endometrial carcinoma but also many other types of cancer, including ovarian tumors, sporadic colorectal cancer, acute myeloid leukemia, and others. It is suggested that this process may be induced by the presence of *Yersinia enterocolitica* and *H. pylori* which leads to the hypermethylation of the hMLH1 promoter region. Similar hypermethylation in promoter regions of 24 tumor suppressor genes was found in endometrioid carcinomas, however, in this case, microsatellite instability in methylated regions was so far suggested as the main reason for epigenetic changes.⁷¹⁻⁷³

Bacterial infection, causing chronic inflammation, attributes up to 10–20% of cancers. However, the initiation of the inflammatory state by the presence of bacteria seems to be not a limited aspect and should be examined more thoroughly.⁵⁴

NSAIDs as antimicrobial agents

The antibacterial property of some NSAIDs was recently discovered. The reason is the increased resistance to the commonly

used antimicrobial drugs. Since 90', diclofenac sodium has been studied as a *Salmonella* Typhimurium growth inhibitor. Moreover, diclofenac, aspirin, and etodolac can prevent biofilm formation.⁷⁴ Chan et al.⁷⁵ tested the effects of drug treatment on gram-positive and gram-negative strains. The wide-spectrum activity of aspirin was noted. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were 2.5 mg/mL and 5 mg/mL, respectively. At the same time, ibuprofen was found to be a powerful agent against gram-negative bacterial species (MIC 0.625–2.5 mg/mL). These concentrations are much lower than normal therapeutic doses used during anti-inflammatory therapy. Similarly, a prevalence rate of *H. pylori*, the gastric cancer inducer, was decreased in specimens collected from indomethacin and ibuprofen users.⁷⁶ Sodium salicylate (aspirin salt) treatment reduces the capsular polysaccharide formation of *Klebsiella pneumoniae* hypermucoviscosity phenotype (HV-KP). It is particularly interesting, because capsular polysaccharide plays a protective role, helping bacteria to avoid phagocytosis. Besides, it has been identified, that capsular polysaccharide, as a determinant of *K. pneumoniae* infection, is ominous for patients with type 2 diabetes mellitus.⁷⁷

The mechanisms of a preventive antimicrobial activity of NSAIDs are unclear. The study of Yin et al.⁷⁸ presented the ability of these drugs to bind *E. coli* DNA polymerase III β subunit, also known as a sliding clamp (SC). The compounds used during studies were mainly vedaprofen, carprofen, and bromfenac, which are routinely used in veterinary protocols. NSAIDs are blocking bacterial protein-protein interactions, DNA replication, and repair. Studies of Cai et al.⁷⁹ described the impact of PGE2 on enhanced biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Bacterial biofilm formation by those strains can cause toxic shock syndrome, sepsis, pneumonia, endocarditis, and impetigo. MRSA-positive patients are particularly difficult to treat. PGE2 found to be attenuating the bactericidal effects of kanamycin or ampicillin, commonly used against *S. aureus* infections. Potentially, PGE2 causes drug resistance, by enhancing efflux pump activity, which is why biofilm formation further continues. Celecoxib, aspirin or naproxen inhibited the PGE2 activity in combined therapy, decreasing bacterial growth ratio.

An important aspect from the vaginal and endometrial microbiome perspective is the selectiveness of some NSAIDs against gram-negative bacteria. Milani and Iacobelli⁸⁰ reported the effect of ibuprofen and ibuprofen isobutanolammonium (Ib-isob, Ginenorm) to interfere with *G. vaginalis* adhesion. In addition, antifungal effect against *Candida albicans*, vulvo-vaginal candidiasis (VVC) etiological agent, was noticed. Combinatorial treatment with econazole stopped the germtube formation, preventing penetration into mucous cells.

NSAIDs and their potential role in endometrial cancer prevention and therapy

NSAIDs, COX-2 selective inhibitors particularly, seem to be promising anticancer agents, however, the reports regarding their effectiveness seem to be contradictory. The regular administration of aspirin led to about 20% lower risk of breast cancer occurrence in a tested women group. In other studies, more than two years of the administration of celecoxib or rofecoxib, used in chronic inflammatory states, remarkably

reduced risk of cancer development: 71% breast, 70% colon, 55% prostate and 79% lung cancer.^{81,82} However, there are also reports indicating opposite effects, e.g. administration of ibuprofen in HER2- breast cancer group, increased risk of cancer development in about 27%.⁸³ Brasky et al.⁸⁴ reported aspirin and non-aspirin NSAIDs (ibuprofen, naproxen, indomethacin, piroxicam, and sulindac) association with the extent of endometrial carcinoma-specific mortality within I-staged patients. Nevertheless, the reported results were not validated, the dose and frequency of NSAID use were not precise, which means that analysis has some limitations to consider.

Positive NSAID therapy effects in the case of some EC types were mentioned. Nevadunsky et al.⁸⁵ presented the positive effect of aspirin and statins in combined therapy of non-endometrioid endometrial cancer group, manifesting in improved low disease-specific mortality. Research of Matsuo et al.⁸⁶ suggested the association of low-dose aspirin consumption with good survival outcomes in endometrial cancer women group. Therapy was efficient for women younger than 60 years old, with body mass index (BMI) of 30 or greater, in the first stage of the disease and after postoperative radiotherapy. Generalizing, a meta-analysis of Verdooth et al.⁸⁷ reported about an 11% reduction of risk of endometrial cancer development in case-control studies after regular aspirin use. For cohort studies, about 8% risk of EC development reduction was observed. For non-aspirin drugs, this percentage was smaller – about 9% and 6% respectively. Additionally, body mass index analysis was assessed. BMI higher than 30 was found to be an adverse factor, avoiding the positive preventing effect.

Induced dose-dependent growth repression of endometrial cancer cells was observed *in vitro*. Acetylsalicylic acid led to about 21% – 88% growth inhibition of Ishikawa cells, apoptosis induction, and reduced Bcl-2 expression in a dose-dependent manner.^{88,89} Indomethacin affected the HEC-1-B cancer cell line by up-regulation of PTEN tumor suppressor.⁹⁰ Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, reduced HEC-1-A and HEC-1-B cell lines growth, assisting the inhibition of tumor cell proliferation.^{91,92}

The mechanism responsible for NSAIDs' tumor preventive effect is characterized by multiple responses of cancer cells signaling pathways. Chemopreventive properties of these drugs could act through the combined action of various cell proteins at the molecular, as well, as epigenetic and post-transcriptional levels. Some of NSAIDs (aspirin, indomethacin) provide the enhanced expression of NAG-1 (non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1), which encodes the member of anti-tumorigenic and pro-apoptotic TGF- β protein superfamily.⁹³ Baek et al.⁹⁴ presented the effect of increased NAG-1 production in the human colorectal cell line (HCT-116) in response to NSAIDs treatment. The consequence was the apoptosis initiation, which was induced in concentration and time-dependent manner.

Arousing interests around NSAIDs as chemopreventive agents persuade to create new derivatives of these compounds. Non-steroidal anti-inflammatory hybrid nitrate drugs (NO-NSAIDs) are conjugates of NO-donating moiety and well-known NSAIDs, which enhances the activity of such compounds. NO-NSAIDs, NO-ASA (nitroaspirin) particularly, inhibit cellular β -actin/TCF signaling pathway, NOS2 expression and binding of NF-

κ B transcription factor to DNA regulatory sequences.^{95,96} Moreover, NO-derivative suppresses the microsatellite instability (MSI) of nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). The effective NO-ASA dose was from 300- to 3,000-fold lower than ASA.⁹⁷ NO-indomethacin was reported to affect invasive and noninvasive adenocarcinomas in azoxymethane treated rat model. Moreover, drug use did not create a threat of gastrointestinal ulcers or other side effects.⁹⁸

Other derivatives were designed to be COX-independent targets and to involve other mechanisms of anti-inflammatory response. One of those is cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase, or cGMP PDE, which is responsible for negative cGMP signaling regulation. The example is sulindac, which found its place in colon cancer prevention and treatment.⁹⁹ Pro-NSAIDs drugs, such as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, phospho-NSAIDs, 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO), 4-hydroxy-TEMPO (TEMPOL) and hydrogen sulfide (HS) NSAIDs, represent an effective approach in cancer prevention and treatment supporting, but none of them were examined from the endometrial cancer perspective.¹⁰⁰

Conclusions

Nowadays, endometrial cancer is one of the most common cancer types in women's population. Molecular bases of the disease are depending on various factors, women's lifecycle, and lifestyle. Bacterial features and balanced microbiome are relatively new factors to consider from the perspective of cancer initiation, prevention and the success of treatment. The importance of normal bacterial uterine/endometrial flora was proved in relation to bacterial vaginosis, endometriosis, and vaginitis. However, bacterial endometrial flora as a cancer-promoting agent is still one of the most omitted and poorly investigated items. As was noted, some bacteria are well known for their tumorigenic effect, which should be also examined thoroughly in endometrial cancer cases.

G. vaginalis and *A. vaginalis* presence in the endometrial samples seems to be a new factor to estimate cancer initiation risk. The overgrowth of those strains potentially leads to cancer development, by inducing COX-2 overexpression, which is common in EC cases. The COX-2 enzyme is involved in various cell signaling pathways, proliferation, angiogenesis, and apoptosis – the crucial mechanisms in a normal life cycle. The reason for *G. vaginalis* participation in cancer initiation and/or progression could be a bacterial toxin, so-called vaginolysin (VLY). The presence of VLY can serve as a pro-inflammatory factor, increasing the COX-2 expression. Moreover, *G. vaginalis* has a high pore-forming activity to epithelium cells. Bacterial toxins and metabolites may also be engaged in host epigenetic chromatin remodeling, down- or up-regulating of crucial genes products, which are involved in normal cell cycle and tumor suppression. Current approaches to study that coexistence have some limitations but open wide prospects in the understanding of endometrial cancer development and research of new ways of treatment.

Meanwhile, the cancer-preventive and antimicrobial effects of some NSAID derivatives were examined. Regular consumption of well-known drugs, mainly aspirin, contributes to cancer risk reduction. Moreover, some of them are

demonstrating to be gram-negative antibacterial agents, which is an important aspect from the perspective of the endometrial and vaginal microbiome. Inhibition of bacterial growth, as well as cancer cells, was shown to be dose-dependent. Nevertheless, mechanisms of those interactions are unclear, illustrating the ground for further research.

NSAIDs seem to be a perfect double-edged tool in anti-microbial and antitumor assistance. For enhancing those properties, NSAIDs were designed in conjunction with other molecules. NO-NSAIDs and cGMP PDE were reported to have positive effects on the gastrointestinal tract. AChE inhibitors, phospho-NSAIDs, TEMPO, TEMPOL, and HS NSAIDs were found to be beneficial as cancer preventative agents. However, none of them were examined on EC cell lines or uterine/endometrial microbiome representatives.

Described reports suggest the potential role of bacteria in EC. NSAIDs could be a powerful therapy tool from both – bacterial and cancer cell perspectives. These drugs can be also useful in case of other pro-inflammatory diseases, which can be initiated by bacterial infections. This aim can lead to the manifestation of new therapeutic strategies, new NSAIDs modifications and have big potential for chemical and biological research study.

Disclosure of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

This work was supported by the University of Łódź from the funds for scientific activities [Project WBIOS B2011000000038.01].

ORCID

Paweł Stączek  <http://orcid.org/0000-0003-4416-8289>

References

- Gandhi J, Khera L, Gaur N, Paul C, Kaul R. Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gammaherpesvirus mediated tumorigenesis. *Front Microbiol.* 2017;8:538. doi: 10.3389/fmicb.2017.00538.
- Rizzo S, Femia M, Buscarino V, Franchi D, Garbi A, Zanagnolo V, Del Grande M, Manganaro L, Alessi S, Giannitto C, et al. Endometrial cancer: an overview of novelties in treatment and related imaging keypoints for local staging. *Cancer Imaging.* 2018;18(1):45. doi:10.1186/s40644-018-0180-6.
- Yong-Tark J, Sokbom K, Dae-Hee K, Keun-Young Y, In-Ae P, Yung JB, Jae WK, Noh-Hyun P, Soon-Beom K, Hyo-Pyo L, et al. Cyclooxygenase-2 and p53 expressions in endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2004;13(9):1538–1542.
- Lambropoulou M, Alexiadis G, Limberis V, Nikolettos N, Tripsianis G. Clinicopathologic and prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma. *Histol Histopathol.* 2005;20:753–759. doi: 10.14670/HH-20.753.
- Ma X, Hui Y, Lin L, Wu Y, Zhang X, Liu P. Clinical significance of COX-2, GLUT-1 and VEGF expressions in endometrial cancer tissues. *Pak J Med Sci.* 2015;31(2):280–284. doi:10.12669/pjms.312.6604.
- Lewis A, Elks PM. Hypoxia induces macrophage *tufa* expression via cyclooxygenase and prostaglandin E2 *in vivo*. *Front Immunol.* 2019;10:2321. doi: 10.3389/fimmu.2019.02321.
- Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol.* 2004;183(1):145–154. doi:10.1677/joe.1.05599.
- Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6140. doi:10.3390/ijms20246140.
- Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci.* 2005;12:29. doi: 10.1007/s11373-004-8177-5.
- St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer.* 2004;3:7. doi: 10.1186/1476-4598-3-7.
- Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol.* 2019;234:5683–5699. doi:10.1002/jcp.27411.
- Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prev.* 2016;21(1):1–12. doi:10.15430/JCP.2016.21.1.1.
- Li W, Xu RJ, Jiang LH, Shi J, Long X, Fan B. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. *Med Oncol.* 2005;22:63. doi: 10.1385/MO.22:1.063.
- Hussain SP, He P, Subleski J, He P, Subleski J, Hofseth LJ, Trivers GE, Mechanic L, Hofseth AB, Bernard M, Schwank J, Nguyen G, et al. Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Res.* 2008;68(17):7130–7136. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0410.
- Poljakovic M, Svensson ML, Svanborg C, Johansson K, Larsson B, Persson K. *Escherichia coli*-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the mouse bladder and kidney. *Kidney Int.* 2001;59(3):893–904. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00572.x.
- Pan MR, Chuang LY, Hung WC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett.* 2001;508(3):365–368. doi:10.1016/S0014-5793(01)03118-0.
- Byun JH, Lee M, Roh SY, Shim BH, Hong S, Ko YH, Ko S J, Woo In S, Kang JH, Seon Hong Y, et al. Association between cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2006;36:263–268. doi: 10.1093/jco/hy024.
- Liu C, Li Y, Hu S, Chen Y, Gao L, Liu D, Guo H, Yang Y. Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(29):e10994. doi:10.1097/MD.00000000000010994.
- Jana S, Chatterjee K, Ray AK, DasMahapatra P, Swarnakar S. Regulation of matrix metalloproteinase-2 activity by COX-2-PGE2-pAKT axis promotes angiogenesis in endometriosis. *PLoS One.* 2016;11(10):e0163540. doi:10.1371/journal.pone.0163540.
- Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:28–37. doi: 10.1038/nrc703.
- Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Stączek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2017;23(9):1521–1540. doi:10.3748/wjg.v23.i9.1521.
- Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(6):403–414. doi:10.1038/nrc2857.

23. Suryawanshi A, Tadagavadi RK, Swafford D, Manicassamy S. Modulation of inflammatory responses by Wnt/ β -catenin signaling in dendritic cells: a novel immunotherapy target for autoimmunity and cancer. *Front Immunol*. 2016;7:460. doi: 10.3389/fimmu.2016.00460.
24. Shang FM, Liu HL. *Fisobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World J Gastrointest Oncol*. 2018;10(3):71–81. doi:10.4251/wjgo.v10.i3.71.
25. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation. *Front Immunol*. 2016;7:378. doi: 10.3389/fimmu.2016.00378.
26. Silva-García O, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM. The Wnt/ β -catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:310183. doi: 10.1155/2014/310183.
27. Nuñez F, Bravo S, Cruzat F, Montecino M, De Ferrari GV. Wnt/ β -catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(4):e18562. doi:10.1371/journal.pone.0018562.
28. Møllemaard A, Gaarslev K. Risk of hepatobiliary cancer in carriers of *Salmonella typhi*. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80(4):288. doi:10.1093/jnci/80.4.288.
29. Crowley SM, Knodler LA, Vallance BA. Salmonella and the inflammasome: battle for intracellular dominance. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;397:43–67. doi: 10.1007/978-3-319-41171-2_3.
30. Garcia-Grau I, Simon C, Moreno M. Uterine microbiome low biomass and high expectations. *Biol of Reprod*. 2018;101(6):1102–1114. doi:10.1093/biolre/ty257.
31. Yang X, Da M, Zhang W, Qi Q, Zhang C, Han S. Role of *Lactobacillus* in cervical cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:1219–1229. doi: 10.2147/CMAR.S165228.
32. Wang S, Wang Q, Yang E, Yan L, Li T, Zhuang H. Antimicrobial compounds produced by vaginal *Lactobacillus crispatus* are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions. *Front Microbiol*. 2017;8:564. doi: 10.3389/fmicb.2017.00564.
33. Nami Y, Abdullah N, Haghsheenas B, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* SBL. *Microbiol Immunol*. 2014;58(9):492–502. doi:10.1111/1348-0421.12175.
34. Sungur T, Aslim B, Karaaslan C, Aktas B. Impact of exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*. 2017;47:137–144. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.05.013.
35. Walther-Antônio MR, Chen J, Multinu F, Hokenstad A, Distad TJ, Cheek EH, Keeney GL, Creedon DJ, Nelson H, Mariani A, et al. Potential contribution of the uterine microbiome in the development of endometrial cancer. *Genome Med*. 2016;8(1):122. doi:10.1186/s13073-016-0368-y.
36. Benner M, Ferwerda G, Joosten I, Van der Molen RG. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Hum Reprod Update*. 2018;4:393–415. doi: 10.1093/humupd/dmy012.
37. Champer M, Wong AM, Champer J, Brito IL, Messer PW, Hou JY, Wright JD. The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG*. 2018;125(3):309–315. doi:10.1111/1471-0528.14631.
38. Fang RL, Chen LX, Shu WS, Yao SZ, Wang SW, Chen YQ. Barcoded sequencing reveals diverse intrauterine microbiomes in patients suffering with endometrial polyps. *Am J Transl Res*. 2016;8(3):1581–1592. PMID: 27186283.
39. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Gannerre M, Bretelle F. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol*. 2010;115:134–140. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181c391d7.
40. Liu Y, Ko EY, Wong KK, Chen X, Cheung WC, Law TS, Chung JP, Tsui SK, Li TC, Chim SS. Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method. *Fertil Steril*. 2019;112(4):707–717.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.05.015.
41. Hardy L, Jespers V, Abdellati S, De Baetselier I, Mwambarangwe L, Musengimana V, van de Wijgert J, Vaneechoutte M, Crucitti T. A fruitful alliance: the synergy between *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in bacterial vaginosis-associated biofilm. *Sex Transm Infect*. 2016;92(7):487–491. doi:10.1136/sextrans-2015-052475.
42. Brooks JP, Edwards DJ, Blithe DL, Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, Strauss JF 3rd, Buck GA, Jefferson KK. Effects of combined oral contraceptives, depot medroxyprogesterone acetate and the levonorgestrel-releasing intrauterine system on the vaginal microbiome. *Contraception*. 2017;95(4):405–413. doi:10.1016/j.contraception.2016.11.006.
43. Mungenast F, Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:192. doi: 10.3389/fendo.2014.00192.
44. Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of vaginolytic, the human-specific cytotoxin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol*. 2008;190(11):3896–3903. doi:10.1128/JB.01965-07.
45. Alouf JE. Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol*. 2000;290(4–5):351–356. doi:10.1016/S1438-4221(00)80039-9.
46. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer*. 2013;4(9–10):342–359. doi:10.1177/1947601913507951.
47. Garcia EM, Kraskauskiene V, Kobliński JE, Jefferson KK. Interaction of *Gardnerella vaginalis* and vaginolytic with the apical versus basolateral face of a three-dimensional model of vaginal epithelium. *Infect Immun*. 2019;87(4). doi:10.1128/IAI.00646-18.
48. Farrand AJ, LaChapelle S, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4341–4346. doi:10.1073/pnas.0911581107.
49. Ouyang Q, Zhang L, Jiang Y, Ni X, Chen S, Ye F, Du Y, Huang L, Ding P, Wang N, et al. The membrane complement regulatory protein CD59 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in breast cancer. *Int J Oncol*. 2016;48(5):2015–2024. doi:10.3892/ijo.2016.3408.
50. Abdelmaksoud AA, Girerd PH, Garcia EM, Brooks JP, Leftwich LM, Sheth NU, Bradley SP, Serrano MG, Fettweis JM, Huang B, et al. Association between statin use, the vaginal microbiome, and *Gardnerella vaginalis* vaginolytic-mediated cytotoxicity. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183765. doi:10.1371/journal.pone.0183765.
51. Castro J, Alves P, Sousa C, Cereija T, França Â, Jefferson KK, Cerca N. Using an in-vitro biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or non-bacterial vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. *Sci Rep*. 2015;5:11640. doi: 10.1038/srep11640.
52. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 2010;156(Pt 2):392–399. doi:10.1099/mic.0.034280-0.
53. Łaniewski P, Gomez A, Hire G, So M, Herbst-Kralovetz MM. Human three-dimensional endometrial epithelial cell model to study host interactions with vaginal bacteria and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*. 2017;85(3):e01049–16. doi:10.1128/IAI.01049-16.
54. Dalmasso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. 2014. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes*. 2014;5(5):675–680. doi:10.4161/19490976.2014.969989.
55. Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006;313:848–851. doi: 10.1126/science.1127059.

56. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:11537–11542. doi: 10.1073/pnas.1001261107.
57. Fabbri A, Travaglione S, Ballan G, Loizzo S, Fiorentini C. The cytotoxic necrotizing factor 1 from *E. coli*: a janus toxin playing with cancer regulators. *Toxins (Basel)*. 2013;5(8):1462–1474. doi:10.3390/toxins5081462.
58. Rosadi F, Fiorentini C, Fabbri A. Bacterial protein toxins in human cancers. *Pathog Dis*. 2016;74:1. doi: 10.1093/femspd/ftv105.
59. Yu HC, Lin CY, Chang WC, Shen BJ, Chang WP, Chuang CM. Increased association between endometriosis and endometrial cancer: a nationwide population-based retrospective cohort study. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25(3):447–452. doi:10.1097/IGC.0000000000000384.
60. Puca J, Hoyne GF. Microbial dysbiosis and disease pathogenesis of endometriosis, could there be a link? *Allied J Med Res*. 2017;1(1):1–9. doi:10.35841/medical-research.1.1.1-9.
61. Wu MH, Hsiao KY, Tsai SJ. Endometriosis and possible inflammation markers. *Gynecol Minim Invasive Ther*. 2015;4(6):61–67. doi: 10.1016/j.gmit.2015.05.001.
62. Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(11):2446–2456. doi:10.1093/humrep/deu222.
63. Moreno I, Cicinelli E, Garcia-Grau I, Gonzalez M, Bau D, Vilella F, DE Ziegler D, Resta L, Valbuena D, Simon C. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(6):602.e1–602.e16. doi:10.1016/j.ajog.2018.02.012.
64. Cicinelli E, Trojano G, Mastromauro M, Vimercati A, Marinaccio M, Mitola PC, Resta L, de Ziegler D. Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link. *Fertil Steril*. 2017;108(2):289–295.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.016.
65. Grabiec AM, Potempa J. Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(3):336–350. doi:10.1080/1040841X.2017.1373063.
66. Tolg C, Sabha N, Cortese R, Panchal T, Ahsan A, Soliman A, Aitken KJ, Petronis AB, Auml Gli DJ. Uropathogenic *E. coli* infection provokes epigenetic downregulation of CDKN2A (p16INK4A) in uroepithelial cells. *Lab Invest*. 2011;91:825–836. doi: 10.1038/labinvest.2010.197.
67. Bardwell AJ, Abdollahi M, Bardwell L. Anthrax lethal factor-cleavage products of MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases exhibit reduced binding to their cognate MAPKs. *Biochem J*. 2004;378:569–577. doi: 10.1042/BJ20031382.
68. Raymond B, Batsche E, Boutillon F, Wu YZ, Leduc D, Balloy V, Raoult E, Muchardt C, Goossens PL, Touqui L. Anthrax lethal toxin impairs IL-8 expression in epithelial cells through inhibition of histone H3 modification. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000359. doi: 10.1371/journal.ppat.1000359.
69. Bierne H, Hamon M, Cossart P. Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a010272. doi:10.1101/cshperspect.a010272.
70. Draisma A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med*. 2009;37(4):1261–1267. doi:10.1097/CCM.0b013e31819c3c67.
71. Stampoliou A, Arapantoni-Dadioti P, Pavlakis K. Epigenetic mechanisms in endometrial cancer. *J BUON*. 2016;21(2):301–306.
72. Sauvonnet N, Pradet-Balade B, Garcia-Sanz JA, Cornelis GR. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem*. 2002;277(28):25133–25142. doi:10.1074/jbc.M203239200.
73. Santos JC, Ribeiro ML. Epigenetic regulation of DNA repair machinery in *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(30):9021–9037. doi:10.3748/wjg.v21.i30.9021.
74. Titilayo U, Charles N, Ibrahim K, Uchechukwu N. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: diclofenac sodium as a case study. *Afr J Biotechnol*. 2009;8:7332–7339.
75. Chan EWL, Yee ZY, Raja I, Yap JKY. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;10:70–74. doi: 10.1016/j.jgar.2017.03.012.
76. Shirin H, Moss SF, Kancherla S, Kancherla K, Holt PR, Weinstein IB, Sordillo EM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have bacteriostatic and bactericidal activity against *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(9):1388–1393. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04194.x.
77. Lee CH, Su LH, Liu JW, Chang CC, Chen RF, Yang KD. Aspirin enhances opsonophagocytosis and is associated to a lower risk for *Klebsiella pneumoniae* invasive syndrome. *BMC Infect Dis*. 2014;14:47. doi: 10.1186/1471-2334-14-47.
78. Yin Z, Wang Y, Whittell LR, Jergic S, Liu M, Harry E, Dixon NE, Kelso MJ, Beck JL, Oakley AJ. DNA replication is the target for the antibacterial effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chem Biol*. 2014;21(4):481–487. doi:10.1016/j.chembiol.2014.02.009.
79. Cai JY, Hou YN, Li J, Ma K, Yao GD, Liu WW, Hayashi T, Itoh K, Tashiro SI, Onodera S, et al. Prostaglandin E2 attenuates synergistic bactericidal effects between COX inhibitors and antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2018;133:16–22. doi: 10.1016/j.plefa.2018.04.005.
80. Milani M, Iacobelli P. Vaginal use of Ibuprofen isobutanolammonium (ginenorm): efficacy, tolerability, and pharmacokinetic data: a review of available data. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012;2012:673131. doi: 10.5402/2012/673131.
81. Harris RE. Inflammation in the pathogenesis of chronic diseases: the COX-2 controversy. New York: Springer-Verlag; 2007.
82. Wong RSY. Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in cancer prevention and cancer promotion. *Adv Pharmacol Sci*. 2019;2019:3418975. doi: 10.1155/2019/3418975.
83. Moris D, Kontos M, Spartalis E, Fentiman IS. 2016. The role of NSAIDs in breast cancer prevention and relapse: current evidence and future perspectives. *Breast Care (Basel)*. 2016;11(5):339–344. doi:10.1159/000452315.
84. Brasky TM, Felix AS, Cohn DE, McMeekin DS, Mutch DG, Creasman WT, Thaker PH, Walker JL, Moore RG, Lele SB, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and endometrial carcinoma mortality and recurrence. *J Natl Cancer Inst*. 2016;109(3):1–10. doi:10.1093/jnci/djw251.
85. Nevadunsky NS, Van Arsdale A, Strickler HD, Spoozak LA, Moadel A, Kaur G, Girda E, Goldberg GL, Einstein MH. Association between statin use and endometrial cancer survival. *Obstet Gynecol*. 2015;126(1):144–150. doi:10.1097/AOG.0000000000000926.
86. Matsuo K, Cahoon SS, Yoshihara K, Shida M, Kakuda M, Adachi S, Moeini A, Machida H, Garcia-Sayre J, Ueda Y, et al. Association of low-dose aspirin and survival of women with endometrial cancer. *Obstet Gynecol*. 2016;128(1):127–137. doi:10.1097/AOG.0000000000001491.
87. Verdoodt F, Friis S, Dehlendorf C, Albiéri V, Kjaer SK. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and risk of endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Gynecol Oncol*. 2015;140(2):352–358. doi:10.1016/j.ygyno.2015.12.009.
88. Arango HA, Icely S, Roberts WS, Cavanagh D, Becker JL. Aspirin effects on endometrial cancer cell growth. *Obstet Gynecol*. 2001;97(3):423–427. doi:10.1016/s0029-7844(00)01161-3.
89. Webb PM, Na R, Weiderpass E, Adami HO, Anderson KE, Bertrand KA, Botteri E, Brasky TM, Brinton LA, Chen C, et al. Use of aspirin, other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen and risk of endometrial cancer: the epidemiology

- of endometrial cancer consortium. *Annals Oncol.* 2019;30(2):310–316. doi:10.1093/annonc/ndy541.
90. Abdulkareem IH, Blair M. Effects of indomethacin on expression of PTEN tumour suppressor in human cancers. *Niger Med J.* 2013;54(2):100–106. doi:10.4103/0300-1652.110041.
 91. Xiao Y, Teng Y, Zhang R, Luo L. Antitumor effect of the selective COX-2 inhibitor celecoxib on endometrial adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Oncol Lett.* 2012;4(6):1219–1224. doi:10.3892/ol.2012.936.
 92. Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y, Nishio E, Udagawa Y. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol.* 2005;26(5):1419–1428.
 93. Gurpinar E, Grizzle WE, Piazza GA. NSAIDs inhibit tumorigenesis, but how? *Clin Cancer Res.* 2013;20(5):1104–1113. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1573.
 94. Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol.* 2001;59(4):901–908. doi:10.1124/mol.59.4.901.
 95. Dunlap T, Abdul-Hay SO, Chandrasena RE, Hagos GK, Sinha V, Wang H, Thatcher GR. Nitrates and NO-NSAIDs in cancer chemoprevention and therapy: in vitro evidence querying the NO donor functionality. *Nitric Oxide.* 2008;19(2):115–124. doi:10.1016/j.niox.2008.04.013.
 96. Williams JL, Nath N, Chen J, Hundley TR, Gao J, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and -catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor- κ B, and NO Synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention. *Cancer Res.* 2003;63:7613–7618.
 97. McIlhatton MA, Tyler J, Burkholder S, Ruschoff J, Rigas B, Kopelovich L, Fishel R. Nitric oxide-donating aspirin derivatives suppress microsatellite instability in mismatch repair deficient and hereditary nonpolyposis colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(22):10966–10975. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2562.
 98. Rao CV, Reddy BS, Steele VE, Wang CX, Liu X, Ouyang N, Patlolla JM, Simi B, Kopelovich L, Rigas B. Nitric oxide-releasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxymethane-treated rats: effects on molecular targets. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(6):1530–1538. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0061.
 99. Tinsley HN, Piazza GA. Novel therapeutics: NSAIDs, derivatives, and phosphodiesterases. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2012;8(4):325–330. doi:10.1007/s11888-012-0142-5.
 100. Qandil AM. Prodrugs of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), more than meets the eye: a critical review. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):17244–17274. doi:10.3390/ijms131217244.



Article

Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)] and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer Cells

Olga Kuźmycz , Aleksandra Kowalczyk and Paweł Stączek *

Department of Molecular Microbiology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, 12/16 Banacha, 90-237 Łódź, Poland
* Correspondence: pawel.staczek@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-635-44-66



Citation: Kuźmycz, O.; Kowalczyk, A.; Stączek, P. Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)] and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11568. <https://doi.org/10.3390/ijms231911568>

Academic Editor: Bruno Imbimbo

Received: 2 September 2022

Accepted: 27 September 2022

Published: 30 September 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are inhibitors of cyclooxygenase enzyme (COX) and were found to have positive effects in reducing the risk of developing gynecological cancers. However, long-term administration of NSAIDs carries the risk of various side effects, including those in the digestive and circulatory systems. Therefore, there is a constant need to develop new NSAID derivatives. In this work, we investigated rhenium NSAIDs, comparing their effects on endometrial cancer cells with original NSAIDs, demonstrating the high activity of aspirin and indomethacin derivatives. The cytotoxic activity of rhenium derivatives against the Ishikawa and HEC-1A cancer cell lines was higher than that of the original NSAIDs. The IC₅₀ after 24-h incubation of Ishikawa and HEC-1A were 188.06 μ M and 394.06 μ M for rhenium aspirin and 228.6 μ M and 1459.3 μ M for rhenium indomethacin, respectively. At the same time, IC₅₀ of aspirin and indomethacin were 10,024.42 μ M and 3295.3 μ M for Ishikawa, and 27,255.8 μ M and 5489.3 μ M for HEC-1A, respectively. Moreover, these derivatives were found to inhibit the proliferation of both cell lines in a time- and state-dependent manner. The Ishikawa cell proliferation was strongly inhibited by rhenium aspirin and rhenium indomethacin after 72-h incubation ($*** = p < 0.001$), while the HEC-1A proliferation was inhibited by the same agents already after 24-h incubation ($*** = p < 0.001$). Furthermore, the ROS level in the mitochondria of the tested cells generated in the presence of rhenium derivatives was higher than the original NSAIDs. That was associated with rhenium indomethacin exclusively, which had a significant effect ($*** = p < 0.001$) on both Ishikawa and HEC-1A cancer cells. Rhenium aspirin had a significant effect ($*** = p < 0.001$) on the mitochondrial ROS level of Ishikawa cells only. Overall, the research revealed a high potential of the rhenium derivatives of aspirin and indomethacin against endometrial cancer cells compared with the original NSAIDs.

Keywords: endometrial cancer; NSAIDs; rhenium compounds

1. Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most commonly used drugs worldwide. Since their first use in the 1960s, the chemical structure and the principal objective of their usage was modified and changed. Along with their intended application as anti-inflammatory agents, these drugs are currently administered as analgesics, antipyretics, and antiplatelet-aggregation agents [1]. The well-known activity of NSAIDs involves the inhibition of isoforms of the cyclooxygenase (COX) enzyme-COX-1, COX-2, or both, depending on the specific drug. In particular, those NSAIDs capable of inhibiting COX-2 (alone or together with COX-1) are of particular interest in the context of cancer prevention and supportive treatment, as this enzyme has been found to be an inducible isoform associated with inflammation and cancer proliferation [2]. Recently, several research groups

have focused on the role of inflammatory processes in the development of gynaecologic cancers [3–5], as well as the reduction of the risk of developing these types of cancer as a result of long-term NSAIDs administration. The consumption of aspirin in low doses has already been recommended for the prevention of colorectal cancer and cardiovascular diseases. It has also been suggested to be helpful in the case of lung, breast, and prostate cancers [6–9]. In addition to the anti-inflammatory effect, the cytostatic activity of NSAIDs was noticed. Chiu et al. [10] reported the inhibition of melanoma cell (A375) proliferation after celecoxib and indomethacin treatment. Marinov et al. [11] indicated the high potential of diclofenac as a cytostatic agent against breast (MCF-7) and colorectal (HT-29) cancer cells but not cervical cancer cells (HeLa). Moreover, studies by Buzharevski et al. [12] performed with carboranyl derivatives of rofecoxib against melanoma (A375, 518A2, B16, B16F10) and colon (HCT116, SW480, SW620, CT25CL26) cancer cells highlighted the potential perspectives of modified NSAIDs as anticancer agents with cytostatic properties. Here, the observed activities of agents imply that the anticancer potential of NSAIDs may not be explained only by their COX-inhibitory activities. Still, the major clinical problem with NSAID consumption in anticancer therapy is gastrointestinal complications. The side effects of NSAIDs (especially those that inhibit COX-1) can lead to gastric/duodenal bleeding and ulceration, so modifications to these commonly used drugs have been necessary. Some of these modifications, such as substitution with nitric oxide (NO), hydrogen sulfide (H₂S), lipids, and metal complexation, were shown to give a broad spectrum of biological activities. Furthermore, the complexation of NSAIDs with certain metals, such as copper or zinc, reduced the effective dose of the “native” drug [13–15]. Complexes of rhenium with aspirin, naproxen, indomethacin, and ibuprofen, were synthesized by Skiba et al. and subsequently tested by our group on HeLa and L929 cell lines [16]. The key aspect of the antitumor activity of these complexes was not the increased inhibition of the COX enzyme but the broadening of the spectrum of activity of the rhenium derivatives of the NSAIDs tested. Indeed, rhenium-aspirin was found to exhibit higher cytotoxicity against cancerous HeLa cells compared with non-cancerous L929 cells. It was also noted that the mechanism inducing cancer cell death was based on an increase in reactive oxygen species (ROS) levels, which was correlated with a cell cycle arrest in sub-G1 and S phases [16]. Here, we report our findings using an *in vitro* model of the endometrial cancer cell lines Ishikawa and HEC-1-A. Our studies focused on the cytotoxic effects of rhenium-modified NSAIDs, as well as the effects of metal complementation with these agents.

2. Results

2.1. Effects of Aspirin, Indomethacin and Their Rhenium Derivatives on Endometrial Cancer Cell Viability

The tested compounds, i.e., aspirin, indomethacin, naproxen, ibuprofen, and their rhenium derivatives, were applied at selected concentrations against Ishikawa and HEC-1A cells and their effects on cell viability were evaluated by the MTT assay. Only two rhenium compounds—rhenium aspirin (375) and rhenium-indomethacin (377), and their corresponding NSAIDs, aspirin (375a) and indomethacin (377a), showed an effect on endometrial cancer cell viability. The examination was performed using the same methodology as described in previous studies [16] conducted by our research group.

The IC₅₀ values were determined with a tetrazolium (MTT) assay, and the results are summarized in Table 1 for the Ishikawa cell line and Table 2 for the HEC-1A cell line. After 24-h incubation, the cytotoxic activity of rhenium derivatives 375 and 377 against Ishikawa and HEC-1A cancer cell lines was significantly higher than that of 375a and 377a, indicating that they were more effective than the corresponding original NSAIDs. IC₅₀ for 375 was 188.06 µM and 394.06 µM for Ishikawa and HEC-1A cancer cells, respectively, whereas the IC₅₀ of 375a was several folds higher for both cancer cell lines, reaching 10,024.42 µM and 27,255.8 µM, respectively. The IC₅₀ values of 377 for Ishikawa and HEC-1A were 228.6 µM and 1459.3 µM, respectively, while the IC₅₀ values of 377a for both cancer cell lines were 3295.3 µM and 5489.3 µM, respectively. The cytotoxic effect of the reference agent

CisPt, was also studied under the same conditions. The IC₅₀ for Ishikawa and HEC-1A was 13.57 µM and 20.05 µM, respectively. As the results showed, cells of the Ishikawa line were more susceptible to the compounds during the first 24-h incubation period than cells of the HEC-1A line, which could be related to the pre- and postmenopausal nature of the cells.

After a 72-h incubation period, the enhancement of the cytotoxic effect of both rhenium derivatives on Ishikawa and HEC-1A cancer cells was observed. IC₅₀ for 375 in Ishikawa and HEC-1A was 146.3 µM and 112.4 µM, respectively, while the initial NSAID IC₅₀ value of 375a was 17,395.6 µM for Ishikawa and 17,168 µM for HEC-1A cell line. The IC₅₀ value of 377 was 107.7 µM for Ishikawa and 138.5 µM for HEC-1A cells, whereas the IC₅₀ value of 377a was 4737.4 µM and 6375.2 µM, respectively. The IC₅₀ values of CisPt for both Ishikawa and HEC-1A cancer cell lines were 41.03 µM and 10.27 µM, respectively. After 72-h incubation with the studied agents, the discrepancy between IC₅₀ values was lower than that between IC₅₀ values after 24-h incubation. Moreover, the inhibitory effect of the agents against HEC-1A cancer cells was increased.

Table 1. Effect of studied NSAIDs and their rhenium derivatives on the viability of Ishikawa cell line after 24- and 72-h treatment; the results were expressed as the mean IC₅₀ (µM; µg/mL) from three independent experiments; CisPt—cisplatin.

24 h									
IC ₅₀	373	373a	375	375a	376	376a	377	377a	CisPt
µg/mL	na *	na	11.83	180.6	na	na	18.45	117.9	4.072
µM	na	na	188.06	10,024.42	na	na	228.6	3295.3	13.57
72 h									
IC ₅₀	373	373a	375	375a	376	376a	377	377a	CisPt
µg/mL	na	na	9.208	313.4	na	na	8.695	169.5	12.31
µM	na	na	146.3	17,395.6	na	na	107.7	4737.4	41.03

* na—no activity against studied cells; 373a—naproxen; 373—rhenium naproxen; 375a—aspirin; 375—rhenium aspirin; 376a—ibuprofen; 376—rhenium ibuprofen; 377a—indomethacin; 377—rhenium indomethacin.

Table 2. Effect of studied NSAIDs and their rhenium derivatives on the viability of HEC-1A cell line after 24- and 72-h treatment; the results were expressed as the mean IC₅₀ (µM; µg/mL) from three independent experiments; CisPt—cisplatin.

24 h									
IC ₅₀	373	373a	375	375a	376	376a	377	377a	CisPt
µg/mL	na *	na	24.81	490.5	na	na	117.8	196.4	6.016
µM	na	na	394.06	27,255.8	na	na	1459.3	5489.3	20.05
72 h									
IC ₅₀	373	373a	375	375a	376	376a	377	377a	CisPt
µg/mL	na	na	7.702	309.3	na	na	11.18	228.1	3.083
µM	na	na	112.4	17,168	na	na	138.5	6375.2	10.27

* na—no activity against studied cells; 373a—naproxen; 373—rhenium naproxen; 375a—aspirin; 375—rhenium aspirin; 376a—ibuprofen; 376—rhenium ibuprofen; 377a—indomethacin; 377—rhenium indomethacin.

2.2. Inhibition of Endometrial Cancer Cell Proliferation by Aspirin, Indomethacin, and Their Rhenium Derivatives

Due to the previous results of the MTT test, further research was continued by using 375, 375a, 377, and 377a. To evaluate the effects of NSAIDs and their derivatives on the proliferation of Ishikawa and HEC-1A cells, a BrdU assay was performed, which involves the incorporation of BrdU into newly synthesized DNA followed by its detection. Ishikawa and HEC-1A cells were incubated with each compound for 24 and 72 h.

The changes in the proliferation status of Ishikawa endometrial cancer cells were examined for each of the tested compounds at IC_{50} (Figure 1), $1/2 IC_{50}$, and $1/4 IC_{50}$ (Table 3) after 24- and 72-h incubation. After 24-h incubation with 375, 375a, 377, and 377a, only 377 and 377a showed a significant antiproliferative effect on the tested cells. However, the rhenium derivative 377 inhibited proliferation less ($* = p < 0.05$) than the original NSAID 377a ($*** = p < 0.001$). Differences in proliferation status of the tested cells were also observed in the case of $1/2$ and $1/4 IC_{50}$. Here, both 377 and 377a showed higher significance ($*** = p < 0.001$) in inhibiting cell proliferation, compared with 375 and 375a, where only the effect of 375a was significant ($* = p < 0.05$). The proliferation inhibitory effect of the reference drug CisPt was tested after 24-h incubation under the same test conditions ($* = p < 0.05$). All tested compounds significantly inhibited the proliferation of Ishikawa cells after 72-h incubation. Only 375a had a lower proliferation inhibitory effect on cells in IC_{50} ($** = p < 0.01$), compared with the other compounds tested ($*** = p < 0.001$).

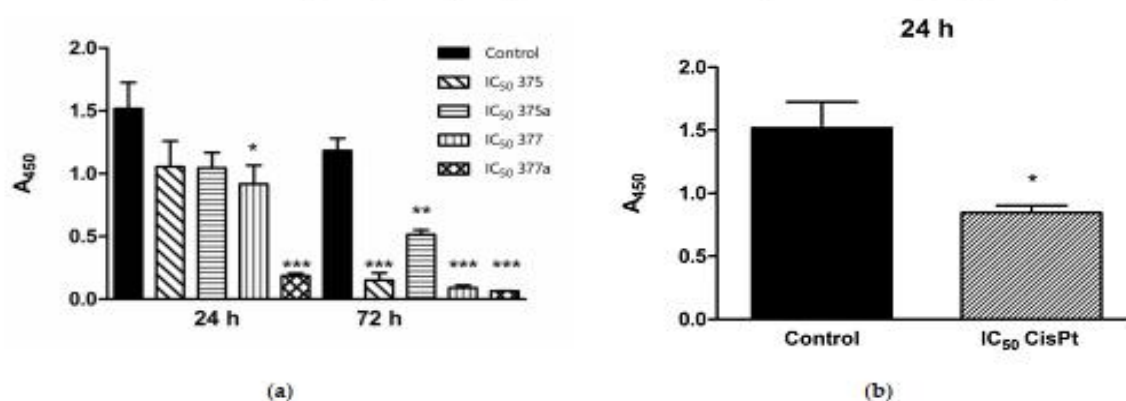


Figure 1. Changes in proliferation status of Ishikawa endometrial cancer cells after 24- and 72-h incubation with 375 (rhenium aspirin), 375a (aspirin), 377 (rhenium indomethacin) and 377a (indomethacin) at IC_{50} concentrations (a). The assay was performed using the BrdU proliferation kit (Biovision). Cisplatin (CisPt) was used as a positive control (b). Data were obtained by measuring absorbance at 450 nm in three independent experiments. Results were statistically compared with the negative control (untreated cells with 1% DMSO dissolved in cell culture medium) using a Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test; $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$.

Table 3. Effect of 375, 375a, 377, and 377a at IC_{50} , $1/2 IC_{50}$, and $1/4 IC_{50}$ concentrations on Ishikawa cells proliferation. Results are presented for 24- and 72-h incubation periods. One-way ANOVA with Bonferroni's comparison test was chosen for statistical analysis.

	Compound	$p < 0.05$	SD	Compound	$p < 0.05$	SD
24 h	375 at $1/2 IC_{50}$	no *	± 0.005102	375a at $1/2 IC_{50}$	*	± 0.00035
	375 at $1/4 IC_{50}$	no	± 0.0002	375a at $1/4 IC_{50}$	no	± 0.00015
	377 at $1/2 IC_{50}$	***	± 0.0003	377a at $1/2 IC_{50}$	***	± 0.02975
	377 at $1/4 IC_{50}$	***	± 0.1768	377a at $1/4 IC_{50}$	***	± 0.1933

Table 3. Contd.

	Compound	$p < 0.05$	SD	Compound	$p < 0.05$	SD
72 h	375 at $1/2$ IC ₅₀	***	±0.0308	375a at $1/2$ IC ₅₀	***	±0.1401
	375 at $1/4$ IC ₅₀	***	±0.01290	375a at $1/4$ IC ₅₀	***	±0.01455
	377 at $1/2$ IC ₅₀	***	±0.0432	377a at $1/2$ IC ₅₀	***	±0.07570
	377 at $1/4$ IC ₅₀	***	±0.0914	377a at $1/4$ IC ₅₀	***	±0.1038

* no—no significant changes; 373a—naproxen; 373—rhenium naproxen; 375a—aspirin; 375—rhenium aspirin; 376a—ibuprofen; 376—rhenium ibuprofen; 377a—indomethacin; 377—rhenium indomethacin; SD—standard deviation; * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$.

The proliferation status of HEC-1A endometrial cancer cells was studied under the same conditions as the Ishikawa cells described above. Studies were performed using the tested compounds at their IC₅₀ (Figure 2), $1/2$ IC₅₀, and $1/4$ IC₅₀ (Table 4) after 24- and 72-h incubation. After 24-h incubation, only 1 of the tested compounds revealed no significant antiproliferative effect on the studied cells, 375a, while the other compounds showed high inhibitory activity (*** = $p < 0.001$). This effect was not observed at the lower concentrations of the compounds, where only two, 375 at $1/2$ IC₅₀ and 375a at $1/4$ IC₅₀, showed significant inhibition of cell proliferation (* = $p < 0.05$). The reference drug CisPt was tested after 24-h incubation under the same assay conditions. However, no significant effect on cells was observed. The lack of proliferation inhibitory effect of CisPt on HEC-1A after 24-h incubation could be related to the short incubation time with the drug. Proliferation inhibition by the tested derivatives was enhanced after 72-h incubation (*** = $p < 0.001$), and all agents had a similar effect on HEC-1A cells.

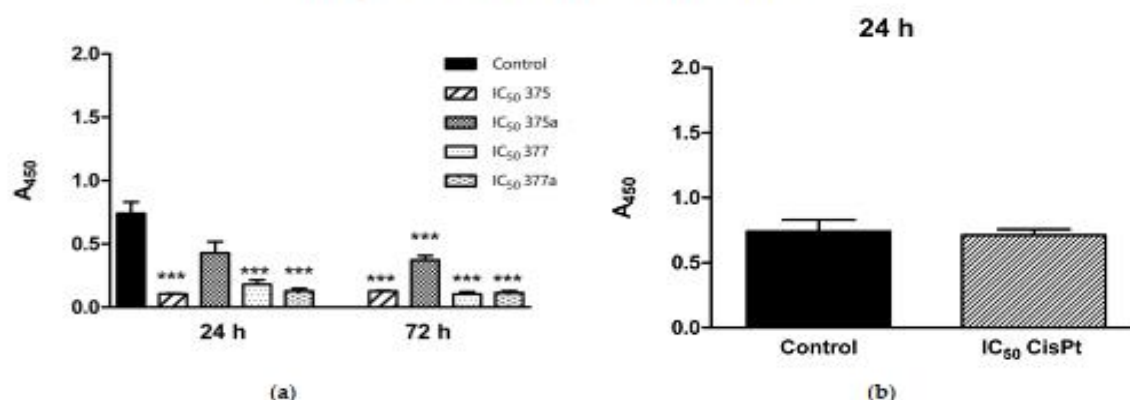


Figure 2. Changes in proliferation status of HEC-1A endometrial cancer cells after 24- and 72-h incubation with 375 (rhenium aspirin), 375a (aspirin), 377 (rhenium indomethacin) and 377a (indomethacin) at IC₅₀ concentrations (a). The assay was performed using the BrdU proliferation kit (Biovision). Cisplatin (CisPt) was used as a positive control (b). Data were obtained by measuring absorbance at 450 nm in three independent experiments. Results were statistically compared with the negative control (untreated cells with 1% DMSO dissolved in cell culture medium) using a Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test; *** = $p < 0.001$.

Table 4. Effect of 375, 375a, 377, and 377a at IC_{50} , $1/2 IC_{50}$, and $1/4 IC_{50}$ concentrations on HEC-1A cells proliferation. Results are presented for 24- and 72-h incubation periods. One-way ANOVA with Bonferroni's comparison test was chosen for statistical analysis.

	Compound	$p < 0.05$	SD	Compound	$p < 0.05$	SD
24 h	375 at $1/2 IC_{50}$	*	± 0.0600	375a at $1/2 IC_{50}$	no *	± 0.04030
	375 at $1/4 IC_{50}$	no	± 0.3835	375a at $1/4 IC_{50}$	*	± 0.4275
	377 at $1/2 IC_{50}$	no	± 0.1122	377a at $1/2 IC_{50}$	no	± 0.1232
	377 at $1/4 IC_{50}$	no	± 0.1461	377a at $1/4 IC_{50}$	no	± 0.1284
72 h	375 at $1/2 IC_{50}$	***	± 0.0115	375a at $1/2 IC_{50}$	***	± 0.0886
	375 at $1/4 IC_{50}$	***	± 0.1675	375a at $1/4 IC_{50}$	***	± 0.1061
	377 at $1/2 IC_{50}$	***	± 0.04905	377a at $1/2 IC_{50}$	***	± 0.05215
	377 at $1/4 IC_{50}$	***	± 0.0171	377a at $1/4 IC_{50}$	**	± 0.3529

* no—no significant changes; 373a—naproxen; 373—rhenium naproxen; 375a—aspirin; 375—rhenium aspirin; 376a—ibuprofen; 376—rhenium ibuprofen; 377a—indomethacin; 377—rhenium indomethacin; SD—standard deviation; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

2.3. The Effect of Aspirin, Indomethacin and Their Rhenium Derivatives on ROS Level in the Studied Endometrial Cancer Cells

2.3.1. Cytosolic ROS Level Measurement

The ROS are well-known for their signaling capabilities and can trigger oxidative stress-induced cancer cell death. On the other hand, cancer cells can maintain ROS homeostasis and escape the initiation of cell death by the increase of their antioxidant properties [17]. Thus, new drugs that strongly induce the formation of ROS to overcome this defense may prove effective in fighting cancer cells. Therefore, the tested compounds were analyzed in this respect against Ishikawa and HEC-1A cell lines using H_2DCF -DA dye (Thermo Fisher, Warsaw, Poland).

The measurements in Ishikawa cells (Figure 3) revealed the high ROS inducing activity of aspirin rhenium derivative 375 at $1/2 IC_{50}$ (*** = $p < 0.001$), and IC_{50} (* = $p < 0.05$), as well as the native NSAID 375a at $1/2 IC_{50}$ (*** = $p < 0.001$) and IC_{50} (** = $p < 0.01$). In Ishikawa cells, 377 was found to be less effective in generating ROS compared to the native NSAID, with 377a at $1/2 IC_{50}$ and IC_{50} being significant (*** = $p < 0.001$ and * = $p < 0.05$, respectively). In the case of the HEC-1A cell line (Figure 4), the level of ROS produced by the rhenium compounds was significant for both 375 and 377 (*** = $p < 0.001$) but not for corresponding NSAIDs. In addition, both rhenium derivatives induced increased ROS levels at $1/2 IC_{50}$ concentrations (*** = $p < 0.001$). However, the activity of the drug was not constant at all measured time points (0.5, 1 or 3 h after incubation), indicating a time-dependent effect of the NSAIDs and rhenium-NSAIDs on ROS induction. In addition, lower drug doses ($1/2 IC_{50}$) were found to initiate the production of ROS more rapidly, possibly related to the high solubility of the compounds in the culture medium, leading to immediate uptake of the drugs across the cell membrane.

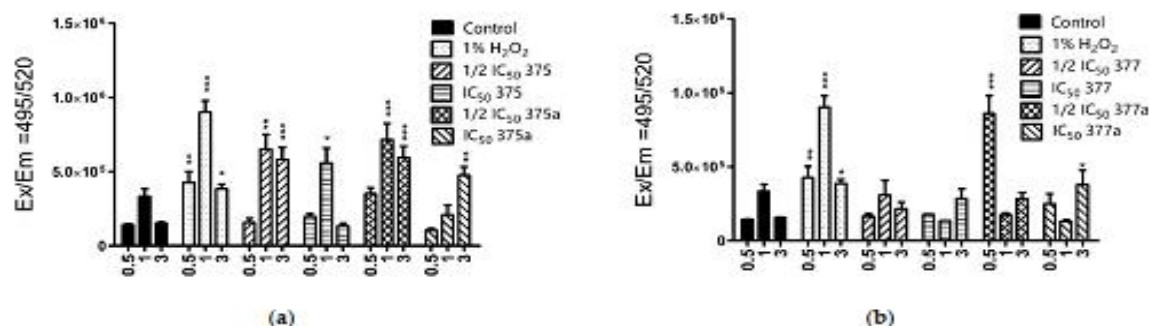


Figure 3. Cytosolic levels of reactive oxygen species in Ishikawa cells after 0.5, 1 and 3-h treatment with 375 (rhenium aspirin), 375a (aspirin) (a), 377 (rhenium indomethacin) and 377a (indomethacin) (b). Cells were preincubated with H₂DCF-DA dye and then treated with the tested drugs. Data were obtained by measuring the fluorescence at Ex/Em = 495/520 nm. 1% H₂O₂ was used as a positive control. Results were statistically compared with the negative control (untreated cells with 1% DMSO dissolved in cell culture medium). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used for statistical analyses; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

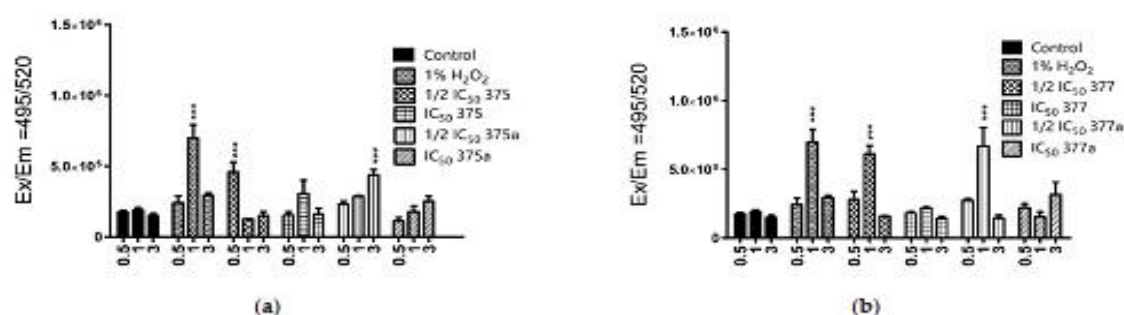


Figure 4. Cytosolic levels of reactive oxygen species in HEC-1A cells after 0.5, 1 and 3 h-treatment with 375 (rhenium aspirin), 375a (aspirin) (a), 377 (rhenium indomethacin) and 377a (indomethacin) (b). Cells were preincubated with H₂DCF-DA dye and then treated with the tested drugs. Data were obtained by measuring the fluorescence at Ex/Em = 495/520 nm. 1% H₂O₂ was used as a positive control. Results were statistically compared with the negative control (untreated cells with 1% DMSO dissolved in cell culture medium). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used for statistical analyses; *** = $p < 0.001$.

2.3.2. Mitochondrial ROS Level Measurement

It has been found that about 90% of cellular reactive oxygen species is produced by mitochondria. Disruption of this overproduction leads to oxidative stress, which in turn leads to oxidative damage. This damage affects cellular components such as lipids, DNA, and proteins, which is unfavorable for cells [18]. However, the accumulation of rhenium NSAIDs in mitochondria was reported in a previous study [16] and could possibly be considered as an anticancer mechanism of rhenium NSAIDs action. Therefore, mitochondria-specific ROS production was also investigated in endometrial cancer cells.

The mitochondrial ROS changes were observed only after 2-h incubation with studied agents, by using MitoSOX Red dye (Invitrogen, Waltham, MA, USA). These results showed that the rhenium NSAID derivatives produced a significant amount of mitochondrial ROS compared to the original NSAIDs. In addition, differences were found between 375 and 377. In both Ishikawa (Figure 5a) and HEC-1A cells (Figure 5b), 377 generated

more mitochondrial ROS than 375 when these drugs were used at their IC_{50} values. At the same time, no correlation was observed between mitochondrial and cytosolic ROS levels, which is probably related to a different nature of ROS and incubation time. H_2O_2 is used as a secondary messenger to coordinate the oxidative metabolism of cells. Levels of H_2O_2 are regulated through its production and degradation, where mitochondria serve as “stabilizing devices” and buffer cellular H_2O_2 levels. The stabilization of hydrogen peroxide is related to the high concentration of antioxidant defense enzymes in the matrix [19,20]. These properties of H_2O_2 cleavage by mitochondria can explain the lack of significant mitochondrial ROS production initiated by 1% H_2O_2 .

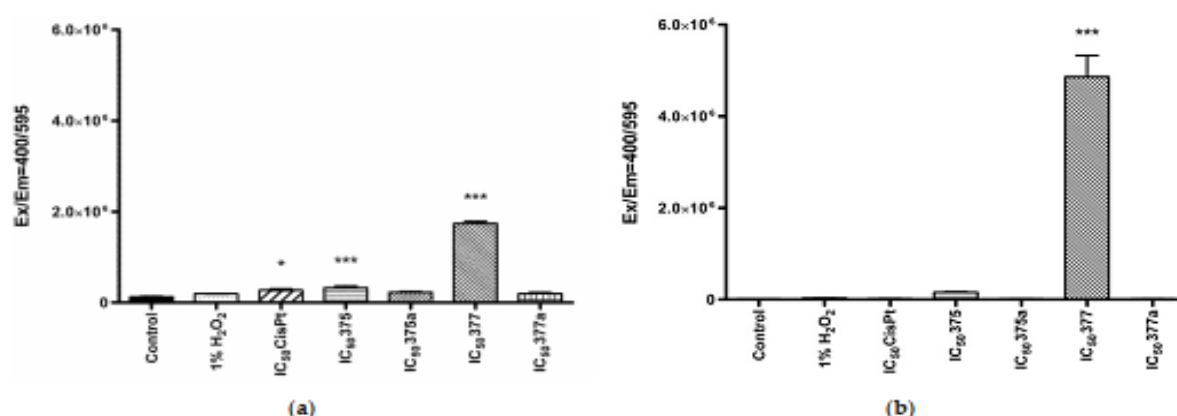


Figure 5. (a). Mitochondrial levels of reactive oxygen species in Ishikawa (a) and HEC-1A (b) cells after 2-h treatment with 375 (rhenium aspirin), 375a (aspirin), 377 (rhenium indomethacin) and 377a (indomethacin). Cells were preincubated with MitoSOX Red dye and then treated with the tested drugs. Data were obtained by measuring the fluorescence at Ex/Em = 400/595 nm. 1% H_2O_2 was used as a positive control. Results were statistically compared with the negative control (untreated cells with 1% DMSO dissolved in cell culture medium). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used for statistical analyses; * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$.

3. Discussion

Positive anticancer effects of NSAIDs, including specific action against endometrial cancer, have already been studied [21]. It was found that the positive effect of low-dose aspirin and its synergism with some other NSAIDs were not only associated with good patient survival outcomes but also had an anti-proliferative effect on cancer cells [22–24]. These effects were also previously noticed in vitro for Ishikawa and HEC-1A endometrial cancer cells. Studies performed by Gao et al. [25] determined the effects of aspirin, indomethacin, and chosen cyclooxygenase (COX-2)-selective inhibitor-NS398. All three NSAIDs significantly inhibited the proliferation of Ishikawa and HEC-1A cancer cells in a dose- and time-dependent manner. In addition, aspirin and indomethacin were involved in cellular apoptosis initiation through a cytochrome c-related pathway. Other studies have shown the inhibition of growth, apoptosis induction, and reduced Bcl-2 expression of Ishikawa cells about 21–88% after aspirin treatment [26,27]. Indomethacin was found to be related to the up-regulation of the PTEN tumor suppressor, which affected the HEC-1B cancer cell line [28]. A selective COX-2 inhibitor-celecoxib, reduced HEC-1A and HEC-1B cell lines growth and assisted in the inhibition of tumor cell proliferation [29]. However, none of these studies used modified NSAIDs. Structural and chemical modifications of NSAIDs may not only enhance the antitumor activity but also reduce the risk of side effects which are common during regular NSAIDs intake [30,31]. For this reason, new NSAID derivatives have been developed and synthesized, such as: NO-NSAIDs (hybrid nitrate NSAIDs), cGMP

PDE (cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase), AChE (acetylcholinesterase inhibitors), phospho-NSAIDs, TEMPO (2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy), TEMPOL (4-hydroxy-TEMPO) and HS-NSAIDs (hydrogen sulfide NSAIDs) [23–25,32–34]. However, the study omitted endometrial cancer cells, which are known to overexpress COX-2 [35,36]. Because of metal complexation, NSAIDs could also get new anticancer qualities. Some zinc complexes of naproxen had shown high activity against bacterial strains while copper-aspirin complexation had served as superoxide dismutase mimetics and had high cytotoxic activity against selected human cancer cells. These agents were not associated with COX inhibition properties but were involved in DNA binding and cleavage [37,38].

The results of the cell viability assay (MTT) showed the activity of 375a and 377a as well as their rhenium derivatives 375 (Re-aspirin) and 377 (Re-indomethacin) against Ishikawa and HEC-1A cells. Both cell lines responded to the rhenium derivatives, for which the biologically active concentrations were significantly lower than in the case of the original NSAID counterparts. Moreover, the rhenium derivatives showed higher inhibitory activity during prolonged incubation, which was not observed with NSAIDs. These effects were found to be not only time-dependent but also cell line-dependent, as different concentrations were required for 50% inhibition of Ishikawa and HEC-1A viability. The nature of the endometrial cancer cell lines may be the reason for these differences. According to Bokhman's classification [39], based on different etiopathological, genetic and clinical features, Ishikawa cells belong to type I EC, while HEC-1A cells are representatives of type II. Carcinoma cells of type I had shown high expression of estrogen and progesterone receptors, had low histological differentiation, and are considered typical of early-stage disease. Type II cells represent highly aggressive and invasive carcinoma types, with low levels of expression of estrogen and progesterone receptors and are commonly referred to as typical of the advanced stage of the disease. Moreover, these two cell lines were derived from adenocarcinomas from women at different ages (39-year and 71-year-old for Ishikawa and HEC-1A, respectively), which is associated with the premenopausal and postmenopausal nature of the cells [40]. Ishikawa cell line is a well-differentiated human adenocarcinoma cell line carrying estrogen and progesterone receptors. This cell line is known to produce corticotropin-releasing hormone, placental alkaline phosphatase, and chorionic gonadotropin and is responsive to steroid hormones [41,42]. HEC-1A cancer cells express the wild-type form of the estrogen receptor, and 17-beta-estradiol induces proliferation of these cells. In addition, these cells contain a nonsense mutation in the *hpm2* and a splicing mutation in the *hmsl6* genes, which play key roles in DNA's methyl-directed mismatch repair (MMR) pathway [43,44]. These differences in characteristics are probably the main reason for the different responses of the cells to treatment with NSAIDs versus rhenium-NSAIDs. The better activity of rhenium derivatives compared with the original NSAIDs was also observed in previous studies performed by our research group using HeLa and L929 cell lines. Rhenium-aspirin and rhenium-indomethacin were more active against cancerous HeLa cells than non-cancerous L929 cells with IC₅₀ values of 36 µM and 158 µM, respectively. The IC₅₀ values for aspirin and indomethacin against HeLa were much more higher (2819 µM and 326 µM, respectively) [16].

The proliferation assay showed higher sensitivity of HEC-1A cells to original NSAIDs and their rhenium derivatives than Ishikawa cells. In this case, HEC-1A cells were affected by both tested rhenium compounds already after the 24-h incubation period, while Ishikawa cells proved susceptible to 377 and 377a. For both cancer cell lines, the anti-proliferative effect increased after 72-h incubation with tested NSAIDs and their rhenium derivatives. The proliferation rate of cells grown under normal conditions varies and depends on the type of cancer. In the case of Ishikawa cells, their proliferation rate is faster than that of HEC-1A cells and increases with the number of passages [40,45]. That may be a possible reason for the lower inhibitory effect of the tested compounds against Ishikawa cells proliferation. Changes in proliferation rate were studied not only at IC₅₀ but also at concentrations equal to 1/2 IC₅₀ and 1/4 IC₅₀ (Tables 3 and 4). For the lower concentrations, only 375a showed a significant anti-proliferative effect after 24-h incubation, where 1/2 IC₅₀ and 1/4

IC₅₀ of this compound (* = $p < 0.05$) inhibited cell proliferation of Ishikawa and HEC-1A cells, respectively. This observation is consistent with previous reports showing that low doses of NSAIDs, especially aspirin, provided good survival outcomes for women with endometrial cancer [46,47]. Cisplatin (CisPt) is a good candidate for comparison because of its widespread use as an anti-EC drug as a so-called first-line chemotherapeutic agent, which is administered to patients in single doses as well as in combination chemotherapy (at a dose and regimen of 50–100 mg per m² of a body surface area, every 3 weeks) [48]. CisPt was found to inhibit EC cell proliferation by increasing the expression of semaphorin 3B (SEMA3B), which has suppressive effects on cancer cell proliferation and angiogenesis. As our results showed, after 24-h incubation, CisPt had a significant (* = $p < 0.05$) anti-proliferative effect only on Ishikawa endometrial cancer cells but not on HEC-1A. That could be explained by the overexpression of *BCL2*, which is associated with the resistance of HEC-1A cancer cells to CisPt and the longer incubation time required to transpose the drug across the cell membrane, as shown by Rouette et al. [49].

It has already been shown that NSAIDs are associated with an increase in the production of reactive oxygen species (ROS). This mechanism of action of NSAIDs is commonly suggested to initiate side effects, particularly within the gastroenterological tract. However, this mechanism also may be used to destroy cancer cells by inhibiting cell growth and metabolism and disrupting the signaling pathways. Increased levels of ROS induce disruption of cellular homeostasis, leading to cellular damage and initiation of apoptosis [50–52]. Therefore, the induction of high ROS levels has been suggested by our group as a positive mechanism of rhenium-NSAIDs activity against previously studied cells [16]. In this study, this effect was evident only in HeLa cancer cells, not in non-neoplastic L-929 fibroblast cells. It was observed that cancer cells have a significantly higher ability to accumulate rhenium derivatives in mitochondria, which could also be related to an increase in mitochondria-specific ROS. As shown in the present study, there was increased production of cytosolic ROS in Ishikawa cells following treatment with both NSAIDs and their rhenium derivatives. Moreover, both NSAIDs and their rhenium derivatives, had a significant impact on ROS levels in HEC-1A, but at 1/2 IC₅₀ concentrations, which may be related to better penetration of compounds across cell membranes. Furthermore, the 1/2 IC₅₀ concentrations of rhenium derivatives 375 and 377 were lower than 1/2 IC₅₀ of original NSAIDs 375a and 377a, corresponding to 197.03 µM and 729.65 µM and to 13,627.9 µM and 2744.65 µM, respectively. These results indicate a more effective induction of ROS by rhenium compounds than by their original NSAID counterparts because of the higher activity of the former at lower concentrations than the latter. The result of measuring mitochondrial-specific ROS levels did not match the effects of the agents on cytosolic ROS levels. In this case, the highest level (which is considered to be a 100% increase in ROS amount) for both cell lines appeared to be associated with 377. In the case of Ishikawa cells, this effect was additionally evident for 375, but not to the same extent as for 377. That may be related to the cell-dependent mode of interaction of the compounds with mitochondria. It should additionally be noted that the incubation time of the compounds with cells was only two hours, which is related to the limitations of an assay.

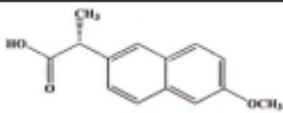
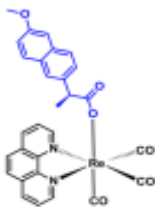
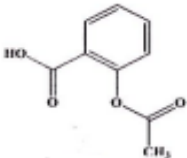
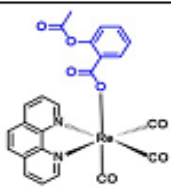
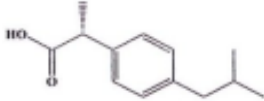
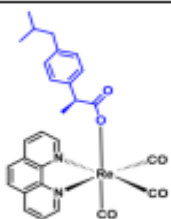
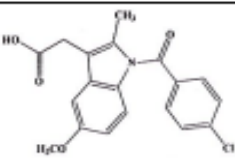
The investigated rhenium derivatives have potential as agents against uterine-related cancers, but the study of the biological activity of these compounds should be further pursued. The next steps should include investigating the mechanisms of rhenium-NSAIDs impact at deeper molecular levels.

4. Materials and Methods

4.1. NSAIDs and Rhenium-NSAIDs Complexes

NSAIDs and their complexes with rhenium were synthesized in the Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, by K. Kowalski research group [16]. Compounds tested in this study are listed in Table 5.

Table 5. NSAIDs and their corresponding rhenium complexes used in cell viability assay of Ishikawa and HEC-1A cell lines.

NSAIDs and Rhenium-NSAIDs Agents		
Structure	Name/Formula	Molecular Weight [g/mol]
	Naproxen (373a) C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230.26
	Rhenium-naproxen (373) C ₂₀ H ₂₁ N ₂ O ₆ Re ₁	679.69
	Aspirin (375a) C ₉ H ₈ O ₄	180.16
	Rhenium-aspirin (375) C ₂₄ H ₁₅ N ₂ O ₇ Re ₁	629.59
	Ibuprofen (376a) C ₁₄ H ₂₂ O ₂	206.28
	Rhenium-ibuprofen (376) C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₃ Re ₁	655.72
	Indomethacin (377a) C ₁₉ H ₁₆ Cl ₁ N ₁ O ₄	357.79

$1/2$ IC_{50} , and $1/4$ IC_{50} concentrations established previously in the MTT assay and incubated under standard conditions for 24 and 72 h. Absorbance was measured at 450 nm using a SpectraMax i3 plate reader (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA). The assay was performed in three independent experiments. The results were calculated using GraphPad Prism 7 software.

4.5. Cellular ROS Level Measurement

Reactive oxygen species (ROS) levels were measured using H_2DCFDA (ThermoFisher) fluorescent dye. Fluorescence measurement is made by converting H_2DCFDA to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), the amount of which is directly dependent on the amount of ROS produced in the cells. Thus, ROS detection was performed by measuring the fluorescence of H_2DCFDA -treated Ishikawa and HEC-1A cancer cells at $Ex/Em = 495/520$ nm. Ishikawa and HEC-1A cells were seeded into black bottom 96-well cell culture plates. Once cells reached approximately 80–90% confluence, 100 μ L of DMEM-F12 medium w/o FBS supplemented with H_2DCFDA dye at a final concentration of 5 μ M was added. Cells were then incubated for 40 min under standard conditions, protected from light. After incubation, cells were washed twice with DPBS, treated with the selected compound at IC_{50} and $1/2$ IC_{50} concentrations, obtained in the MTT assay, and then incubated for 0.5, 1, and 3 h. After each time point, cells were washed twice with DPBS and suspended in 100 μ L of DPBS. Fluorescence was measured at $Ex/Em = 495/520$ nm using a SpectraMax i3 plate reader (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA). The assay was performed in three independent experiments, and the results were calculated using GraphPad Prism 7 Software.

4.6. Mitochondrial ROS Level Measurement

The assay was performed using the MitoSOX Red dye (Invitrogen, Waltham, MA, USA). When incorporated into mitochondria, this dye is rapidly oxidized by peroxide and converted into the fluorescent product 2-hydroxymitoethidium. Initially, cells were seeded into a black bottom 96-well plate. Once approximately 80–90% cell confluence was achieved, the culture medium was replaced with the medium w/o FBS containing 5 μ M MitoSOX Red dye and incubated for 10 min under standard conditions. After incubation, cells were washed twice with DPBS and treated with NSAIDs and rhenium-NSAIDs at IC_{50} concentrations. 1% H_2O_2 and cisplatin were used as controls. Cells were incubated with the compounds for 2 h under standard conditions, protected from light. Cells were then washed twice with DPBS and resuspended in 100 μ L of DPBS. Fluorescence was measured at $Ex/Em = 400/595$ nm using SpectraMax i3 plate reader (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA). The assay was performed in three independent replicates and the results were calculated using GraphPad Prism 7 software.

Author Contributions: Conceptualization, O.K., A.K. and P.S.; methodology, O.K.; investigation, O. K.; writing—original draft preparation, O.K.; writing—review and editing, P.S. and A.K.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by the National Science Centre, Poland (grant SONATA 17 UMO-2021/43/D/NZ7/01386), and by a subsidy for scientific activity provided to the Department of Molecular Microbiology by the University of Lodz (B2111000000038.01). For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Some of the biological experiments were performed in part using equipment of the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland.

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

References

- Smith, W.L.; Dewitt, D.L.; Garavito, R.M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 145–182. [\[CrossRef\]](#)
- De Leval, X.; Delarge, J.; Somers, F.; De Tullio, P.; Henrotin, Y.; Pirotte, B.; Dogne, J.-M. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1041–1062. [\[CrossRef\]](#)
- Macciò, A.; Madeddu, C. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine* **2012**, *58*, 133–147. [\[CrossRef\]](#)
- Deivendran, S.; Marzook, K.H.; Pillai, M.R. The Role of Inflammation in Cervical Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *816*, 377–399. [\[CrossRef\]](#)
- Szewczyk, G.; Maciejewski, T.M.; Szukiewicz, D. Current progress in the inflammatory background of angiogenesis in gynecological cancers. *Inflamm. Res.* **2019**, *68*, 247–260. [\[CrossRef\]](#)
- Chubak, J.; Whitlock, E.P.; Williams, S.B.; Kamineni, A.; Burda, B.U.; Buist, D.S.; Anderson, M.L. Aspirin for the Prevention of Cancer Incidence and Mortality: Systematic Evidence Reviews for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* **2016**, *164*, 814–825. [\[CrossRef\]](#)
- Friis, S.; Riis, A.H.; Erichsen, R.; Baron, J.A.; Sørensen, H.T. Low-Dose Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Colorectal Cancer Risk. *Ann. Intern. Med.* **2015**, *163*, 347–355. [\[CrossRef\]](#)
- Kehm, R.D.; Hopper, J.L.; John, E.M.; Phillips, K.-A.; MacInnis, R.J.; Dite, G.S.; Milne, R.L.; Liao, Y.; Zeinomar, N.; Knight, J.A.; et al. Regular use of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk for women at familial or genetic risk: A cohort study. *Breast Cancer Res.* **2019**, *21*, 52. [\[CrossRef\]](#)
- Doat, S.; Cénée, S.; Trétarre, B.; Rebillard, X.; Lamy, P.-J.; Bringer, J.-P.; Iborra, F.; Murez, T.; Sanchez, M.; Menegaux, F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and prostate cancer risk: Results from the EPICAP study. *Cancer Med.* **2016**, *6*, 2461–2470. [\[CrossRef\]](#)
- Chiu, L.; Tong, K.; Ooi, V. Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, S293–S297. [\[CrossRef\]](#)
- Marinov, L.; Georgieva, A.; Voynikov, Y.; Toshkova, R.; Nikolova, I.; Malchev, M. Cytotoxic and antiproliferative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac in human tumour cell lines. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2021**, *35*, 1118–1126. [\[CrossRef\]](#)
- Buzharevski, A.; Paskaš, S.; Sárosi, M.-B.; Laube, M.; Lönnecke, P.; Neumann, W.; Murgarić, B.; Mijatović, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Pietzsch, J.; et al. Carboranyl Derivatives of Rofecoxib with Cytostatic Activity against Human Melanoma and Colon Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4827. [\[CrossRef\]](#)
- Sostres, C.; Gargallo, C.J.; Lanas, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Res. Ther.* **2013**, *15*, 3. [\[CrossRef\]](#)
- Lim, Y.J.; Lee, J.S.; Ku, Y.S.; Hahn, K.-B. Rescue strategies against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal damage. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 1169–1178. [\[CrossRef\]](#)
- Dillon, C.T.; Hambley, T.W.; Kennedy, B.J.; Lay, P.A.; Zhou, Q.; Davies, N.M.; Biffin, J.R.; Regtop, H.L. Gastrointestinal Toxicity, Antiinflammatory Activity, and Superoxide Dismutase Activity of Copper and Zinc Complexes of the Antiinflammatory Drug Indomethacin. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 28–37. [\[CrossRef\]](#)
- Skiba, J.; Kowalczyk, A.; Stączek, P.; Bernas, T.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Schatzschneider, U.; Czerwieniec, R.; Kowalski, K. Luminescent *fac*-[Re(CO)₃(phen)] carboxylato complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis and mechanistic insights into the in vitro anticancer activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)]. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 573–583. [\[CrossRef\]](#)
- Reczek, C.R.; Chandel, N.S. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, *1*, 79–98. [\[CrossRef\]](#)
- Tirichen, H.; Yaigoub, H.; Xu, W.; Wu, C.; Li, R.; Li, Y. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 627837. [\[CrossRef\]](#)
- Mailloux, R.J. Mitochondrial Antioxidants and the Maintenance of Cellular Hydrogen Peroxide Levels. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 7857251. [\[CrossRef\]](#)
- Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1. [\[CrossRef\]](#)
- Brasky, T.M.; Felix, A.S.; Cohn, D.E.; McMeekin, D.S.; Mutch, D.G.; Creasman, W.T.; Thaker, P.H.; Walker, J.L.; Moore, R.G.; Lele, S.B.; et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Endometrial Carcinoma Mortality and Recurrence. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, djw251. [\[CrossRef\]](#)
- Matsuo, K.; Cahoon, S.S.; Yoshihara, K.; Shida, M.; Kakuda, M.; Adachi, S.; Moeini, A.; Machida, H.; Garcia-Sayre, J.; Ueda, Y.; et al. Association of Low-Dose Aspirin and Survival of Women With Endometrial Cancer. *Obstet. Gynecol.* **2016**, *128*, 127–137. [\[CrossRef\]](#)
- Verdoodt, F.; Friis, S.; Dehlendorff, C.; Albieri, V.; Kjaer, S.K. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and risk of endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Gynecol. Oncol.* **2016**, *140*, 352–358. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Y.; Zhao, J.; Chen, X.; Zhang, F.; Li, X. Aspirin use and endometrial cancer risk: A meta-analysis and systematic review. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 461. [\[CrossRef\]](#)
- Gao, J.; Niwa, K.; Sun, W.; Takemura, M.; Lian, Z.; Onogi, K.; Seishima, M.; Mori, H.; Tamaya, T. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 901–907. [\[CrossRef\]](#)
- Arango, H. Aspirin effects on endometrial cancer cell growth. *Obstet. Gynecol.* **2001**, *97*, 423–427. [\[CrossRef\]](#)

27. Webb, P.M.; Na, R.; Weiderpass, E.; Adami, H.O.; Anderson, K.E.; Bertrand, K.A.; Botteri, E.; Brasky, T.M.; Brinton, L.A.; Chen, C.; et al. Use of aspirin, other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen and risk of endometrial cancer: The Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 310–316. [\[CrossRef\]](#)
28. Abdulkareem, I.; Blair, M. Effects of indomethacin on expression of PTEN tumour suppressor in human cancers. *Niger. Med. J.* **2013**, *54*, 100–106. [\[CrossRef\]](#)
29. Xiao, Y.; Teng, Y.; Zhang, R.; Luo, L. Antitumor effect of the selective COX-2 inhibitor celecoxib on endometrial adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 1219–1224. [\[CrossRef\]](#)
30. Wongrakpanich, S.; Wongrakpanich, A.; Melhado, K.; Rangaswami, J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging Dis.* **2018**, *9*, 143–150. [\[CrossRef\]](#)
31. Henry, D.A. Side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Baillière's Clin. Rheumatol.* **1988**, *2*, 425–454. [\[CrossRef\]](#)
32. Dunlap, T.; Abdul-Hay, S.O.; Chandrasena, R.E.P.; Hagos, G.K.; Sinha, V.; Wang, Z.; Wang, H.; Thatcher, G.R.J. Nitrates and NO-NSAIDs in cancer chemoprevention and therapy: In vitro evidence querying the NO donor functionality. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 115–124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Tinsley, H.N.; Piazza, G.A. Novel Therapeutics: NSAIDs, Derivatives, and Phosphodiesterases. *Curr. Color. Cancer Rep.* **2012**, *8*, 325–330. [\[CrossRef\]](#)
34. Qandil, A.M. Prodrugs of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), More Than Meets the Eye: A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 17244–17274. [\[CrossRef\]](#)
35. Hasegawa, K.; Ohashi, Y.; Ishikawa, K.; Yasue, A.; Kato, R.; Achiwa, Y.; Nishio, E.; Udagawa, Y. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 1419–1428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Jeon, Y.-T.; Kang, S.; Kang, D.-H.; Yoo, K.-Y.; Park, L.-A.; Bang, Y.-J.; Kim, J.W.; Park, N.-H.; Kang, S.-B.; Lee, H.-P.; et al. Cyclooxygenase-2 and p53 Expressions in Endometrial Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2004**, *13*, 1538–1542. [\[CrossRef\]](#)
37. Abu Ali, H.; Fares, H.; Darawsheh, M.; Rappocciolo, E.; Akkawi, M.; Jaber, S. Synthesis, characterization and biological activity of new mixed ligand complexes of Zn(II) naproxen with nitrogen based ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 67–76. [\[CrossRef\]](#)
38. O'Connor, M.; Kellett, A.; McCann, M.; Rosair, G.; McNamara, M.; Howe, O.; Creaven, B.S.; McClean, S.; Kia, A.F.-A.; O'Shea, D.; et al. Copper(II) Complexes of Salicylic Acid Combining Superoxide Dismutase Mimetic Properties with DNA Binding and Cleaving Capabilities Display Promising Chemotherapeutic Potential with Fast Acting in Vitro Cytotoxicity against Cisplatin Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1957–1968. [\[CrossRef\]](#)
39. Wilczyński, M.; Danielska, J.; Wilczyński, J. An update of the classical Bokhman's dualistic model of endometrial cancer. *Menopausal Rev.* **2016**, *15*, 63–68. [\[CrossRef\]](#)
40. Kozak, J.; Wdowiak, P.; Maciejewski, R.; Torres, A. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology* **2018**, *70*, 339–350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Nishida, M.; Kasahara, K.; Kaneko, M.; Iwasaki, H.; Hayashi, K. Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **1985**, *37*, 1103–1111. [\[PubMed\]](#)
42. Nishida, M. Ishikawa Cells: Opening of In Vitro Hormone Research on Endometrial Carcinoma. In *Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma*; Springer: Tokyo, Japan, 2003; pp. 35–38. [\[CrossRef\]](#)
43. Castro-Rivera, E.; Safe, S. Estrogen- and antiestrogen-responsiveness of HEC1A endometrial adenocarcinoma cells in culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *64*, 287–295. [\[CrossRef\]](#)
44. Glaab, W.E.; Risinger, J.I.; Umar, A.; Kunkel, T.A.; Barrett, J.C.; Tindall, K.R. Characterization of Distinct Human Endometrial Carcinoma Cell Lines Deficient in Mismatch Repair That Originated from a Single Tumor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26662–26669. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Nishida, M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum. Cell* **2002**, *15*, 104–117. [\[CrossRef\]](#)
46. Kuźmycz, O.; Stączek, P. Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome. *Cancer Biol. Ther.* **2020**, *21*, 486–494. [\[CrossRef\]](#)
47. Nevadunsky, N.S.; Van Arsdale, A.; Strickler, H.D.; Spoozak, L.A.; Moodel, A.; Kaur, G.; Girda, E.; Goldberg, G.L.; Einstein, M.H. Association Between Statin Use and Endometrial Cancer Survival. *Obstet. Gynecol.* **2015**, *126*, 144–150. [\[CrossRef\]](#)
48. Moxley, K.M.; McMeekin, D.S. Endometrial Carcinoma: A Review of Chemotherapy, Drug Resistance, and the Search for New Agents. *Oncologist* **2010**, *15*, 1026–1033. [\[CrossRef\]](#)
49. Rouette, A.; Parent, S.; Girouard, J.; Leblanc, V.; Asselin, E. Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1755–1767. [\[CrossRef\]](#)
50. Ghosh, R.; Alajbegovic, A.; Gomes, A.V. NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 536962. [\[CrossRef\]](#)
51. Kusuvara, H.; Komatsu, H.; Sumichika, H.; Sugahara, K. Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured gastric cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *383*, 331–337. [\[CrossRef\]](#)
52. Adachi, M.; Sakamoto, H.; Kawamura, R.; Wang, W.; Imai, K.; Shinomura, Y. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. *Histol. Histopathol.* **2007**, *22*, 437–442. [\[PubMed\]](#)

A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients - identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor

1 Olga Kuźmycz¹, Aleksandra Kowalczyk^{1*}, Aleksandra Bolanowska², Anna Drozdowska²,
2 Jakub Lach^{1,3}, Wiktoria Wierzbńska^{1,4}, Tomasz Kluz^{2,5}, and Paweł Stączek¹

3 ¹ University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Institute of Microbiology,
4 Biotechnology and Immunology, Department of Molecular Microbiology, Banacha 12/16, 90-237
5 Lodz, Poland; aleksandra.strzelczyk@biol.uni.lodz.pl (A.K.), olga.kuzmych@biol.uni.lodz.pl (O.K.),
6 jakub.lach@biol.uni.lodz.pl (J.L.), wiktoria.wierzbinska@edu.uni.lodz.pl (W.W.),
7 pawel.staczek@biol.uni.lodz.pl (P.S.)

8 ² Department of Gynecology and Obstetrics, Fryderyk Chopin University Hospital No. 1, 35-055
9 Rzeszow, Poland; bolanowskaaleksandra@gmail.com (A.B.), aanna.dro@gmail.com (A.D.),
10 jtkluz@interia.pl (T.K.)

11 ³ University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Biobank Lab, Department of
12 Cancer Biology and Epigenetics, 93-338 Lodz, Poland; j.roch.lach@gmail.com
13 j.roch.lach@gmail.com (J.L.)

14 ⁴ BioMedChem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of Polish Academy of
15 Sciences, Matejki 21/23, 90-237 Lodz, Poland; wiktoria.wierzbinska@edu.uni.lodz.pl (W.W.)

16 ⁵ Department of Gynecology, Gynecology Oncology and Obstetrics, Institute of Medical Sciences,
17 Medical College of Rzeszow University, 35-959 Rzeszow, Poland; jtkluz@interia.pl (T.K.)

18 * Correspondence:
19 Aleksandra Kowalczyk
20 aleksandra.strzelczyk@biol.uni.lodz.pl

21 **Keywords:** endometrial cancer¹, microbiome², *Anaerococcus vaginalis*³, metagenome
22 sequencing⁴, ANCOM analysis⁵.

Abstract

24 The advent of sequencing techniques has facilitated the application of microbiome studies in cancer
25 research. It has been observed that microbial pathogens contribute to tumorigenesis in a significant
26 portion of reported cancer cases. Endometrial cancer (EC) is a prevalent malignancy among women,
27 with several known risk factors such as estrogen exposure, age, obesity, and comorbidities. The
28 upper genital tract of healthy women is typically dominated by *Lactobacillus* species. Dysbiosis in
29 microbial composition has been observed in EC. In the presented study, the endocervical canal
30 microbiomes of women with EC or endometrial myoma (EM) were examined. Microbial
31 communities in endometrial samples significantly differed between the two groups, with EC samples
32 exhibiting higher microbial diversity. Pathogenic taxa such as *Streptococcus*, *Anaerococcus*,
33 *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus*, and *Porphyromonas* were enriched in EC samples.
34 Interestingly, the genus *Anaerococcus* was found to be a differentiating taxon between microbiomes

35 isolated from women with EC and those with benign lesions (EM). As *A. vaginalis* is a well-
36 recognized gynecological pathogen associated with chronic endometritis, endometriosis and bacterial
37 vaginosis, the ability of cells of this species to adhere to human uterine fibroblasts and induce the
38 formation of reactive oxygen species (ROS) was investigated, revealing a potential role for this
39 bacterium in the development of EC. Further research is needed to elucidate the role of the uterine
40 microbiome in EC.

41 1 Introduction

42 Endometrial cancer (EC) is one of the most common female reproductive tract malignancies in
43 developed countries. According to the International Agency for Research on Cancer, the incidence
44 rate of EC is increasing rapidly compared with 2018 and is estimated to increase by more than 50%
45 worldwide by 2040. In 2020, Poland had the highest rate of EC in the world, which corresponded to
46 9,869 diagnosed new cases (Chen et al., 2017; Morice et al., 2016; World Cancer Research Fund
47 International, 2023.). Only several factors, including host genetic alterations and hereditary factors,
48 have been shown to play important roles in endometrial carcinogenesis. But still, this can only
49 explain 10–20% of EC cases. A woman's lifetime risk of EC is approximately 3%, with a median age
50 at diagnosis of 61 years. Environmental factors, such as hormones, obesity, inflammation, as well as
51 menopausal status and microbiome composition, were found to be related to EC initiation and
52 progression (Kuźmycz and Stączek, 2020; Morice et al., 2016). The Human Microbiome Project has
53 revealed that about 9% of the total human microbiome was found in the female reproductive tract.
54 Historically, the cervix was considered to be the barrier which protected the upper genital tract from
55 bacteria. Thus, the uterus, in its physiological state, was suggested to be a bacteria-free zone.
56 However, the studies with the use of metagenome sequencing techniques demonstrated a diversity of
57 bacterial populations in the uterus, which additionally can undergo significant changes in
58 pathological states (Moreno et al., 2022). Interestingly, a risk factor for EC is postmenopause since,
59 in this period, an increase of uterine bacterial diversity is observed, which is associated with
60 disorders and pathologies in the female reproductive tract. The endometrial microbiota in
61 postmenopausal women may create conditions that allow the bacterial community correlated to EC to
62 emerge. It was suggested that EC-related bacteria are probably associated with chronic inflammation
63 and disruption of host cellular functions, leading to a carcinogenic process (Medina-Bastidas et al.,
64 2022; Walsh et al., 2019). In the presented study, the endocervical canal microbiomes of women with
65 EC or endometrial myoma (EM) were examined to reveal the differences in microbial composition.
66 Some pathological taxa were identified, which may play a crucial role in EC development and
67 progression.

68 2 Materials and Methods

69 2.1 Participant enrollment

70 In this study, we analyzed the endocervical canal microbiomes of the 29 participants. The
71 endocervical canal swabs were prepared and supplied by the Fryderyk Chopin Clinic no 1 of
72 Rzeszów, Poland. The procedure of material identification and collection was supported with all
73 necessary protocols and procedures and obtained the Regional Bioethics Committee approval number
74 24/B/2019 with further updates. Participants were patients of the Gynecology Department of
75 Fryderyk Chopin Clinical Hospital no 1 in Rzeszów who were qualified for surgical treatment due to
76 diagnosed EC or EM. The mainstay of treatment for EC is total hysterectomy with bilateral salpingo-
77 oophorectomy. Hysterectomy and adnexectomy can be done with minimally invasive techniques
78 (laparoscopy or robotassisted surgery), vaginally, or laparotomically (Braun et al., 2016; Morice et

al., 2016). Removal of the uterus is also recommended for women with symptomatic EM, for whom medical treatments have failed, and who have completed childbearing (Thubert et al., 2016). The main criteria for the selection of participants were as follows: women aged 18 years or older, with EC or EM, who had not been treated with antibacterial agents for more than one month before collecting the samples. Participants also completed the additional questionnaires, the data of which are presented in Table 1.

2.2 Endocervical canal swabs collection

Swabs were collected by the surgeon from the endocervical canal (after visualization in a speculum) before the hysterectomy using sterile Dacron swabs and then placed in sterile Falcon tubes. The smear material prepared in this way was stored on dry ice. For long-term storage, -80°C was used. No additional buffer was added to the swabs.

2.3 Sample preparation and processing

1 ml of the sterile Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) was added to the swabs and then vortexed three times for 15 seconds. Samples were then centrifuged at 10,000 x g for 15 minutes to collect all bacterial cells in the supernatant. All genomic DNA extractions were performed using the DNeasy Power Soil Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with minor modifications. For lysis, Lysis Solution was used, which was a part of the kit supplemented with Lysozyme (10 mg/ml), Mutanolysin (10 U/μl), and Lizostaphin (0.4 U/μl) (AandA Biotechnology, Gdańsk, Poland). Lysis was performed overnight at 37°C with gentle shaking. Subsequent DNA extraction steps were performed according to the manufacturer's instructions. The amount of eluted DNA was measured on BioDrop (BioDrop Ltd, Harvard Bioscience, Holliston, USA, MA). The 5 ng of extracted DNA was used for polymerase chain reaction (PCR) amplification of the V3-V4 region of 16S rDNA. The reaction was prepared according to the instructions for 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, San Diego, USA, CA) and the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA, CA). 16S rDNA sequencing was performed by the University of Lodz Biobank Lab using the Illumina MiSeq nextgeneration sequencing platform (Illumina, San Diego, USA, CA) (Figure 1).

2.4 Bioinformatic sequence analysis

At the first stage of analysis, the quality of reads was checked using FastQC. In the next step, adaptors and low-quality sequences were removed from the reads with trim galore v. 0.6.4 set on default parameters. Further analysis was performed with QIIME2 2021.4. DADA2 was used for denoising data and ASVs (amplicon sequence variants) table generation with parameters --p-trim-left-f 25 --p-trim-left-r 25 --p-trim-left-f 240 --p-trim-left-r 240. Alpha and beta diversity metrics were generated with the core-metrics-phylogenetic plugin with a sampling depth of 27 132. Alpha diversity, which presents the evenness and richness of bacterial population within samples, was investigated with the Shannon index and ASVs number. Between groups, a comparison of α -diversity was performed with the Kruskal-Wallis test. Beta diversity was measured by three methods: Bray-Curtis dissimilarity, Unweighted UniFrac distance and Weighted UniFrac distance. These indexes were calculated for analysis of the shared diversity between bacterial communities in terms of ecological distance between samples. Differences in β -diversity between groups were tested by the PERMANOVA procedure, which is a multivariate analysis of variance based on distance matrices and permutation. Principal coordinate analysis (PCoA) of β -diversity was also performed and plotted with QIIME2. The Analysis of Compositions of Microbiomes (ANCOM) was performed using the standard QIIME2 pipeline.

165 Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please
166 ensure to add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

167 3 Results

168 3.1 Participants characteristics

169 Twenty-nine patients were included in this study. The patients were divided into two major groups:
170 13 participants with endometrial EM and 16 with EC. The characteristics of cohorts are described in
171 Table 1. Material examination and diagnoses were made by a pathologist at the Fryderyk Chopin
172 Clinic no 1 (Rzeszow, Poland). The material from healthy women was not considered in this study
173 because the hysterectomy is not provided in healthy patients. Endometrial myoma was chosen instead
174 because these cells are non-tumorigenic in nature, and at the molecular level, they have qualities
175 closer to normal cells on molecular bases.

176 3.2 Statistical comparison of uterus lesions microbiome

177 The α -diversity comparison based on the Shannon index revealed statistically significant differences
178 between EM and EC samples ($p < 0.01$) (Figure 2). It can be noticed that samples collected from the
179 EC patients were characterized by greater biodiversity than samples from the EM patients, which
180 may suggest the appearance of dysbiosis. The observed amplicon sequence variants (ASVs) number
181 is included in Figure 3.

182 Principal Coordinate Analysis (PCoA), based on Bray-Curtis distance (Table 2 and Figure 4A),
183 showed the significant sample separation according to the pathology type. Moreover, the sequencing
184 results revealed that EM samples were colonized by a homogeneous microbiome dominated by
185 *Lactobacillus* spp. (Figure 4B, blue dots). The comparison between the EM and EC groups based on
186 Bray-Curtis distance showed statistically significant differences ($p = 0.001$).

187 These observations were also confirmed by β -diversity analysis with the use of the Unweighted
188 UniFrac ($p = 0.014$), as well as with Weighted UniFrac methods ($p = 0.005$) (Figure 5), and the
189 results are presented in Table 3.

190 ANCOM analysis of the samples was performed using the model in which taxa that were identified
191 in less than five samples were removed. The results of taxon analysis were associated with the
192 differentiating effect of d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia;
193 o_Peptostreptococcales-Tissierellales; f_Peptostreptococcales-Tissierellales; g_Anaerococcus,
194 which were predominant in the samples from EC. Possibly, the *Anaerococcus* representatives could
195 be the indicators of dysbiosis, and their presence correlates with EC incidence. In this analytical
196 model, the sample types differed significantly in the abundance of *Firmicutes* and *Cyanobacteria* in
197 EM. Moreover, the analysis showed the predomination of pathogenic taxa such as *Streptococcus*,
198 *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus*, and *Porphyromonas* to predominate in EC
199 samples (Figure 6). The main types of bacteria in the pathologies studied and their percentage
200 distribution in the form of pie chart are presented in Figure 7.

201 3.3 The adhesion level of *Anaerococcus vaginalis* to human uterus fibroblasts

202 Based on the above taxonomic analysis of the uterine microbiota, revealing genus *Anaerococcus* as a
203 differentiating taxon between EC and EM, the strain *A. vaginalis* DSM 7457 was selected for the

204 next experimental steps. This strain was originally isolated from an ovarian abscess (Ezaki et al.,
205 2001).

206 The results of the test showed a high adhesion rate for both *L. jensenii* and *A. vaginalis* strains
207 (Figure 8). However, the tendency of a higher adhesion rate of *A. vaginalis* to HUF cells compared to
208 *L. jensenii* was observed. The percentage of adhesion of the studied pathogenic strain was almost
209 50% after 24 hours of infection. The MOI of 0.5 was found to be suitable for testing, as the result of
210 calculations described in methodology.

211 **3.4 The ROS level changes in HUF cells after Anaerococcus vaginalis infection**

212 The increase in reactive oxygen species (ROS) level is one of the indicators of the inflammatory
213 process that could be associated with infections caused by pathogens. It is one of the responses of the
214 host's innate immunity to microbial invaders and is aimed at eliminating pathogens. However, long-
215 term exposure to bacterial infection could lead to repercussions - the accumulation of damage in the
216 human cellular apparatus. These abnormalities could lead to the development of cancer (Kennel and
217 Greten, 2021; Spooner and Yilmaz, 2011). The level of ROS in HUF cells 24 h after infection with *A.*
218 *vaginalis* are shown in Figure 9.

219 The results of ROS level measurement in HUF cells after 24 hours of infection with *A. vaginalis*
220 show a statistically significant increase. This level was statistically similar to the one induced by
221 0.5% H₂O₂. Such effect was not observed when HUF cells were infected with the *L. jensenii*,
222 indicating a reduced impact on oxidative stress induction in human cells.

223 **4 Discussion**

224 Since the progress of sequencing techniques, microbiome studies found practical applications in
225 cancer research. It has been shown that microbial pathogens have a tumorigenic effect in 15-20% of
226 reported cancer cases and are referred to as "oncomicrobes." The risk of pathogen influence on
227 carcinogenesis and progression is also present in the so-called "complicit" microbes, whose functions
228 are broad and yet not well understood (Menati Rashno et al., 2021; Sepich-Poore et al., 2021). The
229 pathogenic changes of microbiota can promote resistance to host cell death, which is one of the
230 cancer hallmarks, and induce cancer-promoting inflammation. The composition of the bacterial
231 microbiome modulates the specific alternative responses, one of which depends on the
232 inflammasome complex and the second on the inflammasome independent secretion of pro-
233 inflammatory cytokines, highlighting the key role in activating different degrees of inflammation (De
234 Seta et al., 2019). In addition, the microbiota influences carcinogenesis by releasing carcinogenic
235 molecules (e.g., genotoxins) and producing tumor-promoting metabolites. It is undeniable that the
236 microbiome has serious implications for human health and the progression of disease (Menati
237 Rashno et al., 2021; Schwabe and Jobin, 2013).

238 Endometrial cancer is one of the most common cancers among women in high-income countries.
239 There are many known risk factors: the excessive, uncontrolled exposure of the endometrium to
240 estrogens, including uncontrolled estrogen therapy, early menarche, late menopause, tamoxifen
241 therapy, nulliparity, infertility or failure to ovulate, polycystic ovary syndrome, diet, and general
242 lifestyle. Other risk factors include increasing age, obesity, hypertension, diabetes mellitus, and
243 hereditary nonpolyposis colon cancer. It was found that menopausal age was positively associated
244 with EC, and the risk increased for women of age above 46.5 years (Braun et al., 2016; Wu et al.,
245 2019). Until the second half of the 20th century, the uterine cavity was considered free of microbes.
246 Then it was assumed that colonization of the uterine cavity occurs from the intestine, oral cavity,

293 Caselli et al. (Caselli et al., 2019) revealed that *P. somerae* and *A. vaginae* induced the release of
 294 proinflammatory cytokines by human endometrial cells after 24 hours of co-culturing. As indicated
 295 by the above studies, enrichment in certain taxa was observed among patients suffering from
 296 hyperplasia and cancer, suggesting an inflammatory role of specific microorganisms in
 297 carcinogenesis.

298 The presence of certain bacterial species may contribute to altering the expression of genes encoding
 299 proteins involved in the inflammatory response, proliferation or apoptosis. Consequently, these
 300 events may ultimately disrupt physiological processes and promote the development of disease states,
 301 such as endometritis and endometriosis, which are associated with the development of cancer. In the
 302 study described herein, using ANCOM analysis of the metagenomic data, we identified
 303 *Anaerococcus* as the taxon differentiating between EC and EM microbiomes. One representative,
 304 *Anaerococcus vaginalis*, is known as a gynecologic pathogen associated with chronic endometritis
 305 (CE), endometriosis, bacterial vaginosis (BV), and possibly also with cancer. In the study conducted
 306 by Tsementzi et al. (Tsementzi et al., 2020), samples of vaginal swabs from women suffering from
 307 gynecological cancer who were undergoing pre-radiation therapy (N=65), post-radiation therapy
 308 (N=25) and from a control group of healthy volunteers (N=67) were sequenced. Results from 16S
 309 rRNA V4 region sequencing revealed that the swabs taken from the cancer group were enriched in 16
 310 phylogroups associated with BV and inflammation, including *Sneathia*, *Prevotella*, *Peptoniphilus*,
 311 *Fusobacterium*, *Anaerococcus*, *Dialister*, *Moryella* and *Peptostreptococcus*, comparing to the healthy
 312 group. In another study, Liu et al. (Liu et al., 2019) collected and sequenced endometrial biopsy
 313 tissue and fluid from 130 infertile women with chronic endometritis, revealing that this malignancy is
 314 associated with the abundance of bacterial taxa including *Dialister*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*,
 315 *Gardnerella* and *Anaerococcus*. Another study conducted by Perrotta et al. (Perrotta et al., 2020)
 316 revealed that in a group of 59 patients with different types of endometriosis, the amount of
 317 *Lactobacillus* species was decreased while the vaginal pathogenic bacteria, including *Anaerococcus*,
 318 was increased, compared to 24 control samples from healthy volunteers' group. Moreover, in a recent
 319 study, Semertzidou et al. (Semertzidou et al., 2024) compared the microbiota composition from 24
 320 benign diseases and 37 EC patients from different anatomical sites (vagina, cervix, endometrium) and
 321 observed a high diversity and *Lactobacillus* depletion in the EC group. EC samples were also
 322 enriched in several pathogenic species, including *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Peptoniphilus*, and
 323 *Anaerococcus*.

324 Based on our metagenomic data, we have selected *A. vaginalis* as a representative of the taxon
 325 differentiating between EC and EM and used these bacteria for additional testing of their ability to
 326 adhere to the human uterine fibroblasts, as well as induction of reactive oxygen species (ROS), to
 327 investigate their potential role in EC development and progression. *Lactobacillus jensenii* was used
 328 as a member of the genus *Lactobacillus*, found in the physiological microflora of the uterus. Both
 329 strains showed a high adhesion rate, which means they can efficiently colonize endometrium, and the
 330 imbalance between lactobacilli and pathogenic species such as *A. vaginalis* may lead to dysbiosis.
 331 Bacterial infections can promote genetic instability of nearby host cells through bacterial genotoxins
 332 or tumor promoting metabolite secretion, and the relationship between chronic infections and cancer
 333 has already been demonstrated, e.g. in the case of *Helicobacter pylori* and *Fusobacterium nucleatum*
 334 in gastric and colorectal cancers, respectively (Kostic et al., 2012; Lofgren et al., 2011; McCoy et al.,
 335 2013; Touati et al., 2003). Moreover, bacterial infections usually lead to inflammation, causing ROS
 336 induction, dysregulation of the innate immune system and cell damage. However, the association
 337 between inflammation and cancer is not fully understood (Coussens and Werb, 2002; Hussain et al.,
 338 2003; Lin and Karin, 2007). Dossus et al. conducted a case-control study which comprised 305
 339 incident cases of EC and 574 matched controls, where they observed a significant increase in the risk

of EC with elevated levels of three inflammatory markers: C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL6), and IL1 receptor antagonist (IL1Ra) (Dossus et al., 2010). In addition to inflammatory markers, free radicals are generated during the inflammation response to eliminate invading pathogens (Spooner and Yilmaz, 2011). However, elevated levels of ROS can also damage healthy human cells and trigger carcinogenesis (Hussain et al., 2003). It has been estimated that infections and associated inflammation contribute to about 15% of all cancer cases worldwide (Coussens and Werb, 2002). In our research, we have demonstrated that *A. vaginalis* induced a significant increase of ROS inside human uterine fibroblasts, and the levels were much higher than in the presence of *L. jensenii*. High levels of ROS may damage proteins, lipids, membranes, and organelles. The oncogenic role of ROS is associated with the induction of oxidative DNA damage involving double-stranded breaks and the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG). This oxidized guanine induces transversion of guanine to thymine and is a major cause of spontaneous mutagenesis, leading to carcinogenesis (Nakamura and Takada, 2021; Valavanidis et al., 2009).

The literature data and the metagenomic results presented in this study indicated significant differences in the composition of the uterine microbiome between cases of EC and benign lesions of this organ. Our results are not only in agreement with data indicating the pathological involvement of the genus *Anaerococcus* in the development of the most common gynecological diseases but also shed new light on our previous understanding regarding the possibility of induction of neoplastic processes by this microorganism. This knowledge may lead to new diagnostic and preventive strategies for EC, but clarifying the role of *A. vaginalis* in EC requires further research. If confirmed in the larger cohorts, examination of the microbiome of cervical swabs concerning the presence of *A. vaginalis* as an EC indicator could form the basis of microbiological diagnosis of EC, which would be of great importance in detecting the early stages of the disease.

5 Conclusions

In conclusion, our study indicated that microbial composition significantly differs between patients with endometrial cancer and benign lesions such as myoma. Furthermore, some pathogenic taxa, such as *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Peptoniphilus*, and *Porphyromonas*, may play a key role in endometrial cancer development and progression. Understanding the functional interactions between the endometrial microbiome and the immune system could provide new insights into the pathogenesis of endometrial cancer.

6 Data Availability Statement

The authenticity of this article has been validated by uploading the key raw data onto The University of Lodz Repository: <http://hdl.handle.net/11089/52937>

7 Ethics statements

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Council in Rzeszow City (Protocol number 24/B/2019, update 54/B/2020, date of approval 21.05.2020).

8 Author contributions

Conceptualization, A.K., O.K., P.S. and T.K.; methodology, A.K., O.K., A.B., A.D., and J.L.; software, J.L.; validation, O.K. and J.L.; formal analysis, A.K., T.K. and P.S.; investigation, A.K., O.K., A.B., A.D., J.L. and W.W.; resources, A.K., A.B., A.D.; data curation, A.K., O.K., A.B., A.D.,

and J.L.; writing—original draft preparation, A.K., O.K., A.B., A.D., J.L. and W.W.; writing—review and editing, A.K., P.S. and T.K.; visualization, A.K., O.K. and J.L.; supervision, A.K., P.S. and T.K.; project administration, A.K., and P.S.; funding acquisition, A.K., P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

9 Funding

This research was funded in part by the National Science Centre, Poland (grant SONATA 17 UMO-2021/43/D/NZ7/01386), 1st edition of the Doctoral Fellowship Programme of University of Lodz (No. 26/DGB/IDUB/2022), and by a subsidy for scientific activity provided to the Department of Molecular Microbiology by the University of Lodz (B2211000000038.01). For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright licence to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

10 Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

11 References

- Benner, M., Ferwerda, G., Joosten, I., and van der Molen, R. G. (2018). How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction Update*, 24(4), 393–415. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy012>
- Braun, M. M., Overbeek-Wager, E. A., and Grumbo, R. J. (2016). Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *American Family Physician*, 93(6), 468–474.
- Caselli, E., Soffritti, I., D'Accolti, M., Piva, I., Greco, P., and Bonaccorsi, G. (2019). *Atopobium vaginae* And *Porphyromonas somerae* Induce Proinflammatory Cytokines Expression In Endometrial Cells: A Possible Implication For Endometrial Cancer? *Cancer Management and Research, Volume 11*, 8571–8575. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S217362>
- Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., Xie, H., Chen, X., Zeng, C., Wen, B., Zeng, L., Du, H., Tang, H., Xu, C., Xia, Y., ... Jia, H. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature Communications*, 8(1), 875. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>
- Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- De Seta, F., Campisciano, G., Zanotta, N., Ricci, G., and Comar, M. (2019). The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02451>
- Dossus, L., Rinaldi, S., Becker, S., Lukanova, A., Tjønneland, A., Olsen, A., Stegger, J., Overvad, K., Chabbert-Buffet, N., Jimenez-Corona, A., Clavel-Chapelon, F., Rohrmann, S., Teucher, B., Boeing, H., Schütze, M., Trichopoulou, A., Benetou, V., Lagiou, P., Palli, D., ... Kaaks, R.

(2010). Obesity, inflammatory markers, and endometrial cancer risk: a prospective case-control study. *Endocrine-Related Cancer*, 17(4), 1007–1019. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0053>

Ezaki, T., Kawamura, Y., Li, N., Li, Z. Y., Zhao, L., and Shu, S. (2001). Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1521–1528. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1521>

Hussain, S. P., Hofseth, L. J., and Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrc1046>

Kaakoush, N. O., Olzomer, E. M., Kosasih, M., Martin, A. R., Fargah, F., Lambie, N., Susic, D., Hoehn, K. L., Farrell, R., and Byrne, F. L. (2022). Differences in the Active Endometrial Microbiota across Body Weight and Cancer in Humans and Mice. *Cancers*, 14(9), 2141. <https://doi.org/10.3390/cancers14092141>

Kennel, K. B., and Greten, F. R. (2021). Immune cell - produced ROS and their impact on tumor growth and metastasis. *Redox Biology*, 42, 101891. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101891>

Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., Ojesina, A. I., Jung, J., Bass, A. J., Tabernero, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R. A., Ogino, S., Birren, B. W., Huttenhower, C., Garrett, W. S., and Meyerson, M. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 292–298. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>

Kuźmycz, O., and Stączek, P. (2020). Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome. *Cancer Biology and Therapy*, 21(6), 486–494. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1736483>

Li, C., Gu, Y., He, Q., Huang, J., Song, Y., Wan, X., and Li, Y. (2021). Integrated Analysis of Microbiome and Transcriptome Data Reveals the Interplay Between Commensal Bacteria and Fibrin Degradation in Endometrial Cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.748558>

Lin, W.-W., and Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175–1183. <https://doi.org/10.1172/JCI31537>

Liu, Y., Ko, E. Y.-L., Wong, K. K.-W., Chen, X., Cheung, W.-C., Law, T. S.-M., Chung, J. P.-W., Tsui, S. K.-W., Li, T.-C., and Chim, S. S.-C. (2019). Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method. *Fertility and Sterility*, 112(4), 707–717.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.05.015>

Lofgren, J. L., Whary, M. T., Ge, Z., Muthupalani, S., Taylor, N. S., Mobley, M., Potter, A., Varro, A., Eibach, D., Suerbaum, S., Wang, T. C., and Fox, J. G. (2011). Lack of Commensal Flora in *Helicobacter pylori*-Infected INS-GAS Mice Reduces Gastritis and Delays Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology*, 140(1), 210–220.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.048>

494 Spooner, R., and Yilmaz, Ö. (2011). The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence
495 and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 334–352.
496 <https://doi.org/10.3390/ijms12010334>

497 Thubert, T., Foulot, H., Vinchant, M., Santulli, P., Marzouk, P., Borghese, B., and Chapron, C.
498 (2016). Surgical treatment: Myomectomy and hysterectomy; Endoscopy: A major advancement.
499 *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 34, 104–121.
500 <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.11.021>

501 Toson, B., Simon, C., and Moreno, I. (2022). The Endometrial Microbiome and Its Impact on Human
502 Conception. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 485.
503 <https://doi.org/10.3390/ijms23010485>

504 Touati, E., Michel, V., Thiberge, J.-M., Wuscher, N., Huerre, M., and Labigne, A. (2003). Chronic
505 *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice1 This report is dedicated to the
506 memory of Prof. Maurice Hofnung. *Gastroenterology*, 124(5), 1408–1419.
507 [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00266-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00266-X)

508 Tsementzi, D., Pena-Gonzalez, A., Bai, J., Hu, Y., Patel, P., Shelton, J., Dolan, M., Arluck, J.,
509 Khanna, N., Conrad, L., Scott, I., Eng, T. Y., Konstantinidis, K. T., and Bruner, D. W. (2020).
510 Comparison of vaginal microbiota in gynecologic cancer patients pre- and post-radiation therapy
511 and healthy women. *Cancer Medicine*, 9(11), 3714–3724. <https://doi.org/10.1002/cam4.3027>

512 Valavanidis, A., Vlachogianni, T., and Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-
513 OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of*
514 *Environmental Science and Health, Part C*, 27(2), 120–139.
515 <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>

516 Walsh, D. M., Hokenstad, A. N., Chen, J., Sung, J., Jenkins, G. D., Chia, N., Nelson, H., Mariani, A.,
517 and Walther-Antonio, M. R. S. (2019). Postmenopause as a key factor in the composition of the
518 Endometrial Cancer Microbiome (ECbiome). *Scientific Reports*, 9(1), 19213.
519 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55720-8>

520 Walther-Antônio, M. R. S., Chen, J., Multinu, F., Hokenstad, A., Distad, T. J., Cheek, E. H., Keeney,
521 G. L., Creedon, D. J., Nelson, H., Mariani, A., and Chia, N. (2016). Potential contribution of the
522 uterine microbiome in the development of endometrial cancer. *Genome Medicine*, 8(1), 122.
523 <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0368-y>

524 Wang, L., Yang, J., Su, H., Shi, L., Chen, B., and Zhang, S. (2022). Endometrial microbiota from
525 endometrial cancer and paired pericancer tissues in postmenopausal women: differences and
526 clinical relevance. *Menopause*, 29(10), 1168–1175.
527 <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000002053>

528 World Cancer Research Fund International. (n.d.). [https://www.wcrf.org/cancertrends/endometrial-](https://www.wcrf.org/cancertrends/endometrial-cancer-statistics)
529 [cancer-statistics](https://www.wcrf.org/cancertrends/endometrial-cancer-statistics) . Accessed on 15.04.2023.

530 Wu, Y., Sun, W., Liu, H., and Zhang, D. (2019). Age at Menopause and Risk of Developing
531 Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2019, 1–13.
532 <https://doi.org/10.1155/2019/8584130>

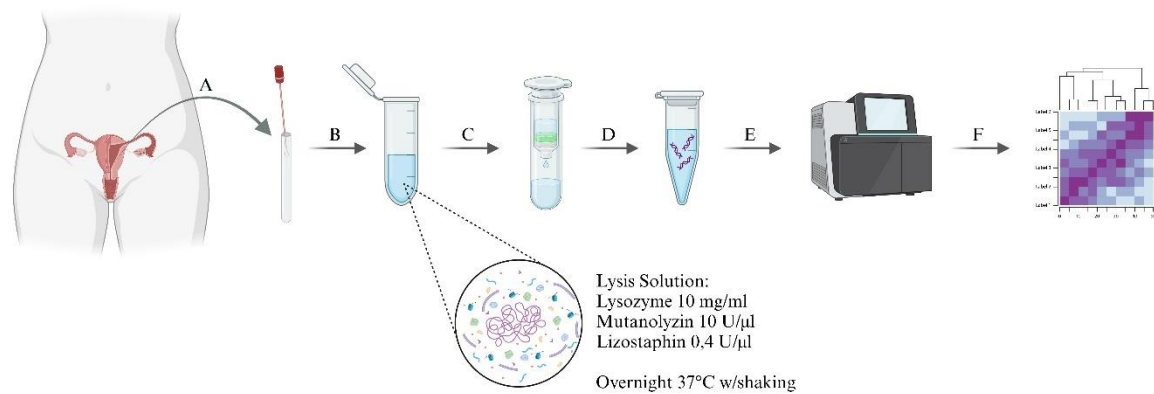


Figure 1. Draft of the experimental procedure, A – sample collection, B – primary lysis in Lysis Solution, containing the specific bacterial enzymes cocktail, C - bacterial DNA extraction, D – bacterial DNA amplification, E – sequencing using the Illumina MiSeq next-generation sequencing platform, F – bioinformatic analysis of the samples.

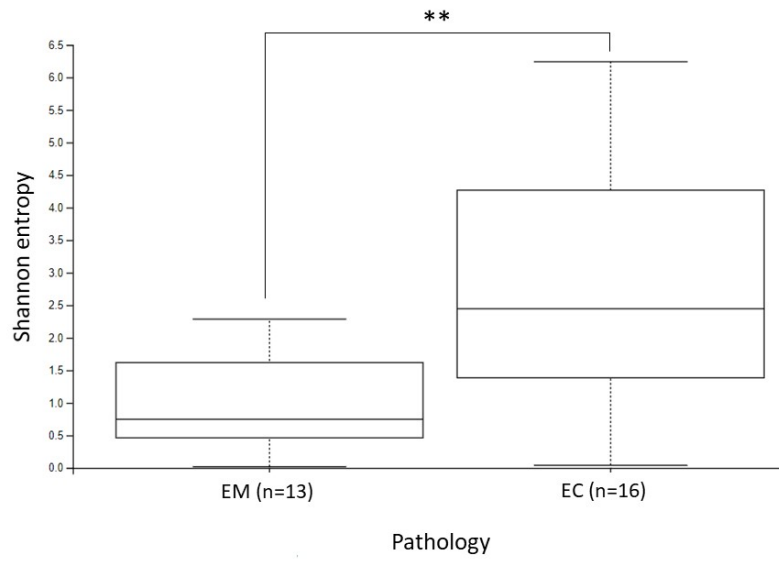


Figure 2. The alpha diversity comparison of EM and EC microbiome, based on the Shannon index. ** $p < 0.01$.

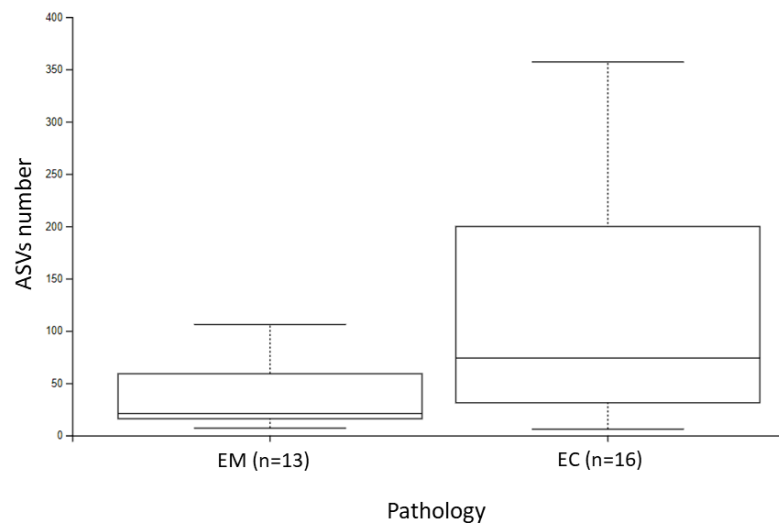
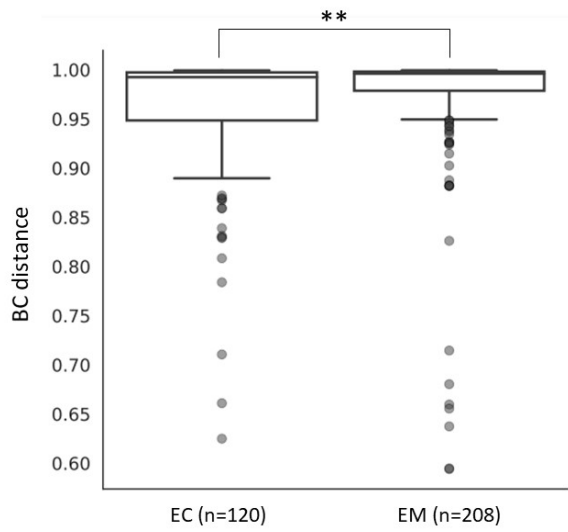


Figure 3. The ASVs number of endometrial myoma (EM) and endometrial cancer (EC) samples.

A.



B.

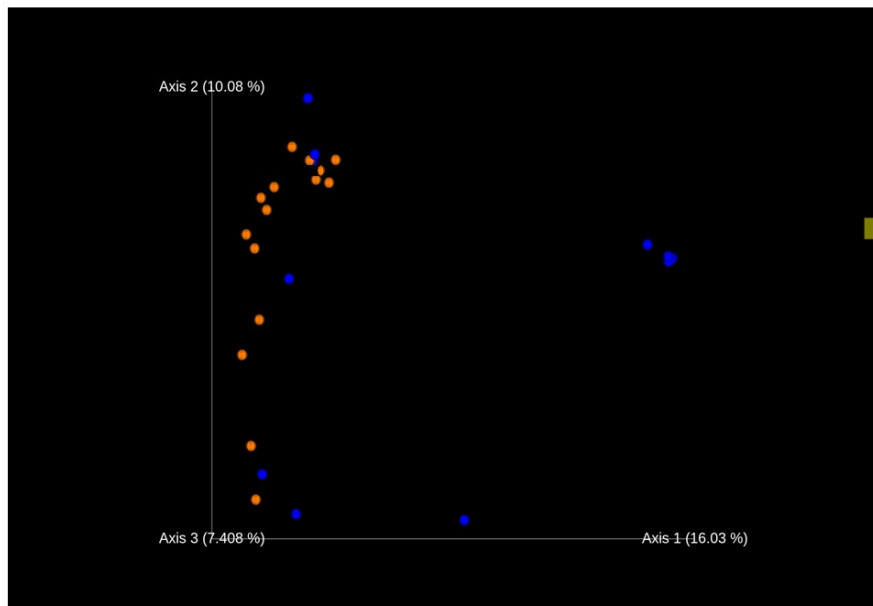
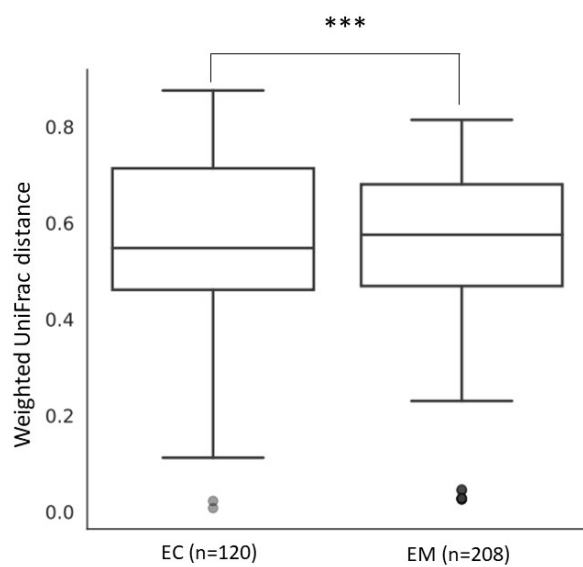


Figure 4. The Bray-Curtis distance comparison of endometrial myoma (EM) and endometrial cancer (EC) samples. ** = $p < 0.001$ (A). The Bray-Curtis distance mapping of samples. EM – blue; EC – orange (B).

A.



B.

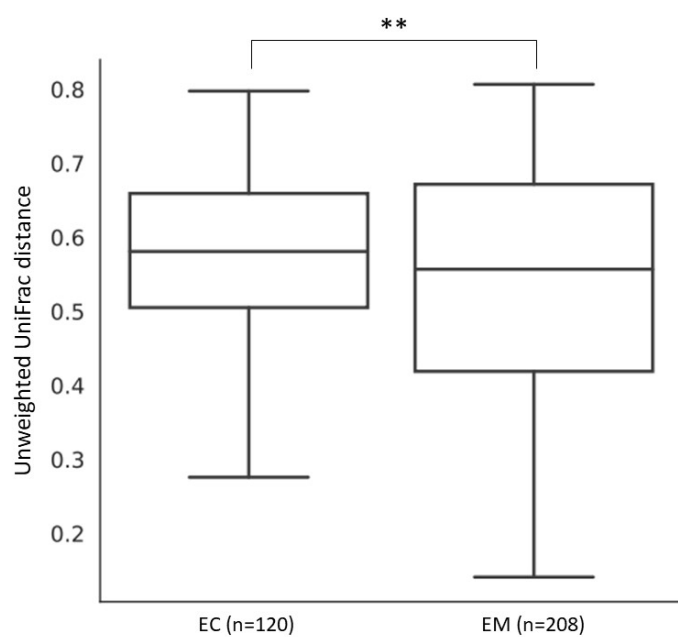


Figure 5. Weighted (A) and unweighted (B) UniFrac comparison of endometrial myoma (EM) and endometrial cancer (EC) samples. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

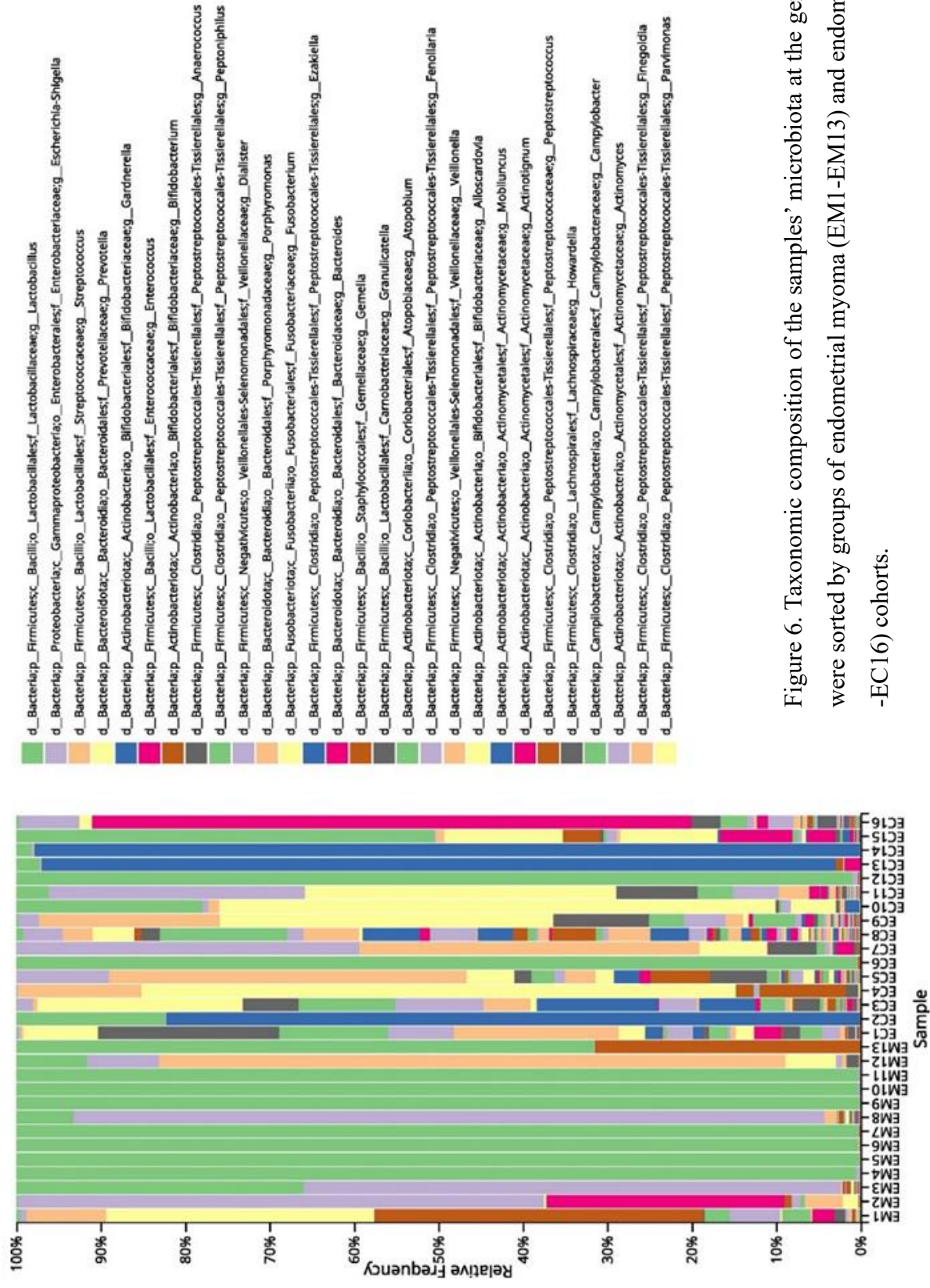


Figure 6. Taxonomic composition of the samples' microbiota at the genus level. Samples were sorted by groups of endometrial myoma (EM1-EM13) and endometrial cancer (EC1-EC16) cohorts.

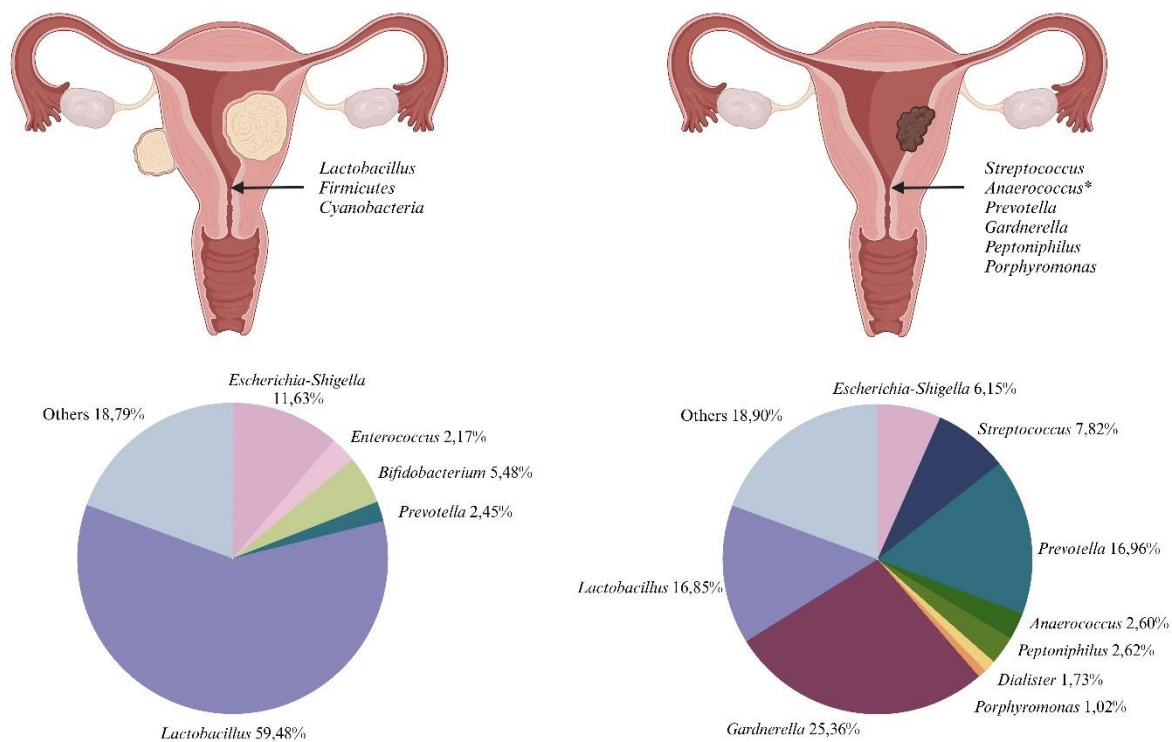


Figure 7. The main taxons of bacteria identified in the samples from women with endometrial myoma (left) and endometrial cancer (right) and their corresponding percentage distribution in the form of a pie chart.

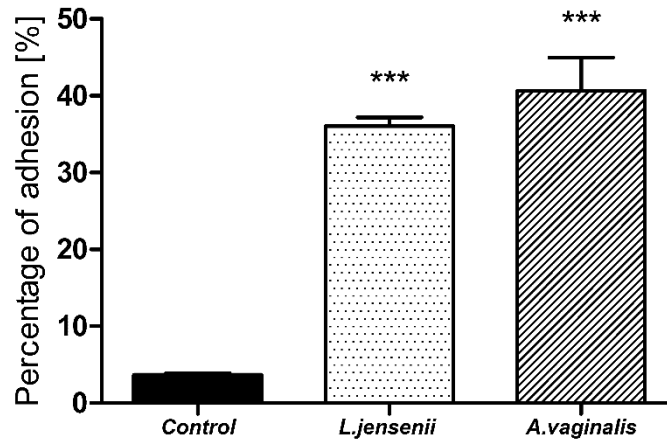


Figure 8. Percentage of *L. jensenii* and *A. vaginalis* adhesion to HUF cells at 0.5 MOI of *L. jensenii* and *A. vaginalis*. Data were obtained by measuring fluorescence at Ex/Em = 480/561 nm in three independent experiments. Results were statistically compared with the control using One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test. ***p < 0.001.

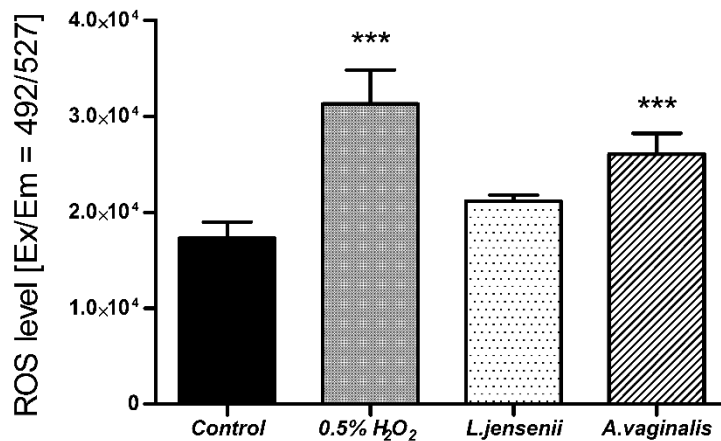


Figure 9. ROS level in HUF cells, after 24-hour co-incubation at 0.5 MOI of *L. jensenii* and *A. vaginalis*. Data were obtained by measuring fluorescence after H2DCFDA staining at Ex/Em = 492/527 nm in three independent experiments. Results were statistically compared with the control using a One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test; *** = p < 0.001; *L. jensenii* was used as a representative of the physiological state, and the 0,5% H2O2 as the positive control (ROS inducer).

XII. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer
and pathological species of the uterine microbiome**

Kuźmycz O, Stączek P. *Cancer Biol Ther.* 2020; 21(6):486-494. doi:
10.1080/15384047.2020.1736483

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy,
zebraniu odnośników literaturowych i przygotowaniu tekstu manuskryptu. Mój udział oceniam
na 60%.



mgr Olga Kuźmycz

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer
and pathological species of the uterine microbiome**

**Kuźmycz O, Stączek P. *Cancer Biol Ther.* 2020; 21(6):486-494. doi:
10.1080/15384047.2020.1736483**

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na nadzorze postępu pracy, nanoszeniu poprawek i uwag merytorycznych, pełnieniu roli autora korespondującego, odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział oceniam na 40%.



dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)]
and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer
Cells**

**Kuźmycz O, Kowalczyk A, Stączek P. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(19),
11568; <https://doi.org/10.3390/ijms231911568>**

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych, analizie, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu i współudział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział oceniam na 70%.



mgr Olga Kuźmycz

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)]
and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer
Cells

Kuźmycz O, Kowalczyk A, Stączek P. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(19),
11568; <https://doi.org/10.3390/ijms231911568>

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, nanoszeniu poprawek i uwag merytorycznych w pracy, współudział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział oceniam na 15%.



dr Aleksandra Kowalczyk

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**Biological Activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], *fac*-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)]
and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer
Cells**

**Kuźmierz O, Kowalczyk A, Stączek P. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(19),
11568; <https://doi.org/10.3390/ijms231911568>**

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, nanoszeniu poprawek i uwag merytorycznych w pracy, współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego. Mój udział oceniam na 15%.



dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

Kuźmycz O, Kowalczyk A, Bolańska A, Drożdżowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, przygotowaniu oryginalnego opisu manuskryptu, wykonaniu interpretacji i analiz statystycznych wyników i zarządzaniu projektem, z którego finansowane były badania. Mój udział oceniam na 40%.



mgr Olga Kuźmycz

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

**Kuźmierz O, Kowalczyk A, Bołanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, nadzorze nad postępem wykonywanych prac, przygotowaniu oryginalnego opisu manuskryptu, zarządzaniu projektem, z którego finansowane były badania, oraz pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego. Mój udział oceniam na 30%.



dr Aleksandra Kowalczyk

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients – identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor

**Kuźmierz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu metodyki badań, zebraniu i przygotowaniu materiału ludzkiego do badań oraz zebranie wywiadu pacjentów, w celu sporządzenia ankiety do celów naukowych, przygotowaniu opisów podrozdziału 2.1 *Participant enrollment* oraz 2.2 *Endocervical canal swabs collection* manuskryptu. Mój udział oceniam na 5%.

.....
lek. Aleksandra Bolanowska

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

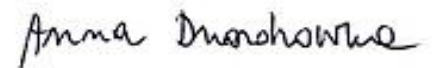
**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

**Kuźmierz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu metodyki badań, zebraniu i przygotowaniu materiału ludzkiego do badań oraz zebranie wywiadu pacjentów, w celu sporządzenia ankiety do celów naukowych, przygotowaniu opisów podrozdziału 2.1 *Participant enrollment* oraz 2.2 *Endocervical canal swabs collection* manuskryptu. Mój udział oceniam na 5%.

Anna Drozdowska
lekarz
specjalista położnictwa, ginekologii
i ginekologii onkologicznej.
2535327



.....
lek. Anna Drozdowska

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

**Kuźmycz O, Kowalczyk A, Bołanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu metodyki badań, analizie bioinformatycznej prób, przygotowaniu opisów podrozdziału 2.4 *Bioinformatic sequence analysis* oraz 3.2 *Statistical comparison of uterus lesions microbiome* i opracowaniu graficznym ww. podrozdziałów. Mój udział oceniam na 5%.


.....
dr Jakub Lach

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

**Kuźmycz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzińska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współprzygotowaniu opisu
rozdziału *4 Discussion* oraz opracowanie graficzne manuskryptu. Mój udział oceniam na 5%.

.....
mgr Wiktoria Wierzińska

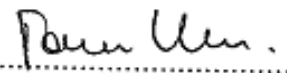
Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

**Kuźmierz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, nadzorze nad postępem wykonywanych prac, nanoszeniu poprawek i uwag merytorycznych w pracy. Mój udział oceniam na 5%.



prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

**A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients –
identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor**

**Kuźmycz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbńska W, Kluz T,
Stączek P.**

Praca złożona do czasopisma: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na współtworzeniu planu i koncepcji badań, nadzorze nad postępem wykonywanych prac, nanoszeniu poprawek i uwag merytorycznych w pracy. Mój udział oceniam na 5%.



dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ

XII. Literatura

- Abbe, C., & Mitchell, C. M. (2023). Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment and prevention. *Frontiers in Reproductive Health*, 5. <https://doi.org/10.3389/frph.2023.1100029>
- Alcendor, D. J. (2016). Evaluation of Health Disparity in Bacterial Vaginosis and the Implications for <scp>HIV</scp> -1 Acquisition in African American Women. *American Journal of Reproductive Immunology*, 76(2), 99–107. <https://doi.org/10.1111/aji.12497>
- American Cancer Society. (b.d.). *Key Statistics for Endometrial Cancer* <https://www.cancer.org/cancer/types/endometrial-cancer/about/key-statistics.html>.
- Anton, L., Ferguson, B., Friedman, E. S., Gerson, K. D., Brown, A. G., & Elovitz, M. A. (2022). Gardnerella vaginalis alters cervicovaginal epithelial cell function through microbe-specific immune responses. *Microbiome*, 10(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01317-9>
- Baker, J. M., Chase, D. M., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2018). Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00208>
- Bansal, N., Yendluri, V., & Wenham, R. M. (2009). The Molecular Biology of Endometrial Cancers and the Implications for Pathogenesis, Classification, and Targeted Therapies. *Cancer Control*, 16(1), 8–13. <https://doi.org/10.1177/107327480901600102>
- Barczyński, B., Frąszczak, K., Grywalska, E., Kotarski, J., & Korona-Główniak, I. (2023). Vaginal and Cervical Microbiota Composition in Patients with Endometrial Cancer.

International Journal of Molecular Sciences, 24(9), 8266.
<https://doi.org/10.3390/ijms24098266>

- Benner, M., Ferwerda, G., Joosten, I., & van der Molen, R. G. (2018). How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction Update*, 24(4), 393–415. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy012>
- Bertran, T., Brachet, P., Varelle-Delarbre, M., Falenta, J., Dosgilbert, A., Vasson, M.-P., Forestier, C., Tridon, A., & Evrard, B. (2016). Slight Pro-Inflammatory Immunomodulation Properties of Dendritic Cells by *Gardnerella vaginalis*: The “Invisible Man” of Bacterial Vaginosis? *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/9747480>
- Bhattacharya, S., Akula, Y., Mitongo, G. M., & Khorram, Q. (2017). Comparison between effects of antibiotics, NSAIDs and their mixture on the growth of microorganisms. *Porto Biomedical Journal*, 2(5), 176–177. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2017.07.006>
- Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, 180, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
- Borbolis, F., Mytilinaiou, E., & Palikaras, K. (2023). The Crosstalk between Microbiome and Mitochondrial Homeostasis in Neurodegeneration. *Cells*, 12(3), 429. <https://doi.org/10.3390/cells12030429>
- Boutriqu, S., González-González, A., Plaza-Andrades, I., Laborda-Illanes, A., Sánchez-Alcoholado, L., Peralta-Linero, J., Domínguez-Recio, M. E., Bermejo-Pérez, M. J., Lavado-Valenzuela, R., Alba, E., & Queipo-Ortuño, M. I. (2021). Gut and Endometrial Microbiome Dysbiosis: A New Emergent Risk Factor for Endometrial Cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 11(7), 659. <https://doi.org/10.3390/jpm11070659>

- Brasky, T. M., Felix, A. S., Cohn, D. E., McMeekin, D. S., Mutch, D. G., Creasman, W. T., Thaker, P. H., Walker, J. L., Moore, R. G., Lele, S. B., Guntupalli, S. R., Downs, L. S., Nagel, C. I., Boggess, J. F., Pearl, M. L., Ioffe, O. B., Park, K. J., Ali, S., & Brinton, L. A. (2017). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Endometrial Carcinoma Mortality and Recurrence. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(3), djw251. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw251>
- Burkett, W. C., Clontz, A. D., Keku, T. O., & Bae-Jump, V. (2023). The interplay of obesity, microbiome dynamics, and innovative anti-obesity strategies in the context of endometrial cancer progression and therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1878(6), 189000. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189000>
- Carosso, A., Revelli, A., Gennarelli, G., Canosa, S., Cosma, S., Borella, F., Tancredi, A., Paschero, C., Boatti, L., Zanutto, E., Sidoti, F., Bottino, P., Costa, C., Cavallo, R., & Benedetto, C. (2020). Controlled ovarian stimulation and progesterone supplementation affect vaginal and endometrial microbiota in IVF cycles: a pilot study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(9), 2315–2326. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01878-4>
- Castro, J., Alves, P., Sousa, C., Cereija, T., França, Â., Jefferson, K. K., & Cerca, N. (2015). Using an in-vitro biofilm model to assess the virulence potential of Bacterial Vaginosis or non-Bacterial Vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. *Scientific Reports*, 5(1), 11640. <https://doi.org/10.1038/srep11640>
- Castro, J., Martins, A. P., Rodrigues, M. E., & Cerca, N. (2018). *Lactobacillus crispatus* represses vaginolysin expression by BV associated *Gardnerella vaginalis* and reduces cell cytotoxicity. *Anaerobe*, 50, 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.014>

- Castro, J., Rosca, A. S., Cools, P., Vaneechoutte, M., & Cerca, N. (2020). Gardnerella vaginalis Enhances Atopobium vaginae Viability in an in vitro Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00083>
- Champer, M., Wong, A., Champer, J., Brito, I., Messer, P., Hou, J., & Wright, J. (2018). The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 125(3), 309–315. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.14631>
- Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., Xie, H., Chen, X., Zeng, C., Wen, B., Zeng, L., Du, H., Tang, H., Xu, C., Xia, Y., ... Jia, H. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature Communications*, 8(1), 875. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>
- Clarke, M. A., Long, B. J., Del Mar Morillo, A., Arbyn, M., Bakkum-Gamez, J. N., & Wentzensen, N. (2018). Association of Endometrial Cancer Risk With Postmenopausal Bleeding in Women. *JAMA Internal Medicine*, 178(9), 1210. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.2820>
- Contreras-Ochoa, C. O., Bahena-Román, M., López-Díaz, L. Y., Lagunas-Martínez, A., Mojica-Cardoso, C., Manzo-Merino, J., Torres-Poveda, K., & Madrid-Marina, V. (2022). Fas and Fas ligand are highly expressed in lymphocytes from cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer patients: A possible role for immune escaping. *Iranian journal of basic medical sciences*, 25(3), 383–389. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.61808.13678>

- Cryer, B., & Feldman, M. (1998). Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 Selectivity of Widely Used Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *The American Journal of Medicine*, 104(5), 413–421. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(98\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00091-6)
- Danforth, K. N., Gierach, G. L., Brinton, L. A., Hollenbeck, A. R., Katki, H. A., Leitzmann, M. F., Schatzkin, A., & Lacey, J. V. (2009). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use and Endometrial Cancer Risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Prevention Research*, 2(5), 466–472. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0239>
- de Leval, X., Delarge, J., Somers, F., de Tullio, P., Henrotin, Y., Pirotte, B., & Dogne, J.-M. (2000). Recent Advances in Inducible Cyclooxygenase (COX-2) Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 7(10), 1041–1062. <https://doi.org/10.2174/0929867003374417>
- Dillon, C. T., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., Lay, P. A., Zhou, Q., Davies, N. M., Biffin, J. R., & Regtop, H. L. (2003). Gastrointestinal Toxicity, Antiinflammatory Activity, and Superoxide Dismutase Activity of Copper and Zinc Complexes of the Antiinflammatory Drug Indomethacin. *Chemical Research in Toxicology*, 16(1), 28–37. <https://doi.org/10.1021/tx020078o>
- Dumitrascu, F., Caira, M. R., Avram, S., Buiu, C., Udrea, A. M., Vlad, I. M., Zarafu, I., Ioniță, P., Nuță, D. C., Popa, M., Chifiriuc, M.-C., & Limban, C. (2023). Repurposing anti-inflammatory drugs for fighting planktonic and biofilm growth. New carbazole derivatives based on the NSAID carprofen: synthesis, in silico and in vitro bioevaluation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1181516>
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., Koenig, S. S. K., Fu, L., Ma, Z. (Sam), Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L. J., & Ravel, J. (2012).

- Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Science Translational Medicine*, 4(132). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003605>
- Gandhi, J., Khera, L., Gaur, N., Paul, C., & Kaul, R. (2017). Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00538>
- Garcia-Grau, I., Simon, C., & Moreno, I. (2019). Uterine microbiome—low biomass and high expectations†. *Biology of Reproduction*, 101(6), 1102–1114. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy257>
- Garrett, W. S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230), 80–86. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>
- Gelber, S. E., Aguilar, J. L., Lewis, K. L. T., & Ratner, A. J. (2008). Functional and Phylogenetic Characterization of Vaginolysin, the Human-Specific Cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3896–3903. <https://doi.org/10.1128/JB.01965-07>
- Gressel, G. M., Usyk, M., Frimer, M., Kuo, D. Y. S., & Burk, R. D. (2021). Characterization of the endometrial, cervicovaginal and anorectal microbiota in post-menopausal women with endometrioid and serous endometrial cancers. *PLOS ONE*, 16(11), e0259188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259188>
- Herb, M., Gluschko, A., & Schramm, M. (2020). LC3-associated phagocytosis - The highway to hell for phagocytosed microbes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 101, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.016>
- Herb, M., & Schramm, M. (2021). Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants*, 10(2), 313. <https://doi.org/10.3390/antiox10020313>

- Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., & Foulkes, N. S. (2024). Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants*, 13(3), 312. <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>
- Huang, S.-P., Wu, M.-S., Shun, C.-T., Wang, H.-P., Hsieh, C.-Y., Kuo, M.-L., & Lin, J.-T. (2005). Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 12(1), 229–241. <https://doi.org/10.1007/s11373-004-8177-5>
- Kadogami, D., Nakaoka, Y., & Morimoto, Y. (2020). Use of a vaginal probiotic suppository and antibiotics to influence the composition of the endometrial microbiota. *Reproductive Biology*, 20(3), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.001>
- Kiewisz, J., Wasniewski, T., & Kmiec, Z. (2015). Participation of WNT and β -Catenin in Physiological and Pathological Endometrial Changes: Association with Angiogenesis. *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/854056>
- Kolawole, O. R., & Kashfi, K. (2022). NSAIDs and Cancer Resolution: New Paradigms beyond Cyclooxygenase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1432. <https://doi.org/10.3390/ijms23031432>
- Kruszewska, H., Zawistowska-Rojek, A., & Tyski, S. (2023). Do NSAIDs and Other Pain Relief Drugs Can Inhibit the Growth of *Lactobacillaceae*? *Polish Journal of Microbiology*, 72(4), 507–513. <https://doi.org/10.33073/pjm-2023-038>
- Kuźmycz, O., Kowalczyk, A., & Stączek, P. (2022). Biological Activity of fac-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], fac-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)] and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11568. <https://doi.org/10.3390/ijms231911568>

- Kuźmycz, O., & Stączek, P. (2020). Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome. *Cancer Biology & Therapy*, 21(6), 486–494. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1736483>
- Kyono, K., Hashimoto, T., Nagai, Y., & Sakuraba, Y. (2018). Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal *RNA* gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), 297–306. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12105>
- Lambropoulou, M., Alexiadis, G., Limberis, V., Nikolettos, N., & Tripsianis, G. (2005). Clinicopathologic and prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma. *Histology and histopathology*, 20(3), 753–759. <https://doi.org/10.14670/HH-20.753>
- Lennard, K. S., Goosen, R. W., & Blackburn, J. M. (2016). Bacterially-Associated Transcriptional Remodelling in a Distinct Genomic Subtype of Colorectal Cancer Provides a Plausible Molecular Basis for Disease Development. *PLOS ONE*, 11(11), e0166282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166282>
- Leoni, C., Vinci, L., Marzano, M., D'Erchia, A. M., Dellino, M., Cox, S. N., Vitagliano, A., Visci, G., Notario, E., Filomena, E., Cicinelli, E., Pesole, G., & Ceci, L. R. (2024). Endometrial Cancer: A Pilot Study of the Tissue Microbiota. *Microorganisms*, 12(6), 1090. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061090>
- Leslie, K. K., Thiel, K. W., Goodheart, M. J., De Geest, K., Jia, Y., & Yang, S. (2012). Endometrial Cancer. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 39(2), 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2012.04.001>

- Lewis, F. M. T., Bernstein, K. T., & Aral, S. O. (2017). Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. *Obstetrics & Gynecology*, 129(4), 643–654. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001932>
- Li, C., Gu, Y., He, Q., Huang, J., Song, Y., Wan, X., & Li, Y. (2021). Integrated Analysis of Microbiome and Transcriptome Data Reveals the Interplay Between Commensal Bacteria and Fibrin Degradation in Endometrial Cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.748558>
- Li, J., Liu, R., Sun, Z., Tang, S., Wang, L., Liu, C., Zhao, W., Yao, Y., & Sun, C. (2018). The association between statin use and endometrial cancer survival outcome. *Medicine*, 97(47), e13264. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013264>
- Libby, E. K., Pascal, K. E., Mordechai, E., Adelson, M. E., & Trama, J. P. (2008). Atopobium vaginae triggers an innate immune response in an in vitro model of bacterial vaginosis. *Microbes and Infection*, 10(4), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.01.004>
- Lim, Y. J., Lee, J. S., Ku, Y. S., & Hahm, K. (2009). Rescue strategies against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal damage. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(7), 1169–1178. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05929.x>
- Lin, W., Zhang, Q., Chen, Y., Dong, B., Xue, H., Lei, H., Lu, Y., Wei, X., & Sun, P. (2022). Changes of the vaginal microbiota in HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional analysis. *Scientific Reports*, 12(1), 2812. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06731-5>
- Liu, Y., Ko, E. Y.-L., Wong, K. K.-W., Chen, X., Cheung, W.-C., Law, T. S.-M., Chung, J. P.-W., Tsui, S. K.-W., Li, T.-C., & Chim, S. S.-C. (2019). Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a

- quantitative and reference range-based method. *Fertility and Sterility*, 112(4), 707-717.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.05.015>
- Lozano, F. M., Lledó, B., Morales, R., Cascales, A., Hortal, M., Bernabeu, A., & Bernabeu, R. (2023). Characterization of the Endometrial Microbiome in Patients with Recurrent Implantation Failure. *Microorganisms*, 11(3), 741. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030741>
- Lu, W., He, F., Lin, Z., Liu, S., Tang, L., Huang, Y., & Hu, Z. (2021). Dysbiosis of the endometrial microbiota and its association with inflammatory cytokines in endometrial cancer. *International Journal of Cancer*, 148(7), 1708–1716. <https://doi.org/10.1002/ijc.33428>
- Łaniewski, P., Gomez, A., Hire, G., So, M., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2017). Human Three-Dimensional Endometrial Epithelial Cell Model To Study Host Interactions with Vaginal Bacteria and Neisseria gonorrhoeae. *Infection and Immunity*, 85(3). <https://doi.org/10.1128/IAI.01049-16>
- Ma, X., Hui, Y., Lin, L., Wu, Y., Zhang, X., & Liu, P. (2015). Clinical significance of COX-2, GLUT-1 and VEGF expressions in endometrial cancer tissues. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 31(2). <https://doi.org/10.12669/pjms.312.6604>
- Ma, X., Wang, X., Ye, S., Liu, J., Yuan, H., & Wang, N. (2022). Biofilm and pathogenic factor analysis of Gardnerella vaginalis associated with bacterial vaginosis in Northeast China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1033040>
- Maarsingh, J. D., Łaniewski, P., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2022). Immunometabolic and potential tumor-promoting changes in 3D cervical cell models infected with bacterial vaginosis-associated bacteria. *Communications Biology*, 5(1), 725. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03681-6>

- Machado, A., Salgueiro, D., Harwich, M., Jefferson, K. K., & Cerca, N. (2013). Quantitative analysis of initial adhesion of bacterial vaginosis-associated anaerobes to ME-180 cells. *Anaerobe*, 23, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.007>
- Maseda, D., & Ricciotti, E. (2020). NSAID–Gut Microbiota Interactions. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01153>
- Maurice, N. M., & Sadikot, R. T. (2023). Mitochondrial Dysfunction in Bacterial Infections. *Pathogens*, 12(8), 1005. <https://doi.org/10.3390/pathogens12081005>
- Milani, M., & Iacobelli, P. (2012). Vaginal Use of Ibuprofen Isobutanolammonium (Ginenorm): Efficacy, Tolerability, and Pharmacokinetic Data: A Review of Available Data. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/673131>
- Mitchell, C. M., Haick, A., Nkwopara, E., Garcia, R., Rendi, M., Agnew, K., Fredricks, D. N., & Eschenbach, D. (2015). Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(5), 611.e1-611.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.11.043>
- Molina, N., Sola-Leyva, A., Saez-Lara, M., Plaza-Diaz, J., Tubić-Pavlović, A., Romero, B., Clavero, A., Mozas-Moreno, J., Fontes, J., & Altmäe, S. (2020). New Opportunities for Endometrial Health by Modifying Uterine Microbial Composition: Present or Future? *Biomolecules*, 10(4), 593. <https://doi.org/10.3390/biom10040593>
- Moreno, I., Codoñer, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazán, J., Alonso, R., Alamá, P., Remohí, J., Pellicer, A., Ramon, D., & Simon, C. (2016). Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(6), 684–703. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>

- Moreno, I., Garcia-Grau, I., Perez-Villaroya, D., Gonzalez-Monfort, M., Bahçeci, M., Barrionuevo, M. J., Taguchi, S., Puente, E., Dimattina, M., Lim, M. W., Meneghini, G., Aubuchon, M., Leondires, M., Izquierdo, A., Perez-Olgati, M., Chavez, A., Seethram, K., Bau, D., Gomez, C., ... Simon, C. (2022). Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients. *Microbiome*, *10*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01184-w>
- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Science*, *112*(10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., ... Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type–specific intracellular bacteria. *Science*, *368*(6494), 973–980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>
- Paes Leme, R. C., & da Silva, R. B. (2021). Antimicrobial Activity of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Biofilm: Current Evidence and Potential for Drug Repurposing. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707629>
- Pairat, M., Van Ryn, J., Mauz, A., Schierok, H., Diederer, W., Türck, D., & Engelhardt, G. (1998). Differential inhibition of COX-1 and COX-2 by NSAIDs: a summary of results

- obtained using various test systems. W *Selective COX-2 Inhibitors* (s. 27–46). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4872-6_3
- Patterson, J. L., Stull-Lane, A., Girerd, P. H., & Jefferson, K. K. (2010). Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*, 156(2), 392–399. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034280-0>
- Pelzer, E. S., Willner, D., Buttini, M., & Huygens, F. (2018). A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(6), 933–943. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0992-6>
- Pietilä, M., Lähteenmäki, K., Lehtonen, S., Leskelä, H.-V., Närhi, M., Lönnroth, M., Mättö, J., Lehenkari, P., & Nordström, K. (2012). Monitoring mitochondrial inner membrane potential for detecting early changes in viability of bacterium-infected human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(6), 53. <https://doi.org/10.1186/scrt144>
- Rastogi, S., & Singh, A. (2022). Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1042189>
- Ren, X., Fan, Y., Shi, D., & Liu, Y. (2023). Expression and significance of IL-6 and IL-8 in canine mammary gland tumors. *Scientific Reports*, 13(1), 1302. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28389-3>
- Rocha-Ramírez, L. M., Hernández-Chiñas, U., Moreno-Guerrero, S. S., Ramírez-Pacheco, A., & Eslava, C. A. (2021). Probiotic Properties and Immunomodulatory Activity of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dairy Products. *Microorganisms*, 9(4), 825. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040825>

- Roselletti, E., Sabbatini, S., Perito, S., Mencacci, A., Vecchiarelli, A., & Monari, C. (2020). Apoptosis of vaginal epithelial cells in clinical samples from women with diagnosed bacterial vaginosis. *Scientific Reports*, 10(1), 1978. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58862-2>
- Rubinstein, M. R., Baik, J. E., Lagana, S. M., Han, R. P., Raab, W. J., Sahoo, D., Dalerba, P., Wang, T. C., & Han, Y. W. (2019). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ β -catenin modulator Annexin A1. *EMBO reports*, 20(4). <https://doi.org/10.15252/embr.201847638>
- Salerian, A. J. (2020). What is the Origin of Human Bacterial Flora? *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.12691/jaem-8-1-1>
- Sankarapandian, V., Venmathi Maran, B. A., Rajendran, R. L., Jogalekar, M. P., Gurunagarajan, S., Krishnamoorthy, R., Gangadaran, P., & Ahn, B.-C. (2022). An Update on the Effectiveness of Probiotics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Life*, 12(1), 59. <https://doi.org/10.3390/life12010059>
- Santos, A. C. F., Monteiro, L. P. G., Gomes, A. C. C., Martel, F., Santos, T. M., & Ferreira, B. J. M. L. (2022). NSAID-Based Coordination Compounds for Biomedical Applications: Recent Advances and Developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2855. <https://doi.org/10.3390/ijms23052855>
- Shahanavaj, K., Gil-Bazo, I., Castiglia, M., Bronte, G., Passiglia, F., Carreca, A. P., del Pozo, J. L., Russo, A., Peeters, M., & Rolfo, C. (2015). Cancer and the microbiome: potential applications as new tumor biomarker. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 15(3), 317–330. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.992785>
- Shvartsman, E., Hill, J. E., Sandstrom, P., & MacDonald, K. S. (2023). *Gardnerella* Revisited: Species Heterogeneity, Virulence Factors, Mucosal Immune Responses, and

- Contributions to Bacterial Vaginosis. *Infection and Immunity*, 91(5).
<https://doi.org/10.1128/iai.00390-22>
- Skiba, J., Kowalczyk, A., Stączek, P., Bernaś, T., Trzybiński, D., Woźniak, K., Schatzschneider, U., Czerwieniec, R., & Kowalski, K. (2019). Luminescent *fac* - [Re(CO)₃(phen)] carboxylato complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs: synthesis and mechanistic insights into the *in vitro* anticancer activity of *fac* -[Re(CO)₃(phen)(aspirin)]. *New Journal of Chemistry*, 43(2), 573–583.
<https://doi.org/10.1039/C8NJ05494K>
- So, K. A., Yang, E. J., Kim, N. R., Hong, S. R., Lee, J.-H., Hwang, C.-S., Shim, S.-H., Lee, S. J., & Kim, T. J. (2020). Changes of vaginal microbiota during cervical carcinogenesis in women with human papillomavirus infection. *PloS one*, 15(9), e0238705.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238705>
- Sola-Leyva, A., Andrés-León, E., Molina, N. M., Terron-Camero, L. C., Plaza-Díaz, J., Sáez-Lara, M. J., Gonzalvo, M. C., Sánchez, R., Ruíz, S., Martínez, L., & Altmäe, S. (2021). Mapping the entire functionally active endometrial microbiota. *Human Reproduction*, 36(4), 1021–1031. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa372>
- Soni, J., Sinha, S., & Pandey, R. (2024). Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in Microbiology*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1370818>
- Sostres, C., Gargallo, C. J., & Lanás, A. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Research & Therapy*, 15(Suppl 3), S3. <https://doi.org/10.1186/ar4175>

- Stones, D. H., & Krachler, A. M. (2016). Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization. *Biochemical Society Transactions*, 44(6), 1571–1580. <https://doi.org/10.1042/BST20160186>
- Sun, Y., Huang, L., Mackenzie, G. G., & Rigas, B. (2011). Oxidative Stress Mediates through Apoptosis the Anticancer Effect of Phospho-Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Implications for the Role of Oxidative Stress in the Action of Anticancer Agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(3), 775–783. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.183533>
- Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć, P., & Śliżewska, W. (2020). The Role of Probiotics in Cancer Prevention. *Cancers*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.3390/cancers13010020>
- Tao, X., Franasiak, J. M., Zhan, Y., Scott, R. T., Rajchel, J., Bedard, J., Newby, R., Scott, R. T., Treff, N. R., & Chu, T. (2017). Characterizing the endometrial microbiome by analyzing the ultra-low bacteria from embryo transfer catheter tips in IVF cycles: Next generation sequencing (NGS) analysis of the 16S ribosomal gene. *Human Microbiome Journal*, 3, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2017.01.004>
- The Integrative Human Microbiome Project. (2019). *Nature*, 569(7758), 641–648. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>
- Toson, B., Simon, C., & Moreno, I. (2022). The Endometrial Microbiome and Its Impact on Human Conception. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 485. <https://doi.org/10.3390/ijms23010485>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27(2), 120–139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>

- Valenti, P., Rosa, L., Capobianco, D., Lepanto, M. S., Schiavi, E., Cutone, A., Paesano, R., & Mastromarino, P. (2018). Role of Lactobacilli and Lactoferrin in the Mucosal Cervicovaginal Defense. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00376>
- Van Nyen, T., Moiola, C. P., Colas, E., Annibali, D., & Amant, F. (2018). Modeling Endometrial Cancer: Past, Present, and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2348. <https://doi.org/10.3390/ijms19082348>
- Vilotić, A., Nacka-Aleksić, M., Pirković, A., Bojić-Trbojević, Ž., Dekanski, D., & Jovanović Krivokuća, M. (2022). IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *International journal of molecular sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232314574>
- Walsh, D. M., Hokenstad, A. N., Chen, J., Sung, J., Jenkins, G. D., Chia, N., Nelson, H., Mariani, A., & Walther-Antonio, M. R. S. (2019). Postmenopause as a key factor in the composition of the Endometrial Cancer Microbiome (ECbiome). *Scientific Reports*, 9(1), 19213. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55720-8>
- Walther-António, M. R. S., Chen, J., Multinu, F., Hokenstad, A., Distad, T. J., Cheek, E. H., Keeney, G. L., Creedon, D. J., Nelson, H., Mariani, A., & Chia, N. (2016). Potential contribution of the uterine microbiome in the development of endometrial cancer. *Genome Medicine*, 8(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0368-y>
- Wan, E. Y. F., Yu, E. Y. T., Chan, L., Mok, A. H. Y., Wang, Y., Chan, E. W. Y., Wong, I. C. K., & Lam, C. L. K. (2021). Comparative Risks of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 16(6), 898–907. <https://doi.org/10.2215/CJN.18501120>

- Wang, L., Yang, J., Su, H., Shi, L., Chen, B., & Zhang, S. (2022). Endometrial microbiota from endometrial cancer and paired pericancer tissues in postmenopausal women: differences and clinical relevance. *Menopause*, 29(10), 1168–1175. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000002053>
- Wang, X., Tang, Q., Hou, H., Zhang, W., Li, M., Chen, D., Gu, Y., Wang, B., Hou, J., Liu, Y., & Cao, H. (2021). Gut Microbiota in NSAID Enteropathy: New Insights From Inside. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.679396>
- Wells, J. M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1), S17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S17>
- Winters, A. D., Romero, R., Gervasi, M. T., Gomez-Lopez, N., Tran, M. R., Garcia-Flores, V., Pacora, P., Jung, E., Hassan, S. S., Hsu, C.-D., & Theis, K. R. (2019). Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? *Scientific Reports*, 9(1), 9905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46173-0>
- Wojciechowska U., C. K. . , C. A. , O. P. , D. J. (2018). *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku: T. ISSN 0867-8251*. Krajowy rejestr nowotworów.
- World Cancer Research Found International.. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/endometrial-cancer-statistics/>.
- Xiang, N., Yin, T., & Chen, T. (2021). Gardnerella vaginalis induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophages and THP-1 monocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(4), 1174. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10609>

- Yin, Z., Wang, Y., Whittell, L. R., Jergic, S., Liu, M., Harry, E., Dixon, N. E., Kelso, M. J., Beck, J. L., & Oakley, A. J. (2014). DNA Replication Is the Target for the Antibacterial Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chemistry & Biology*, 21(4), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.02.009>
- Yuan, C., Xie, K., Feng, L., Gao, S., & Cai, L. (2024). The role and challenges of regulating endometrial microbiome in uterine health and diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 50(5), 937–954. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2320247>
- Zádori, Z. S., Király, K., Al-Khrasani, M., & Gyires, K. (2023). Interactions between NSAIDs, opioids and the gut microbiota - Future perspectives in the management of inflammation and pain. *Pharmacology & Therapeutics*, 241, 108327. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108327>