

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Tvorba ovariálních hormonů v nádorech prsu
Diplomová práce



Vedoucí diplomové práce: MUDR. Jiří HOCHMANN, CSc.

Hradec Králové 2009

Hana Štambergová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND MEDICAL SCIENCES

**Production of the ovarian hormones in breast
tumours**

Thesis

Supervisor: MUDr. Jiří HOCHMANN, CSc.

Hradec Králové 2009

Hana Štambergová

Poděkování

Děkuji školiteli MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za cenné rady a všestrannou pomoc při vzniku této diplomové práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Obsah

1	SOUHRN	6
2	SUMMARY	7
3	ÚVOD	9
4	ČESKÁ UČEBNICOVÁ A MONOGRAFICKÁ LITERATURA	10
4.1	Mamma	10
4.2	Ženské reprodukční hormony	11
4.3	Pohlavní steroidní hormony	12
4.3.1	Estrogeny	12
4.3.2	Gestageny	13
4.3.3	Biosyntéza estrogenů a gestagenů	13
4.3.4	Transport estrogenů a gestagenů v plazmě	16
4.4	Steroidní receptory	16
4.4.1	Estrogenové receptory, mechanismus účinku estrogenů	16
4.4.2	Progesteronové receptory	18
4.5	Fyziologické účinky ženských steroidních hormonů	18
4.5.1	Fyziologický účinek estrogenů	18
4.5.2	Fyziologický účinek gestagenů	19
4.6	Metabolismus a vylučování pohlavních steroidů	19
4.7	Ovariální cyklus	19
4.8	Přehled karcinogeneze prsu	21
4.9	Nádory prsu	21
5	ČESKÁ MONOGRAFICKÁ A ZAHRANIČNÍ ČASOPISOVÁ LITERATURA	23
5.1	Estrogeny a riziko karcinomu prsu	23
5.2	Hormonálně dependentní karcinom prsu	24
5.3	Lokální tvorba estrogenů v prsu	25
6	ZAHRANIČNÍ ČASOPISOVÁ LITERATURA	30
6.1	Aromatáza	30
6.1.1	Fyziologický účinek	30
6.1.2	Genová exprese a distribuce aromatázy	30
6.1.3	Regulace aromatázy	32
6.1.4	Role aromatázy v karcinogenezi prsu	33
6.1.5	Role inhibitorů aromatázy v karcinomu prsu	34
6.2	Steroidní sulfatáza	35
6.2.1	Fyziologický účinek STS	35

6.2.2	Genová exprese, regulace a distribuce STS	35
6.2.3	Role steroidní sulfatázy v karcinomu prsu	36
6.2.4	Role STS v karcinogenezi prsu.....	36
6.2.5	Role inhibitorů steroidní sulfatázy v karcinomu prsu.....	37
6.3	Estrogenová sulfotransferáza	38
6.4	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza	38
6.4.1	17 β -HSD typ 1	39
6.4.2	17 β -HSD typ 2	42
6.4.3	17 β -HSD typ 5	43
6.4.4	17 β -HSD typ 7	43
6.4.5	17 β -HSD typ 12	43
6.4.6	17 β -HSD typ 14	44
6.5	Aldo-keto reduktázy a zaměření pracovní skupiny prof. Wsóla.....	44
6.5.1	Enzymy rodiny AKR	44
6.5.2	Vliv enzymů AKR na chemoterapeutika s karbonylovou skupinou.....	46
7	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	50
7.1	Laboratorní stanovení estradiolu.....	50
7.1.1	Radioimunoanalýza (RIA).....	51
7.1.2	Příbuzné radioizotopové metody	53
7.1.3	Enzymoimunoanalýza (EIA)	53
7.1.4	Enzymová imunoanalýza na mikročástečích (MEIA).....	54
7.1.5	Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)	54
7.2	Stanovení intratumorálních hladin estradiolu	55
8	DISKUZE	57
8.1	Vyšetřování intratumorální hladiny estradiolu a jeho možný přínos pro pacientky s karcinomem prsu	57
8.2	Cesty extraovariální tvorby E2.....	58
8.2.1	Aromatáza	58
8.2.2	Steroidní sulfatáza a estrogenová sulfotransferáza.....	58
8.2.3	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza.....	59
8.3	Možnost rutinního vyšetření estradiolu v nádorech v klinických laboratořích	60
8.4	Možnosti vyšetřování estradiolu v nádorech na farmaceutické fakultě z hlediska souvislosti se zaměřením katedry biochemie	61
8.5	Vztah koncentrace intratumorálního estradiolu a poměru ER/PR.....	61
9	ZÁVĚR	64
10	SEZNAM ZKRATEK	65
11	POUŽITÉ ZDROJE.....	67

1 SOUHRN

Karcinomem prsu onemocní každoročně na celém světě na milion žen. Přibližně 60 – 80 % těchto nádorů vykazuje pozitivitu pro hormonální receptory, tedy odpovídají na stimulaci estrogenu, které působí jako kokarcinogeny. Incidence rakoviny mléčné žlázy stoupá s věkem, většina nových případů této choroby se diagnostikuje v postmenopauzálním období, kdy je ovariální tvorba estrogenů utlumena. U postmenopauzálních pacientek se stává významným faktorem stimulace růstu tumoru lokální produkce estrogenů.

V rámci této diplomové práce jsme vypracovali přehled enzymů, které se účastní intratumorální tvorby estrogenů resp. estradiolu, na jehož biosyntéze se podílí zejména aromatáza, jednotlivé typy 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy a steroidní sulfatáza. U jednotlivých enzymů jsme uvedli jak biochemické a biologické vlastnosti tak i jejich zapojení do procesu karcinogeneze prsu a jejich využití jako potenciálního cíle farmakoterapie.

Do přehledu jsme zařadili také informace o skupině enzymů z podrodiny AKR1C, jejichž studiem (účast na metabolismu xenobiotik nesoucích karbonylovou skupinu) se na naší fakultě zabývá katedra biochemických věd (prof. Wsól). AKR1C3 (= 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typ 5) je schopna tvořit estradiol přímo v nádoru prsu a zároveň může inaktivovat cytostatikum doxorubicin a zhoršovat tak výsledky léčby. Tato skupina enzymů je mimo centrum zájmu české klinické literatury a považovali bychom za vhodné rozšířit tyto experimenty na vzorky nádorů pacientek.

V další části diplomové práce jsme se věnovali zmapování možností laboratorní detekce estradiolu v nádorové tkáni prsu v návaznosti na metodiky užívané v rutinní praxi. V současné době se běžně provádí imunohistochemické stanovení koncentrace hormonálních receptorů v bioptické tkáni karcinomu prsu. Vyšetření intratumorální koncentrace estradiolu by mohlo být přínosné u těch postmenopauzálních pacientek, u kterých jsou hodnoty koncentrace hormonálních receptorů hraniční a klinik by tak získal další informaci, která by mu napomohla ve výběru vhodné terapie. Navíc u pozitivních vzorků by mohlo následovat vyšetření, který z enzymů toto zvýšení hladin estradiolu způsobuje, a tak by se mohlo v terapii využít cílených inhibitorů.

2 SUMMARY

The breast cancer affects over one million women all over the world every year. Approximately 60 – 80 % of these tumours are declared as hormone sensitive, which means they are able to respond on a stimulation of estrogens that work as cocancerogens. The breast cancer incidence increases according to an age, a majority of new cases is detected during the postmenopausal period when the ovaries ceased to be functional. In postmenopausal patients the local estrogen production becomes a considerable stimulating growth factor of tumours.

In this thesis we have brought together a review of enzymes participating on the intratumoral biosynthesis of estrogens or estradiol. The enzymes responsible for the local synthesis include predominantly the aromatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroid sulphatase. We have specified by each type of the enzymes its biochemistry, biological characteristics and also its engagement in a breast cancerogenesis as well as their advantage as a pharmacological target.

We have also placed pieces of information about members of the AKR1C subfamily. Professor Wsól from the department of biochemistry sciences of our faculty focuses on their study (a participation on a biodegradation of carbonyl groups xenobiotics). AKR1C3 (also called 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5) is able catalyse synthesis of estradiol directly in a breast cancer, inactivates anticancer drug doxorubicin and causes its less antitumor activity as well. This group of enzymes is not a major topic of a Czech clinical literature and we would consider appropriate to extend those experiments on a bioptic sample of a carcinoma tissue of patients.

We have devoted couple paragraphs of this thesis to survey the laboratory possibilities of the estradiol detection in a breast cancer tissue regarding to methods used in a routine practice. Nowadays the immunohistochemical determination of concentration of hormone receptor in a bioptic carcinoma tissue is common use. The determination of an intratumoral level of estradiol could be helpful for such patients who have an indecisive concentration of a hormone receptor. The physician could receive from this scan the additional information that could help him in a decision about a suitable therapy. Moreover, in case of the positive samples – it could be followed the

determination of enzymes which are responsible for this increased level of estradiol. Therefore it could be used for deciding about the specific inhibitors in the treatment.

3 ÚVOD

Školící pracoviště v předchozích letech rozpracovávalo v několika publikacích a diplomových pracích problematiku významu a stanovení estrogenových a progesteronových receptorů v karcinomech prsu v návaznosti na zkušenosti s vyšetřováním těchto receptorů v pardubické nemocnici před více než 10 lety.

V poslední publikaci (Hochmann, 2007) byl řešen z matematického hlediska způsob využití poměru ER/PR pro zpřesnění diagnózy a prognózy karcinomu prsu.

Zdá se, že v případě extrémního snížení poměru ER/PR je prognóza karcinomu nepříznivá. Na to navazují otázky, jaké jsou příčiny změny tohoto poměru. Jednou z nich by mohla být extraovariální tvorba estradiolu přímo v nádorové tkáni prsu. V takovém případě by měly být hodnoty ER sníženy a PR naopak zvýšeny (Hochmann, 2007b). Avšak ER není sníženo natolik, aby mohlo být označeno jako negativní. Naopak, endogenním estrogenem jsou stimulovány k růstu pouze ER pozitivní prekancerózy, takže se přemění na ER pozitivní karcinom (Subramanian et al., 2008).

Je tedy vhodné zkoumat, od které hranice má význam považovat poměr ER/PR za neadekvátně snížený. K tomu lze využít také informace o koncentracích estrogenů přímo v nádorech. V řešení metodických problémů s biochemickým vyšetřováním můžeme navázat na zkušenosti pracoviště prof. Wsóla na Katedře biochemických věd FaF UK.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na vypracování literárního přehledu o neadekvátně nízkém poměru ER/PR (orientačně) o možných příčinách a prognóze, o extraovariální tvorbě estrogenů a jejich koncentraci (detailně) a o metodách detekce estrogenů ve tkáni např. nádorové.

4 ČESKÁ UČEBNICOVÁ A MONOGRAFICKÁ LITERATURA

4.1 Mamma

Prsy jsou párový orgán, v němž je uložena mléčná žláza (glandula mammae), obklopená vazivovou a tukovou tkání pod kůží hrudi. Prs klinicky rozdělujeme na čtyři kvadranty, centrální část a mamiloareolární komplex. Horní zevní kvadrant obsahuje největší masu žlázy (Citterbart, 2008).

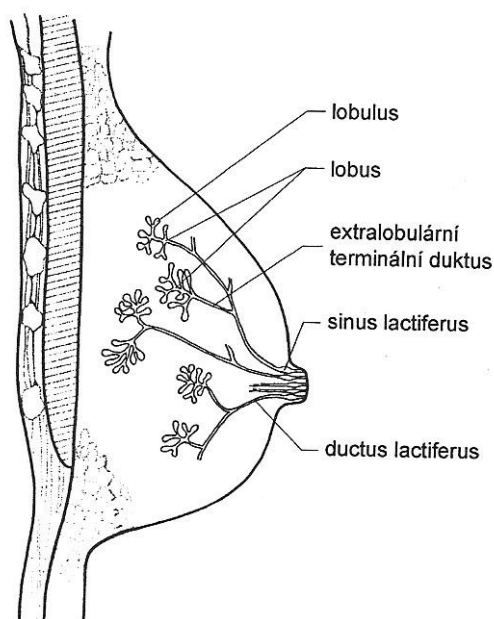
Mléčná žláza je ektodermový derivát kůže, v podstatě se jedná o modifikovanou apokrinní potní žlázu. Funkceschopná mléčná žláza se u člověka vyvíjí z jediného (thorakálního) základu (Motlík, 2001).

Anatomicky (histologicky) jde o bohatě větvenou tubulární žlázu, jejíž terminální úsek citlivě reaguje na hormonální podněty (estrogeny, gestageny, prolaktin) a v těhotenství se proměňuje v tubulárně acinózní žlázu s morfologickými projevy laktace „acinárního“ epitelu (Motlík, 2001). Mléčná žláza se skládá z 15 až 20 laloků (lobi), které jsou k sobě těsně přiloženy a ústí svými velkými dukty v mamile tvořené těmito dukty a tuhým vazivem. Velké laloky se dále větví v lalůčky (lobuly). Každý velký duktus drénuje asi 20 – 40 lobulů (Strnad, 2001). Nejperifernější úsek vývodového stromu se v současnosti definuje jako tzv. terminální duktulární lobulární jednotka (TDLU), jejíž počet kolísá mezi 10 – 100 na jeden lobulus (Motlík, 2001; Strnad 2001). Skládá se z intralobulárního úseku terminálního ductu (duktulu), z něhož do stran odstupují slepé terminální duktuly („aciny“). Epitelové struktury TDLU ani extralobulární terminální dukty (část vývodového stromu od jeho posledního větvení k periferii) nejsou provázány elastickými vlákny (Motlík, 2001).

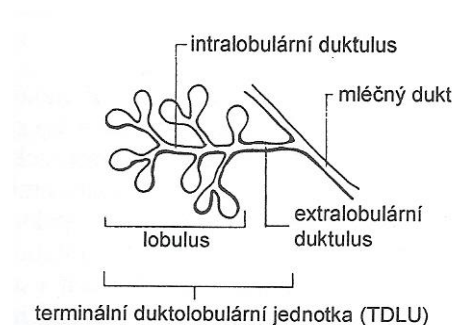
TDLU je vybavena charakteristickým epitelem a zvláštním řídkým („intralobulárním“) vazivovým stromatem. Epitel je dvouvrstevný, jeho vnitřní vrstva kubických buněk je substrátem většiny nenádorových i nádorových změn lobulu (Motlík, 2001). Zhruba 7% těchto epitelových buněk vykazuje pozitivitu estrogenových receptorů (ER) vázaných na struktury jádra (Abrahámová, 2000). Jeho zevní vrstva hraničící s vazivovým stromatem je tvořena prakticky souvislou vrstvou myoepitelií, jež jsou charakteristické morfologicky (vřetenitý tvar, světlá cytoplazma, kulatá jádra) a imunohistochemicky. Tohoto se v histopatologické diagnostice využívá k posuzování

vztahu epitelových lézí lobulu ke stromatu, zejména k detekci časné invaze nádorového epitelu do stromatu (Motlík, 2001).

Další úseky vývodového stromu se liší strukturou své stěny. Počínaje posledním periferním větvením vývodového stromu jsou větší extralobulární vývody provázány narůstajícím množstvím elastických vláken, kdežto myoepitelová vrstva se centrálním směrem postupně vytrácí. Jednotlivé úseky stromu jsou predilekční lokalizací pro různé patologické léze žlázy. Valná většina onkologicky významných patologických změn se odehrává v rozsahu TDLU nebo z ní vychází (TDLU je predilekční lokalizací pro karcinom in situ) (Motlík, 2001).



Obr. č. 1: Struktura prsu (Strnad, 2001)



Obr. č. 2: Struktura TDLU (Strnad, 2001)

4.2 Ženské reprodukční hormony

Hypothalamus je klíčovým orgánem v lidské reprodukci, jeho centra ovládají gonadotropní funkci hypofýzy pomocí gonadoliberinu (GnRH). Cílovým orgánem toho hypothalamického hormonu je adenohipofýza, která produkuje gonadotropní hormony folikulostimulační a luteinizační hormon (FSH a LH). Tyto hormony řídí funkci gonád. Přední lalok hypofýzy dále produkuje prolaktin, který má vliv na vznik a udržení laktace. Oxytocin, hormon neurohypofýzy, se uplatňuje během těhotenství a porodu (Henzl, 2002).

Centrem reprodukční funkce jsou gonády, tedy ovaria, ve kterých probíhá steroidogeneze (Henzl, 2002).

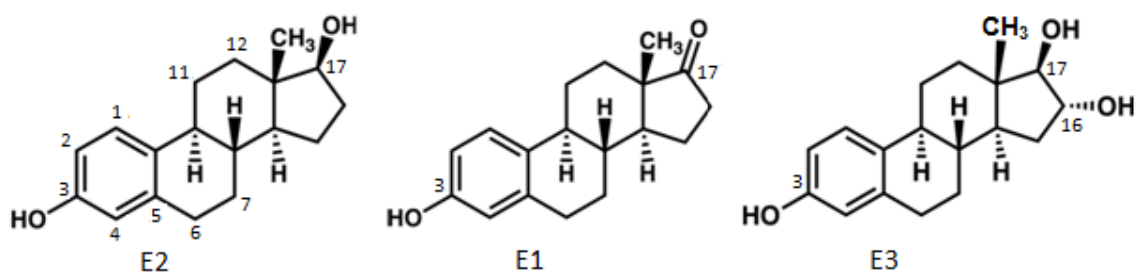
4.3 Pohlavní steroidní hormony

Pohlavní žlázy ženy a muže, kůra nadledvin a v případě estradiolu i extraglandulární tuková tkáň produkují steroidní pohlavní hormony – estrogeny, gestageny a androgeny (Lincová, 2007; Henzl, 2002). Tyto sloučeniny mají podobnou strukturu s relativně malými chemickými změnami, které však způsobují zásadní změny v biologické aktivitě (Citterbart, 2008). Tvorbu těchto steroidů regulují hypothalamické a adenohipofyzární hormony: GnRH, FSH a LH, jejichž uvolňování je ovlivňováno plazmatickou koncentrací pohlavních steroidů mechanismem zpětné vazby, na které se kromě gonadálních steroidů podílí také peptidové faktory inhibin, aktivin a folistatin, jejichž hlavním zdrojem v ovariu je rostoucí folikul (Lincová, 2007; Henzl, 2002).

4.3.1 Estrogeny

Estrogeny jsou skupinou steroidních sloučenin syntetizovaných v různých tkáních, jejichž název je odvozen od estrálního cyklu (oestrus, série změn v reprodukčním systému samic vedoucích k ovulaci), v němž hrají důležitou roli (Trojan, 2003 a Granner 2002).

Základní skelet tvoří cyklopentanoperhydrofenanthren – gonan. Pro estrogeny je typický aromatický kruh A a fenolická hydroxylová skupina v poloze 3 α (Hanč a Pádr, 1982). U člověka bylo zjištěno 25 různých estrogenů, hlavními estrogeny tvořenými u žen jsou estradiol (17 β -estradiol, E2), estron (E1) a estriol (E3) (Citterbart, 2008).



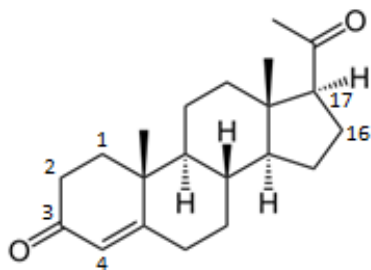
Obr. č. 1: Hlavní estrogeny (Wikipedia, 2009)

Estradiol je hlavním sekrečním produktem ovarií, kde je tvořena i část estronu (Katzung, 2006). Biologicky aktivní je 17β -estradiol, hydroxylová skupina v poloze 17 je orientovaná nad rovinu molekuly (Henzl, 2002). Většina estronu a estriolu je tvořena v játrech z estradiolu, dále jsou estrogény tvořeny v periferních tkáních (v tukových buňkách, v kůži, v kůře nadledvin) z androstendionu a dalších androgenů (Granner, 2002). Během první části menstruačního cyklu jsou estrogény tvořeny thekálními (theca interna) a granulózovými buňkami (stratum granulosum) ovariálních folikulů. Po ovulaci jsou estrogény syntetizovány luteinizovanými buňkami granulózy a theky žlutého tělíska a cesta jejich biosyntézy je poněkud odlišná (Katzung, 2006).

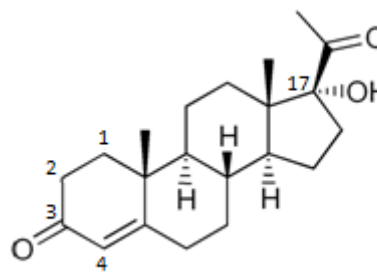
Během těhotenství je syntetizováno velké množství estrogenů fetoplacentární jednotkou, ta se skládá z fetální nadledvinové zóny a placenty (Katzung, 2006) – relativně více se tvoří estriol (Granner 2002).

4.3.2 Gestageny

Na rozdíl od estrogenů je progestinů jen malé množství. U žen je hlavním a nejdůležitějším gestagenem progesteron, malou gestační aktivitu má i 17-hydroxyprogesteron (Citterbart, 2008). Progesteron je syntetizován z cirkulujícího cholesterolu v ovariích (především během luteální fáze v corpus luteum, malé množství je tvořeno thekálními buňkami před ovulací) a v nadledvinách (Katzung, 2006; Trojan 2003).



Obr. č. 3: Progesteron (Wikipedia, 2009)



Obr. č. 2: 17-hydroxyprogesteron (Wikipedia, 2009)

4.3.3 Biosyntéza estrogenů a gestagenů

Ovariální steroidogeneze se odehrává v thekálních a granulózových buňkách ovariálních folikulů a v ovariálním stromatu. Probíhá pod vlivem LH v buňkách theca interna až do stádia syntézy androgenů. Thekální buňky samy estrogény netvoří, ale

„předávají“ vytvořené androgeny buňkám, které naopak nejsou schopny syntézy androgenů. Granulózové buňky, které jsou pod vlivem FSH, mají potřebnou enzymatickou výbavu, která z molekuly androgenu odštěpí 19. uhlík a aromatizuje kruh A, čímž mění androgeny na estrogény (Henzl, 2002).

První kroky biosyntézy estrogenů a androgenů jsou shodné. Základním prekurzorem je cholesterol, který vzniká postupnými kondenzačními reakcemi z „aktivované kyseliny octové“ – acetylkoenzymu A in situ nebo je vycytáván z cirkulující krve. Vstup cholesterolu do buňky je umožněn membránovými receptory pro low-density lipoprotein (LDL), který je nosičem cholesterolu v krvi (Citterbart, 2008).

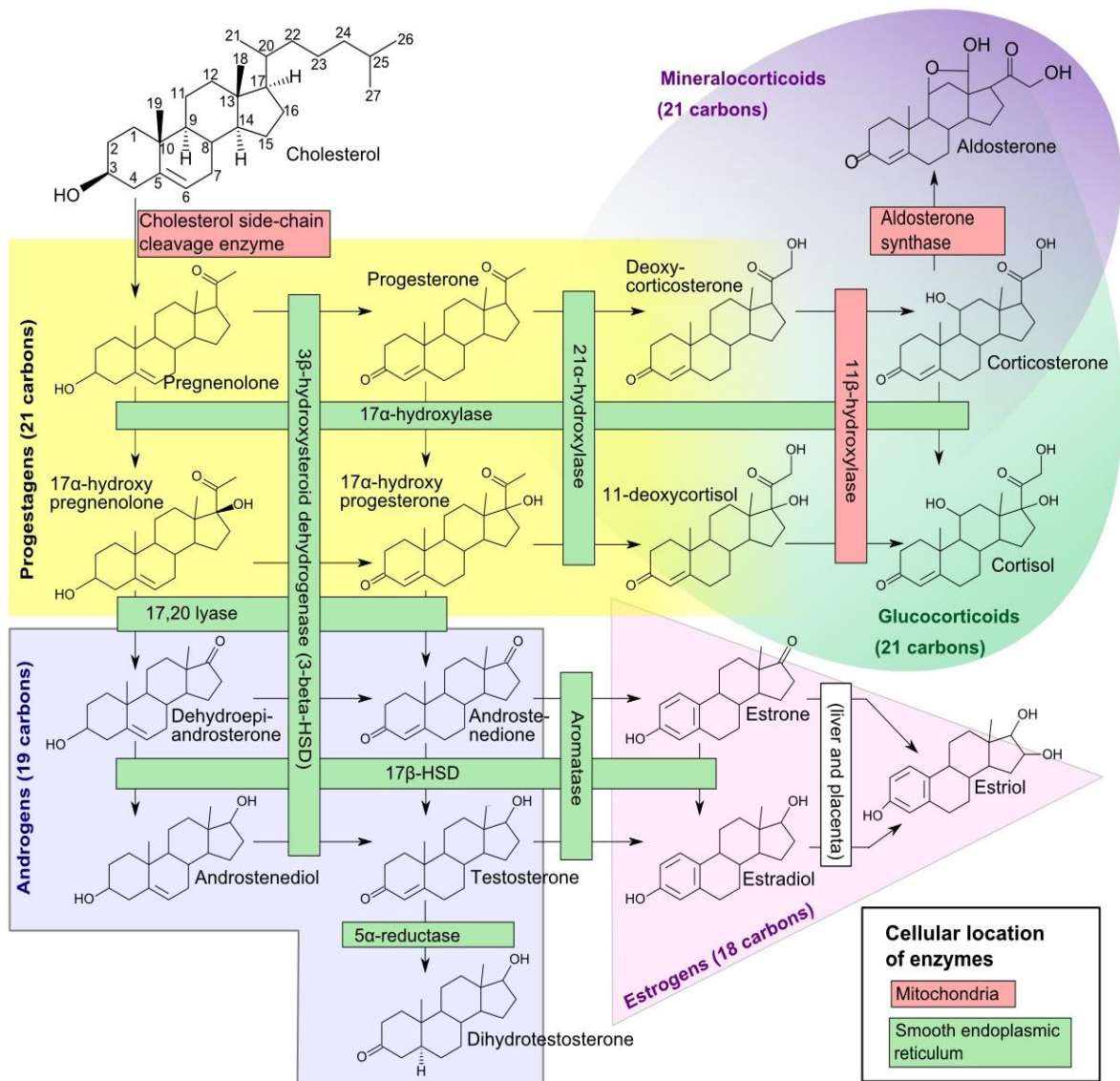
V průběhu steroidogeneze (obr. č. 6) se počet atomů uhlíku u cholesterolu (27C) nebo jiného steroidního prekurzoru vždy snižuje (deriváty pregnanu 21C, deriváty androstanu 19C, deriváty estranu 18C) (Citterbart, 2008).

Při štěpení postranního řetězce cholesterolu se uplatňuje enzym P450scs (20, 22-desmoláza), který je exprimován z genu uloženém na 15. chromozomu, tento enzym je lokalizován v mitochondriích (Citterbart, 2008). Odstraněním postranního šestiuhlíkového fragmentu izokapronové kyseliny vzniká pregnenolon. Tato reakce nebo skupina reakcí je rychlost limitujícím krokem v biosyntetických procesech a je kontrolována LH z adenohipofýzy (Greenspan, 2003). Pregnenolon může podléhat dvěma metabolickým cestám P450c17, neboli 17 α -hydroxyláze, za vzniku 17-hydroxypregnenolonu nebo 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáze (3 β -HSD) za vzniku progesteronu (Citterbart, 2008).

Ve folikulární fázi se pregnenolon působením enzymu P450c17 přeměňuje na 17 α -hydroxypregnenolon a ten pomocí 17,20-lyázy konvertuje na dehydroepiandrosteron (DHEA) (Citterbart, 2001; Mašek, 2008). DHEA podléhá 3 β -HSD a Δ^5 Δ^4 ketosteroid izomeráze za vzniku androstendionu (Greenspan, 2003).

V luteální fázi pregnenolon podléhá 3 β -HSD, ta oddělí vodík z hydroxylové skupiny na třetím uhlíku (C - OH \rightarrow C=O) a Δ^5 Δ^4 ketosteroid izomeráze, která přesune dvojnou vazbu mezi uhlíkem C5 a C6 na uhlík C4 a C5 (Greenspan, 2003; Henzl, 2002). Progesteron je secernován žlutým tělískem ve velkém množství po ovulaci. Slouží také jako prekurzor pro androgeny a estrogény, protože je substrátem pro 17 α -

hydroxylázu (P450c17), která přeměňuje progesteron na 17 α -hydroxyprogesteron v endoplazmatickém retikulu. Po 17 α -hydroxylaci může být dvouuhlíkový postranní řetězec odštěpen pomocí 17, 20-lyázy za vzniku androgenů (Greenspan, 2003).



Obr. č. 4: Steroidogeneze (Vivo, 2009)

Estrogeny vznikají aromatizací androgenů (androstendionu a testosteronu) komplexním procesem, kterého se účastní tři hlavní hydroxylační kroky a každý z nich vyžaduje kyslík O₂ a NADPH (Granner, 2002). Aromatázový komplex zahrnuje hydroxylaci methylové skupiny na uhlíku C19, oxidaci této skupiny a hydroxylaci v pozici 3 α . Soudí se, že tyto tři kroky nastávají v mikrozomální frakci (Greenspan, 2003). Androstendion může opět podléhat dvěma metabolickým cestám. Účinkem 17 β -

hydroxysteroid dehydrogenázy (17β -HSD) vzniká testosteron a z něj působením aromatázy estradiol nebo přímo z androstendionu pomocí aromatázy vzniká estron (hlavní zdroj estrogenů u postmenopauzálních žen) (Mašek, 2008; Citterbart, 2008).

4.3.4 Transport estrogenů a gestagenů v plazmě

Estrogeny se v plazmě váží na SHBG (sex hormon binding globulin), albumin a transkortin a v této formě jsou z místa tvorby transportovány k místu účinku (Citterbart, 2001). SHBG je syntetizován v játrech a protože je tvorba stimulována estrogeny a inhibována androgeny, hladina je u žen dvakrát vyšší než u mužů (Greenspan, 2003). Asi 99 % steroidních hormonů je vázáno na proteiny, pouze 1 % je ve volné formě a je považováno za biologicky aktivní (Citterbart, 2008).

Hlavním úkolem proteinů, které váží steroidní hormony, je zabránit jejich degradaci, event. konverzi, a tak regulovat jejich biologickou aktivitu (Citterbart, 2008). Tyto transportní proteiny vytvářejí rezervoár hormonů v krvi a pro svou poměrně vysokou vazebnou kapacitu vyrovnávají náhlé změny v hladinách (Granner, 2002). Koncentrace cirkulujícího SHBG je nepřímo závislá na tělesné hmotnosti, tzn. že při významném zvýšení hmotnosti se snižuje hladina SHBG a zvyšuje se koncentrace nevázaných pohlavních steroidů v plazmě (Citterbart, 2008). Rychlost metabolické clearance steroidů je nepřímo úměrná k jejich afinitě vazby na SHBG, estron se ztrácí z krve rychleji než estradiol (Granner, 2002).

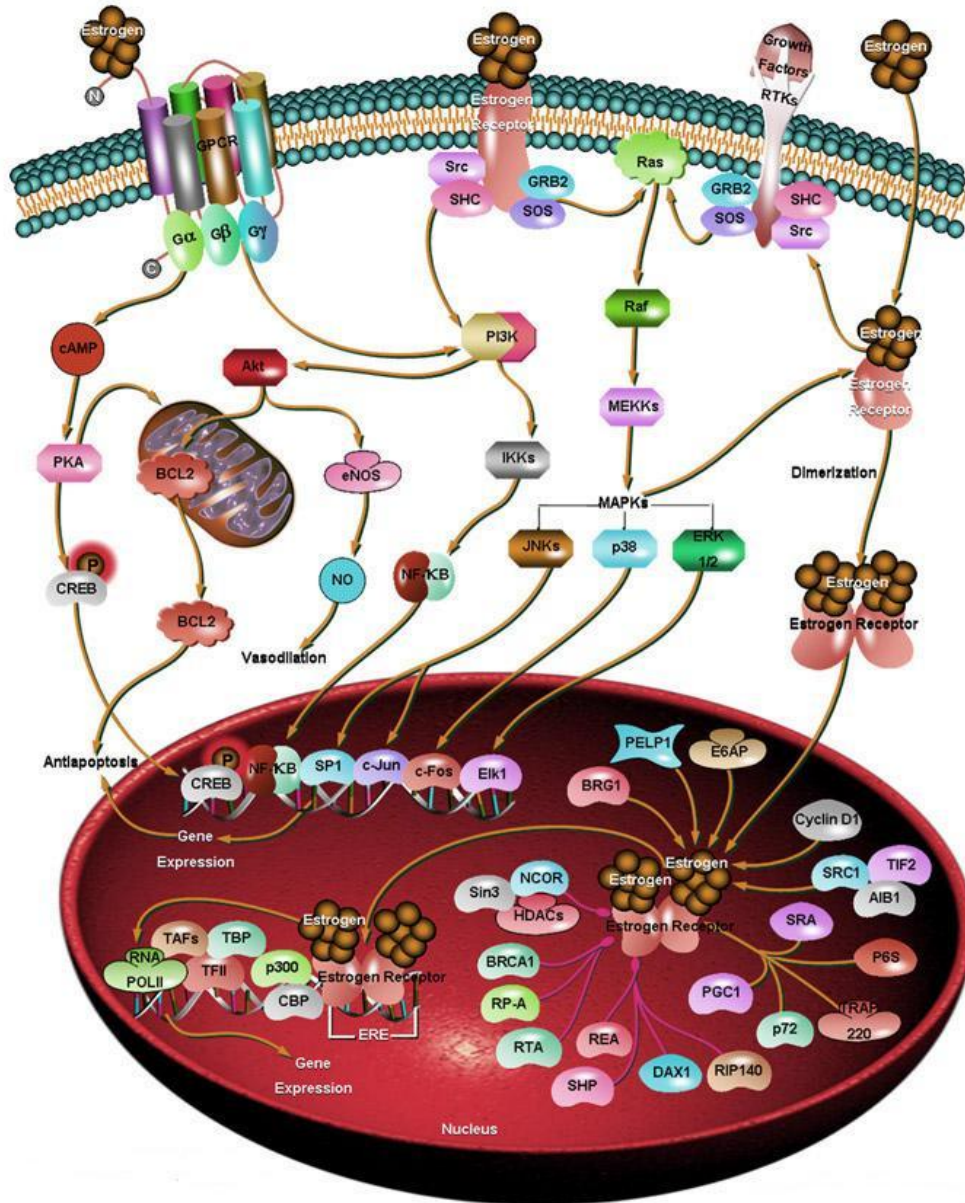
Progesteron je v plazmě vázán na kortikosteroidy vázající globulin (CBG) a albumin (Trojan, 2003).

4.4 Steroidní receptory

4.4.1 Estrogenové receptory, mechanismus účinku estrogenů

Podstatná část regulačních zásahů estrogenů je zprostředkována jejich vazbou na specifické receptory (α , β), které patří do nadrodiny receptorů kontrolujících genovou transkripci. Jsou specifické jak svojí strukturou tak i lokalizací. Jsou prokázány nejen v pohlavních orgánech, hypothalamu a prsní žláze, ale také v játrech, ledvinách, kostní tkáni a cévním endotelu. Receptory pohlavních steroidů jsou však také v nádorových buňkách hormonálně dependentních nádorů prsu, prostaty, dělohy, ovaria a jejich

inhibice nebo zábrana jejich stimulace endogenními steroidy má terapeutický význam (Lincová, 2007).



Obr. č. 7: Estrogenová signalizace (SABiosciens, 2009)

Receptory pro pohlavní steroidy jsou lokalizovány především v buněčném jádře. Pro zvýšení pravděpodobnosti vazby s ligandem jsou však vysunovány do cytoplazmy a dokonce mohou být zanořeny do buněčné membrány (viz obrázek č. 7). Steroid se po průniku buněčnou membránou váže na vazebné místo receptoru pro steroidní strukturu a mění jeho konformaci. Tato vazba umožňuje vznik receptorového dimeru, který vytváří se specifickou sekvencí DNA buněčného jádra komplex nazývaný „hormone

responsive element“. Tento komplex aktivuje odpovídající RNA-polymerázu, ta vytvoří specifickou sekvenci mRNA, která indukuje transkripci genů regulujících ve smyslu aktivace nebo inhibice syntézu specifických proteinů. Takto mohou vznikat určité enzymy nebo dochází k indukci, resp. inhibici tvorby receptorů pro další steroidní hormony (Lincová, 2007).

Gen pro estrogenový receptor (ER) je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 6. Koncentrace steroidních receptorů v cílových buňkách je velmi variabilní, kolísá od 50 do 50 000 vazebných míst. Estrogenový receptor se skládá ze šesti hlavních strukturálních a funkčních oblastí, tzv. domén, označených A – F (Strnad, 2001).

4.4.2 Progesteronové receptory

Tvorba tohoto proteinového receptoru je indukována estrogeny, které zvyšují koncentraci progesteronového receptoru (PR) a zvyšují tak tkáňovou odpověď na účinky progesteronu. Přítomnost PR vypovídá o funkčním stavu ER a je ukazatelem stavu estrogenové signální transdukce. Nedávno byly u člověka nalezeny dvě formy PR A a B. Stejně jako u ER existuje tkáňová variabilita v zastoupení obou forem PR. Předpokládaná funkce PR-A je transkripční inhibice hormonálních receptorů (ER a PR-A) a progesteronového genu (Strnad, 2001).

4.5 Fyziologické účinky ženských steroidních hormonů

4.5.1 Fyziologický účinek estrogenů

Estrogeny mají obecně stimulační a proliferační účinek na pohlavní orgány, sekundární pohlavní znaky, přídavné reprodukční orgány a dále mají účinky metabolické. Jejich účinkem se např.: vyvíjí zevní genitál, proliferační vaginální sliznice, stimuluje růst svaloviny vejcovodu a zvyšuje jeho motilita, stimuluje počáteční růst folikulů v ovariích, ovlivňuje vývoj prsů (růst a větvení mlékovodů), ovlivňuje psychika, chování a jednání. Estrogeny působí také na erytropoezu a polymerizací mukopolysacharidů zpevňují cévní stěnu (Citterbart, 2008).

4.5.2 Fyziologický účinek gestagenů

Jak vyplývá z názvu, hlavním účinkem těchto hormonů je příprava a udržení těhotenství. Účinek progesteronu na orgány reprodukce zahrnuje vývin žlázoové části prsu (stimulace rozvoje lobulů a alveolů mléčné žlázy, vyvolání jejich sekreční aktivity) a cyklický vývin endometria během menstruačního cyklu. Metabolické působení progesteronu zahrnuje vliv na metabolismus sacharidů, tuků a bílkovin nebo tělesnou teplotu. (Trojan, 2003; Greenspan 2003)

4.6 Metabolismus a vylučování pohlavních steroidů

Estrogeny jsou aktivně metabolizovány játry, kde se estradiol rychle a reverzibilně dehydrogenuje 17 β -HSD na estron a ten je konvertován na dihydroxy-, methoxy-, catechol- deriváty a estriol (Mašek, 2008). Estradiol, estron i estriol jsou pak substráty pro jaterní enzymy, které konjugují molekuly s kyselinou glukuronovou a sulfátovými skupinami, což vede ke zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě (Granner, 2002). Vzniklé sloučeniny jsou pak snadno vylučovány z organismu především ledvinami (močí) a v menší míře prostřednictvím žlučových cest do tenkého střeva (Citterbart, 2008). Malé množství estronu vstupuje znovu do cirkulace (Greenspan, 2003).

Progesteron je z organismu rychle odstraňován, hlavním metabolitem je pregnandiol, který je syntetizován v játrech, a následně je konjugován kyselinou glukuronovou. Dalším metabolitem je 17-hydroxyprogesteron, který se po konjugaci vylučuje ve formě pregnantriolu, nebo 20 α -hydroxyprogesteron, který má jednu pětinu aktivity progesteronu (Greenspan 2003, Citterbart, 2008).

4.7 Ovariální cyklus

V první fázi ovariálního cyklu je vlivem FSH potencován růst primárního folikulu. V buňkách, které obalují oocyt, se tím aktivuje produkce estrogenů. K FSH se posléze připojuje LH a spolu s ním působí na receptory buněk předovulačního folikulu (sám FSH není schopen vyvolat úplné vyžrání folikulu). Jeden z 6 až 12 rostoucích folikulů se zvětšuje rychleji a vytvoří tzv. Graafův folikul, který vyčnívá nad povrch

ovaria. Jeho růst je dán vysokou produkcí estrogenů zrajícího folikulu. Pozitivní zpětná vazba ovlivňuje jak produkci, tak i výdej LH a FSH z adenohipofýzy (Trojan, 2003).

První (folikulární) fáze ovulačního cyklu trvá 12 – 14 dnů od prvního dne poslední menstruace (Trojan, 2003). Tvorbu pohlavních steroidů během této fáze vysvětluje teorie dvou gonadotropinů a dvou typů buněk. FSH stimuluje růst granulózových buněk a LH zahajuje proliferaci thekálních buněk. Buňky theca interna obsahují LH receptory a jejich stimulací jsou syntetizovány androgeny, které pronikají do granulózových buněk. Ty obsahují FSH receptory, jejichž stimulací se indukuje tvorba enzymu aromatázy a tím je zahájena konverze androgenů na estrogeny. Granulózní buňky secernují estrogeny do intercelulárních prostorů, kde stimulují růst oocyty. Zároveň se zvyšuje koncentrace estrogenů v krvi a snižuje se sekrece FSH, naopak je zvýšená sekrece LH (Citterbart, 2008).

Vrchol druhé (ovulační) fáze nastane asi 14. den cyklu, kdy Graafův folikul zduří, praskne a vajíčko s cumulus oophorus se vyplaví do břišní dutiny, kde je zachyceno fimbriemi vejcovodu. Ruptura je výsledkem působení hydrolytických enzymů buněk theca externa a nastane asi 16 hodin po vyplavení LH, který ukončuje folikulární fázi (Trojan, 2003).

Po ovulaci akumulují buňky folikulu vlivem LH lipid lutein (žlutý pigment), vytváří se corpus luteum – třetí (luteální) fáze. Buňky membrana granulosa proliferují, hladké endoplazmatické retikulum žlutého tělíska produkuje estradiol (druhý vrchol sekrece) a zejména progesteron, jehož biologická aktivita je zaměřena zejména na endometrium a navazuje na terén připravený estrogeny (Trojan, 2003).

Do vrstvy granulózních buněk žlutého tělíska začnou prorůstat kapiláry, které se plní krví. Největší stupeň vaskularizace je patrný 4. – 9. den po ovulaci. Estrogeny a progesteron působí tlumivě na sekreci LH a FSH, což po dobu sekreční fáze zabraňuje zrání dalšího folikulu. Stejně působí i inhibin produkovaný buňkami žlutého tělíska. Corpus luteum (pokud nedojde k oplodnění) postupně involuje, zmenšuje se jeho prokrvení, klesá produkce progesteronu a estrogenů, což následně vyvolá zvýšené vyplavování FSH z adenohipofýzy a je zahájen nový ovulační cyklus (Trojan, 2003).

4.8 Přehled karcinogeneze prsu

Nádorové onemocnění lze charakterizovat jako neregulovaný růst buněk o autonomní povaze buněčné proliferace spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciaci. Neregulovaný růst vede ke zvětšení takto postižené tkáně, která může stlačovat okolní struktury, nebo k postupné invazi do okolních struktur a metastazování (Klener, 2002).

Karcinom prsu (obecně nádorové onemocnění jakéhokoli orgánu) je genetické onemocnění, při kterém dochází ke změně vlastností genetického materiálu somatických buněk, což vede k deregulaci buněčného růstu, dělení a normálního vývoje tkáně. Karcinom vzniká pravděpodobně z jedné buňky a následně se adaptuje na lokální prostředí v procesu své klonální evoluce. Nádory se obecně identifikují na základě morfologických a histochemických podobností s tkáněmi, ze kterých vznikají. Maligní vlastnosti jsou výsledkem poměrně malého počtu genetických anomálií, které mají dopad na chování v organismu hostitele. Z biologického hlediska se nádorové buňky geneticky i funkčně podobají buňkám tkáně, ze které vznikly. Na rozdíl od nich však ztrácejí své specializované vlastnosti a dochází k jejich dediferenciaci (Strnad, 2001).

Patogeneze karcinomu mléčné žlázy zahrnuje počáteční intraduktální epitelovou hyperplazii, která pokračuje přes stádia atypie – okluze ductu, přes neoplazii in situ až k vývoji lokálně invazivního růstu a metastazování. Mezi fází hyperplazie a neoplazie dochází ke klonální expanzi. Hyperplastický proces je typicky polyklonální a z jednoho buněčného klonu dochází k vývoji neoplazie, která je na začátku svého vývoje monoklonální. Vyvinuté neoplazie jsou důsledkem dalších genetických defektů a mutací typicky polyklonální (Strnad, 2001).

4.9 Nádory prsu

Nádory prsu vznikají v anatomických strukturách mléčné žlázy, které tvoří žlazové těleso prsu, fibrózní a tuková tkáň (Klener, 2002).

Při vystupňované intraduktální proliferaci epitelu vzniká duktální epitelová hyperplazie (tzv. epitelioza), která se společně s komplexem dalších změn podílí na vzniku fibrocystické choroby prsu označované zpravidla jako mastopatie (fibroadenóza) imponující jako tumorózní afekce. Z epitelu mléčné žlázy vzniká i převážná většina

skutečných nádorů prsní žlázy, které mohou mít benigní povahu (papilomy, fibroadenomy). Vzácně mohou benigní nádory vznikat také z mezenchymových struktur (lipomy). Z maligních nádorů jsou nejčastější karcinomy, jejichž vzniku předchází atypická duktální nebo lobulární hyperplazie (Klener, 2002).

Karcinom prsu patří mezi tzv. hormonálně závislé nádory. Karcinogenní účinky se přisuzují zejména estrogenům, které indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů a patrně i onkogenů, jejichž produkty významným způsobem ovlivňují proliferační aktivitu buněk. Za fyziologických podmínek jsou však tyto účinky v rovnováze s různými antiproliferačními působky, jako je např. TGF- β . Rovnováhu může narušit trvající estrogení stimulace nebo účinky dalších kancerogenních faktorů působících různé genetické abnormality (Klener, 2002).

V některých genech vznikají během života i spontánní mutace, které za fyziologických podmínek umí buňka opravit. Pokud se tak nestane (např. při poruše opravných genů), je důsledkem genetických abnormalit aktivace některých onkogenů (myc, ras, HER-2/neu aj.) nebo alterace recesivních onkogenů (p53, Rb). To se projeví postupnou změnou fenotypu buněk vedoucí až ke vzniku karcinomu (Klener, 2002).

5 ČESKÁ MONOGRAFICKÁ A ZAHRANIČNÍ ČASOPISOVÁ LITERATURA

5.1 Estrogeny a riziko karcinomu prsu

Existuje velké množství epidemiologických a experimentálních dat, která dokazují, že estrogeny jsou důležitým činitelem v etiologii karcinomu prsu. Zejména se jedná o ty karcinomy prsu, které vyžadují estrogeny pro svůj pokračující růst a progresi (hormonálně dependentní karcinomy) (Subramanian et al., 2008). Přes nepochybný význam v kancerogenezi nebyly však prokázány jejich mutagenní účinky a proto je přesnější zařazovat ženské pohlavní steroidní hormony mezi kokarcinogeny (Klener, 2002).

Mechanismus karcinogenity estrogenů je různý. Jednak stimulují buněčnou proliferaci pomocí aktivace hormonálních receptorů, jednak zvyšují míru genetických mutací metabolickou aktivací cytochromu P450 a jednak indukují aneuploidie (Subramanian et al. 2007). Bylo prokázáno, že estrogeny mohou aktivovat růstové faktory (EGF, TGF α , IGF-1 i PDGF), stimulují expresi receptorů pro růstové faktory a aktivují proteolytické enzymy (katepsin D, kolagenózu IV. typu aktivátor plazminogenu). Ovlivňují též aktivitu adhezních molekul (integrinů, tenascinů, fodrinu). Předpokládá se i jejich podíl v aktivaci onkogenů (c-erb 2, ras, myc) a inaktivaci antionkogenů (p53, Rb, MTS-1). Mimoto estrogeny svým stimulačním účinkem na cyklin D urychlují průchod buňky fází G₁, čímž zvyšují proliferační aktivitu (Klener, 2002). Estradiol je nejúčinnější steroidní mitogen v prsu. Biologicky aktivní je ta frakce estradiolu, která není vázaná na transportní proteiny. Volný estradiol difunduje do cílové buňky, kde se váže na transkripční faktor – estrogenový receptor. Vazba indukuje tvorbu dimeru, který se váže na krátkou sekvenci DNA, označenou jako estrogen vazebný element ERE. Estrogeny i antiestrogeny svou vazbou s ER řídí úroveň transkripce genů, které se podílejí na aktivaci progresu G₁ fáze buňky (Strnad, 2001).

Riziko vzniku karcinomu prsu je spojeno s prolongovanou expozicí estrogenům. Té může být dosaženo brzkým nástupem menarche, pozdní menopauzou, hormonální substituční terapií anebo postmenopauzální obezitou. Estrogen-dependentním

karcinomem prsu je postiženo přibližně 60 % premenopauzálních a 75 % postmenopauzálních pacientek (Subramanian et al., 2008).

Bylo zjištěno, že progrese z proliferativního onemocnění bez atypií (PDWA) přes atypické duktální hyperplazie (ADH) do duktálního karcinomu prsu in situ (DCIS) a odtud až k invazivnímu karcinomu může sloužit jako model pro další výzkum invazivního duktálního karcinomu (Sasano, 2006). Estrogeny, tedy především E2, jsou považovány za jeden z nejvýznamnějších faktorů v prvních fázích této kaskády vývoje rakoviny (Subramanian et al., 2008). Na druhou stranu, estrogeny mají prospěšný vliv jako protektivní faktor kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy a ztráty kognitivních funkcí (Jansson, 2009).

Studie na hlodavcích prokazují, že estrogeny mohou indukovat a podporovat prsní tumory, zatímco ovariectomie a podávání antiestrogenů mají opačný efekt. Pokud je plod (v případě myši) vystaven nadbytku estrogenů, riziko onemocnění rakovinou prsu u dospělých jedinců výrazně stoupá. Tato nadměrná expozice zvyšovala citlivost na estradiol, snižovala apoptózu, zvyšovala počet epiteliálních buněk pozitivních na PR v období puberty a zvyšovala denzitu i počet koncových neboli terminálních pupenů (Subramanian et al., 2008).

5.2 Hormonálně dependentní karcinom prsu

Estrogeny po navázání na ER cílové buňky vytvoří komplexy hormon-ER, které působí jako transkripční faktory aktivující geny pro tvorbu PR a někdy i ER a stimulující tvorbu a sekreci peptidových růstových faktorů (EGF, TGF- α , IGF-1), které způsobují proliferativní reakci rakovinových buněk (Strnad, 2001; Subramanian et al., 2008). Estrogen rovněž způsobuje regulaci směrem k nadměrné tvorbě onkogenů jako je c-myc a to navázáním k jeho receptorům a prostřednictvím proteinkinázové signální dráhy c-fos a c-jun aktivované vlivem mitogenu Src/p21ras, což vede ke zvýšení buněčné proliferace karcinomu prsu (Subramanian et al., 2008).

Vedle účinku estrogenů je důležitý stav ER, který je zodpovědný za přenos signálu na příslušné vazebné elementy DNA a za aktivaci genové transkripce. Estrogeny působí růst a proliferaci buněk, které obsahují ER. V těchto buňkách jednak indukují tvorbu svých vlastních receptorů a jednak zvyšují koncentraci PR. Estradiol spolupůsobí s prolaktinem, který v prsní tkáni působí jako další mitogenní faktor a jeho

hypofyzární sekrece je hladinou estradiolu podporována. Proliferující buňky duktálního epitelu prsu jsou v průběhu fáze syntézy DNA (S-fáze) velmi citlivé na účinek mitogenů. Estrogeny tak mohou zvyšovat a urychlovat riziko poškození DNA. Stromální a tuková tkáň prsu obsahuje velké množství ER a nízké koncentrace PR. Podle posledních studií je řízení proliferace dependentních tkání prsu ovlivňováno nepřímo, právě vlivem růstových faktorů, které jsou produkovány ve stromální komponentě prsu na základě hormonu stimulované genové transkripce (Strnad, 2001).

Na zvýšenou koncentraci estrogenů reagují buňky mléčné žlázy snížením množství ER, aby výsledné množství estrogenových signálů bylo nezměněné (optimální). To bylo zjištěno nejen in vivo, jako nízké hladiny ER v karcinomu mladých žen v porovnání se staršími, ale i v buněčných kulturách, kde expozice estradiolu vedla ke snížení množství ER (Hochmann, 2007a). Někteří autoři citují, že pro růst estrogen-dependentních tumorů prsu a pro přežití postmenopauzálních pacientek je lokální tvorba estrogenů v nádorech důležitější než hladiny cirkulujících estrogenů v plazmě. Více než dvě třetiny nádorů prsu u postmenopauzálních žen je estrogen-dependentní (Nakata et al., 2003). Za hormonální nezávislost zbylé třetiny nádorů prsu může být zodpovědný vznik různých mutací – variant estrogenového receptoru (Strnad, 2001). To rozpracovala ve své bakalářské práci Kružíková (2008).

Zdůvodnění důležitosti lokální tvorby estrogenů u postmenopauzálních žen je založeno na následujících zjištěních: hladiny E2 v nádorech prsu jsou ekvivalentní těm, které jsou u premenopauzálních pacientek, přestože plasmatické hladiny E2 jsou po menopauze 50krát nižší. Koncentrace E2 v nádorech prsu postmenopauzálních žen jsou 10 – 40krát vyšší než sérové hladiny (Nakata et al., 2003).

Uvažuje se, že nadměrná exprese enzymů, které se podílejí na lokální tvorbě estrogenů, hraje u postmenopauzálních žen nezanedbatelnou roli v patogenezi a v rozvoji hormon-dependentního karcinomu prsu a může souviset s rozvojem agresivnějšího onemocnění a s horšími vyhlídkami s ohledem na zvyšující se pravděpodobnost lokálních a distálních metastáz (Subramanian et al., 2008).

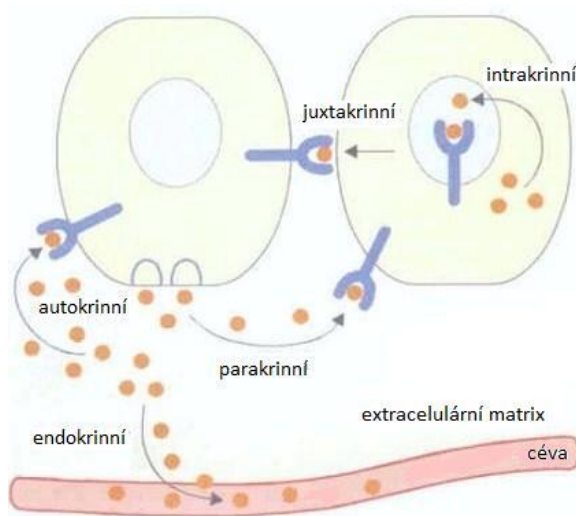
5.3 Lokální tvorba estrogenů v prsu

U premenopauzálních a postmenopauzálních žen pochází E2 z odlišných zdrojů. U premenopauzálních žen jsou hlavním zdrojem cirkulujících estrogenů ovaria nebo

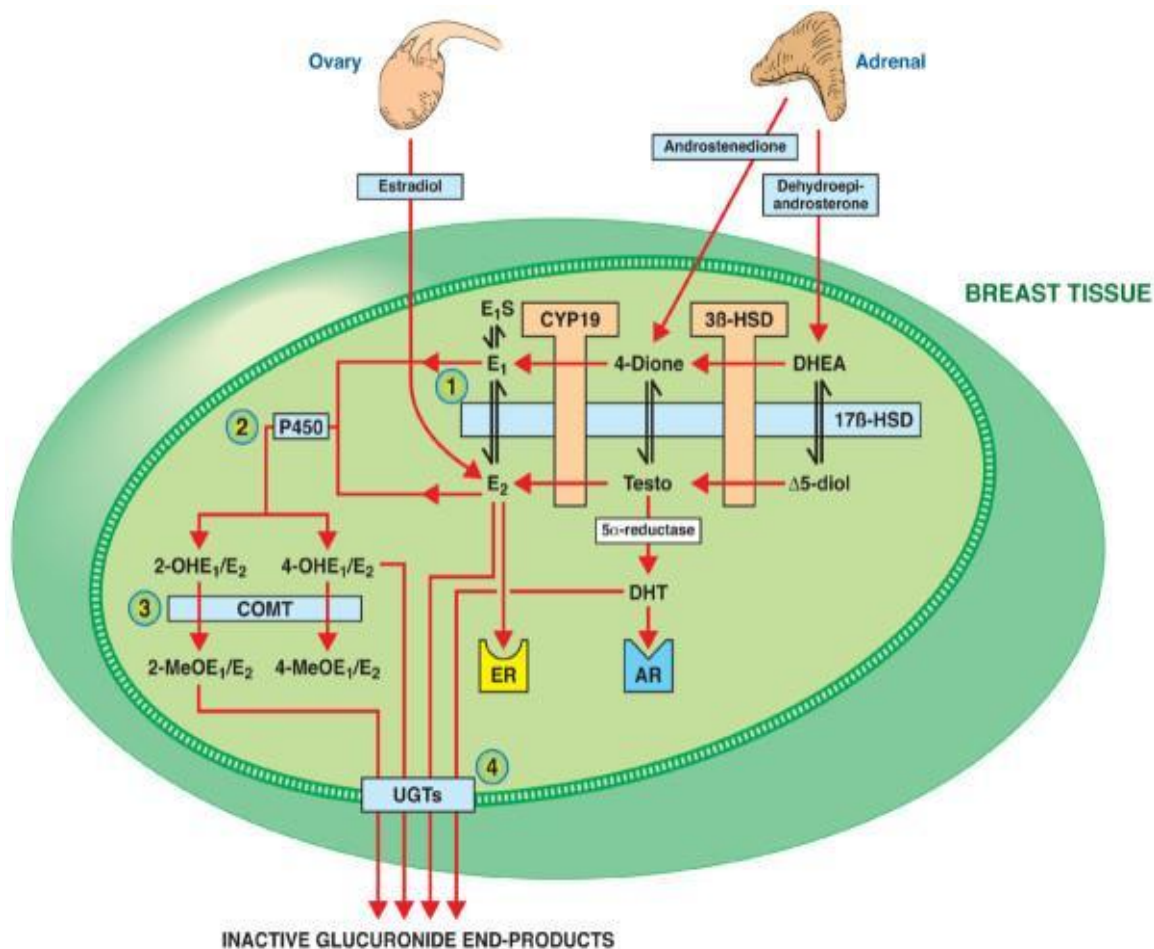
lépe řečeno granulózní membrána Graafova folikulu. Estrogeny jsou cirkulací transportovány do cílových míst, kde jsou přítomny specifické receptory. U klasického endokrinního systému je v cílových tkáních využito jen malé množství hormonů. Převážná většina hormonů je metabolizována (degradována) nebo konvertována na neaktivní formy (Subramanian et al., 2008).

U postmenopauzálních žen je naopak většina estrogenů syntetizována v periferních tkáních z hojně cirkulujících steroidních prekurzorů. Příkladem může být tuková tkáň v různých lokalizacích, ale navíc u žen s karcinomem prsu, jsou estrogeny syntetizovány epitelovými buňkami tumoru, působí tedy autokrinně. Kromě toho, sousedící stromální buňky mohou produkovat estrogeny, jež jsou bez uvolnění do celkové cirkulace transportovány do tumorových buněk a působí parakrinně (Subramanian et al., 2008).

Navíc také vykazují své působení lokálně produkované aktivní estrogeny v buňkách, kde dochází k jejich syntéze bez uvolnění do extracelulárního prostoru. Tento jev je odlišný od autokrinního, parakrinního i klasického endokrinního působení a označuje se jako intrakrinní. Intrakrinní systém vyžaduje minimální množství biologicky aktivních hormonů k dosažení maximálního efektu. Zde je nutno podotknout, že v intrakrinním systému nemusí sérové koncentrace hormonů v cílových tkáních bezpodmínečně odpovídat lokální hormonální aktivitě. Relativní zastoupení výše zmíněných mechanismů se s velkou pravděpodobností liší s ohledem na fyziologický stav ženy a možná též s ohledem na lokální a systémové změny vyskytující se během tumorogeneze a progresu rakoviny prsu (Subramanian et al., 2008).



Obr. č. 5: Způsoby účinku signálních molekul (Klener, 2002)



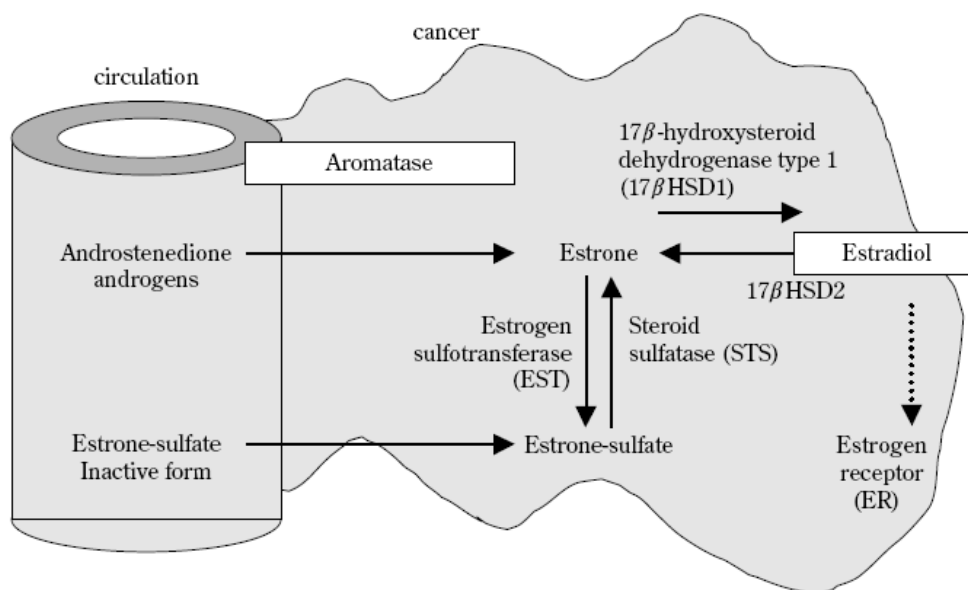
Obr. č. 6: Biosyntéza a metabolismus steroidů v prsní tkáni (Guillemette et al., 2009)

Popis obrázku: Do prsní tkáně přichází estrogény buď přímo z ovarií anebo jsou syntetizovány z androgenů sekretovaných nadledvinami. (1) První metabolická dráha estrogenů zahrnuje transformaci E2 na E1 působením 17β-HSD a jeho částečnou konjugací na estron sulfát (E1S) za katalýzy estrogensulfotransferázy (EST). (2) Jak E2 tak E1 může být oxidován působením různých cytochromů P450 za vzniku 2- a 4-hydroxykatecholestrogeneru (OHCE). (3) Tyto metabolity mohou být dále methoxylovány katechol-O-methyltransferázou (COMT). (4) UDP-glukuronosyltransferázy (UGTs) jsou schopné konjugovat výchozí estrogény E2 a E1 stejně tak jako jejich deriváty 2/4-OHCE a 2/4-methoxykatecholestrogen (MeOCE). Vzniklé estrogen glukuronidy jsou biologicky neaktivní.

Použité zkratky: AR, androgenový receptor; 3β-HSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenáza; CYP19, aromatáza; Δ5-diol, androstenediol; DHT, dihydrotestosteron; ER, estrogenový receptor; MeO, methoxyderivát; OH, hydroxyderivát; testo, testosteron; E2, estradiol; E1, estron; E1S, estronsulfát.

Na lokální produkci estrogenů se podílí tzv. aromatázová a sulfatázová dráha.

- a) Aromatázový enzymový komplex hraje důležitou roli v konverzi androgenů na estrogeny (testosteron se konvertuje na estradiol a androstendion na estron).
- b) Většina cirkulujícího estronu je v sulfátové formě. V případě sulfatázové dráhy je cirkulující estronsulfát (E1S), který se do rakovinové tkáně prsu dostane z krve, hydrolyzován steroidní sulfatázou (STS) na E1 (Aka et al., 2008). Naopak estrogensulfotransferáza (EST), člen nadrodiny steroidních sulfotransferáz, sulfonuje estrogeny na biologicky neaktivní estrogensulfáty. STS a EST hrají tedy důležitou roli v udržování hladin biologicky aktivních estrogenů.
- c) Estron je následně redukován na 17β -estradiol pomocí enzymu 17β -hydroxysteroid dehydrogenázy (17β -HSD), E2 pak lokálně působí na buňky karcinomu prsu přes ER (Sasano et al., 2006; Subramanian et al., 2008).
- d) Mezi další enzymy, které se účastní metabolismu estrogenů a mají tak rovněž částečný význam v karcinogenezi prsu, patří 3β -hydroxysteroid dehydrogenáza (3β -HSD), CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4 (Subramanian et al., 2008).



Obr. č. 7: Intratumorální metabolismus a tvorba estrogenů v lidském karcinomu prsu (Sasano et al., 2006)

Aromatázová aktivita je limitujícím krokem lokální syntézy estrogenů, přičemž její intenzita závisí na lokálním stavu tukové tkáně. Konverze ve stromálních buňkách je katalyzována aromatázovým cytochromem P450, který je produktem genu CYP19 a jeho aktivace ovlivňuje růst karcinomu prsu. Aromatázový cytochrom P450 je odpovědný za přeměnu steroidů C19 na estrogenu v mnoha lidských tkáních (např. v placentě, gonádách, tukové tkáni, mozku). Naopak v kůře nadledvin, děloze a ve zdravé jaterní tkáni chybí. Nadměrná aromatázová exprese je pak spojena se zvýšenými hladinami estrogenů v cirkulaci nebo se zvýšením koncentrace estrogenů v dané tkáni, kde stimuluje růst dependentních nádorů.

Přibližně 50 – 60 % všech karcinomů prsu vykazuje vyšší aromatázovou aktivitu, než jaká je v periferní cirkulaci (pozn. způsobuje tak vzrůst koncentrace E2 v nádoru). Tato aktivita je podporována para-autokrinním působením řady růstových faktorů a cytokinů produkovaných nádorem. Důsledkem jsou vysoké hladiny estrogenů v nádoru (Strnad, 2001).

Aromatáza byla imunohistochemicky detekována ve stromálních buňkách (adipocyty, fibroblasty), přičemž maximální aktivita byla nalezena ve stromálních buňkách, které těsně naléhaly na nádor a její hodnoty nekorelovaly se stavem ER. Intenzivní aromatázovou aktivitu vykazují stromální vřetenovité buňky, které nejsou difúzně distribuovány ve tkáni, nýbrž tvoří shluky (Strnad, 2001).

6 ZAHRANIČNÍ ČASOPISOVÁ LITERATURA

6.1 Aromatáza

6.1.1 Fyziologický účinek

Aromatáza patří mezi klíčové enzymy v biosyntéze estrogenů lokalizované v endoplasmatickém retikulu estrogen produkujících buněk. Konverze testosteronu na estradiol a androst-4-en-3,17-dionu (4-dion) na estron je dosaženo postupnou hydroxylací, oxidací a odstraněním uhlíku C19 a aromatizací kruhu A (Aka et al., 2008; Subramanian et al., 2008).

6.1.2 Genová exprese a distribuce aromatázy

Aromatáza je kódována lidským genem CYP19 (P450arom), který patří do nadrodiny cytochromu P450 sdružující přes 460 členů v 74 rodinách. Cytochrom P450arom je jediným členem rodiny 19. Je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 15. Gen CYP19 se nachází mezi chromozomovými markery stSG12786 a stSG47530 přičemž 3' konec je blíže centromery a 5' ukazuje směr transkripce od telomery k centromere. Aromatázu kóduje pouze 30 kb (exon II – exon X) oblasti 3', kdežto více než 93 kb sousední oblasti 5' slouží jako regulační jednotka (Subramanian et al., 2008).

Expresí genu pro aromatázu je regulována tkáňově specifickým způsobem, použitím různých promotorů. Nezvykle velká regulační oblast obsahuje 10 tkáňově specifických promotorů, které jsou alternativně použitelné u různých buněčných typů. Vedle protisměrně přepisované oblasti exonu II je zde množství počátečních alternativních exonů, které jsou odlišně posttranskripčně modifikovány do charakteristických 5' oblastí, jež nejsou použity pro translaci. Bylo popsáno až 9 různých transkripčních začátků s individuálními promotory, které umožňují tkáňově specifickou regulaci exprese (Subramanian et al., 2008).

Přestože každá tkáň exprimuje jedinečný počáteční exon 5' nepřekládané oblasti, pomocí posttranskripční modifikace společného splicing-akceptorového místa exonu II, jsou kódující oblasti a produkty translace stejné ve všech tkáních, ve kterých

probíhá exprese. To znamená, že ačkoli mají transkripty v různých tkáních odlišné 5' konce, kódující oblast je stejná a proto jsou také proteiny exprimované těmito tkáněmi stejné (Subramanian et al., 2008).

Současná data zveřejněná v Human Genome Project poprvé dovolují přesně lokalizovat všechny známé promotory a objasnit mimořádně komplexní organizaci celého genu CYP19. Každý promotor je regulovaný odlišnou sadou regulačních sekvencí DNA a transkripčních faktorů, které se na tyto sekvence váží. Zdá se, že prototypová estrogen-dependentní malignita karcinomu prsu využívá pro expresi aromatázy čtyř promotorů (PII, I.3, I.4, I.7) (Subramanian et al., 2008).

Analýzou tkáňových hladin mRNA P450arom v karcinomu prsu byl klonován promotor I.7. U tkání karcinomu prsu a tukové tkáni přiléhající k tumorům byla mRNA P450arom s expresí exonu I.7 signifikantně zvýšena. Tento promotor neobsahující TATA box je zodpovědný za transkripci 29-54% mRNA P450arom v tkáních rakoviny prsu. Nicméně buněčná distribuce tohoto promotoru in vivo a fyziologická role promotoru I.7 ve zdravých tkáních není známa (Subramanian et al., 2008).

Normální tuková tkáň prsu udržuje nízké hladiny exprese aromatázy primárně prostřednictvím promotoru I.4, který leží 73 kb v protisměru běžné kódující oblasti. Primer-specifická analýza RT-PCR odhalila, že dvěma hlavními exony mRNA aromatázy izolované z tumorů prsu jsou I.3 a PII. V normální prsní tkáni jsou tyto exony využívány minimálně. Tyto výsledky naznačují, že promotory I.3 a PII jsou také hlavními řídicími promotory exprese aromatázy v karcinomu prsu a přilehlých stromálních buněk a fibroblastů (Subramanian et al., 2008).

Součet typů mRNA P450arom vznikajících z těchto 4 promotorů výrazně zvyšuje celkové hladiny mRNA P450arom v karcinomu prsu na rozdíl od normální tkáně prsu, která téměř výlučně používá promotor I.4. Mnoho studií prokázalo, že u nádorové prsní tkáně dochází k přepnutí adipo-specifického exonu I (exon 1b nebo I.4) promotoru užívaného ve zdravé tkáni prsu na ovarium-specifický exon I (exon 1c nebo I.2). Tato specifická exprese promotoru pro aromatázu v maligní tkáni může v budoucnosti sloužit jako zajímavý terapeutický cíl (Subramanian et al., 2008).

Zdá se, že v maligní tkáni prsu vede změna promotoru z I.4 na I.3 a PII k rozsáhlejší genové expresi. Změnu promotoru I.4 na PII ve stromálních tukových

buňkách může způsobit prostaglandin E₂ (PGE₂), jenž je považován za jeden z neúčinnějších stimulatorů aromatázové aktivity (Subramanian et al., 2008).

Distribuci aromatázy v rakovinné tkáni prsu lze určit imunohistochemicky použitím anti – AR polyklonálních protilátek. Ve studii Sanabe (2001) bylo zjištěno, že aromatáza je široce exprimována v různých buněčných typech tkáně prsu zahrnujících: epitel mléčné žlázy v kanálcích a acinech, adipocyty obklopující prsní laloky, stromální buňky, které proliferují v reaktivní pojivové tkáni v invazivní místa infiltrující nádor a nádorové buňky (Sanabe, 2001). Také biochemické studie prokázaly vyšší aromatázovou aktivitu u stromálních buněk karcinomu prsu (Subramanian et al., 2008).

Aromatázový komplex se skládá ze dvou polypeptidů. Jedním z nich je specifický cytochrom P450, konkrétně aromatázový cytochrom P450 (P450arom), jehož exprese je buněčně specifická. Přítomnost či absence P450arom tak určuje aromatázovou aktivitu buněk. Druhým je flavoprotein, NADPH-cytochrom P450 reduktáza, která je přítomna ve většině buněk. Vyšší hladiny aromatázy jsou přítomny u premenopauzálních žen v ovariích, kdežto u těhotných žen v placentě. U postmenopauzálních žen a mužů je hlavním místem aromatázové aktivity periferní tuková tkáň (Subramanian et al., 2008).

6.1.3 Regulace aromatázy

Bylo zjištěno, že aromatázovou aktivitu ve stromálních buňkách získaných z podkožní tukové tkáně může stimulovat interleukin IL-6. Tato stimulace vyžaduje solubilní receptor pro IL-6, který je produkován fibroblasty odvozenými z tumorů prsu. Kromě IL-6 přispívají ke stimulaci aromatázové aktivity tyto látky: TNF- α , IL-11, onkostatin M, leukemii inhibující faktor a IGF-1. Na stimulaci produkce IL-6 se podílí prostaglandin E₂ (Subramanian et al., 2008). Mimoto PGE₂ zvyšuje hladinu intracelulárního cAMP a stimuluje syntézu estrogenu. Studie Brueggemeiera a spol. ukázaly silnou lineární závislost mezi expresí aromatázy CYP19 a expresí cyklooxygenáz (COX-1 a COX-2) ve vzorcích karcinomu prsu. Zvýšené hladiny COX měly za následek zvýšenou produkci PGE₂, který následně zvyšoval aromatázovou aktivitu ve stromálních buňkách prsu (Brueggemeier, 2003).

Maligní epiteliální buňky prsu produkují velké množství TNF- α a IL-11, které řídí desmoplastickou reakci. Při tomto procesu se kolem maligních epitelových buněk

shlukují fibroblasty a udržují neobyčejně pevnou konzistenci u mnoha těchto tumorů. Desmoplastická reakce zvyšuje lokální koncentrace estrogenu, které jsou díky nadměrné expresi aromatázy lokalizované v těchto nediferenciovaných fibroblastech (Subramanian et al., 2008).

6.1.4 Role aromatázy v karcinogenezi prsu

Regulace aromatázové aktivity v maligních tkáních je velmi komplexní. Millerova pracovní skupina byla první, která dokázala, že umístění tumoru v rámci prsu přímo ovlivňovalo aktivitu aromatázy v daném kvadrantu prsu. Toto zjištění, které bylo mj. potvrzeno na úrovni exprese a aktivity aromatázy, naznačuje, že tumory se buď vyvíjí v místech s vysokou aktivitou aromatázy nebo jsou schopné produkovat faktory stimulující aktivitu aromatázy v sousedních tkáních. Bulun a kol. oznámili, že hladiny mRNA CYP19 byly nejvyšší v kvadrantech, v nichž se vyskytovaly tumory v porovnání s oblastmi od tumoru vzdálených nebo nemaligních (Subramanian et al., 2008).

Užitím kvantitativní PCR analýzy bylo rovněž potvrzeno, že tukové stromální buňky obklopující rakovinné buňky obsahují vyšší hladiny mRNA CYP19 než tukové stromální buňky v nepostižených oblastech. James a kol. zjistil, že v in vitro tumorech prsu byla aktivita aromatázy vyšší než v sousedních tukových buňkách nebo normálních tukových buňkách prsu (Subramanian et al., 2008).

Experimenty na buněčných liniích potvrdily roli aromatázy jako stimulantu růstu rakovinných buněk. Navíc bylo zjištěno, že nadměrná exprese aromatázy je úzce spojena se špatným klinickým výsledkem u pacientek s rakovinou prsu. V Macaulayově (1994) studii bylo pomocí RT-PCR technologie analyzováno na aromatázu a 17 β -HSD1 127 vzorků rakoviny prsu a 33 vzorků normálních. Vysoké hladiny jak aromatázy (P=0,0105) tak 17 β -HSD1 (P=0,0183) souvisely se špatnou prognózou karcinomu prsu zjištěnou Kaplan-Meierovou metodou. U žen s karcinomem prsu, u nichž došlo k lokálním rekurencím a distálním metastázám nebo u těch, které na rakovinu prsu zemřely, byly hladiny aromatázy nebo její mRNA vyšší než u pacientek, které byly po deseti a více letech bez nálezu (Subramanian et al., 2008).

V minulosti nebyl dokázán vztah mezi aromatázovou expresí a klinicko-patologickými faktory, jakými jsou např. věk, velikost tumoru, zapojení axilárních lymfatických uzlin, histologický typ. Zajímavou skutečností je, že Brodie a kol. zjistili,

že tumory s relativně vysokou aromatázovou aktivitou inklinují k ER pozitivitě. Miller a jeho spolupracovníci také dokázali statisticky signifikantní sklon k souvislosti mezi aromatázou aktivitou a přítomností ER α , ačkoli tumory exprimující aromatázu obsahovaly jak ER α pozitivní tak negativní. Vzárostající počet důkazů, že u postmenopauzálních žen s pokročilými ER+ nádory prsu jsou inhibitory aromatázy lepší než tamoxifen je ve shodě s pozorování Subramaniana a spol., že exprese aromatázy koreluje se špatným klinickým výsledkem (Subramanian et al., 2008).

6.1.5 Role inhibitorů aromatázy v karcinomu prsu

U postmenopauzálních žen s pokročilým karcinomem prsu s pozitivitou ER anebo PR je třetí generace inhibitorů aromatázy (anastrozol, letrozol a exemestan) v současné době považována za zlatý standard endokrinní terapie v první a druhé linii léčby. Vzárostá počet důkazů, že jsou pro adjuvantní terapii výhodnější než tamoxifen (Subramanian et al., 2008).

Například randomizovaná studie ATAC, rozdělila 9366 postmenopauzálních pacientek do třech skupin (samotný Arimidex, n = 3125, samotný Tamoxifen, n = 3116, kombinace Arimidexu a Tamoxifenu, n = 3125) a sledovala je 5 let. Výsledky ukázaly znatelně prodlouženou dobu bez nemoci u skupiny užívající anastrozol (575 případů), v porovnání se skupinou užívající tamoxifen (651 případů). Studie také ukázala snížení výskytu vzdálených metastáz (324 případů ve skupině užívající anastrozol v porovnání s 375 případy ve skupině užívající tamoxifen) a snížení vzniku kontralaterálních karcinomů v anastrozolové skupině v porovnání s tamoxifenem. Ve skupině užívající anastrozol v porovnání se skupinou užívající tamoxifen rovněž o 17 % kleslo (avšak jen statisticky nevýznamně) riziko úmrtí související s rakovinou prsu (Subramanian et al., 2008).

U hormon-dependentních onemocnění prokázala studie BIG, že užití letrozolu významně snižuje riziko rekurence o 28 % u receptorově pozitivních nádorů, zejména pak riziko vzdálených rekurencí. Toto snížení distantních relapsů je vyšší u letrozolu než v případě užívání anastrozolu jak uvádí studie ATAC, ale příčina by měla být studována ve zkříženém porovnání. Oproti studii ATAC, dílčí analýzy BIG1-98 ukázaly statisticky významný přínos užívání letrozolu ve velmi postižené skupině pacientek

s nádorem větším než 2 cm. Přínos letrozolu byl také spatřen v případech ER+ bez ohledu na stav PR (Subramanian et al., 2008).

V současné době je u velmi rizikových žen studována chemoprevence inhibitory aromatázy. Studie IBIS-II se pokouší zhodnotit potencionální roli třetí generace inhibitorů aromatázy u vysoce rizikových postmenopauzálních žen v prevenci rozvoje karcinomu prsu. Paralelní studie IBIS-II duktálního karcinomu prsu (DCIS) bude zkoumat úspěšnost anastrozolu v porovnání s tamoxifenem v prevenci rekurence po vyoperování DCIS (Subramanian et al., 2008).

6.2 Steroidní sulfatáza

6.2.1 Fyziologický účinek STS

Druhou dráhou biosyntézy estrogenů v nádorové tkáni prsu je dráha steroidní sulfatázy (STS). STS hydrolyzuje biologicky inaktivní estrogen-sulfáty a androgen-sulfáty na jejich aktivní (nesulfátové formy) (Nakata et al., 2003).

6.2.2 Genová exprese, regulace a distribuce STS

Steroidní sulfatáza je členem nadrodiny dvanácti různých savčích sulfatáz. Gen kódující lidskou STS je lokalizován na distálním raménku chromosomu X a v chromozomální mapě je zakreslován v blízkosti genu Xp22.3-Xpter, je pseudo-autozomální a nepodléhá X-inaktivaci. Na chromosomu Y je pseudogen pro STS, který je transkripčně inaktivní, protože promotor a několik exonů bylo vymazáno (v dávné minulosti delecemi). Gen se skládá z 10 exonů a je rozložen na oblasti 146 kb. Velikosti intronů dosahují od 35 do 102 kb. Informace o molekulární regulaci STS jsou stále nedostatečné (Subramanian et al., 2008).

V buněčných liniích karcinomu prsu MCF-7 a MDA-MB-231 bylo pozorováno, že jak základní růstový faktor fibroblastů tak IGF-I v závislosti na dávce a čase zvyšují aktivitu STS. V rakovinných buňkách prsu MCF-7 regulují aktivitu STS k nadměrnosti jak TNF α tak IL-6. Tato regulace směrem vzhůru vzniká spíše posttranslačně než změnou v genové transkripci nebo ve stabilitě mRNA. Hladiny mRNA STS klesly, když byly buňky karcinomu prsu MCF-7 ovlivněny progestagenem – promegestonem (R-5020). Na druhou stranu bylo pozorováno, že expozice rakovinných buněk MCF-7 a

MDA-MB-231 progesteronu – medoxyprogesteron acetátu naopak aktivitu STS v těchto buňkách stimuluje (vlivem progesteronu klesá koncentrace, ale stoupá aktivita) (Subramanian et al., 2008).

Ke zjištění lokalizace STS v tumorech prsu bylo využito imunohistochemie. Imunoreaktivita STS byla detekována v cytoplazmě rakovinových buněk s expresí mRNA STS. Byla detekována ve fragmentech buněk karcinomu, ale ne u stromálních buněk (Subramanian et al., 2008).

6.2.3 Role steroidní sulfatázy v karcinomu prsu

STS hydrolyzuje cirkulující biologicky inaktivní estron-3-sulfát (E1S) na E1 v různých lidských tkáních. Působí i na dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS) (ten je považován za nejhojněji secernovaný steroid kůry nadledvin), který redukuje odstraněním sulfátové skupiny na DHEA (Nakata et al., 2003). DHEA může následně podstoupit redukcii na Adiol, u kterého je známa afinita k ER a může tak in vitro stimulovat růst ER pozitivních buněk karcinomu prsu. Maggioliniho studie (1999) ukázala, že Adiol za účelem stimulace růstu tumoru nemusí být konvertován na estrogen. Další studie rovněž prokázaly, že DHEA a Adiol mohou přímo aktivovat ER a stimulovat tak proliferaci buněk karcinomu prsu. Navíc současný výzkum ukazuje, že DHEAS, DHEA a Adiol mohou stimulovat proliferaci buněk rakoviny prsu in vitro a způsobovat vznik nádorů prsu in vivo. Tato jejich schopnost je blokována ER antagonistou nafoxidenem, ale nikoli inhibitory aromatázy. Tyto výsledky poskytují pádné důkazy o tom, že existuje stimulace buněčného růstu vlivem DHEAS prostřednictvím biochemické dráhy nezávislé na aromatáze, která může být potencionálně blokována inhibitory STS (Subramanian et al., 2008).

6.2.4 Role STS v karcinogenezi prsu

Zdá se, že exprese mRNA STS u maligní prsní tkáně je daleko vyšší než u normální tkáně, což souvisí s vyšší enzymatickou aktivitou STS, která byla u maligní prsní tkáně detekována. Bylo rovněž zjištěno, že exprese mRNA STS je nezávislým prognostickým indikátorem předvídajícím přežití bez relapsu. S vysokými hladinami exprese STS je spojena větší velikost tumoru, metastázy do lymfatických uzlin, zvýšené riziko rekurence a špatná prognóza (Subramanian et al., 2008).

Miyoshi a kol. analyzovali 187 tumorových vzorků a porovnávali je s 34 normálními. Zjistili, že u tumorové tkáně je průměrná exprese mRNA pro aromatázu ($P=0,005$), sulfatázu ($P=0,001$) a 17 β -HSD typu 1 ($P=<0,001$) vyšší než u normální tkáně. Podobně průměrná exprese mRNA sulfatázy byla vyšší u tumorů s nodální pozitivitou ($P<0,005$), ER negativitou ($P<0,05$) a s vysokým histologickým stupněm malignizace ($P<0,01$). Podobná studie s 97 pacientkami prokázala významně vyšší expresi STS v tumorech s pozitivními uzlinami (s metastázami v uzlinách) ($P=0,033$) a také signifikantní spojitost s kratším přežitím bez nemoci ($P=0,028$), zvýšenou mírou rekurence ($P=0,029$), ale bez efektu na celkové přežití. Evans a kol. nenašli žádný prognostický význam související s STS (Subramanian et al., 2008).

Nicméně nedávno byla dokázána, analyzováním Kaplan-Meierovy křivky přežití, významná korelace mezi vysokými hladinami mRNA STS a špatnými vyhlídkami na přežití. Hladiny mRNA STS korelovaly s hladinami mRNA aromatázy. Bylo pozorováno, že v případě pre- i postmenopauzálních žen je vysoká exprese mRNA STS spojena se špatnou prognózou. Tato zjištění vedla Subramaniana a kol. k myšlence, že dokonce i u premenopauzálních žen může hrát intratumorální syntéza estrogenu důležitou roli v růstu tumorů prsu (Subramanian et al., 2008).

6.2.5 Role inhibitorů steroidní sulfatázy v karcinomu prsu

Syntéza estrogenu pomocí STS (z E1S a DHEAS) nemůže být blokována inhibitory aromatázy, proto je STS novým molekulárním cílem pro léčbu estrogen-dependentních tumorů. Předpokladem docílení maximálního přínosu inhibitorů STS je přesné stanovení hladin STS a ER ve vzorcích tumoru. Užitečnost takovýchto léků určí až třetí fáze klinického testování. V současnosti jsou zkoumány jak steroidní tak nesteroidní inhibitory STS a zdá se, že jsou efektivní v potlačení proliferace estrogen-dependentních buněk MCF-7. Nyní bylo identifikováno několik účinných ireverzibilních inhibitorů STS. U všech těchto inhibitorů je aktivní částí molekuly aromatický kruh, na který se připojuje sulfátový ester. Ukázalo se, že inhibitor STS první generace STX64 je účinným inhibitorem u hlodavců. Blokuje schopnost E1S stimulovat růst tumoru prsu u samic potkanů, které podstoupily ovariectomii. Nyní byla vyvinuta druhá generace inhibitorů STS, jako je STX213. Když je tato látka podána hlodavcům v jedné dávce blokuje STS aktivitu mnohem déle než STX64. Tyto

inhibitory STS jsou po orálním podání aktivní s vysokou hladinou dostupnosti v biologickém systému. Po absorpci do krve z místa podání se váží na anhydrázu II v erythrocytech, což jim umožňuje projít játry bez podstoupení inaktivace first-pass efektem (Subramanian et al., 2008).

Poprvé byly použity inhibitory STS v I. fázi klinického zkoušení u postmenopauzálních žen s lokálně pokročilou nebo metastatickou rakovinou prsu, což bylo zveřejněno Reedem a kol. Inhibice STS aktivity byla spojena se signifikantní redukcí sérových koncentrací androstendiolu a estrogenu. Nečekaně také klesly sérové koncentrace androstendionu, hlavního substrátu aromatázy u postmenopauzálních žen. Tato zjištění naznačují, že u takovéto skupiny žen je androstendion získáván především z konverze DHEAS v periferních tkáních a ne, jak se původně předpokládalo, přímou sekrecí z kůry nadledvin. Slibné prvotní výsledky poskytuje vývoj duálních inhibitorů aromatázy a steroidní sulfatázy (Subramanian et al., 2008).

6.3 Estrogenová sulfotransferáza

Enzymatická aktivita EST byla dokumentovaná v různých buněčných liniích karcinomu prsu a rovněž v nádorových tkáních prsu. EST hraje důležitou roli v inaktivaci lokálních estrogenů (katalyzuje jejich sulfataci). Použitím micro-dissection/RT-PCR analýzy byla lokalizovaná mRNA EST jak ve žlázových buňkách karcinomu tak v intratumorálních stromálních buňkách. Imunoreaktivita EST nepřímo korelovala s velikostí tumoru nebo stavem lymfatických uzlin a byla signifikantně spojena s poklesem rizika rekurence a lepší prognózou. EST je nezávislým prognostickým faktorem u lidského karcinomu prsu a pokles jejich hladin může mít za následek změnu estrogenového metabolismu v hormon-dependentních karcinomech prsu (Sasano, 2006).

6.4 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

V současné době je u savců známo 15 typů 17 β -HSD. Všechny patří do rodiny dehydrogenáz/reduktáz krátkého řetězce (SDR) vyjma 17 β -HSD typu 5, která patří do rodiny aldo-keto reduktáz (AKR) (Jansson, 2009).

17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy se liší specifitou pro kofaktory, substráty, lokalizací v rámci buněk i tkání. Většinou jsou děleny do dvou velkých skupin na in

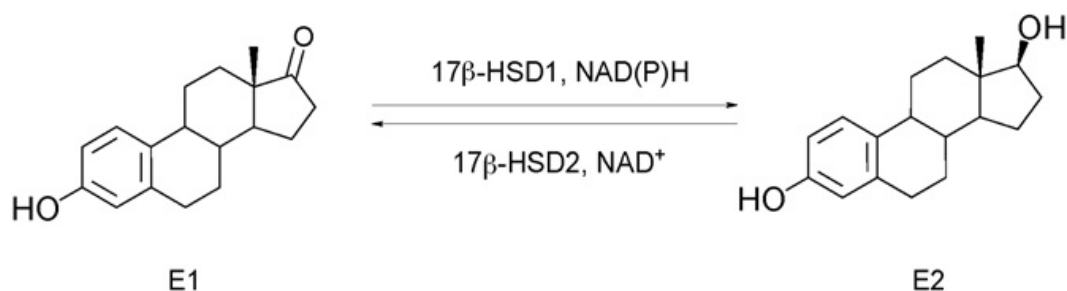
vivo oxidativní enzymy katalyzující NAD^+ dependentní inaktivaci receptorových ligandů (17 β -HSD typ 2, 4, 6, 8, 10, 11, 14) a na in vivo redukční enzymy (17 β -HSD typ 1, 3, 5, 7, 12), které jsou NADPH dependentní. Tyto redukční enzymy katalyzují vznik aktivních steroidů, jež se váží na příslušné receptory (Lukacik et al., 2006). Členové rodiny SDR působí jako oligomery, zatímco AKR enzymy působí jako monomery. SDR enzymy mají širokou substrátovou specifitu zahrnující steroidy, retinoly, mastné kyseliny a prostaglandiny. Jednotlivé typy 17 β -HSD se někdy označují jako izoenzymy. Toho by se mělo vyvarovat, protože nejsou kódovány homologními geny, jsou lokalizovány v různých částech buňky a preferují různé substráty stejně tak jako kofaktory (Jansson, 2009).

Pro všechny 17 β -HSD je charakteristické, že se podílí na katalýze oxidace nebo redukce uhlíku C17 steroidů. Tyto enzymy variabilně preferují substráty jako je estron, estradiol, testosteron, androstendion a dihydrotestosteron, jsou exprimovány v různých částech buňky a v odlišných tkáních (Jansson, 2009).

Názvosloví jednotlivých typů 17 β -HSD je v pořadí, ve kterém byly postupně popsány (Jansson, 2009).

6.4.1 17 β -HSD typ 1

Do roku 1990 byla 17 β -HSD1 jediným známým členem rodiny 17 β -HSD (Aka et al., 2009). 17 β -HSD1 je spojena s vysokou specifitou pro C18 steroidy. Převážně katalyzuje redukci E1 na biologicky aktivní E2, k čemuž využívá jako kofaktoru NAD(H) nebo NADP(H) (Jansson, 2009).



Obr. č. 8: Přeměna estronu a estradiolu katalyzovaná 17 β -HSD (Kruchten et al., 2009)

6.4.1.1 Genová exprese, regulace a distribuce 17 β -HSD1

Gen pro 17 β -HSD1 se nachází na chromozomu 17q12-21, tato oblast u karcinomu prsu často podléhá genetické přeměně (Jansson, 2009).

Aktivita 17 β -HSD1 je stimulována IL-6 a TNF α . Přeměnu E1 na E2 regulují rovněž IGF-1 a albuminu podobná molekula izolovaná z cytosolu karcinomu prsu (Subramanian et al., 2008). Exprese 17 β -HSD1 je v normálních epiteliálních buňkách nízká, ale v tumorových buňkách vzrůstá. Bylo detekováno velmi variabilní množství 17 β -HSD1 v závislosti na typu buněčné linie (Jansson, 2009; Suzuki, 2009).

6.4.1.2 Role 17 β -HSD1 v karcinogenezi prsu

V in vivo studiích byly transfekovány (tzn. geneticky modifikovány přidáním neobalené DNA) buněčné linie estrogen-dependentních MCF-7 buněk karcinomu prsu pomocí exprese schopného plazmidu s lidským HSD17B1. Enzymy účinně katalyzovaly přeměnu E1 na E2 a podporovaly růst estrogen-dependentních buněčných kultur MCF-7 v přítomnosti hormonálně méně aktivního E1. Buňky exprimující gen HSD17B1 rovněž tvořily estrogen-dependentní tumory u imunodeficientních laboratorních myší. Jakmile byla myším podána odpovídající dávka E1 došlo ke znatelnému rozdílu v růstu tumoru u netransfekovaných a HSD17B1 transfekovaných buněk MCF-7 (Subramanian et al., 2008).

Existuje několik imunohistochemických studií o 17 β -HSD1 v karcinomu prsu, které neprokázaly zřetelný vztah k prognóze a klinickým parametrům. Přesto však některé nedávné studie prokázaly, že karcinomové buňky prsních epiteliálních lézí pozitivní na 17 β -HSD1 mají sklon být pozitivní na ER a dále, že 17 β -HSD1 funguje jako nezávislý prognostický marker u pacientek s rakovinou prsu. Zároveň se předpokládá, že 17 β -HSD1 hraje důležitou roli v hormon-dependentních karcinomech prsu. Studie vedené Gunnarssonem a kol. prokázaly, že vysoká hladina 17 β -HSD1 indikuje zvýšené riziko vzniku pozdního relapsu karcinomu prsu. Autoři studie také naznačují, že abnormální exprese určitých typů 17 β -HSD má prognostický význam při onemocnění rakovinou prsu a že pozměněná exprese těchto enzymů může být důležitá v progresi rakoviny prsu. V další studii Gunnarssona a kol. bylo analyzováno 387 prsních tumorů na expresi mRNA a na počet genových kopií 17 β -HSD1

(několikanásobný počet těchto genů v chromosomech). Výsledky exprese byly klasifikovány do třech skupin: vysoká exprese ($>2,0$), pokročilá exprese (1,5 až 2,0) a nízká exprese ($<1,5$). Při takovéto kategorizaci tumorů byl zjištěn významný vztah mezi nadpočetnými kopiemi genu HSD17B1 a expresí mRNA. Také při analýze přežití pomocí Kaplan-Meierovy metody vykazovaly ER+ pacientky s amplifikací genu HSD17B1 horší přežití než pacientky bez této amplifikace, přestože tato skutečnost nebyla pozorována u ER- skupiny. Amplifikace genu měla prognostický význam ve vícefaktorové analýze upravené pro další klinicko-patologické proměnné (Subramanian et al., 2008).

Feigelson a kol. zjistili, že polymorfismus genu pro 17 β -HSD1 by mohl být využit k identifikování žen ve zvýšeném riziku rozvoje pokročilého karcinomu prsu. Do studie vybrali 1508 kontrolních subjektů a 850 případů s rakovinou prsu a následně analyzovali prevalenci dvou vysoce rizikových alel CYP17A2 a HSD17B1. Bylo zjištěno, že relativní riziko rozvoje pokročilé rakoviny prsu u těch případů, které měly 4 vysoce rizikové alely, bylo 2,21 krát větší v porovnání s těmi, které nenesou žádné. Současná studie Subramanian a kol., ve které analyzovali expresi mRNA ze 127 tumorových a 33 normálních tkání v principu tyto nálezy podporuje. Využitím Kaplan-Meierovy křivky pro přežití zjistili, že vysoká exprese aromatázy a 17 β -HSD1 korelovala se špatnou prognózou přežití. U pacientek s karcinomem prsu se zvyrazňuje významný vztah mezi špatným přežitím a vysokou expresí těchto enzymů (Subramanian et al., 2008).

6.4.1.3 Role inhibitorů 17 β -HSD1 v karcinomu prsu

S ohledem na výše zmíněné informace by mohla být inhibice aktivity nebo exprese intratumorální 17 β -HSD1 považována za možnou novou endokrinní terapii a mohla by značně přispět k supresi proliferace estrogen-dependentních tumorů. Estrogen-dependentní růst xenograftů (nádorových transplantátů) exprimujících HSD17B1 indukovaný vlivem přítomnosti E1 byl významně inhibován po podání inhibitorů HSD17B1. Po měsíční léčbě byla velikost tumoru redukována o 59,8 % v porovnání neléčenými tumory. Výsledky jasně ukazují, že enzym je potencionálním cílem pro farmakologickou inhibici estrogenového vlivu (Subramanian et al., 2008).

Potter a kol. nedávno oznámili, že jako vzor pro modelování specifických inhibitorů 17β -HSD1 by mohly sloužit modifikované steroidy s E-kruhem. Nicméně je důležité podotknout, že aromatáza a 17β -HSD1 jsou regulovány rozdílně a že u pacientek s karcinomem prsu nebyla mezi těmito dvěma enzymy dokumentovaná korelace. To bylo dokázáno v nedávné studii Suzukiho a kol. U 68 ze 111 pacientek s duktálním karcinomem prsu korelovala vysoká hladina 17β -HSD1 s výskytem nádorů se špatným histologickým stupněm a proto s horší prognózou. U pacientek s nadměrnou expresí 17β -HSD1, ale ne aromatázy, by tak mohla být inhibice 17β -HSD1 daleko efektivnější terapií než inhibice aromatázy. V budoucnu by se tak mohly využívat inhibitory 17β -HSD1 jako léky třetí anebo pozdější volby a to zvláště po rozvinutí rezistence na konvenční endokrinní terapii zahrnující selektivní modulátory ER nebo inhibitory aromatázy (Subramanian et al., 2008).

6.4.2 17β -HSD typ 2

17β -HSD2 katalyzuje oxidaci E2 na E1 (tedy opačně než typ 1). Dále se účastní přeměny testosteronu na 4-dion a 5-diolu na DHEA a hraje tak důležitou roli v periferní inaktivaci androgenů a estrogenů. K této katalýze využívá jako kofaktoru NAD^+ (Han et al., 2008). Určuje stálé hladiny estrogenů v cílových tkáních (Subramanian et al., 2008).

6.4.2.1 Genová exprese 17β -HSD typ 2

Gen pro 17β -HSD2 (HSD17B2) je lokalizován na chromosomu 16q24.1. Skládá se z pěti exonů a dává vzniknout proteinu o velikosti 42,7 kDa (Han et al., 2008). Poškození 16q24.1 je u rakoviny prsu poměrně častým jevem. Snížená exprese 17β -HSD2 by mohla být výsledkem mutace příslušného genu. Jansson a spol. zjistili, že HSD17B2 v karcinomu prsu není cílem pro inaktivaci mutací. Soudí naopak, že možným mechanismem, který vede k poklesu exprese 17β -HSD2 může být nesprávná aktivace/represe transkripčních faktorů vázajících se na promotor HSD17B2 nebo hypermethylace promotoru (Jansson, 2009).

6.4.2.2 Role 17β -HSD2 v karcinomu prsu

Enzym chrání epiteliální buňky prsu vyrovnáváním hladin E2 a E1. Gunnarsson a kol. detekovali přítomnost mRNA 17β -HSD2 v 69 % případech karcinomu prsu.

Naopak Suzuki a spol. zjistili, že 17β -HSD2 chyběla ve všech případech rakoviny prsu (Han et al., 2008).

Speirs a kol. zjistili, že v normální tkáni prsu převažuje oxidativní cesta ($E2 \rightarrow E1$) - tedy 17β -HSD2, kdežto v maligních tumorech prsu je dominantní redukční dráha ($E1 \rightarrow E2$), což chápeme jako 17β -HSD1 respektive nedostatek typu 2 (Han et al., 2008).

6.4.3 17β -HSD typ 5

17β -HSD5 je jediným enzymem, který patří do rodiny AKR, dle oficiální AKR nomenklatury je také označován jako AKR1C3 (Lukacik et al., 2006). Enzym katalyzuje NADPH dependentní redukci androstendionu na testosteron (Jansson, 2009). Lidská 17β -HSD5 působí také jako reduktáza 3α -HSD a 20α -HSD a rovněž jako prostaglandin syntáza (Lukacik et al., 2006). Z toho lze soudit, že aktivuje E1 na E2.

Oduwole a kol. (2004) zjistili, že pacientky s vysokou expresí tohoto enzymu v tumoru měly horší prognózu v porovnání s těmi, které měly hladiny 17β -HSD5 nízké nebo nulové. Jansson a kol. zjistili, že vysoká exprese 17β -HSD5 souvisela s významně zvýšeným rizikem pozdního relapsu u pacientek s ER+ tumory (Jansson, 2009).

6.4.4 17β -HSD typ 7

Dalším členem rodiny 17β -HSD je membránově asociovaný enzym 17β -HSD7. Enzym se podílí na konverzi E1 na E2 a rovněž se podílí na cholesterogenezi jako 3-ketosteroid reduktáza. Enzym byl detekován nejen v placentě, prsu a ovariích, ale také v játrech a mozku (Aka et al., 2009).

6.4.5 17β -HSD typ 12

Původně se myslelo, že 17β -HSD12 je zapojena pouze do syntézy mastných kyselin, ale z výsledků Luu-The a kol. vyplývá, že v redukci E1 na E2 je 17β -HSD12 stejně důležitá jako 17β -HSD1. Luu-The a kol. zjistili, že exprese 17β -HSD12 je u pacientek s tumorem prsu vyšší než v normálním epitelu prsu (Song et al., 2006).

Song a kol. zjistili významnou expresi 17β -HSD12 v 83 % případů karcinomu prsu. 17β -HSD12 byla detekována jak v cytoplasmě normálních buněk tak v jádrech buněk karcinomu. Zjistili také významnou korelaci mezi koncentrací 17β -HSD12 a

ER β , přičemž existují studie, které naznačují, že exprese ER β je spojena s horšími prognostickými rysy včetně nodální positivity tumorů. ER β a 17 β -HSD12 jsou častěji exprimovány v buňkách rakoviny než v nemaligních sousedních tkáních, z čehož může být dedukováno, že nadměrná exprese ER β a 17 β -HSD12 může vést ke zvýšené estrogen-dependentní proliferaci a progresi karcinomu prsu (Song et al., 2006).

6.4.6 17 β -HSD typ 14

17 β -HSD14 je jeden z posledních identifikovaných enzymů 17 β -HSD patřící do rodiny SDR. Je také znám jako DHRS10 nebo retSDR3. 17 β -HSD14 je NAD⁺ dependentní dehydrogenáza, která je zapojena do udržování rovnováhy mezi estronem a estradiolem, ale může také katalyzovat oxidaci androgenů a mastných kyselin (Jansson, 2009).

Po zjištění struktury lidského enzymu 17 β -HSD14 bylo odhaleno, že aktivní místo je přizpůsobeno steroidním substrátům. Transfekce 17 β -HSD14 do lidských buněk karcinomu prsu vedlo k významnému snížení hladin estradiolu v kultivačním prostředí dvou buněčných linií. Přestože snížení koncentrace estradiolu v experimentu bylo malé, enzym může mít význam v dlouhodobém a v intrakrinním systému. Nízká exprese mRNA 17 β -HSD14 v karcinomu prsu korelovala s poklesem přežití pacientek (Jansson, 2009).

6.5 Aldo-keto reduktázy a zaměření pracovní skupiny prof. Wsóla

6.5.1 Enzymy rodiny AKR

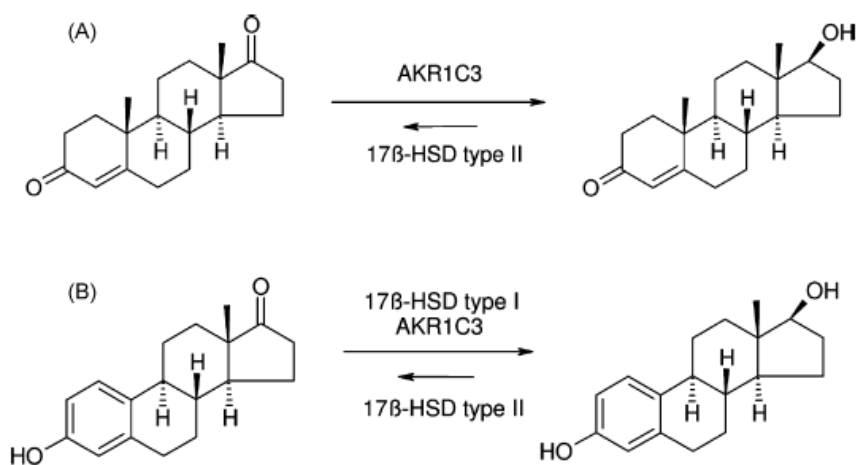
V projektu HUGO (Human Genome Project Data) bylo identifikováno 10 lidských enzymů AKR, z kterých se čtyři členové podrodiny AKR1C (AKR1C1 – AKR1C4) vyznačují pluripotentností k endogenním steroidům a nesteroidním xenobiotikům s karbonylovou skupinou. Enzymy AKR jsou NAD(P)(H) dependentní oxidoreduktázy s charakteristickou válcovitou strukturou ((α/β)₈ TIM barrel struktura). Přestože členové podrodiny AKR1C sdílí více jak 86 % aminokyselinové sekvenční identity, mají odlišné biochemické vlastnosti (Wsól et al., 2007). Obecně působí jako ketosteroidní reduktázy přeměňující aktivní steroidní hormony na jejich analogické neaktivní metabolity a naopak (katalyzují redukci ketosteroidů na pozici C3, C17 anebo

C20). Mají tak významnou roli v preceptorové regulaci působení steroidních hormonů (Škarydová et al., 2009).

AKR1C1 působí především jako $20\alpha[3\alpha]$ -HSD. Inaktivuje progesteron a může mít roli v rozvoji rakoviny prsu a endometria (Škarydová et al., 2009; Jin et al., 2009).

AKR1C2 působí jako periferní 3α -HSD typ 3, inaktivuje 5α -dihydrotestosteron na 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol především v cílových tkáních steroidních hormonů (prostatě) (Wsól et al., 2007; Jin et al., 2009).

AKR1C3 byla poprvé klonována Qinem a spol. (1993) z lidských jater a později Linem a spol. (1997) z prostaty. Její exprese byla zjištěna primárně v mléčné žláze a prostatě, následně v játrech, plicích, tenkém střevě, nadledvinách, mozku, děloze a varlatech (Novotná et al., 2008). AKR1C3 jsou přisuzovány četné enzymatické vlastnosti, působí jako 3α -HSD typu 2 i jako 17β -HSD typu 5. AKR1C3 pracuje jako 3-ketosteroid reduktáza (přeměňuje účinný androgen 5α -dihydrotestosteron na slabý androgen 3α -androstadiol) a jako 17-ketoreduktáza (katalyzuje přeměnu slabého androgenu Δ^4 -androsten-3,17-dionu na účinný testosteron a slabý estrogen estron na účinný 17β -estradiol) (Škarydová et al., 2009). AKR1C3 hraje také roli v biosyntéze prostaglandinů (Novotná et al., 2008). Vzhledem k zjištění, že k nadměrné tvorbě tohoto enzymu dochází v hormon-dependentních tkáních karcinomu prsu a prostaty je pochopitelné klást si otázky: a) zda není zodpovědný za transformaci slabých hormonů na jejich aktivnější formy a tedy za zvýšení růstové stimulace těchto nádorů a b) zda je zodpovědný za inaktivaci protirakovinných léčiv (Novotná et al. 2009).



Obr. č. 9: Fyziologická role AKR1C3 v metabolismu steroidů (Novotná et al., 2008)
 (A) tvorba testosteronu z Δ^4 - androsten-3,17-dionu; (B) tvorba estradiolu z estronu

AKR1C4 je jaterní specifická 3α -HSD typu 1, která katalyzuje s vysokou účinností tvorbu 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diolu (Jin et al., 2009). Je zapojena do clearance steroidních hormonů z cirkulace a biosyntézy žlučových kyselin (Novotná et al., 2008).

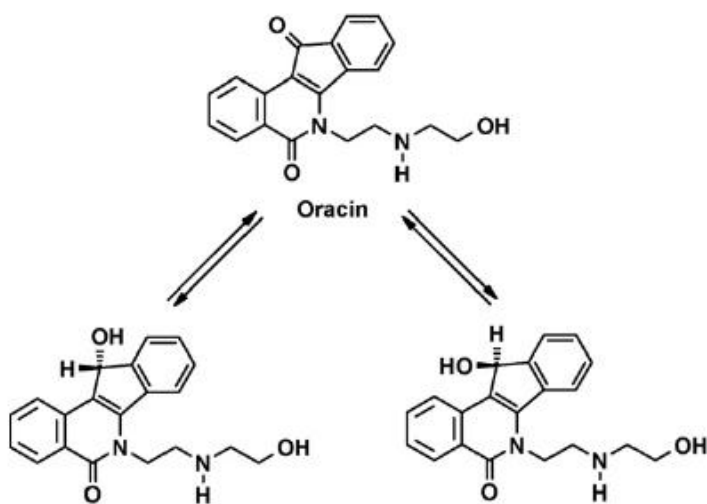
Při metabolismu estrogenů jsou AKR1C3 a AKR1C4 nejúčinnější ve vzájemné přeměně estronu a 17β -estradiolu, ale v estrogenových cílových tkáních jako je mléčná žláza je přítomný pouze AKR1C3. Lokální tvorba aktivního estrogenu je kritická, jelikož hladiny E2 jsou o řád vyšší (10krát vyšší) v nádorech prsu než v cirkulující plazmě. Důležité je, že exprese mRNA AKR1C3 byla zjištěna u 65 % - 83 % tkání karcinomu prsu. Zejména Vihko a spol. dokumentovali, že exprese mRNA AKR1C3 byla statisticky významně vyšší v nádorech prsu než v normálních tkáních. Rovněž demonstrovali, že skupina pacientek s nadměrnou expresí mRNA AKR1C3 měla horší prognózu než ostatní pacientky (Novotná, 2008).

6.5.2 Vliv enzymů AKR na chemoterapeutika s karbonylovou skupinou

Chemoterapie rakoviny v mnoha případech stále nedosahuje uspokojivých výsledků, vzácně celkové remise a odpovědí relativně krátkého trvání. Mezi hlavní problémy patří rezistence a orgánově specifická toxicita protirakovinných léčiv. Například antracykliny daunorubicin a doxorubicin podléhají karbonylové redukci jako nežádoucí metabolické cestě, jejímž působením vznikají sekundární alkoholy daunorubicinol a doxorubicinol, antitumorově méně účinné metabolity. Navíc jsou tyto metabolity zodpovědné za kardiotoxicitu, která limituje klinické použití mateřských látek. Proto jsou nepřetržitě hledány látky s novou strukturou, které by byly proti rakovině více účinné a méně toxické (Wsól et al., 2007).

Oracin je nadějným protirakovinným lékem, který se v současnosti nachází ve druhé fázi klinického testování. Z chemické struktury a mechanismu působení (interkalační látka) může být usuzováno na jeho podobnost s antitumorovými antibiotiky ze skupiny antracyklinů. Oracin působí i dalšími mechanismy. Je zapojen do inhibice topoizomerázy II, stimulace aerobního odbourání glukózy a v menší míře do tvorby laktátu v buňkách tumoru stejně tak jako do indukce apoptózy (Wsól et al., 2007).

Pracovníci katedry biochemických věd FaF UK prováděli farmakokinetické studie biotransformace oracinu a odhalili, že tato prochirální látka podstupuje metabolickou inaktivaci karbonylovou redukcí na uhlíku C11 za vzniku chirálního dihydrooracinu (DHO). Rovněž bylo zjištěno, že DHO je stereospecificky tvořen jak v mikrozomální tak v cytosolové frakci u všech studovaných druhů a stereospecifity je také dosaženo u pohlaví laboratorních zvířat (Wsól et al., 2007).



Obr. č. 10: Metabolická konverze oracinu (Wsól et al., 2007)

Karbonylová redukce je důležitým procesem uvnitř buňky a může být považována za první fázi biotransformace, která vede k inaktivaci a eliminaci xenobiotik. Zatímco oxidační reakce dráhou cytochromu P450, který má obvykle za následek zavedení hydrofilnějších skupin do lipofilní molekuly, karbonylová redukce ketonů a aldehydů vede ke vzniku primárních či sekundárních alkoholů, což usnadňuje jejich eliminaci. Vzhledem k tomu, že metabolická inaktivace přispívá k rezistenci na chemoterapii, jsou nezbytné detailní znalosti o enzymech, které se tohoto procesu účastní, tyto informace mohou pomoci zlepšit protirakovinný režim léčby současným podáváním příslušných inhibitorů těchto enzymů (Wsól et al., 2007).

V předešlé studii pracovníci katedry biochemických věd naší fakulty (Wsól et al., 2007) purifikovali AKR1C1, 1C2 a 1C4 lidských jater, určili kinetickou a katalytickou účinnost a prokázali, že tyto enzymy se podílejí na karbonylové redukcí oracinu na neaktivní metabolit DHO (Novotná et al., 2008). Navíc zkoumali stereospecifitu tvorby redukovaného oracinu. Zatímco AKR1C2 a 1C4 jsou výhradně stereospecifické pro tvorbu (+)-DHO, pro AKR1C1 byla zjištěna tvorba asi 3 % (-)-

DHO. Na druhou stranu, aktivita AKR1C1 v celkové redukci oracinu byla o jeden řád vyšší v porovnání s AKR1C2 a 1C4 (Wsól et al., 2007). V této studii netestovali AKR1C3, neboť u tkáně zdravých jater jsou exprimovány jen velmi nízké hladiny (Novotná et al., 2008).

Ve studii Novotné a spol. (2008) pracovníci katedry biochemických věd úspěšně klonovali lidskou AKR1C3 z cDNA knihovny a dokázali, že tento člen podrodiny AKR1C je schopen katalyzovat karbonylovou redukci oracinu s vysokou účinností. Navíc zjistili, že AKR1C3 zprostředkovává redukci karbonylu na C13 doxorubicinu (nejběžněji používaného protirakovinného léčiva) na jeho inaktivní hydroxymetabolit doxorubicinol. Jelikož AKR1C3 je exprimovaný ve vyšší míře v hormonálně dependentních malignitách jako je rakovina prostaty a prsu, spolupodávání inhibitorů AKR1C3 by mohlo zvýšit chemoterapeutickou účinnost oracinu a doxorubicinu a současně snížit riziko kardiomyopatie při léčbě doxorubicinem.

Kinetiky redukce karbonylu u oracinu byly stanoveny inkubací 0,025 až 0,800 mM finálních koncentrací substrátu s rekombinantním AKR1C3 (= s enzymem AKR1C3 připraveným pomocí genového inženýrství) (3,52 μg v jednom vzorku) v 0,1 ml 50mM pufru fosforečnanu sodného, pH 7,4, obsahujícím NADPH generující systém (finální koncentrace: 3 mM NADP^+ , 20 mM glukózo-6-fosfátu, 1.8 jednotky/0.1 ml glukózo-6-fosfát dehydrogenázy 10 mM MgCl_2). Reakční směsi byly inkubovány jednu hodinu a pak byla inkubace zastavena přidáním 40 μl 30 % ledového amoniaku a zchlazením na 0 °C. Vzorky byly extrahovány pomocí 0,3 ml ethylacetátu a organická fáze byla odpařena pod vakuem. Rezidua pak byla rozpuštěna v mobilní fázi a analyzována pomocí HPLC (Novotná et al., 2008).

Kinetiky karbonylové redukce doxorubicinu byly studovány při finálních substrátových koncentracích pohybujících se od 0,05 do 1,00 mM v přítomnosti rekombinantní AKR1C3 (8,8 μg v jednom vzorku). Reakční směsi (0,15 ml) obsahovaly stejný pufr a NADPH generující systém jako předchozí zmiňovaná směs. Reakce byly zastaveny po šedesáti minutách přidáním 0,15 ml 0,2 M ledového roztoku hydrogenufosforečnanu sodného, pH 8,4, a zchlazením na 0 °C. Extrakce byly provedeny použitím 1,2 ml směsi chloroformu a heptan-1-olu v poměru 9:1. Organické fáze byly přeneseny do další zkumavky, jež obsahovala 0,15 ml 0,1 M ortho-fosforečné kyseliny. Vodné fáze byly sebrány a analyzovány pomocí HPLC (Novotná, 2008).

Z hlediska hypotézy, která zajímá naše pracoviště je možno uvažovat, že enzymy jako AKR1C3 mohou stimulovat k růstu hormonálně dependentní nádory jako je karcinom prsu účinkem na molekuly steroidních hormonů. Navíc, z hlediska hypotézy řešené na katedře biochemických věd, lze shrnout, že lidská AKR1C3 hraje významnou roli v inaktivaci protirakovinných léčiv během chemoterapie.

7 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

7.1 Laboratorní stanovení estradiolu

Současné laboratorní vyšetřovací metody hormonů využívají principu vysoce citlivé a specifické imunoanalýzy založené na reakci antigen – protilátka. Využívá se unikátních vlastností protilátek reagovat s antigenem specificky a při velmi nízkých koncentracích obou komponent reakce a relativně pevné vazby ve vzniklém imunokomplexu. Protilátky jsou tvořeny proti konkrétním vazebným místům na molekule antigenů zvaným epitopy. Lymfocyty mohou být fúzovány s myelovými buňkami a separovány tak, že lze získat klonny produkující protilátku proti jednomu jedinému epitopu – tzv. monoklonální protilátky. Lze použít i větší množství aktivovaných lymfocytových linií, které produkují směs protilátek proti jednotlivým epitopům antigenu – tzv. polyklonální protilátky. (Henzl, 2002).

Steroidy, na rozdíl od peptidových hormonů a proteohormonů, se většinou stanovují kompetitivní imunoanalýzou, kde značený antigen (Agn^+) a neznačený antigen (Agn) stanovovaný ve vzorku soutěží o vazebné místo(a) protilátky (Ab) (Agn^+ se přidává ve známém množství). Získaná kalibrační závislost, kde se na ose souřadnic vynáší příslušná měřená fyzikální veličina podle použitého způsobu značení (radioaktivita, fluorescence, absorbance apod.) proti koncentraci antigenu, je klesající křivka esovitého tvaru. U steroidních sloučenin se dává přednost polyklonálním protilátkám (Hampl, 2008; Doležalová, 1995b). Nekompetitivní imunoanalýza se používá při stanovení antigenů s minimálně dvěma vazebnými místy. Tato metoda používá dvě specifické protilátky, první Ab je neznačená a v nadbytku je vázaná na pevnou fázi, druhá je značená a je namířena proti jinému vazebnému místu Agn , přičemž obě Ab jsou monoklonální (Doležalová, 1995b).

Ke stanovení sérových hladin estradiolu se v současnosti využívají metody radioimunoanalýzy (RIA), enzymoimunoanalýzy (EIA), enzymoimunoanalýzy na mikročásticích (MEIA) a fluorescenční polarizační imunoanalýzy (FPIA) (Doležalová, 1995a).

7.1.1 Radioimunoanalýza (RIA)

RIA je kompetitivní technika s heterogenním uspořádáním. Pracuje se třemi reaktanty, jimiž jsou stanovovaný antigen Agn, značený antigen Agn^+ a Ab přidaná v limitovaném množství (Doležalová, 1995b). Ke značení antigenu se používá radioaktivní prvek např. radioaktivní izotop jodu ^{125}I nebo tritium ^3H . Radioimunoanalýza umožňuje stanovit biologicky aktivní látky v hladinách nanogramů až pikogramů na mililitr biologické tekutiny (Henzl, 2002).

Pro analýzu je nutné sestavit kalibrační křivku, která se sestavuje změřením standardních roztoků antigenů o známých koncentracích (Doležalová, 1995b).

7.1.1.1 Klasická RIA

U klasické RIA jsou všechny tři reaktanty (stanovovaný Agn, Agn^+ i Ab přidaná v limitovaném množství) v tekutém stavu - v roztoku.

Metoda je založena na soutěžení dvou forem téže molekuly (Agn a Agn^+) ve vazbě na limitované množství specifické protilátky. K analyzovanému vzorku se přidá známé množství Agn^+ a Ab proti stanovovanému Agn a provede se inkubace.

V průběhu inkubace dojde ke vzniku imunokomplexů Agn-Ab a Agn^+ -Ab. Jejich množství závisí na koncentraci stanovovaného antigenu Agn ve vzorku a přidaného izotopem značeného antigenu Agn^+ . Poněvadž se protilátka Ab se přidává jen v malém limitovaném množství, zůstanou v roztoku molekuly nezreagovaných Agn a Agn^+ . Po ukončení imunoreakce jsou v roztoku přítomny dva radioaktivní reaktanty - komplex Agn^+ -Ab i volný Agn^+ . U této heterogenní techniky se před měřením radioaktivity musí odstranit jedna či druhá složka, protože obě dávají signál (Doležalová, 1995b). Platí, že v jakém vzájemném poměru vstupuje značený a neznačený antigen do reakce, v takovém z ní vystupuje (Henzl, 2002).

Měří-li se radioaktivita imunokomplexu, pak je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného Agn. Naopak radioaktivita naměřená u frakce s volným nezreagovaným Agn^+ se bude s rostoucí koncentrací Agn zvyšovat.

Nejčastěji se měří radioaktivita imunokomplexu Agn^+ -Ab a volný Agn^+ se musí odstranit některou separační technikou. Obvykle se používá způsob vysrážení

imunokomplexů (tvoří velmi jemný zákal) polyethylenglykolem nebo druhou protilátkou (byla-li specifickou protilátkou proti stanovovanému Agn např. králičí Ab, pak imunokomplexy vysráží např. ovčí Ab) či směsí obou látek. Z původně jemného zákalu imunokomplexů pak vznikne sraženina, která se izoluje centrifugací. Po odstranění všech volných Agn a Agn⁺ promytím a odsátím se měří radioaktivita imunokomplexu Agn⁺-Ab přímo ve zkumavce (Doležalová, 1995b).

K měření radioaktivity se v závislosti na použitém radioizotopu používá detektor γ -záření v případě izotopu ¹²⁵I nebo β -záření v případě tritia. Nevýhodou použití ¹²⁵I jako markeru je krátký poločas rozpadu a tedy krátká doba použitelnosti (Henzl, 2002).

7.1.1.2 RIA na pevné fázi

Na rozdíl od klasické RIA se ke směsi stanovovaného Agn a přidaného značeného Agn⁺ nepřidává Ab v roztoku, ale je v limitovaném množství vázána na pevnou fázi - imunosorbent (Ab-L). Imunokomplexy Agn-Ab-L a Agn⁺-Ab-L se pak již nemusí oddělovat od Agn⁺ separačními technikami, ale mohou se od volných Agn a Agn⁺ přímo oddělit např. centrifugací a následným odsátím vodní vývěvou. Jako pevná fáze mohou sloužit např. nerozpustné částice celulózy, polyakrylamidový gel, Sephadex apod.

U techniky pevné fáze může být protilátka vázána v limitovaném množství na povrch sialinizovaných skleněných kuliček nebo na vnitřní stěnu zkumavek z polystyrenu, polypropylenu nebo polytetrafluorethylenu. Stěny reakčních zkumavek jsou potaženy protilátkou, na kterou se kompetitivně naváže Agn i Agn⁺. Po ukončení reakce se roztok s nezreagovanými Agn a Agn⁺ odsaje a po vypláchnutí stěn zkumavky se měří radioaktivita imunokomplexu Agn⁺-Ab- L.

Při technice pevné fáze se rovněž využívají speciální sorbenty z magnetizovatelných materiálů. Analýza se provádí v polystyrenových zkumavkách. Protilátka se v limitovaném množství naváže na magnetický nosič a po ukončení reakce se volný Agn⁺ oddělí od antigenu vázaného v imunokomplexu magneticky tím, že se vloží zkumavky do stojanu se zabudovanými magnety a volný Agn⁺ se odstraní odsátím (Doležalová, 1995b).

7.1.2 Příbuzné radioizotopové metody

7.1.2.1 Radioreceptorová analýza (RRA)

Radioreceptorová analýza se od metod RIA liší typem vazby mezi stanovovanou látkou a specifickým vazebným činidlem (nejde o imunochemickou vazbu). Tato mikroanalytická metoda využívá specifické interakce endogenních biologicky aktivních látek se specifickými vazebnými místy (receptory) přítomnými v určitých cílových tkáních.

Principem RRA je konkurence izotopem značeného ligandu s neznačeným ligandem o receptor. Specifickým vazebným činidlem je preparát tkáňového receptoru (specifický vazebný protein). Radioindikátorem je značený ligand, kterým je určovaná látka.

Praktický význam mají i opačné postupy, kde se stanovují koncentrace receptorů ve tkáních (např. stanovení koncentrace ER v nádorové tkáni prsu) (Doležalová, 1995b).

7.1.3 Enzymoimunoanalýza (EIA)

Enzymová imunoanalýza byla jednou z prvních alternativ k metodám RIA (Henzl, 2002). V klasickém pojetí se ke značení používá enzym (E), který dává barevnou reakci se svým substrátem. Po ukončení enzymové reakce se měří absorbance barevného produktu.

Ke značení haptenu, antigenů nebo protilátek se nejčastěji používá křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza apod. Pro imunoreagencie značené alkalickou fosfatázou se jako substrát používá p-nitrofenylfosfát, pro peroxidázu peroxid vodíku a uvolněný kyslík při enzymové reakci oxiduje bezbarvý chromogen (o-fenylendiamin) na barevný produkt. Výsledné zbarvení se měří fotometricky.

Principem kompetitivní enzymoimunoanalýzy je soutěžení stanovovaného antigenu Agn ve vzorku a antigenu značeného enzymem Agn^E o vazebná místa na specifické protilátce. Po proběhlé inkubované reakci budou v reakční směsi přítomny imunokomplexy Agn-Ab a Agn^E-Ab i volný nezreagovaný Agn a Agn^E. Oba značené produkty poskytují specifickou reakci se substrátem. Lze tak měřit enzymová aktivita

nezreagovaného Agn^{E} (u techniky homogenní imunoanalýzy – EMIT) nebo enzymovou aktivitu imunokomplexu $\text{Agn}^{\text{E}}\text{-Ab}$ (u techniky heterogenní enzymoimunoanalýzy – ELISA).

Výhodou enzymoimunoanalytických metod je jednoduchost, rychlost a možnost automatizace. Materiál před analýzou není nutné upravovat extrakcí a na rozdíl od RIA není nutná drahá přístrojová technika (stačí spektrofotometr) a odpadá i práce s radioaktivním zářením (Doležalová, 1995b).

7.1.4 Enzymová imunoanalýza na mikročasticích (MEIA)

Jde o nekompetitivní sendvičovou metodu enzymoimunoanalýzy (EIA), kde pevnou fází tvoří mikročástice, na kterých je v přebytku navázaná protilátka proti stanovovanému antigenu. Do reakce vstupuje stanovovaný antigen Agn , protilátka Ab navázaná v nadbytku na mikročasticích ($\square\text{-Ab}$), enzymový konjugát a fluorogenní substrát.

Na rozdíl od předchozí techniky EIA, kde se měřila intenzita zbarvení fotometricky, u techniky MEIA reaguje enzym označený jako sendvič ($\square\text{-Ab-Agn-Ab}^{\text{E}}$) s fluorogenním substrátem. Měří se intenzita fluorescence, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

Každá molekula antigenu vytvoří se svoji protilátkou na mikročasticích imunokomplex. Po promytí se přidá enzymový konjugát obsahující alkalickou fosfatázu, který se naváže na imunokomplex vázaný na mikročasticích, vznikne tak komplex protilátka – antigen – enzymový konjugát. Mikročástice nesoucí tento komplex se zachytí na skleněných vláknech, zatímco ostatní reaktanty se odstraní vymytím puforem. Po vymytí se přidá fluorogenní substrát, který je alkalickou fosfatázou štěpen a uvolní se fluorescenční látka, jejíž množství odpovídá koncentraci stanovovaného analytu. Fluorescence se měří kineticky.

7.1.5 Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)

Fluorescenční polarizační imunoanalýza je kompetitivní homogenní metoda, při které se měření provádí v polarizovaném světle. Využívá různé rychlosti rotace malých a velkých molekul, které vedou ke změně polarizace. Následně se měří intenzita polarizovaného světla.

Wolframová halogenová lampa vysílá světlo různých vlnových délek. U techniky FPIA se před zdroj světla vkládá interferenční filtr, který propouští jen světlo o vlnové délce 481-489 nm (modré světlo). To dále prochází tekutým polarizačním krystalem, ze kterého vychází polarizované modré světlo. Vloží-li se do polarizovaného světla fluoreskující látka, je uvedena do excitovaného stavu. Po excitaci se fluorofor vrací do ustáleného stavu a vyzařuje světlo o vlnové délce 525-550 nm (zelené světlo).

Je-li fluoreskující látka vázána s velkou molekulou, nemůže volně rotovat a vyzařované zelené světlo bude kmitat ve stejné rovině jako modré polarizované světlo, tzn. polarizace bude zachována. Naopak v případě, že je fluoreskující látka vázána s malou molekulou, může volně rotovat a emitované zelené světlo bude kmitat v jiné rovině než modré polarizované světlo a polarizace se zeslabí nebo ztratí.

Do reakční kyvety obsahující vzorek se stanovovaným Agn se přidá antigen značený fluoresceinem Agn^F a Ab v malém limitovaném množství. Oba antigeny soutěží ve vazbě na Ab, přičemž se na ni váží ve stejném poměru, v jakém byly Agn a Agn^F zastoupeny ve směsi. Po ukončení reakce zůstanou v roztoku značené i neznačené imunokomplexy a volné antigeny.

Na kyvetu s reaktanty dopadá polarizované modré světlo. Po průchodu kyvetou je jeho intenzita ovlivněna množstvím volného Agn^F. Měří se intenzita polarizovaného světla, která je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného Agn (Doležalová a kol., 1995 b).

7.2 Stanovení intratumorálních hladin estradiolu

V české literatuře se nám nepodařilo vyhledat popisy metod stanovení intratumorálního estradiolu, ale pouze jeho detekci v séru pomocí imunoanalytických metod. Proto jsme hledali příslušné informace v anglicky psaných textech. Ze zahraničních informačních zdrojů jsme zjistili nejčastěji používané metody, které používají špičkové laboratoře. I oni využívají imunochemické reakce (RIA), které navazují na analytické metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Nagaya et al. (1997) stanovovali intratumorální koncentrace estronu a estradiolu pomocí senzitivní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v kombinaci s radioimunoanalýzou RIA (Nagaya et al., 1997). Falk, Gentschein et al. (2008)

stanovovali hladinu steroidních hormonů v tukové prsní tkáni. Tuk získaný z adipocytů po enzymatickém působení na tukovou tkáň extrahovali a pomocí chromatografie oddělili steroidy, které následně kvantifikovali pomocí RIA (Falk, Gentschein et al., 2008). Falk, Xu et al. (2008) se zabývali metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) ke kvantifikaci 15 současně se vyskytujících estrogenů a metabolitů estrogenů v moči (Falk, Xu et al., 2008). Xu et al. (2007) používali pro měření absolutních množství volných (nekonjugovaných) a celkových (konjugovaných a nekonjugovaných) endogenních estrogenů a estrogenových metabolitů v lidském séru metodu HPLC-MS, při čemž používali monitoring pomocí vybraných reakcí (Xu et al., 2007). Zeleniuch-Jacquotte et al. (1995) se zabývali vztahem volného estradiolu – nevázaného na SHBG a rizikem rakoviny prsu, respektive vztahem mezi estradiolem a jeho volnou a SHBG vázanou frakcí. Uvádí, že vztah byl popsán již ve studii New York Women's Health (P. Tomiolo et al., J. Natl. Cancer Inst., 87:190-197, 1995) (Zeleniuch-Jacquotte et al., 1995).

8 DISKUZE

8.1 Vyšetřování intratumorální hladiny estradiolu a jeho možný přínos pro pacientky s karcinomem prsu

Estrogenová závislost karcinomu prsu byla zjištěna u více než dvou třetin postmenopauzálních a přibližně 60 % premenopauzálních pacientek (Subramanian et al., 2008; Nakata et al., 2003). Estradiol, nejúčinnější estrogenový mitogen, po navázání na ER cílové buňky stimuluje tvorbu a sekreci peptidových růstových faktorů, které způsobují proliferaci rakovinných buněk (Strnad, 2001; Subramanian et al., 2008). U postmenopauzálních žen s karcinomem prsu jsou hladiny intratumorálního E2 10 – 40krát vyšší než jeho sérové hladiny (Nakata et al., 2003). Tento E2 se tvoří přímo v nádoru nebo v jeho okolí (Strnad, 2004).

Pro farmakologickou léčbu estrogen-dependentních karcinomů prsu u postmenopauzálních žen jsou v současné době dostupné dvě hlavní metody – selektivní modulátory ER (SERM) anebo inhibitory aromatázy. Při rutinní léčbě tohoto typu rakoviny prsu byl dlouhou dobu doporučován jako lék první volby tamoxifen (SERM) (Abrahámová, 2008), přestože statisticky významnou skupinu karcinomů tvoří estrogen-dependentní tumory s lokální produkcí estrogenů, u kterých je výhodnější použití inhibitorů aromatázy, které by tuto produkci eliminovaly např. anastrozol, letrozol nebo exemestan (Nakata, 2003; ČLS JEP, 2009).

Tyto léčebné postupy jsou účinné na časně i pokročilé stadium rakoviny prsu, přesto rezistence na SERM nebo inhibitory aromatázy (de novo anebo získaná) jsou klinickým problémem (Nakata et al., 2003). Proto detailní znalosti o mechanismu vzniku estradiolu v nádorové tkáni prsu mohou být využity k efektivnější terapii, u které by se cíleně vybíraly inhibitory enzymů podílející se na biosyntéze E2.

Nadměrná exprese enzymů, které se podílejí na lokální tvorbě estrogenů (především E2), hraje důležitou roli v patogenezi a v rozvoji hormon-dependentního karcinomu prsu a může souviset s rozvojem agresivnějšího onemocnění a s horšími vyhlídkami s ohledem na zvyšující se pravděpodobnost lokálních a distálních metastáz (Subramanian et al., 2008). Nádory s takto zvýšeným rizikem by možná byly

odhalitelné předem – vyšetřením koncentrace estradiolu uvnitř nádoru. O intratumorální produkci estrogenů se ví již přes 25 let (Tilson-Mallett, 1983; Santner, 1984), ale do rutinního vyšetřování pacientek s karcinomem prsu nebylo stanovení intratumorálního ani sérového E2 zařazeno (ČLS JEP, 2009).

8.2 Cesty extraovariální tvorby E2

8.2.1 Aromatáza

Přibližně u 50 – 60 % všech karcinomů prsu vykazuje aromatázový komplex vyšší aktivitu, než jaká je v periferní cirkulaci (Strnad, 2001). Již několik výzkumných skupin dokázalo, že umístění tumoru v rámci prsu přímo ovlivňuje aktivitu aromatázy (vyšší expresi mRNA CYP19) v daném kvadrantu v porovnání s oblastmi od tumoru vzdálených nebo nemaligních. Nadměrná exprese aromatázy je úzce spojena se špatnými klinickými výsledky. U žen s karcinomem prsu, u nichž došlo k lokálním rekurencím a distálními metastázám nebo u těch, které na rakovinu prsu zemřely, byly ve stromálních tukových buňkách primárně vyoperovaného nádoru hladiny aromatázy nebo její mRNA vyšší než u pacientek, které byly po deseti a více letech bez nálezu. Zajímavou skutečností je, že Brodie a kol. zjistili, že tumory s relativně vysokou aromatázovou aktivitou inklinují k ER pozitivitě (Subramanian et al., 2008). Studie BIG i ATAC prokázala, že u postmenopauzálních pacientek s ER+ karcinomem prsu je užití selektivních inhibitorů aromatázy výhodnější než podání tamoxifenu (Subramanian, 2007).

8.2.2 Steroidní sulfatáza a estrogenová sulfotransferáza

STS je enzymem aktivujícím estrogenu. Před několika lety byla dokázána významná korelace mezi vysokými hladinami mRNA STS a špatnými vyhlídkami na přežití pacientek s karcinomem prsu. Hladiny mRNA STS korelovaly s hladinami mRNA aromatázy. V případě pre- i postmenopauzálních žen je vysoká exprese mRNA STS spojena se špatnou prognózou (Subramanian et al., 2008). Je dobře známo, že u postmenopauzálních pacientek jsou plazmatické i nádorové hladiny E1S mnohem vyšší než hladiny E2. Lokálně tvořené estrogenu by tak mohly být z části syntetizovány z velkého množství E1S působením STS, která je v prsní tkáni přítomna (některé studie dokládají, že až 80 % karcinomů prsu je barvitelných anti-STS protilátkami) (Nakata et

al., 2003). STS je proto novým molekulárním cílem pro léčbu estrogen-dependentních tumorů. Předpokladem docílení maximálního přínosu inhibitorů STS je přesné stanovení hladin STS a ER ve vzorcích tumoru (Subramanian et al., 2008).

Významnou roli v hormon-dependentním karcinomu prsu hraje také EST (enzym inaktivující estrogenu), jejíž enzymová aktivita byla zaznamenána v různých buněčných liniích tumoru prsu a tumorových prsních tkáních. EST sulfonuje estrogenu na biologicky inaktivní estrogen sulfáty. Sasano a kol. zjistili, že imunoreaktivita EST nepřímo korelovala s velikostí tumoru nebo stavem lymfatických uzlin a byla významně spojena s poklesem rizika rekurence a se zlepšením prognózy. EST je nezávislým prognostickým faktorem lidského karcinomu prsu a její pokles může resultovat ve změněný metabolismus estrogenů v hormon-dependentních karcinomech prsu (Sasano et al., 2006). Stimulace aktivity EST by mohla být potencionálním přínosem v terapii karcinomu prsu. Například studie Gonzala a kol. dokázala, že melatonin ve fyziologických koncentracích stimuluje aktivitu a expresi EST a je tak zajímavou látkou pro klinické použití v léčbě karcinomu prsu. Navíc bylo zjištěno, že v buněčné linii MCF-7 je ve fyziologických koncentracích melatoninu inhibována STS a 17 β -HSD1 (Gonzales et al., 2008).

8.2.3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

Důležitým enzymem v biosyntéze intratumorálního estradiolu je 17 β -HSD. V současné době je známo 15 typů tohoto enzymu, které jsou do tvorby estradiolu zapojeny různě (Jansson, 2009). Na zvyšování lokálních hladin estradiolu v karcinomu prsu se podílí především 17 β -HSD1, 17 β -HSD5 (=AKR1C3), 17 β -HSD7 a 17 β -HSD12 zatímco 17 β -HSD2 a 17 β -HSD14 hladinu aktivního E2 snižují. Vývoj inhibitorů estrogen aktivujících 17 β -HSD by mohl mít přínos v terapii pacientek s vysokou expresí těchto enzymů (Jansson, 2009; Han, 2008; Song, 2006). Navíc enzymy, které se zapojují do metabolismu estrogenů (AKR1C3), se mohou zároveň podílet na inaktivaci některých cytostatik využívaných v terapii karcinomu prsu jako je doxorubicin. Inhibice příslušných enzymů by tak přispívala k vyšší účinnosti těchto léčiv a ke snížení nežádoucích účinků metabolitů, které jejich katalýzou vznikají (Novotná, 2008).

8.3 Možnost rutinního vyšetření estradiolu v nádorech v klinických laboratořích

V současné době je v rakovinné tkáni prsu rutinně stanovována přítomnost steroidních receptorů ER a PR. Toto hodnocení je důležité pro výběr léčebného postupu, přičemž u ER+ karcinomů prsu je vhodné uvažovat o antiestrogenové terapii (Abrahámová, 2008).

V české literatuře jsme nenašli informace o stanovení intratumorální hladiny estradiolu respektive zdá se, že rutinní vyšetření estradiolu v nádorech prsu se u nás neprovádí. Jsou vypracovány metody pro stanovení plazmatických (sérových) hladin estradiolu, které využívají imunochemické principy RIA či EIA. Nabízí se, že by tyto metody mohly být využity ke stanovení intratumorální hladiny E2. Pokud by se bioptický vzorek nádorové tkáně standardně upravil a převedl do tekuté fáze tak, aby mohl být zpracován na imunochemickém analyzátoru (konzultace se společností SEDIA), mohla by se následně stanovit koncentrace E2 v tumoru. Toto vyšetření by tak mohlo doplňovat a upřesnit diagnostiku karcinomu prsu zvláště u hraničních hodnot ER.

Rutinní stanovení E2 přímo v nádorech se pravděpodobně neprovádí ani v zahraničí. Přesto se s ním v literatuře setkáváme a tento stav lze tedy chápat tak, že by se toto vyšetření mohlo přenést z výzkumu do praxe, pokud by přínos pro pacientky vysvětlovaný v předchozích odstavcích převážil nad finanční zátěží kliniky. V zahraničních výzkumných laboratořích používají ke stanovení hladin intratumorálního E2 separační metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v kombinaci s imunochemickou analýzou.

Pokud by u postmenopauzálních pacientek byla zjištěna vysoká koncentrace ER anebo intratumorálního E2, mohlo by následovat vyšetření hladin enzymů, které se na tvorbě E2 podílejí. Z vyhodnocení koncentrací enzymů by tak mohlo být usuzováno na nejvýhodnější léčbu (využití příslušných inhibitorů). Pokud by však bylo vyšetření těchto enzymů finančně méně náročné než stanovení E2 v nádorové tkáni, mohlo by se provádět pouze vyšetření enzymů a to u všech pacientek s karcinomem prsu.

8.4 Možnosti vyšetřování estradiolu v nádorech na farmaceutické fakultě z hlediska souvislosti se zaměřením katedry biochemie

Pracovní skupina prof. Wsóla na Katedře biochemických věd FaF UK se věnuje studiu enzymu AKR1C3, který se významně podílí na prereceptorové regulaci estrogenů. Jeho exprese byla zjištěna primárně v mléčné žláze a prostatě. AKR1C3 jsou přisuzovány vlastnosti 3 α -ketosteroid reduktázy a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy. Expres mRNA AKR1C3 byla zjištěna v 65 – 83 % tkání karcinomu prsu. Zejména Vihko a spol. dokumentovali, že hladina mRNA AKR1C3 je statisticky významně vyšší v nádorech prsu než v normálních buňkách. Rovněž zjistili, že skupina pacientek s nadměrnou expresí mRNA AKR1C3 měla horší prognózu než ostatní pacientky (Novotná, 2008). Ačkoli se prof. Wsól věnuje primárně problematice metabolické inaktivace protirakovinných léčiv (např. doxorubicinu), která se používají zejména u ER- karcinomů (ČSL JEP, 2009), působením AKR1C3, mohli bychom využít jeho zkušeností a pracovního zázemí k vyšetření vzorků nádorů na stanovení hladin intratumorálního E2.

8.5 Vztah koncentrace intratumorálního estradiolu a poměru ER/PR

Na zvýšenou koncentraci estrogenů reagují buňky mléčné žlázy snížením koncentrace ER, aby výsledné množství estrogenových signálů bylo nezměněné. To bylo zjištěno nejen *in vivo* jako nízké hladiny ER v karcinomech prsu premenopauzálních žen v porovnání s postmenopauzálními, ale i v buněčných kulturách, kde po expozici estradiolu došlo ke snížení množství ER. V mládí je intracelulární koncentrace ER nižší, ale počet ER+ buněk není signifikantně nižší než po menopauze (Hochmann, 2007a).

Nabízí se otázka, zdali intratumorální tvorba estradiolu nezpůsobuje pokles ER a nezpůsobuje tak falešnou negativitu nebo hraniční hodnoty (pozitivní i negativní) ER v karcinomu prsu. Stanovování intratumorální hladiny E2 by mělo význam právě u pacientek s těmito hraničními hodnotami ER. Intratumorální koncentrace E2 by tak mohla pomoci klinikovi při rozhodování o způsobu léčby nádoru.

V literatuře se však nevyskytují informace, které by poukazovaly na to, že na intratumorální tvorbu E2 by se dalo usuzovat z poměru ER/PR (Hochmann, 2007b). Naopak je dokumentováno, že nádory tvořící E2 inklinují spíše k ER pozitivitě (Subramanian, 2007). V práci Subramaniana a kol. je ale mimo jiné uvedeno, že se mezi těmito nádory nacházely i ER α negativní. Je tedy otázkou, zda v těchto případech nešlo o falešnou negativitu ER.

Většina autorů, kteří publikovali informace o vzájemném poměru ER/PR, neřešila tento poměr kvantitativně, ale jen kvalitativně. Rozhraní mezi receptorovou pozitivitou a negativitou je 10 fmol/mg (Hochmann, 2007b), i když někteří autoři uvádí cut off value 15 fmol/mg – např. Zima, 2008. Mnohé tyto publikace tak nelze použít pro řešení otázky, zda je správné uvažovat diagnosticky a terapeuticky stejně u pacientky např. s ER = 11 a PR = 9 fmol/mg a pacientky s ER = 100 a PR = 5 fmol/mg. Pacientky z obou příkladů jsou ER+ a PR-, že např. jejich léčba by mohla být odlišná. Našli jsme prakticky jen takové práce, ve kterých jsou zmiňovány (místo číselného poměru) jen procenta pacientek s karcinomem prsu v následujících skupinách.

- a) ER (+)/PR (+)
- b) ER (+)/PR (-)
- c) ER (-)/PR (+)
- d) ER (-)/PR (-)

Vedoucí diplomové práce se domnívá, že je na škodu, že literaturou nebyly posouzeny nádory z hlediska kvantitativního. Tedy že je možné z poměru ER/PR alespoň orientačně odvodit, jaké jsou koncentrace E2.

Pokud bychom zanedbali výjimky a soustředili se pouze na takové nádory, které vznikly před menopauzou a do klinické formy (pro operaci) se rozvinuly po menopauze, mohli bychom ER+ nádory hypoteticky dělit do dvou skupin, které budou mít pozitivitu jak ER tak PR, ale jinak vysokou.

- a) Nádory stimulované při svém vzniku k proliferaci ovariálním E2 budou mít vysoké hodnoty ER (např. 100 fmol/mg), neboť jim chybí E2 a zároveň budou mít nízké PR hodnoty (např. 11 fmol/mg), jelikož tvorba PR má být indukována vlivem E2, kterého je v tomto případě nedostatek.

- b) Nádory, které jsou při vzniku stimulované k proliferaci intratumorálním E2, budou mít nízké hodnoty ER (např. 11 fmol/mg) a zároveň vysoké PR (např. 100 fmol/mg), protože tvorba PR je indukována E2, kterého je v tomto případě i po menopauze nadbytek.

Z důvodu snazšího vysvětlování je tato hypotéza velmi zjednodušená a netýká se tedy pacientek, které jsou pod hranicí 10 fmol/mg (těch je ale málo). V tomto úhlu pohledu se jeví omezení literatury na vyjádření poměru kvalitativních hodnot jako nedostatečné, protože nezohledňuje rozmanitost receptorového stavu a možnost získat z ní informace pro modifikaci léčby.

To je bod, ze kterého tato diplomová práce vznikala. Později jsme zjistili možnost racionálního spojení prostředků s Katedrou biochemických věd FaF UK a možnosti získat biotický materiál v nemocnicích. Tím se tato rešerše rozrostla takovým směrem, aby zabezpečila i spojení s jejich tématem teoreticky. Diplomová práce se tedy snažila dokumentovat literární prameny z hlediska souvislosti řešeného tématu se jmenovanými pracovišti.

9 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsme vypracovali přehled enzymů, které se účastní lokální biosyntézy estrogenů a hrají tak roli v karcinogenezi mléčné žlázy. Zdrojem informací byly převážně zahraniční odborné publikace. Současně jsme zmapovali i skromnější publikační aktivity českých autorů týkající se této problematiky, přičemž k těm významným patří Dr. Strnad.

Cenným zdrojem informací o enzymech participujících na lokální tvorbě estrogenů je i výzkumná činnost pracovní skupiny prof. Wsóla z Katedry biochemických věd FaF UK, která se však primárně zabývá studiem metabolismu xenobiotik nesoucí karbonylovou skupinu, např. doxorubicinu, jenž je jedním ze základních chemoterapeutik používaných při léčbě karcinomu prsu.

Vzhledem k tomu, že estradiol hraje důležitou roli v karcinogenezi prsu, zjišťovali jsme, jaké metody stanovování E2 se používají v naší zemi a jaká je možnost jejich modifikace pro potencionální využití k detekci hladin E2 přímo v nádorové tkáni prsu.

Získané teoretické podklady nám umožnily vypracovat úvahu o možném přínosu vyšetřování intratumorálních koncentracích estradiolu v diagnostice a v rozhodování o způsobu léčby postmenopauzálních pacientek s karcinomem prsu. Avšak nezohledňovali jsme náročnost provedení a ekonomické aspekty tohoto vyšetření, které by zajisté hrály významnou roli.

10 SEZNAM ZKRATEK

17 β -HSD	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza
3-HSD	3-hydroxysteroid dehydrogenáza
Ab	protilátka
ADH	atypická duktální hyperplazie
Agn	antigen
AKR	aldo-keto reduktáza
ATAC	studie Arimidex, Tamoxifen a kombinované terapie
BIG	mezinárodní studie karcinomu prsu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBG	kortikosteroidy vázající globulin
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P450
DCIS	duktální karcinom prsu in situ
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEAS	dehydroepiandrosteronsulfát
E1	estron
E1S	estransulfát
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
EGF	epidermální růstový faktor
ER	estrogenový receptor
ERE	estrogen vazebný element
EST	estrogensulfotransferáza
FSH	folikulostimulační hormon
GnRH	gonadoliberin

HUGO	projekt mapování lidského genomu
IBIS	mezinárodní studie intervence karcinomu prsu
IGF-1	růstový faktor podobný inzulinu
IL	interleukin
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LH	luteinizační hormon
MST1	mnohočetný supresor tumoru
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukováná forma NAD (dihydroderivát)
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukováná forma NADP
p53	tumor supresorový gen
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	růstový faktor z destiček
PDWA	proliferativní onemocnění prsu bez atypií
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PR	progesteronový receptor
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkriptázou
SDR	dehydrogenáza/reduktáza krátkého řetězce
SERM	selektivní modulátor estrogenových receptorů
SHBG	globulin vázající pohlavní hormony
STS	steroidní sulfatáza
TDLU	terminální duktulární lobulární jednotka
TGF- α	transformující růstový faktor α
TGF- β	transformující růstový faktor β
TNF α	tumor nekrotizující faktor α

11 POUŽITÉ ZDROJE

ABRAHÁMOVÁ J., 2008: http://www.linkos.cz/vzdelavani/OnkoPece/2_08/04.pdf; 10/04/09

ABRAHÁMOVÁ J., POVÝŠIL C., HORÁK J. et kol.: Atlas nádorů prsu, Grada 2000, str. 139

AKA J. A., MAZUMDAR M., SHENG-XIANG L.: Reductive 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the sulfatase pathway: Critical in the cell proliferation of breast cancer; *Molecular and Cellular Endocrinology* 301 (2009) 183-190

BRUEGGEMEIER R. W., RICHARDS J.A., PETREL T.A.: Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer, *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; Volume 86, Issues 3 – 5, September 2003; Pages 501-507

CIBULA D., **HENZL M. R.**, ŽIVNÝ J.: Základy gynekologické endokrinologie, Grada 2002, str. 19, 32 – 34, 307 – 329

ČLS JEP, 2009: http://www.linkos.cz/info_praxe/standardy_html.php?t=5; 10/04/09

DOLEŽALOVÁ V. A KOL. (a): Principy biochemických vyšetřovacích metod I. část, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno 1995, str. 222 – 224

DOLEŽALOVÁ V. A KOL. (b): Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno 1995, str. 215 – 240

FALK R. T., **XU X.**, KEEFER L., VEENSTRA T. D., ZIEGLER R. G.: A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Measurement of 15 Urinary Estrogens and Estrogen Metabolites: Assay Reproducibility and Interindividual Variability; *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 3411, December 1, 2008. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0355

FALK R. T., **GENTZSCHEIN E.**, STANCZYK F. Z., BRINTON L. A., GARCIA-CLOSAS M., IOFFE O. B., SHERMAN M. E.: Measurement of Sex Steroid Hormones in Breast Adipocytes: Methods and Implications; *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 1891, August 1, 2008. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0119

GONZALEZ A., COS S., MARTINEZ-CAMPA C., ALONSO-GONZALEZ C., SANCHEZ-MATEOS S., MEDIAVILLA M. D., SANCHEZ-BARCELO E. J.: Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells; *The Journal of Pineal Research*, Vol 45, No 1, Pages 86-92, 2008

GREENSPAN F. S., BAXTER J. D.: Základní a klinická endokrinologie, H&H 2003, str. 461 – 467

GUILLEMETTE ET AL.: *Breast Cancer Res* 2004 **6**:246 doi:10.1186/bcr936;

HAMPL R., BIČÍKOVÁ M., STÁRKA L.: Současnost a výhledy steroidní laboratorní diagnostiky, *Endokrinologie* 3/2008, 135 – 139

HAN B., LI S., SONG D., POISSON-PARÉ D., LIU G., LUU-THE V., OUELLET J., LABRIE F., PELLETIER G.: Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and type 5 in breast cancer and adjacent non-malignant tissue: A correlation to clinicopathological parameters; *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 112 (2008) 194-200

HANČ O., PÁDR Z.: Hormony, úvod do jejich chemie a biochemie, Academia 1982, Praha, str. 462

HOCHMANN J. (a): Je možno vyhledávat pacientky s intramamární tvorbou estrogenů pomocí výsledků estrogenových a progesteronových receptorů?

HOCHMANN J. (b): Ratio of concentrations of estrogen receptors to progesterone receptors (ER/PR) in the cytosol of breast cancers (stratification by forming of groups differing in PR); *Neoplasma*. Vol 54, 2007, No. 4: 290-296

JANSSON A: 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer; *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (2009), doi:10.1016/j.jsbmb.2008.12.012

JIN Y., DUAN L., LEE S. H., KLOOSTERBOER H. J., BLAIR I. A., PENNING T. M.: Human cytosolic hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily catalyze reduction of conjugated steroids: implications for phase I and phase II steroid hormone metabolism; <http://www.jbc.org/cgi/reprint/M809465200v1>; 26/03/09

KATZUNG B. G.: Základní a klinická farmakologie, H&H 2006, str. 644 – 647, 652

KLENER P., ABRAHÁMOVÁ J. et kol.: Klinická onkologie, Galén 2002, str. 39, 43 - 44

KRUCHTEN P., WERTH R., MARCHAIS-OBERWINKLER S., FROTSCHER M., HARTMANN R. W.: Development of biological screening system for the evaluation of highly active and selective 17 β -HSD1-inhibitors as potential therapeutic agents; *The Molecular and Cellular Endocrinology* 301 (2009) 154-157

LINCOVÁ D., FARGHALI H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén 2007, str. 424 – 430

LUKACIK P., KAVANAGH K. L., OPPERMAN U.: Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases; *The Molecular and Cellular Endocrinology* 248 (2006) 61-67

MOTLÍK K., ŽIVNÝ J.: Patologie v ženském lékařství, Grada 2001, str. 393-394

MURRAY R., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W.: Harperova biochemie, H&H 2002, str. 569 – 583

- NAGAYA N., TOI M., SUNAHARA S., KURIMOTO F., TOMINAGA T.:** Determination of intratumoral estrone (E1) and estradiol (E2) in primary breast cancer tissues by sensitive HPLC-RIA; *Gan to kagaku ryōhō* (1997), Volume 24, No 3, Pages 329-336
- NAKATA T., TAKASHIMA S., SHIOTSU Y., MURAKATA C., ISHIDA H., AKINAGA S., LI P., SASANO H., SUZUKI T., SAEKI T.:** Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients; *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* Volume 86, Issues 3-5, September 2003, Pages 455-460
- NOVOTNÁ R., WSÓL V., XIONG G., MASER E.:** Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3; *The Toxicology Letters* 181 (2008) 1-6
- ROB L., MARTAN A., CITTERBART K. et al.:** *Gynekologie, druhé doplněné a přepracované vydání, Galén 2008, str. 12-13, 18-27*
- SANTNER S. J., FEIL P. D., SANTEN R. J.:** In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1984 Jul, 59(1): 29 – 33
- SASANABE R., (AICHIIDAI I GEKA):** Immunohistochemical analysis of aromatase and estrogen receptor in breast cancer tissues. Relative to the clinicopathological findings; *The Journal of the Aichi Medical University Association*, VOL. 29; NO.3/4;PAGE.175-181(2001)
- SASANO H., SUZUKI T., NAKATA T., MORIYA T.:** New development in intracrinology of breast carcinoma; *Breast Cancer* 13:129-136, 2006
- SONG D., LIU G., LUU-THE V., ZHAO D., WANG L., ZHANG H., XUELING G., LI S., DÉSY L., LABRIE F., PELLETIER G.:** Expression of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer, An immunocytochemical study; *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 101 (2006) 136-144
- STRNAD P., DANĚŠ J.:** *Nemoci prsu pro gynekology, Grada 2001, str. 13-15, 109, 155-180*
- STRNAD P.:** Endogenní ovariální hormony a riziko karcinomu prsu; *Praktická gynekologie* 1/04, str. 11 – 13
- SUBRAMANIAN A., SALHAB M., MOKBEL K.:** Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review; *Breast Cancer Res Treat* (2008) 111:191-202
- SUZUKI M., ISHIDA H., SHIOTSU Y., NAKATA T., AKINAGA S., TAKASHIMA S., UTSUMI T., SAEKI T., HARADA N.:** Expression level of enzymes related to in situ estrogen synthesis and clinicopathological parameters in breast cancer patients; *The*

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, Volume 113, Issues 3-5,
February 2009, Pages 195-201

ŠKARYDOVÁ L., ŽIVNÁ L., XIONG G., MASER E., WSÓL V.: AKR1C3 as
potenciál target for the inhibitory effect of dietary flavonoids; *Chemico-Biological
Interactions* 178 (2009) 134 - 144

TILSON-MALLETT N., SANTNER S. J., FEIL P. D., SANTEN R. J.: Biological
significance of aromatase activity in human breast tumors; *The Journal of Clinical
Endocrinology and Metabolism*, 1983 Dec, 57(6): 1125 – 28

TROJAN S. et kol.: *Lékařská fyziologie*, Grada 2003, str. 519 – 521

VIVO, 2009:

www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/basics/steroidogenesis.gif;
10/04/09

WIKIPEDIA, 2009:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/13/Steroidogenesis.svg/676p
x-Steroidogenesis.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/13/Steroidogenesis.svg/676px-Steroidogenesis.svg.png); 10/04/09

WSÓL V., SZOTÁKOVÁ B., MARTIN H. J., MASER E.: Aldo-keto reductases
(AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the karbonyl reduction of the novel
anticancer drug oracin in man; *Toxicology* 238 (2007) 111-118

**XU X., ROMAN J. M., ISSAQ H. J., KEEFER L. K., VEENSTRA T. D., ZIEGLER R.
G.:** Quantitative Measurement of Endogenous Estrogens and Estrogen Metabolites in
Human Serum by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry; *Analytical
Chemistry*, 2007, 79 (20), Pages 7813–7821; DOI: 10.1021/ac070494j

**ZELENIUCH-JACQUOTTE A., TONIOLO P., LEVITZ M., SHORE R. E.,
KOENIG K. L., BANERJEE S., STRAX P., PASTERNAK B. S.:** Endogenous
estrogens and risk of breast cancer by estrogen receptor status: a prospective study in
postmenopausal women; *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* (1995), Vol 4,
Issue 8, Pages 857-860

ZIMA T., 2008 : <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--tumorove-markery>;
10/04/09