

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Salome Kylarová

**Studium mechanismu účinku protinádorového léčiva tamoxifenu a jeho
vedlejších toxických účinků**

Study of mechanism of action of anticancer drug tamoxifen and its toxic side
effects

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 6. 2011

.....

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za její cenné rady, laskavý přístup a čas, který mi v průběhu psaní bakalářské práce věnovala. Rovněž nesmím opomenout poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou během celého studia.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

Abstrakt

Antiestrogenní (hormonální) terapie je užívána při léčbě nádoru prsu s pozitivním nálezem hormonálních receptorů pro estrogen. Vznik tohoto typu rakoviny je důsledkem dlouhodobé hormonální expozice v průběhu života. Tamoxifen patří mezi nejdůležitější zástupce hormonálních léčiv, která blokují účinky těchto hormonů v prsní nádorové tkáni prostřednictvím kompetitivní vazby na odpovídající receptory. Afinita tamoxifenu k těmto receptorům není dostatečná, avšak v organismu dochází k jeho aktivaci na metabolity, které vykazují afinitu o poznání větší, jmenovitě 4-hydroxytamoxifen a endoxifen. Tvorbu těchto meziproduktů katalyzují enzymy ze skupiny cytochromů P450. Ve druhé fázi jeho biotransformace dochází především k sulfataci těchto produktů katalyzovanou sulfotransferasami a jeho eliminaci z organismu. Vedle těchto aktivních meziproduktů, které svými účinky potlačují další růst nádoru, existují i produkty metabolismu tamoxifenu působící negativně v jiných tkáních organismu. Jedná se především o α -hydroxytamoxifen, který po další aktivaci generuje kovalentní adukty s DNA v jaterní tkáni potkanů a endometriu ženské dělohy. Léčba tamoxifenem je doprovázena četnými vedlejšími účinky, z nichž největší pozornost je věnována možnému vývoji rakoviny endometria či rezistenci nádoru vůči léčbě. Účinky terapie tamoxifenem jsou závislé na aktivitě jednotlivých biotransformačních enzymů, která se v populaci liší v rámci výskytu genetických polymorfismů. V úvahu je též nutné brát interakce tamoxifenu s jinými léčivy, a tím možné snížení účinnosti terapie.

Klíčová slova

antiestrogenní terapie, tamoxifen, endometrium, hepatokarcinogenita, rezistence nádoru, vzájemné interakce léčiv

Abstract

Anti-estrogen therapy is used for treatment of hormone (estrogen) receptor positive breast cancer. The rise of this type of cancer is associated with a prolonged exposure to these hormones throughout life. Tamoxifen is one of the most used hormonal drugs, which blocks the effects of these hormones in breast cancer tissue by competitive binding to hormonal receptors. The affinity of tamoxifen to these receptors is not sufficient, therefore it has to be activated to metabolites having greater affinity, namely 4-hydroxytamoxifen and endoxifen. The formation of these intermediates is catalysed by cytochromes P450. In the second phase of its biotransformation hydroxylated metabolites of tamoxifen are primarily sulphated by sulphotransferases and eliminated from the body. In addition to these active intermediates, which inhibit the growth of breast tumor tissue, there are metabolites causing negative effects in the others. The most important metabolite is α -hydroxytamoxifen, which forms covalent DNA adducts in liver tissue of rats and endometrium of females. Tamoxifen therapy is associated with numerous side effects, but the greatest attention is focused to formation of endometrial cancer and induction of tumor's resistance to this therapy. Effects of tamoxifen therapy are dependent on the activity of enzymes, which are associated with its biotransformation. This activity is inter-individually different as a consequence of genetic polymorphisms of such enzymes. In addition, the effects of other drugs used, which can interact with tamoxifen and caused reduced efficiency of tamoxifen therapy, should also be considered. (In Czech)

Key words

anti-estrogen therapy, tamoxifen, endometrium, hepatocarcinogenicity, tumor resistance, drug-drug interactions

Obsah

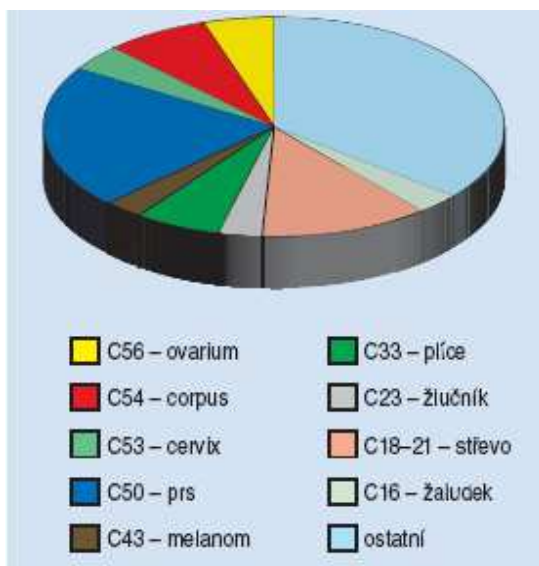
1.	Úvod.....	1
2.	Cíl práce.....	3
3.	Karcinom prsu s pozitivním nálezem hormonálních receptorů a jeho léčba.....	4
	3.1 Antiestrogeny.....	5
	3.1.1 Mechanismus působení antiestrogenů.....	5
	3.1.2 Estrogenní receptory.....	5
	3.1.3 Mechanismus vazby estradiolu na receptor.....	6
	3.1.4 Mechanismus působení antiestrogenů.....	7
4.	Tamoxifen.....	9
	4.1 Obecná charakteristika.....	9
	4.2 Metabolismus tamoxifenu.....	9
5.	Vedlejší účinky tamoxifenu.....	15
	5.1 Genotoxicita tamoxifenu.....	15
	5.2 Vliv terapie tamoxifenem na děložní tkáň.....	16
	5.2.1 Rakovina endometria vyvolaná tamoxifenem.....	16
	5.2.2 Účinky kombinované léčby tamoxifenu s estradiolem.....	19
	5.3 Hepatokarcinogenita tamoxifenu.....	20
	5.3.1 Tvorba kovalentních aduktů s DNA.....	20
	5.3.2 Poruchy jaderného aparátu jaterních buněk potkana.....	21
	5.3.3 Genové mutace v jádře jaterních buněk potkana.....	22
	5.4 Rezistence nádorového onemocnění na léčbu tamoxifenem.....	22
	5.5 Interakce tamoxifenu s jinými léčivými.....	25
6.	Závěr.....	28
	Seznam použitých zkratk.....	30

Seznam použité literatury.....	32
--------------------------------	----

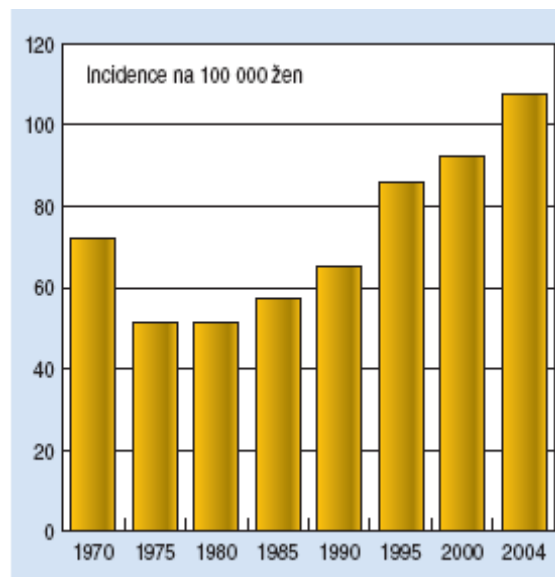
1. Úvod

Rakovina prsu se nepochybně řadí k nejméně závažným onemocněním vyskytujícím se především u žen. Tento problém však zasahuje z necelého 1% i mužskou část populace, u které navíc často dochází k odhalení rakoviny až v jejích pozdních stádiích.[1] Není tedy překvapením, že se neustále hledají nová opatření k boji s touto zákeřnou nemocí.

Ze statistiky rakovinných onemocnění diagnostikovaných u žen (obr.1) vyplývá, že maligní nádor prsu zaujímá vysoké procento všech neoplazií. Zároveň incidence tohoto nádorového onemocnění v průběhu několika posledních desítek let téměř lineárně vzrůstá (obr.2).[2]



Obr. 1: Zastoupení jednotlivých zhoubných novotvarů hlášených u žen v ČR v roce 2004. Převzato z [2]



Obr. 2: Výskyt karcinomu prsu v ČR od roku 1970-2004. Převzato z [2]

Nádor prsu řadíme jako ostatní rakovinná onemocnění k tzv. civilizačním chorobám. Jedná se tedy o onemocnění, v němž hraje velkou roli prostředí, v jakém se daný subjekt nachází a jaký preferuje životní styl. Vývoj tohoto nádoru je ve většině případů řízen hormonálně, estrogeny a progestageny, jejichž účinkům jsou ženy v průběhu

života vystavovány. Méně zastoupené jsou pak nádory, jejichž vznik je podpořen existencí genetické predispozice.[2,3]

V současné době existuje mnoho léčebných prostředků v boji s karcinomem prsu, z nichž některé jsou velmi radikální, jiné naopak šetrné. Existují dva základní typy léčby – léčba *lokoregionální* a léčba *systemová*. Do první skupiny řadíme chirurgické zásahy a radioterapii. Léčba systemová zahrnuje chemoterapii, hormonální terapii a v neposlední řadě se zde začínají uplatňovat postupy tzv. cílené molekulární léčby.[2]

V bakalářské práci se věnuji hormonální terapii a jejímu dosud nejpoužívanějšímu zástupci tamoxifenu. Oproti chemoterapii, která je doprovázena četnými nežádoucími účinky, hormonoterapie je v tomto ohledu mnohem šetrnější. Kromě léčby prostřednictvím antiestrogenů tato léčba představuje i např. bilaterální ooforektomii. Chirurgické nebo radiační odstranění vaječnicků jako hlavního zdroje ženských pohlavních hormonů v premenopauzálním období často předchází antiestrogenní terapii u pokročilého stádia karcinomu.[2]

Tamoxifen, známý ve farmaceutickém průmyslu pod názvem Nolvadex, se jako léčivo objevil již v 70. letech minulého století. Od té doby si ve srovnání s jinými užívanými antiestrogeny stále zachovává vůdčí postavení v léčbě hormonálně pozitivních prsních nádorů. Jedná se o antiestrogen nesteroidní povahy a jeho léty prověřené pozitivní účinky však doprovází i nemalé množství nežádoucích efektů. V předložené práci jsem se zaměřila na vznik těchto vedlejších účinků, možné způsoby jejich potlačení a další otázky spojené s léčbou tamoxifenem.[2,4]

2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o protinádorovém léčivu tamoxifenu se zaměřením na jeho metabolismus a mechanismus působení v organismu. Další část práce je věnována negativním aspektům léčby tamoxifenem, jako jsou především její poměrně rozsáhlé vedlejší účinky a indukce rezistence nádoru na samotné léčivo.

3. Karcinom prsu s pozitivním nálezem hormonálních receptorů a jeho léčba

Prsní nádory s pozitivním nálezem hormonálních receptorů (**E**strogenní **R**eceptor-**ER**/**P**rogesteronový **R**eceptor-**PgR**) se vyvíjí v důsledku celoživotního vystavení jak endogenním hormonům, tak exogenním faktorům. Vývoj tohoto nádoru velmi zřetelně ovlivňuje doba expozice těmto látkám. Mezi okolnosti zvyšující riziko rozvoje onemocnění patří např. nízký věk první menstruace (do 12. roku života) nebo naopak pozdní menopauza, nuliparita a pozdní věk prvního porodu. V postmenopauzálním období pak produkci těchto hormonů částečně zajišťuje tuková tkáň, a proto se obézní ženy řadí k vysoce rizikovým subjektům. Exogenní hormony podávané ve formě estrogenní substituční terapie či užívání hormonální antikoncepce v delším časovém horizontu (10-15 let) riziko vzniku karcinomu prsu o 50 % zvyšuje.[2,5,6]

Pro účinnou léčbu tohoto typu tumoru je nejlepší volbou tzv. hormonální terapie. Terapie zahrnuje postupy **ablační**, kdy dochází k regresi tumoru po odstranění endokrinní žlázy, tedy ovarii. Metody **aditivní** jsou založeny na přijímání vysoké dávky hormonů, vyšší než při hormonální substituční terapii (HST), což vede k zablokování estrogenních receptorů. Nejrozšířenější metody léčby fungují na principu inhibice syntézy estrogenu (metody **inhibiční**) nebo kompetici s estradiolem o vazbu na estrogenní receptory (metody **kompetitivní**).[2]

Mezi hojně užívaná hormonální léčiva se řadí:

- a) Antagonisté estrogenních receptorů - antiestrogeny
- b) Blokátory aromatázy, což je enzym katalyzující poslední krok biosyntézy periferního estrogenu, tedy přeměnu androstenedionu na estron (anastrozol, letrozol)[2,5]

3.1 Antiestrogeny

V bakalářské práci se zabýváme první skupinou hormonálních léčiv, které můžeme dále rozdělit dle jejich chemické povahy takto:

- **trifenylethyleny** – selektivní modulátor estrogenních receptorů (SERM= Selective **E**strogen **R**eceptor **M**odulator), nejdůležitější zástupce tamoxifen
- **čisté antiestrogeny** – steroidní nebo nesteroidní analoga, fulvestrant
- **benzothiofeny** – SERM, např. raloxifen [4]

Ve svých počátcích byly antiestrogeny předmětem výzkumu kvůli jejich patrnému antikoncepčnímu účinku objeveného u laboratorních potkanů. Záhy se však dosáhlo zjištění, že u lidského druhu způsobují opačný efekt, tedy u subfertilních subjektů vyvolávají ovulaci, a tím tedy zvyšují i jejich fertilitu. Další výzkumy však potvrdily jejich vysoký potenciál v léčbě rakoviny prsu.[10]

3.1.1 Mechanismus působení antiestrogenů

Jelikož tamoxifen interaguje s estrogenními receptory (ER), je nejprve nutné se obeznámit s jejich strukturou a mechanismem nádorové proliferace, která je stimulována estrogenem. V případě, že je tento mechanismus známý, můžeme dalšími postupy zjistit jak antiestrogeny do tohoto procesu zasahují a způsobují tak jeho částečné omezení či úplné přerušení.

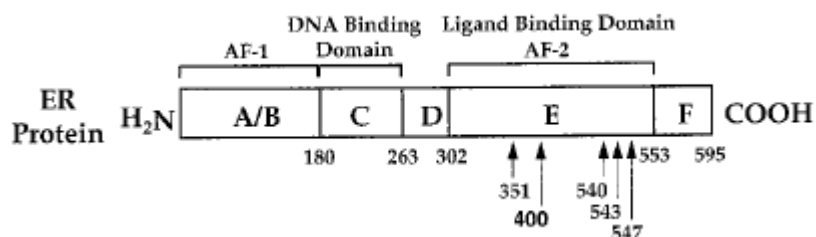
3.1.2 Estrogenní receptory

Jedná se v podstatě o transkripční faktory vyskytující se v jádře buněk a po aktivaci ligandem (v tomto případě hormonem) dochází k iniciaci transkripce specifických genů, tedy vyvolání buněčné odpovědi. Ve struktuře těchto receptorů jsou podstatné dvě domény, **doména vázající DNA** (DBD = DNA binding domain) a **doména vázající hormon** (HBD = hormone binding domain).[7]

Mezi nejdůležitější členy této superrodiny patří **ER α** a **ER β** . Zajímavou skutečností v souvislosti s vazbou tamoxifenu na tyto receptory je, že pouze vazba 4-hydroxytamoxifenu na ER α vyvolává agonistický účinek. Odpověď lze nalézt

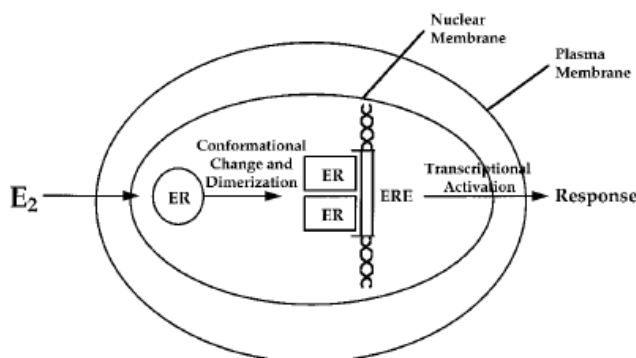
v nedostatečné homologii ER β v oblasti AF-1 (= Activation Function-1) (obr. 3), která je odpovědná za částečný agonismus tamoxifenu.[7]

ER α jsou v hormonálně dependentních tumorech značně exprimovány. Naopak v nádorové prsní tkáni, jejíž růst není řízen hormonálně, dominuje přítomnost ER β . Zajímavé bylo zjištění, že i antiestrogeny, které jsou určeny primárně k účelům léčby hormonálně závislých tumorů, mohou ovlivnit další progresi nádorů s vysokou expresí ER β . Aktivace ER β vazbou estradiolu, tamoxifenu či raloxifenu má za následek regulaci metabolismu extracelulární matrix, zvýšenou biosyntézu kolagenu a zvýšenou expresi β -integrinu. Změny v interakcích mezi matrix a integriny, které se uplatňují v mezibuněčných spojích, mohou vést ke zvýšené malignanci tumoru a potenciálnímu rozvoji metastáz.[9]



Obr. 3: Šest funkčních domén estrogenních receptorů ER α . Šípkami jsou zvýrazněny rozhodující mutace. Převzato z [7]

3.1.3 Mechanismus vazby estradiolu na receptor



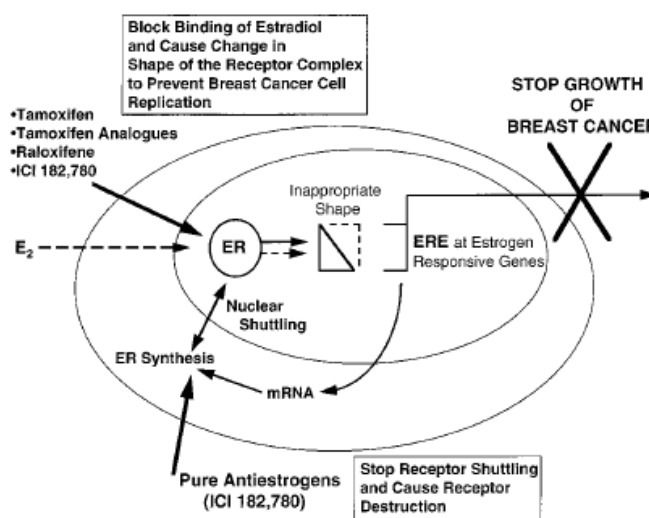
Obr. 4: Mechanismus vazby estradiolu na estrogenní receptor uvnitř jádra. Převzato z [7]

Po vstupu estradiolu do jádra dochází k jeho vazbě na estrogenní receptor, změně konformace receptoru a jeho homodimerizaci. V této aktivní formě pak dochází k vazbě tohoto dimeru na funkční úseky DNA v promotorové oblasti (úseky odpovědné za vazbu estrogenu; EREs = **E**strogen **R**esponse **E**lements) a aktivaci transkripce.[7]

Pro účinnou odpověď buňky na signál vyvolaný vazbou estradiolu do aktivního místa estrogenního receptoru je nutná součinnost oblastí **AF-1** a **AF-2** (obr. 3, str. 6). Pokud by byla jejich funkční aktivita nějakým způsobem narušena, nedošlo by k efektivní transkripci. Antiestrogeny po vazbě na estrogenní receptor často nejsou schopné s těmito oblastmi receptoru dostatečně interagovat a suplovat tak účinky estrogenu.[7]

3.1.4 Mechanismus působení antiestrogenů

Cílem antiestrogenů je blokovat výše popsanou signální dráhu, jejíž aktivita vede k nádorovému bujení. Různé antiestrogeny inhibují tento proces různými postupy (obr. 5)



Obr. 5: Mechanismus antiestrogenního účinku vyvolaný různými antiestrogeny. Převzato z [7]

Na obrázku č. 5 můžeme pozorovat dva hlavní modely působení antiestrogenů:

- 1) Vazba antiestrogenu na receptor způsobí takovou změnu konformace, která brání vazbě vzniklého komplexu na ERE a aktivaci transkripce. V jiném případě dochází k vazbě komplexu do těchto oblastí, ovšem za vzniku neaktivního transkriptu. Tamoxifen zastupuje

tento model, který objasňuje jeho antagonistické a agonistické účinky, Jak bylo výše uvedeno, pro efektivní průběh transkripce je nutná jistá kooperativita mezi oblastmi AF-1, AF-2 a vázaným estrogenem. Antagonistický efekt tamoxifenu je způsoben nedostatečnou aktivací oblasti AF-2. Naopak agonistický účinek lze vysvětlit tím, že pro účinné zahájení a průběh transkripce postačuje pouze aktivace oblasti AF-1.

- 2) Antiestrogen se váže na nově syntetizovaný receptor v cytoplazmě a brání tak jeho transportu do jádra. Vzniklý komplex pak podléhá destrukci. Tento postup je typický pro čisté antiestrogeny.[7]

Modulace estrogenní transdukční signalizační dráhy prostřednictvím antiestrogenů má za následek regulaci buněčného dělení rakovinných buněk. Tamoxifen a ostatní antiestrogeny tedy takto nepřímou způsobem zasahují do buněčného cyklu, především do fáze G1 a G2. Patrný je též efekt antiestrogenní terapie na expresi růstových faktorů, např. transformující růstový faktor α (TGF α = **T**ransforming **G**rowth **F**actor α), TGF β a inzulínu podobný růstový faktor (IGF = **I**nsuline-like **G**rowth **F**actor).[7]

Expresí genů vyvolaná vazbou estradiolu na ER α a její regulace prostřednictvím terapie tamoxifenem závisí na tom, v jaké fázi buněčného cyklu se buňky nacházejí. Například nejrozsáhlejší vliv tamoxifenu na buněčnou proliferaci buněk vedoucí k jejich apoptóze byl zaznamenán u buněk zastavených v S-fázi buněčného cyklu. Indukce apoptózy buněk je velmi důležitá pro účinnou regresi tumoru. Je tedy zatím otázkou, zda by současná léčba tamoxifenem a léčivými užívanými k synchronizaci buněk v určité fázi buněčného cyklu nevedla k ještě lepším antiproliferativním efektům než samotná léčba tamoxifenem.[8]

4. Tamoxifen

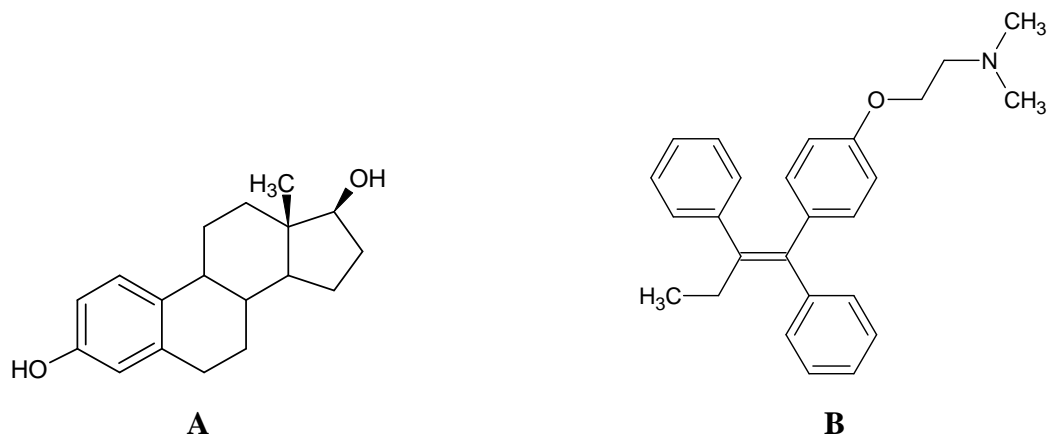
4.1 Obecná charakteristika

Tamoxifen [(Z)-1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]fenyl}-1,2-difenyl-1-buten] (obr. 6, str. 10) se řadí mezi antiestrogeny a náleží do třídy trifenylethylenů. Používá se především pro adjuvantní terapii při léčbě pokročilé rakoviny prsu, často po chirurgickém odstranění ložisek tumoru, kdy existuje možné riziko recidivy. Musí se však jednat o typ nádoru, při kterém se specificky vyvíjejí receptory pro estrogen, tedy ER pozitivní. Účinně bojuje i proti nádorům s rozšířenými ložisky v lymfatických uzlinách v axiliární oblasti. Další jeho využití se týká prevence u rizikových subjektů, jako jsou např. pacientky nesoucí mutace v genech BRCA1 (Breast Cancer 1) a BRCA2. U těchto subjektů dochází až k 50 % snížení rizika vývoje kontralaterální rakoviny prsu. Účinnost preventivní léčby tamoxifenem v tomto směru se však projevila pouze u pacientek, které nepodstoupily ooforektomii. U postmenopausálních pacientek užívajících hormonální substituční terapii se však riziko vzniku rakoviny prsu též násobí. V raném stádiu vývoje nádoru je užíván v kombinaci s chemoterapeutickou léčbou. Od začátku užívání tamoxifenové terapie v průběhu 70. let minulého století se oblast jeho užití značně rozšířila a postupně tak začaly vycházet na povrch i jeho nedostatky.[4,6,10,11,12]

4.2 Metabolismus tamoxifenu

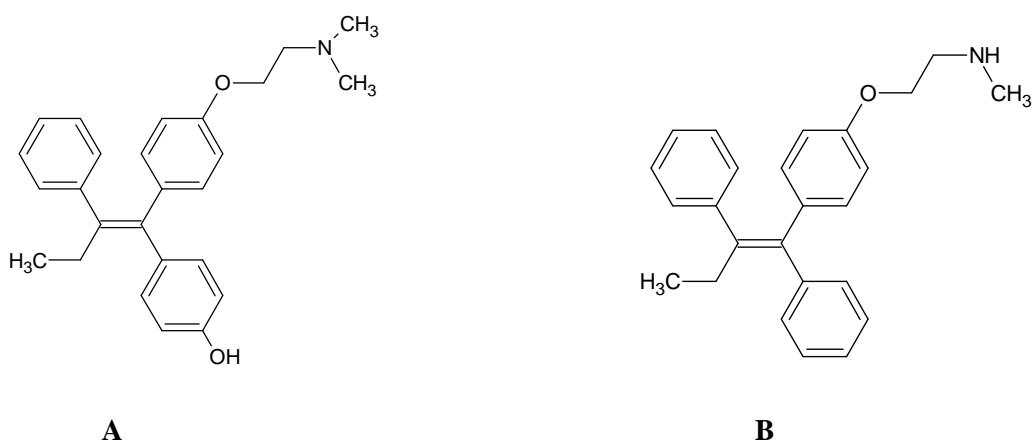
Tamoxifen, stejně jako jakékoliv exogenní látky vstupující do organismu podléhá různým metabolickým reakcím souhrnně nazývaných jako biotransformace. Tyto reakce jsou nezbytné pro zvýšení farmakologického účinku tamoxifenu.[13] Cíle biotransformace jsou následovné:

- a) detoxikace dané látky a snížení účinku
- b) aktivace dané látky, zvýšení účinku
- c) zvýšení hydrofilicity látek a tím usnadnění jejich vyloučení z organismu [14]



Obr. 6: Srovnání struktury pohlavního hormonu estradiolu-17β (A) a jeho syntetického antagonisty tamoxifenu (B)

Biotransformace xenobiotik probíhá ve dvou fázích. V první fázi tohoto procesu v případě tamoxifenu dochází primárně k jeho přeměně na **4-hydroxytamoxifen** (obr. 7) a **N-desmethyltamoxifen**.^[15] Nejvíce tedy tamoxifen podléhá 4-hydroxylaci a N-demethylaci. Kombinací obou procesů pak vzniká poměrně hojně zastoupený produkt **endoxifen** (4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen).^[16] V neposlední řadě je nutno zmínit N-oxid tamoxifenu, který však v průběhu své biologické aktivity pravděpodobně navázaný kyslík ztrácí a dochází k jeho zpětné přeměně na tamoxifen.^[17] Reakce vedoucí k těmto metabolitům (kromě N-oxidu) jsou katalyzovány enzymy ze skupiny cytochromů P450 (CYP), především izoformami CYP2C19, 3A4 a 2D6.^[15]



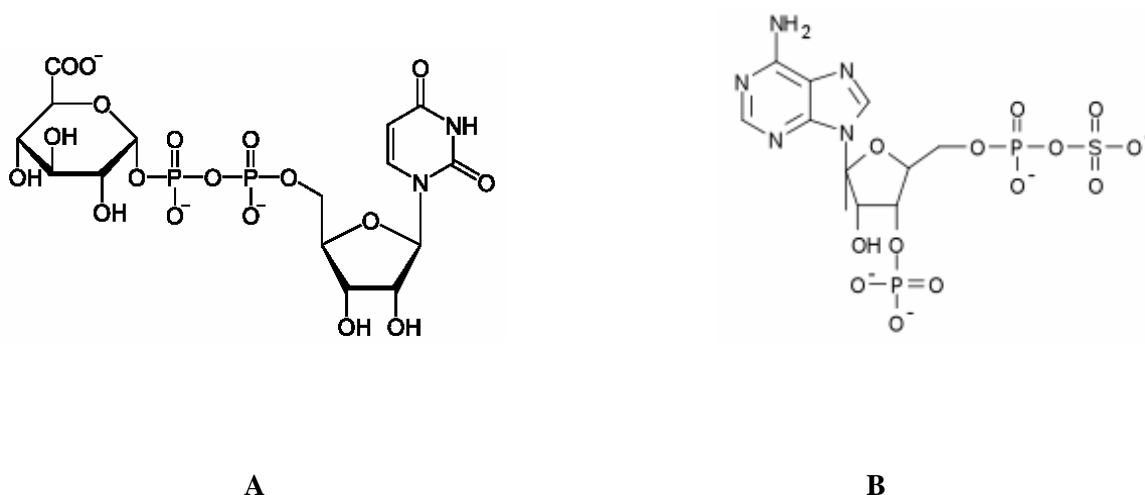
Obr. 7: Hlavní metabolity vznikající v první fázi biotransformace tamoxifenu 4 – hydroxytamoxifen (A) a N-desmethyltamoxifen (B)

Schéma biotransformace tamoxifenu a jeho metabolitů popisuje obr.9, str.12.

Metabolity uvedené na obr. 7 jsou nositelé antiestrogenní aktivity tamoxifenu, tedy jejich existence a generované množství je klíčové pro účinnou terapii. Plazmatické koncentrace endoxifenu dosahují vždy vyšších hodnot než koncentrace 4-hydroxytamoxifenu, který můžeme považovat za minoritní produkt metabolismu. Potlačení nádorového růstu je tedy především dáno aktivitou endoxifenu.[16]

Metabolit hrající roli v procesu karcinogeneze vyvolané tamoxifenem je **α – hydroxytamoxifen**.

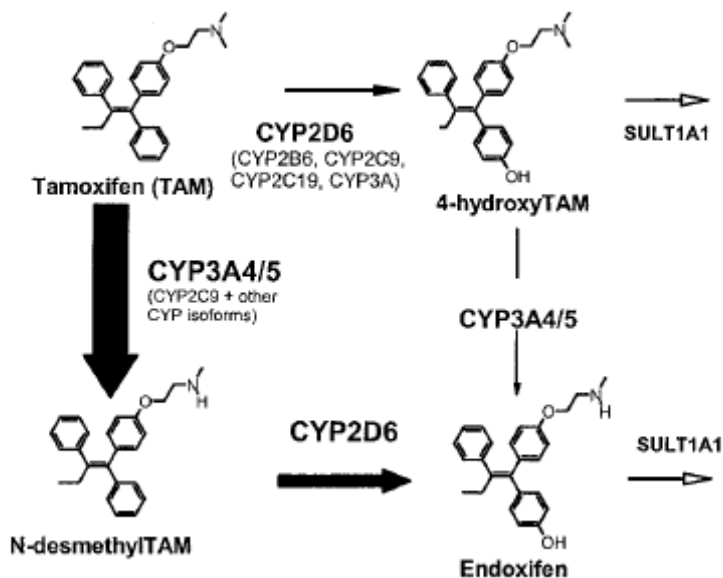
Ve druhé fázi biotransformace xenobiotik dochází ke konjugaci s endogenními látkami, např. s kyselinou glukuronovou (aktivní forma UDP glukuronát), sulfátem (obr. 8) nebo glutathionem.[14] Tyto procesy jsou opět nezbytné pro účinnou exkreci xenobiotika z organismu, přestože konjugace se sulfátem v případě α – hydroxytamoxifenu vede k posílení jeho genotoxicity.[19]



Obr.8: Endogenní látky účastníci se druhé fáze biotransformace: UDP- α -D-glukuronát (převzato z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:UDP-alpha-D-Glucuronat.svg>) (A) a 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PAPS.png>) (B) (PAPS = 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate). PAPS funguje jako donor sulfátu.

Zvýrazněné izofomy CYP (obr. 9) se v metabolismu tamoxifenu uplatňují nejvíce. Na tvorbě N-desmethyltamoxifenu se podílí izofomy CYP3A4/5, vznik 4-

hydroxytamoxifenu a endoxifenu je pak zprostředkován především CYP2D6. Ve druhé fázi biotransformačních procesů je eliminace uvedených metabolitů nejvíce zprostředkována funkcí sulfotransferas (majoritně SULT1A1) [16]



Obr. 9: Hlavní metabolické dráhy 1. fáze biotransformace tamoxifenu a jeho metabolitů. Převzato z [16]

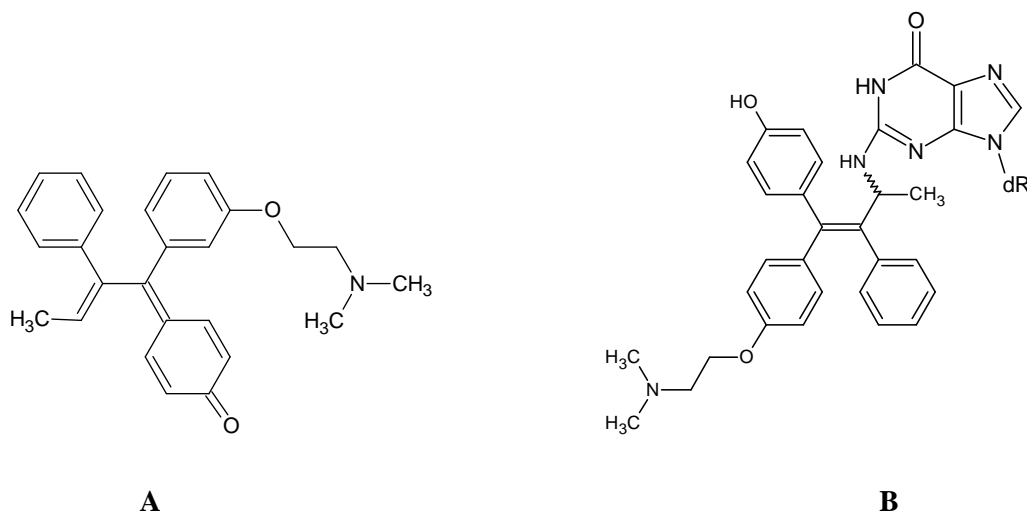
Vzhledem k tomu, že hlavním cílem mé práce je diskutovat vedlejší toxické účinky léčby tamoxifenem, zaměřila jsem se více na ty meziprodukty metabolismu, které se na toxicitě tohoto léčiva podílejí. Jedná se zejména o Z-izomer 4-hydroxytamoxifenu, chinon-methid 4-hydroxytamoxifenu, α -hydroxytamoxifen a 1,2-epoxid tamoxifenu. Poslední ze jmenovaných produktů však nemá valný význam, jelikož jeho podíl na genotoxicitě tamoxifenu je vskutku minimální, a z toho důvodu mu nevěnuji zvýšenou pozornost.[18]

4-hydroxytamoxifen:

V souvislosti s tímto metabolitem je důležité zmínit, že antagonistický účinek vykazuje pouze ve formě Z-izomeru. E-izomer naopak působí jako slabý agonista. Izomeraci tohoto produktu katalyzují především izoformy cytochromů P450 1B1 a 2B6. Dále bylo zjištěno, že tamoxifenová terapie může v některých tkáních (včetně prsní) indukovat expresi výše uvedených enzymů (majoritně CYP2B6) a tím tedy tuto nežádoucí konverzi podporuje. Tento proces pravděpodobně přispívá ke zvýšené odolnosti nádoru vůči léčbě tamoxifenem. Výraznější exprese izoformy CYP1B1 byla zaznamenána též

v nádorových buňkách endometria.[31] Cílem je tedy určit, jak mimojaterní tkáň (játra jsou hlavní lokalizací biotransformačních reakcí [14]) mohou do metabolismu tamoxifenu zasahovat prostřednictvím odlišné exprese jednotlivých izoforem CYP.

4-hydroxytamoxifen částečně podléhá oxidaci na chinon-methid 4-hydroxytamoxifenu (obr.10). Tento produkt je vedle α – hydroxytamoxifenu prekurzorem pro tvorbu kovalentních aduktů s DNA.



Obr. 10: chinon-methid 4-hydroxytamoxifenu (A) a z něho vzniklý (E)- α -(N²-deoxyguanosinyl)-4-hydroxytamoxifen (B)

Generované adukty pak představují dva izomery, (E) a (Z)- α -(N²-deoxyguanosinyl)-4-hydroxytamoxifen. Tvorba těchto genotoxických izomerů je podmíněna nukleofilním atakem allylového uhlíku 4-hydroxytamoxifenu dusíkem v N² pozici deoxyguanosinu (dG).[18]

α – hydroxytamoxifen:

Metabolit, který může v některých tkáních (játra, endometrium) indukovat rakovinné bujení prostřednictvím tvorby kovalentních aduktů s DNA, je α – hydroxytamoxifen (obr. 11, str. 12). Jelikož deuterace tamoxifenu v poloze α ([α -D2-ethyl]tamoxifen) či α i β ([D5-ethyl]tamoxifen) vede k radikálnímu snížení počtu aduktů s DNA, je α – hydroxytamoxifen považován za skutečně stěžejní meziprodukt bioaktivace tamoxifenu. Vedle tohoto produktu přichází v úvahu ještě další dva deriváty, které se podílejí na genotoxicitě tamoxifenu v menší míře, jmenovitě epoxid tamoxifenu a chinon-methid 4-hydroxytamoxifenu (obr. 10).[17,18,19]

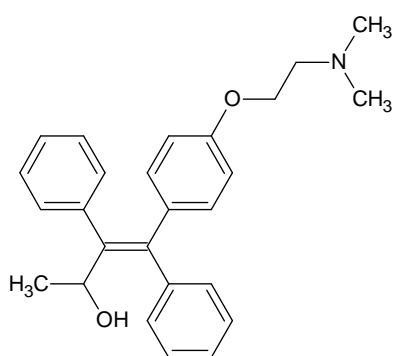
α – hydroxytamoxifen je minoritní produkt metabolismu tamoxifenu a jeho produkce, která se u jednotlivých biologických druhů liší, klesá v pořadí potkan > myš >> člověk. Mechanismus jeho působení *in vivo* byl tedy popsán na základě vyvolaných reakcí u potkanů, kde dochází primárně k postižení jaterní tkáně. Jeho tvorbu katalyzují cytochromy P450 podrodiny 3A, majoritně izoforma CYP3A4.[15,19]

Tvorba aduktů s DNA je podmíněna vznikem elektrofilního karbokationtu na α -pozici tamoxifenu. α -Hydroxylová skupina α – hydroxytamoxifenu však není příliš dobrou „odstupující“ skupinou, a proto vyžaduje ještě další aktivaci. Z experimentů *in vitro* vyplývá, že reakce α – hydroxytamoxifenu s DNA je pH dependentní, rychlejší v kyselém pH (obr.12), kdy dochází k protonaci α -hydroxylové skupiny a její aktivaci. V živém organismu dochází k aktivaci α – hydroxytamoxifenu jeho konjugací se sulfátem.[20]

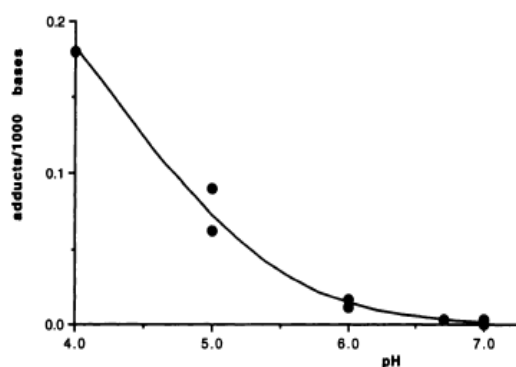
Jako ostatní produkty metabolismu podléhá α -hydroxytamoxifen konjugaci i s jinými endogenními látkami v organismu. Z dosavadních poznatků vyplývá, že je majoritně vylučován ve formě glukosiduronátu, což je produkt detoxikační cesty.[19]

Míra genotoxicity tohoto metabolitu tedy závisí na rovnováze mezi konjugačními reakcemi s kyselinou glukuronovou a aktivním sulfátem. Tyto procesy se liší jak mezidruhově, tak v rámci inter-individuálních rozdílů.[19]

Schéma výše diskutovaného procesu, při kterém dochází k přeměně tamoxifenu na genotoxický intermediát, je znázorněno na obr. 14, kap.5



Obr. 11: α -hydroxytamoxifen



Obr. 12: Závislost pH prostředí na množství aduktů s DNA generovaných z α – hydroxytamoxifenu. Převzato z [20]

5. Vedlejší účinky tamoxifenu

Přestože tamoxifen je prokazatelně efektivní při léčbě rakoviny prsu, tato adjuvantní terapie postihuje i ostatní tkáně lidského organismu. Jedná se jak o pozitivní efekty, tak efekty negativní. Částečné agonistické působení tohoto agens se projevuje v kostech, v ženské děloze a v metabolismu lipidů. Užívání tamoxifenu tedy pozitivně ovlivňuje kardiovaskulární systém prostřednictvím snižování hladiny cholesterolu a hladiny LDL (**L**ow **D**ensity **L**ipoprotein = Nízkodenzitní lipoprotein). Tamoxifen zastává i ochrannou funkci před vznikem osteoporózy, jevu, který je jedním z doprovodných symptomů postmenopausálního období.[4,5]

Mezi nejobávanější sekundární projevy dlouhodobé léčby tamoxifenem patří u žen rakovina endometria, potencionální hepatokarcinogenita a indukce rezistence vůči samotnému léčivu. Indukce rakoviny v obou zmíněných tkáních je důsledkem tvorby kovalentních aduktů s DNA či dalších změn postihující jaderný aparát. Terapie tamoxifenem také vyvolává celou řadu nežádoucích účinků: návaly horka, vaginální krvácení, bolesti hlavy, náladovost, zadržování vody v organismu a zvýšené riziko tromboembolických příhod.[4] Účinnost léčby tamoxifenem může být také ohrožena při současném požívání jiných léčiv, např. antidepressiv. Těmto rizikům, spojeným s léčbou tamoxifenem, se dále věnuji podrobněji.

5.1 Genotoxicita tamoxifenu

Genotoxicita tamoxifenu se projevuje v několika směrech:

- a) generování metabolitů, které se kovalentně vážou na DNA
- b) aneuploidie
- c) tvorba mikrojader
- d) genetické mutace [44]

Nejrozsáhlejší genetické změny byly zaznamenány v jaterní tkáni potkanů a v endometriu ženské dělohy. V ostatních zkoumaných tkáních (ledviny, žaludek, střevo, slezina, plíce a děloha) nebyly nalezeny téměř žádné známky genotoxického působení tamoxifenu. Pouze u několika potkanů bylo detekováno malé množství aduktů v ledvinách

a žaludku po předchozí aplikaci α – hydroxytamoxifenu. Tento vzácný výskyt aduktů s DNA ve zmíněných tkáních lze interpretovat tak, že daní jedinci vykazovaly vyšší míru aktivace (např. snížené pH prostředí, obr. 10, str. 12) či nedostatečné detoxikace. Po aplikaci samotného tamoxifenu nebyly detekovány adukty ani u zmíněných jedinců. Lze to vysvětlit tím, že tvorba α – hydroxytamoxifenu je zastoupena v metabolismu tamoxifenu minimálně, a proto množství generovaných aduktů dosahuje mnohem nižších hodnot než při použití jeho α -hydroxylovaného derivátu.[19,32]

V sekundární fázi biotransformace je α – hydroxytamoxifen aktivován zejména účinkem sulfotransferas (u potkana hydroxysteroid sulfotransferasa (ST2A2), izoforma u člověka SULT2A1).[44] V extrahepatálních tkáních je patrná zvýšená exprese N,O-acetyltransferas (NATs), které například zvyšují genotoxicitu 3-nitrobenzanthronu.[32] K aktivaci α – hydroxytamoxifenu na genotoxické intermediáty účinkem NATs však nedochází a hlavními aktivátory zůstávají sulfotransferasy, jejichž primárním působištěm je jaterní tkáň.[32] Vyšší exprese enzymu ST2A2 je patrná u samic potkana a tedy i generované množství aduktů dosahuje vyšších hodnot. V průběhu léčby tamoxifenem však toto léčivo u samců indukuje tvorbu zmiňovaného enzymu, a tím se zvyšuje i míra tvorby aduktů s DNA. U samic naopak dochází k menšímu poklesu exprese.[44]

U samic potkana nebyla zaznamenána vyšší míra tvorby aduktů s DNA v jejich děloze. Z těchto poznatků lze usoudit, že karcinogeneze v této tkáni je nepochybně spjata i s jinými mechanismy, které nesouvisí s genotoxickými účinky derivátů tamoxifenu.[32]

Tvorba kovalentních aduktů s DNA má za následek vznik bodových mutací v DNA v podobě transverzí a přechodů mezi bazemi purinového či pyrimidinového typu (A→G, C→T) (z angl. transitions). Výsledkem je záměna bazí v místech, kde se nacházejí léze a v komplementárním řetězci. Míra generování daných mutací závisí na prostorovém uspořádání konkrétního stereoizomeru α -(N²-deoxyguanosinyl)tamoxifenu (dG-N²-TAM). [33]

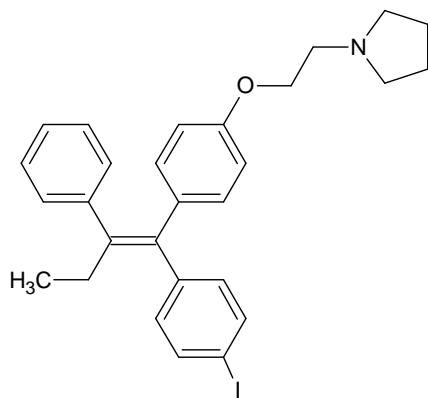
5.2 Vliv terapie tamoxifenem na děložní tkáň

5.2.1 Rakovina endometria vyvolaná tamoxifenem

Endometriální karcinogenita u žen spojená s dlouhodobějším užíváním tamoxifenu je ve výsledku kombinací dvou cest, jakými tamoxifen může v organismu působit. První z nich je pravděpodobně spojená s jeho agonistickým působením na estrogení receptory

v ženské děloze. Druhý příspěvek pak představuje tvorba kovalentních aduktů s DNA. Adukty, které prokazují tento genotoxický efekt jsou odvozené od α -hydroxytamoxifenu, který dále podléhá sulfataci (obr. 14, str. 20) . Po této nezbytné aktivaci dochází majoritně k reakci vzniklého elektrofilního agens s exocyklickou aminoskupinou guaninu za vzniku dG-N²-TAM. Míra tvorby těchto aduktů se v jednotlivých případech značně odlišuje. Např. dle práce Shibutanio et al.(2000) množství vzniklých aduktů u jednotlivých subjektů příliš neodpovídalo době užívání tamoxifenu či rozsahu vyvinutého onemocnění. Tento fakt lze pak vysvětlit tím, že míra vzniku těchto genotoxických produktů závisí na enzymové výbavě daného subjektu, aktivitě těchto enzymů a dále pak na aktivitě reparačních mechanismů. Tyto faktory hrají důležitou roli při stanovení finálního množství aduktů a liší se případ od případu. Prekurzorem α -hydroxytamoxifenu může být jak tamoxifen, tak dále jeho deriváty N-oxid tamoxifenu a N-desmethyltamoxifen.[21,22]

Stěžejní pak pro vznik aduktů s DNA je substituce tamoxifenu na pozici **4** jako např. v případě 4-hydroxytamoxifenu. Bylo zjištěno, že α -hydroxylace a současná 4-hydroxylace podporují tvorbu aduktů z důvodu lepší stabilizace vzniklého karbokationtu na α -pozici. Naopak idoxifen (obr. 13) je v tomto ohledu bezpečnější, jelikož substituce jódem vede k nižší reaktivitě generovaného karbokationtu.[24]



Obr. 13: Idoxifen

Poslední studie vývoje rakoviny endometria jako sekundárního projevu dlouhodobé léčby tamoxifenem se zaměřují na stanovení genové exprese enzymů, které se zapojují do bioaktivace tamoxifenu. Pro získání relevantních výsledků byly použity pro měření míry exprese těchto enzymů tkáně ze tří následujících skupin pacientů:

- 1) pacienti se zvýšenou proliferací buněk endometria (benigní tkáň)

- 2) pacienti trpící endometriálním karcinomem (EK), kteří nebyli ovlivněni léčbou tamoxifemem
- 3) pacienti trpící EK se současným požíváním tamoxifenu

Nejdůležitější závěry, které tento výzkum přinesl jsou následovné:

- a) izoforma sulfotranferas SULT2A1, která hraje roli v druhé fázi bioaktivace tamoxifenu byla detekována ve všech tkáních u všech skupin pacientů
- b) množství mRNA transkriptů CYP3A4 a SULT2A1 dosahovalo nejvyšších hodnot u 2. skupiny pacientů ; u 3. skupiny pacientů byla exprese daných izoform v některých nádorových tkáních značně snížena
- c) úroveň transkriptů CYP1A2 vykazovala největší inter-individuální rozdíly i v rámci jedné skupiny pacientů [25]

Expese studovaných enzymů podporující vznik genotoxických intermediátů tamoxifenu byla všeobecně detekována. Zda je však míra expese těchto enzymů a jejich aktivita dostačující pro vyvolání karcinogeneze v této tkáni prostřednictvím tvorby genotoxických aduktů, je zatím stále předmětem budoucích výzkumů.[25]

Na bioaktivaci tamoxifenu v první fázi biotransformace se určitou mírou podílí cytochromy P450 podrodiny 2B. Byl zkoumán vliv působení inhibitorů na tyto enzymy, které přeměnou tamoxifenu na α -hydroxytamoxifen podporují vznik genotoxických aduktů s DNA. Účinná inhibice těchto enzymů by mohla vést ke snížení genotoxicity tamoxifenu v endometriu a chránit tak před možným vývojem rakoviny v této tkáni. Jako nejúčinnější selektivní inhibitory podrodiny 2B s nejvyšší afinitou byly stanoveny 2-izopropenyl-2-methyladamantan (2-PMADA) a 3-izopropenyl-3-methyldiamantan (3-PM DIA). Jedná se o kompetitivní inhibici, avšak z kinetického hlediska jsou reakce poměrně pomalé. Účinky zmiňovaných látek však dobře poslouží pro hlubší poznání charakteru cytochromů P450 podrodiny 2B a dále usnadní hledání nových struktur vhodných pro jejich inhibici.[26]

Efekt tamoxifenu na rakovinu endometria nemusí být nutně spjat pouze s parciálním agonismem. Tamoxifen totiž sice indukuje expresi určitých genů stejně jako při vazbě estradiolu, jiné však potlačuje. To znamená, že účinky tamoxifenu (agonismus x antagonismus) se pak liší v rámci specifických struktur dané tkáně (v tomto případě např.

stroma a epiteliální tkáň endometria). Tyto projevy byly pozorovány i v některých částech prsní nádorové tkáně, kde indukce exprese některých genů a s tím spjaté další šíření tumoru však není v žádném případě kýženým efektem.[27]

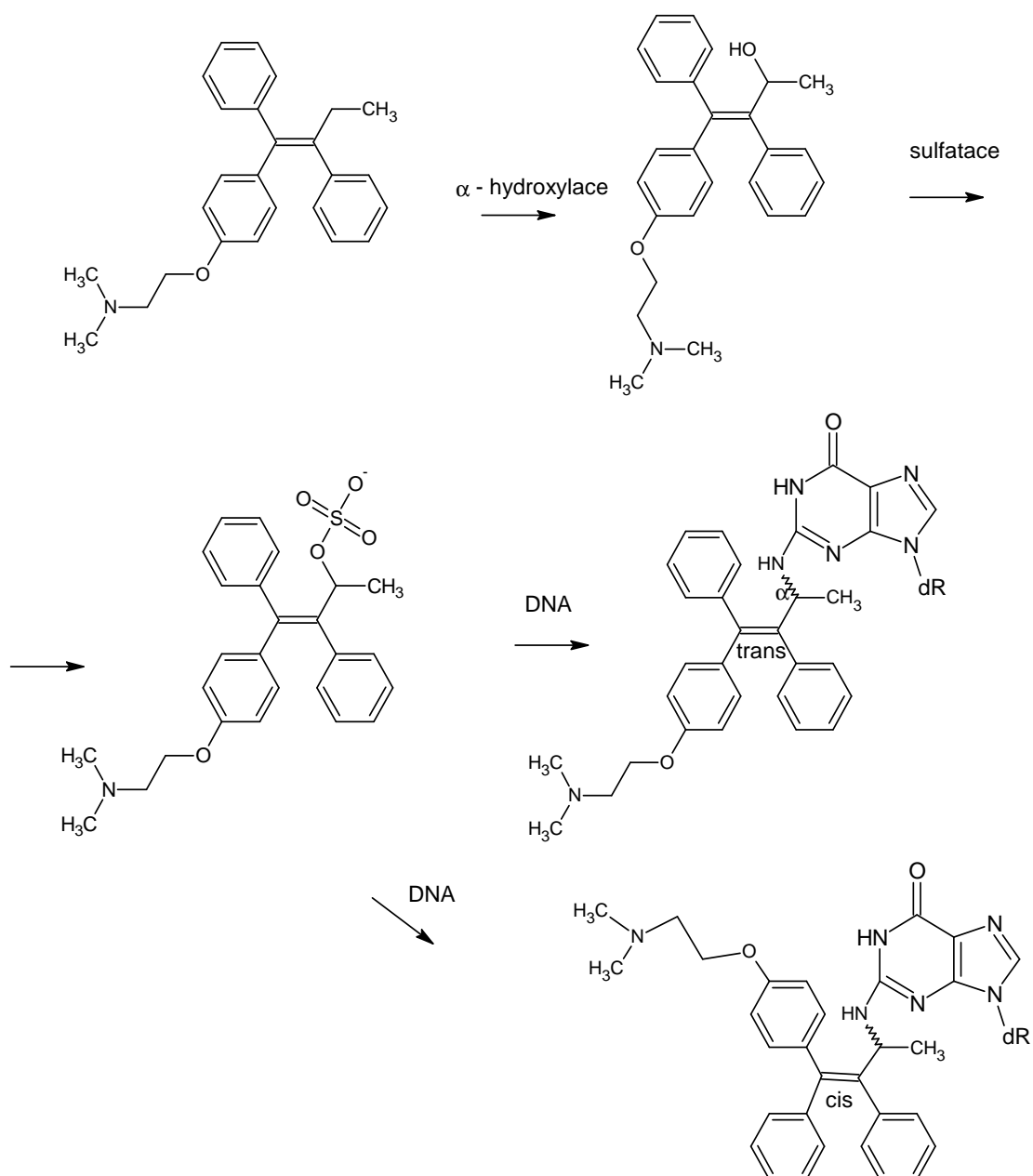
5.2.2 Účinky kombinované léčby tamoxifenu s estradiolem

U postmenopauzálních pacientek, které nepodstoupily hysterektomii, je nutné chránit endometrium a zmírnit obtíže spojené s ubýváním ženských pohlavních hormonů (progesteronu a estrogeneru) užíváním kombinované estrogen-progestinové terapie (EPT)[28]. Progestageny zastávají funkci ochrany endometria proti nežádoucím efektům estrogenů dvěma hlavními mechanismy. Prvním z nich je konverze estradiolu na méně aktivní formu v podobě estronu, tím druhým částečné omezení transportu estrogenů do jadra buněk [5]. Nevýhodou této kombinované léčby je však ještě vyšší pravděpodobnost vývoje prsního tumoru než při samotné estrogenové terapii.[23] V souvislosti s těmito nepříjemnými okolnostmi, které EPT přináší, se dospělo k hledání určité alternativy progestinu. Potencionálním kandidátem, který by blokoval účinky estrogenů v endometriu a prsní tkáni, je právě tamoxifen užívaný v kombinaci s nízkými dávkami estrogeneru. Dodávaný estrogen by si pak zachovával své blahodárné účinky v dalších tkáních, jako jsou např. kosti nebo urogenitální trakt.[27]

Tato léčba se na fyziologii endometriální tkáně projevila v několika směrech:

- 1) zesílení endometriální stěny
- 2) zvýšená stromální fibróza
- 3) cystická dilatace žlázek
- 4) redukce epiteliální a stromální proliferace oproti samotné estrogenové terapii [27]

Z řady studií se došlo k závěru, že terapie tamoxifenem ve všech ohledech dominuje nad terapií estrogenovou a účinky této kombinované léčby se liší minimálně od užívání samotného tamoxifenu nebo estrogeneru. Vzhledem k nebezpečí, které dlouhodobé užívání tamoxifenu přináší, je nutné v tomto ohledu hledat bezpečnější variantu z řad SERM.[27]



Obr. 14: Tamoxifenové adukty tvořené z α -hydroxytamoxifenu. Na α uhlíku je stereogenní centrum, z toho důvodu každý z aduktů *cis* a *trans* představuje dva epimery; dR = 2'-deoxyribosyl. [21]

5.3 Hepatokarcinogenita tamoxifenu

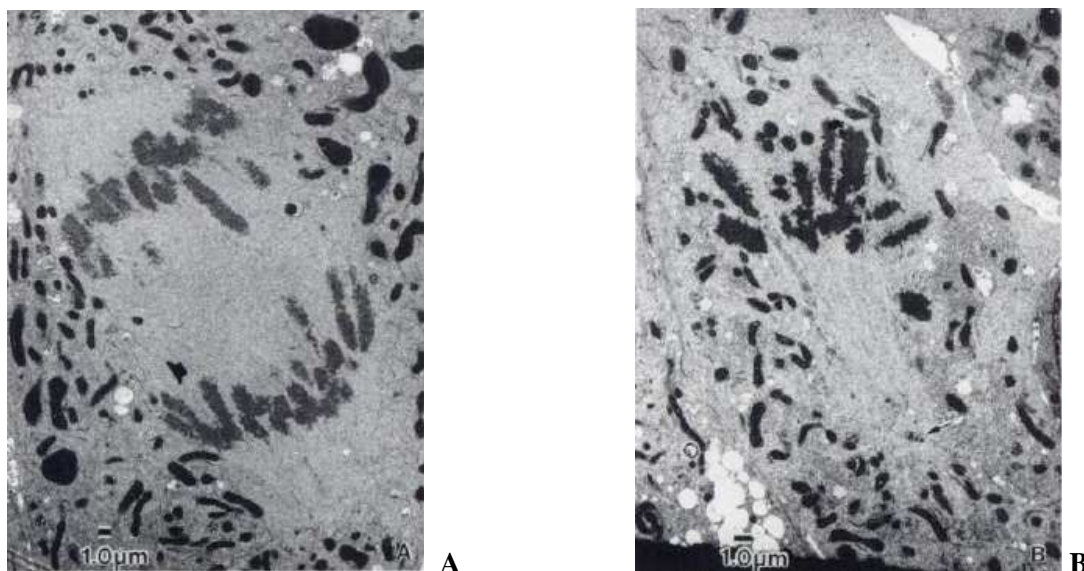
5.3.1. Tvorba kovalentních aduktů s DNA

Karcinogenita tamoxifenu vyvolaná tvorbou kovalentních aduktů s DNA se projevila především u laboratorních potkanů. Jak již bylo uvedeno výše, ve druhé fázi

biotransformace tohoto agens dochází k jeho konjugaci s endogenními látkami, O-glukuronidaci nebo reakci s aktivním sulfátem za tvorby sulfátových esterů. Pokud převažuje konjugace s kyselinou glukuronovou (u člověka) dochází k jeho detoxikaci. Naopak sulfatace zajišťuje aktivaci tamoxifenových intermediátů, které tvoří kovalentní adukty s DNA.[29] Struktury aduktů s DNA v této tkáni odpovídají strukturám detekovaných v endometriální tkáni. Jedná se o cis-trans izomery dG-N²-TAM.[20] Kromě těchto majoritně zastoupených produktů byl registrován ještě adukt s adeninem (α -(N⁶-deoxyadenosinyl)tamoxifen).[30]

5.3.2. Poruchy jaderného aparátu jaterních buněk potkana

Jak již bylo uvedeno, genotoxicita tamoxifenu se projevuje na několika úrovních. Byla to právě jaterní tkáň potkanů, u které byly po předchozí léčbě tamoxifenem zaznamenány různé druhy aberací. Jednalo se především o aneuploidii chromozomů, chromozomální výměny, endoreduplikaci (zdvojení genetické informace chromozomu bez následné mitózy) či předčasnou kondenzaci chromozomů. Všechny tyto jevy jsou patrně důsledkem patologické tvorby dělicího vřeténka. V jaterních buňkách potkanů podrobených terapii tamoxifenem se tvořilo vřeténko monopolární, zatímco u kontrolní skupiny potkanů docházelo ke standardní tvorbě vřeténka bipolárního (obr.15).[34,35]



Obr.15: Snímek dělení hepatocytů pořízený elektronovým mikroskopem : A (kontrolní skupina potkanů) a B (potkani léčeni tamoxifenem o dávce 3 mg/kg). Na obrázku A je zobrazena tvorba bipolárního dělicího vřeténka o standardní délce. Obr. B zobrazuje patologické změny ve struktuře mitotického aparát. Převzato z [35]

Důvodem všech výše uvedených strukturních a funkčních změn v jádře hepatocytů, které vedou ke zvýšenému riziku tvorby nádoru jaterní tkáně, je patrně inhibice účinků kalmodulinu. Kalmodulin zastává důležitou funkci při tvorbě mitotického aparátu. V jaterní tkáni potkanů byly zaznamenány i patrné klastogenní účinky, tedy tvorba zlomů ve struktuře chromozomů.[35,36]

5.3.3 Genové mutace v jádře jaterních buněk potkana

U velké části potkanu s diagnostikovaným hepatokarcinomem byly nalezeny specifické mutace tumor supresorového genu p53, který hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu. Mutace v oblastech tohoto genu bývají důležitým podnětem pro vývoj rakoviny. U potkanů léčených tamoxifenem se jednalo o mutace na dvou specifických místech tohoto proteinu, kodonu 231 a 294, přičemž záměna báze v kodonu 231 má za následek chybné inkorporování aminokyseliny v jeho struktuře.[37,38]

Pro studium mutagenese vyvolané tamoxifenem či jinými karcinogeny lze využít tzv. transgenní organismy. V tomto případě se jednalo o transgenní potkany nesoucí bakteriální gen LacI. Dané subjekty byly vystaveny léčbě tamoxifenem v dávkách vyšších než jsou terapeutické dávky pacientů postižených rakovinou prsu. Mutace, které pravděpodobně vznikly důsledkem stimulace tamoxifenem (z důvodu jejich absence u kontrolní skupiny potkanů) jsou trojího typu:

- a) tranverze G:C párů na T:A
- b) vložení bazí
- c) delece G:C párů

Dané poruchy v sekvenci genu vedly především ke vzniku stopkodonu nebo záměně aminokyseliny v primární struktuře polypeptidu.[39]

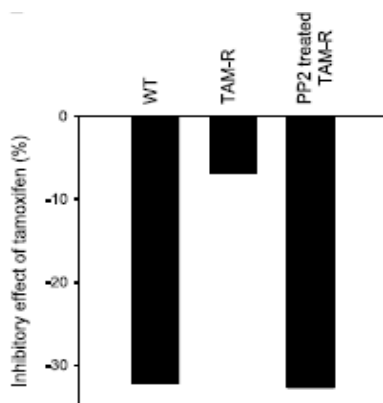
5.4 Rezistence nádorového onemocnění na léčbu tamoxifenem

V důsledku dlouhodobé léčby tamoxifenem lze pozorovat rezistenci tumoru, respektive opětovnou proliferaci nádorových buněk. Mechanismus této proliferace stimulované tamoxifenem může být dvojitý:

- a) tumor se stane v určitém směru na léčbě tamoxifenem závislý, v tomto případě nedochází ke ztrátě estrogenních receptorů
- b) v důsledku nedostatečného množství estradiolu v nádorové buňce ztrácí estrogenní receptory, které se stávají vůči tamoxifenu necitlivé [4]

Koncept mechanismu rezistence na tamoxifen, při němž dochází ke ztrátě ER α není příliš reálný, protože rezistentní tumory jsou v mnoha případech schopné efektivně odpovídat na jiné typy antiestrogenní terapie.[40]

Přesto je patrné snížení antiestrogenního účinku tamoxifenu u nádorových buněk MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), které byly přes 12 měsíců vystaveny působení tamoxifenu. Bylo zjištěno, že při dlouhodobém působení tohoto léčiva dochází k redistribuci estrogenních receptorů mezi jádrem buněk a jejich cytoplazmou. U buněk senzitivních vůči tamoxifenu jsou ER ve vyšší míře zastoupeny v jádře, ale u rezistentních buněk dochází k jejich translokaci do cytoplazmy. Zde dochází k interakcím s receptory pro epidermální růstové faktory (**EGFR** – **E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor), které dále aktivují **MAPK** (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase = mitogenem aktivované protein kinas) signální stezku a tím zvýšenou progresi tumoru. Důležitou úlohu hraje též aktivita c-Src kinasy, která pravděpodobně zabraňuje zpětnému transportu do jádra. Při použití inhibitorů (obr. 16) této kinasy totiž dochází k opětovnému obnovení senzitivity vůči tamoxifenu. [40]



Obr. 16 : Rozdílný inhibiční efekt tamoxifenu u normálních nádorových MCF-7 buněk (**WT**= Wild Type), u rezistentních buněk (**TAM-R**) a rezistentních buněk vystavených působení inhibitoru c-Src kinasy (**PP2 treated TAM-R**) (PP2 = 4-amino-5-(4-chlorofenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin). Převzato z [40]

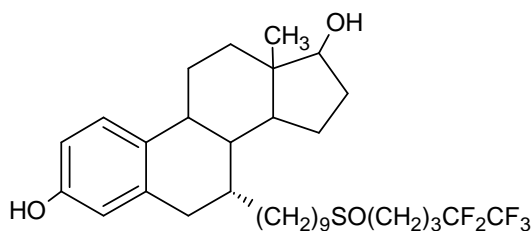
Mechanismus vzniku rezistence na různé antiestrogeny u premenopauzálních (Pre-M) a postmenopauzálních (PM) pacientek je odlišný v důsledku rozdílné hladiny estrogenů. Tyto poznatky byly získány ze studie MCF-7 buněk vystavených dlouhodobému působení různých antiestrogenů (tamoxifen, jeho aktivní forma 4-hydroxytamoxifen a fulvestrant) v Pre-M a PM podmínkách. U rezistentních buněk v Pre-M podmínkách byl estradiol schopen vyvolat růst buněk a inhibovat jejich apoptózu, zatímco v PM podmínkách se projevil opačný efekt.[41]

Zajímavým zjištěním byl efekt epidermálního růstového faktoru (EGF) na nádorové buňky, u kterých byla detekována zvýšená exprese EGFR (4-hydroxytamoxifen, fulvestrant) a u buněk vystavených tamoxifenu. U buněk testovaných tamoxifem způsobily účinky EGF jejich zvýšenou proliferaci, zatímco u buněčných kultur rezistentních na 4-hydroxytamoxifen či fulvestrant došlo pouze k nabytí jejich hmotnosti. Objevují se nové teorie, které tyto účinky připisují pozměněné funkci EGFR v důsledku jejich translokace z plazmatické membrány do cytosolu nebo jádra.[41]

V případě zpozorování těchto projevů rezistence je nutné najít alternativní léčivo, které si bude uchovávat vysoký potenciál v léčbě karcinomu prsu a zároveň bude co nejlépe kompenzovat nedostatky terapie tamoxifem. Jedním z takových agens, které by mohly účinně nahradit tamoxifen po jeho selhání, je **fulvestrant** (ICI 182,780). Tato látka se řadí do skupiny čistých antiestrogenů, které na tzv. ER⁺ nádory působí odlišným mechanismem než tamoxifen. Při vniknutí do jádra nádorových buněk dochází k návazání na ER α a k dimerizaci receptoru s ER α nebo ER β , tedy tzv. heterodimerizaci. V této formě pak ER α interagují se složkami jaderné matrix, cytokeratiny CK8 a CK18, jejichž zvýšené množství v nádorových buňkách posiluje senzitivitu vůči fulvestrantu. Vzniklý komplex je signálem pro proteázy, které způsobují jeho degradaci. Tak tedy dochází k účinné redukci ER α , jejichž masivní zmnožení je příčinou vzniku ER⁺ rakoviny prsu. Důležitou vlastností fulvestrantu je, že nedochází ke křížové rezistenci s tamoxifem, tedy ke snížené účinnosti léčby po předchozí léčbě tamoxifem. Dále potlačuje většinu nežádoucích projevů vyvolaných tamoxifem jako je např. zvýšená proliferace endometriálních buněk. [4, 42]

Fulvestrant (obr. 17, str. 25) postrádá jakékoliv agonistické účinky patrné u tamoxifenu, ale v průběhu jeho užívání byly zaznamenány i nežádoucí projevy v podobě zvýšené slizniční toxicity, která mohla být rovněž důsledkem zvýšené senzitivity pacienta na fulvestrant. Není však pochyb, že při relapsu onemocnění způsobeném rezistencí nádoru

na předchozí endokrinní (hormonální) terapii, je dlouhodobé užívání fulvestrantu vysoce účinným nástrojem k dosažení úplné remise nádorového onemocnění. V rámci různorodých odpovědí na tuto léčbu se však k dávkování léčiva musí přistupovat individuálně.[43]



Obr. 17: Fulvestrant

5.5 Interakce tamoxifenu s jinými léčivy

Mnoho pacientek může v průběhu rakovinného onemocnění podléhat depresím. Z těchto důvodů jsou jim současně s adjuvantní terapií tamoxifenem podávána různá antidepresiva. Mezi nejčastěji používané se řadí SSRI (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors = inhibitory zpětného vychytávání serotoninu).[45]

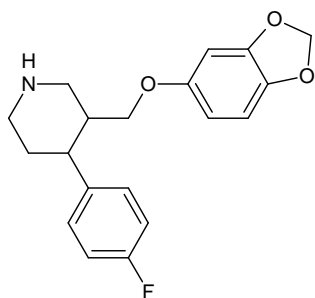
Tamoxifen i SSRI jsou v organismu metabolizovány pomocí stejného enzymu, cytochromem P450 2D6. To může vést ke kompetitivní nebo přímé inhibici a následně ke sníženému množství aktivních tamoxifenových metabolitů, především 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifenu, endoxifenu, který je farmakologicky účinný. Taková redukce aktivních metabolitů tamoxifenu může v dlouhodobém horizontu vést ke zvýšenému riziku návratu onemocnění a v horším případě i ke smrti pacienta. Mezi nejsilnější inhibitory tohoto enzymu řadíme paroxetin a fluoxetin (obr. 18, str. 26), které nevratně redukuje jeho aktivitu. Mezi šetrnější patří fluvoxamin a citalopram.[16,45]

Jak hluboce tedy může být ovlivněna protirakovinná léčba při současné antidepresivní terapii? Z nejnovějších studií vyplývá úzká souvislost s aktivitou cytochromu P450 2D6 u jednotlivých subjektů. U izoforem CYP 2D6, 2C19 a patrně i 2C9 je prokázán častý výskyt genetických polymorfismů. U cytochromu P450 2D6 jsou defekty v jeho genotypu vysoce frekventované a některé z jeho známých 46 polymorfních alel jsou odpovědné za značně redukovanou, či žádnou aktivitu jmenovaného enzymu.

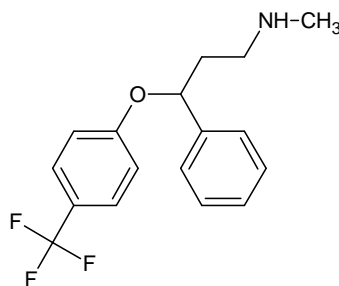
Řešením, jak se vyhnout případným komplikacím, je tedy léčba prostřednictvím slabých inhibitorů, jako jsou např. fluvoxamin či citalopram.[13, 45,47]

Léčba těmito prostředky zároveň v určitých směrech nahrazuje nežádoucí estrogenovou terapii a účinně potlačuje symptomy spojené s menopauzálním obdobím jako jsou např. návaly horka.[16] Tyto účinky léčby antidepresivy potvrzuje i fakt, že subjekty s dvěma nefunkčními alelami formy CYP2D6 jsou postiženy nepříjemnými návaly horka v menší míře než jedinci s aktivní formou enzymu.[46]

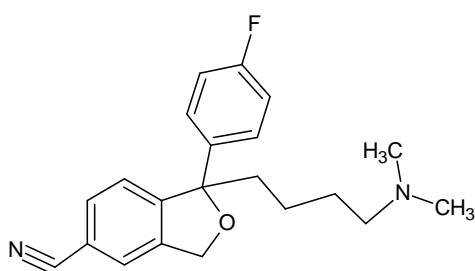
Z výše uvedeného tedy vyplývá, že pro účinnou terapii tamoxifenem musíme brát v úvahu metabolismus konkomitantly užívaných léčiv a genotyp pacienta. Zde hovoříme o CYP2D6 a jejich inhibici prostřednictvím SSRI. V metabolismu tamoxifenu se však uplatňují i další enzymy (podrodiny 3A,1A,2B) a dopodud není zcela prozkoumán vliv příslušných inhibitorů těchto enzymů na účinnost léčby tamoxifenem.[16]



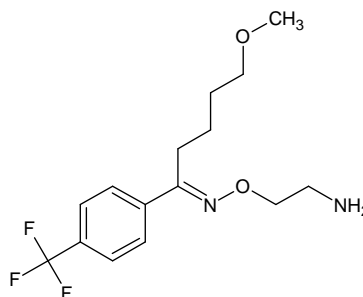
paroxetin



fluoxetin



citalopram



fluvoxamin

Obr. 18: Léčiva z řad SSRI, které snižují účinnost terapie tamoxifenem

Při současném užívání tamoxifenu a hydrofilních blokátorů kalciových kanálů (např. antihypertenziva, léčiva kardiovaskulárních onemocnění), které působí jako inhibitory cytochromů P450 3A4, byly zjištěny vyšší plazmatické koncentrace tamoxifenu než při použití samotného tamoxifenu. Tuto skutečnost lze vysvětlit např. právě tím, že CYP3A hrají roli při eliminaci tamoxifenu z organismu, a tedy jejich aktivita snižuje jeho koncentraci v krvi.[16,48]

6. Závěr

Tamoxifen je protinádorové agens, které účinně bojuje jak proti již vyvinutému nádorovému onemocnění prsu, tak působí i jako prostředek k zamezení jeho vývoje u rizikových pacientek. Mezi farmakologicky účinné metabolity, antagonisty estrogenního receptoru s vysokou afinitou řadíme 4-hydroxytamoxifen a jeho N-demetylovaný derivát endoxifen. Vznik těchto meziproductů metabolismu tamoxifenu je podmíněn aktivitou biotransformačních enzymů ze skupin cytochromů P450 a sulfotransferas, která se u jednotlivých subjektů liší a proto vždy nedochází k příznivé odpovědi na terapii.

Vedle těchto meziproductů metabolismu je pozornost věnována především α -hydroxytamoxifenu, který je nositelem genotoxických vlastností tohoto léčiva v některých tkáních. Jedná se především o indukci rakoviny v jaterní tkáni potkanů a endometriu ženské dělohy. V jaterní tkáni lidského druhu nejsou patrné známky genotoxického působení tamoxifenu, jelikož dochází k jeho aktivaci prostřednictvím sulfatace v nižším rozsahu než u potkanů. Z toho vyplývá, že karcinogeneze v endometriální tkáni musí být způsobena ještě dalšími mechanismy, které nejsou závislé na míře tvorby a aktivace α -hydroxytamoxifenu. V endometriu působí tamoxifen na estrogenní receptory jako částečný agonista, jinými slovy vyvolává podobné účinky jako při vazbě estrogenů, ovšem v menší míře. Kromě problému týkajícího se potenciálního vývoje nádorových onemocnění ve zmiňovaných tkáních, je léčba tamoxifenem dále doprovázena podobnými nežádoucími účinky, které pacientky prožívají v menopauzálním a postmenopauzálním období v důsledku ubývání ženských hormonů. Přesto můžeme tvrdit, že všechny tyto negativní účinky nepřevažují nad účinností samotné léčby tamoxifenem, která stále zastává dominantní postavení při léčbě rakoviny prsu. Vznik endometriálního karcinomu a dalších doprovodných nežádoucích účinků závisí na mnoha faktorech (např. enzymatická výbava pacienta, genotyp enzymů podílejících se na biotransformaci tamoxifenu atd.), které se individuálně liší.

V důsledku těchto nepříznivých projevů léčby tamoxifenem, mezi něž patří i vytvoření rezistence nádorového onemocnění, je nutné se zaměřit i na vývoj a výzkum nových preparátů, které budou nedostatky léčby tamoxifenem kompenzovat. Jedním z nejdůležitějších nástupců tamoxifenu je fulvestrant, který nevyvolává agonistické účinky a stává se tedy vhodným adeptem pro léčbu rakoviny prsu při selhání terapie tamoxifenem.

Jako u všech léčiv se tamoxifen potýká s problémem interakce s jinými léčivy,

z nichž nejméně příznivé pro zdraví a účinnou léčbu pacienta je vzájemná kompetice tamoxifenu a antidepresiv z řad SSRI.

V budoucích studiích je nezbytné se zaměřit na stanovení exprese veškerých enzymů, které se mohou podílet na aktivaci tamoxifenu za následné tvorby mutací DNA v endometriální tkáni. Dále bych považovala za nutné věnovat zvýšenou pozornost hledání nových struktur, které by účinky cílových enzymů inhibovaly, a tím úspěšně potlačily genotoxický efekt tamoxifenu.

Seznam použitých zkratek

2-PMADA	2-izopropenyl-2-methyladamantan
3-PMDIA	3-izopropenyl-3-methyldiamantan
AF	funkční oblast estrogenního receptoru Activation function
BRCA	gen Breast Cancer
CK	cytokeratin
CYP	cytochrom P450
DBD	doména vázající DNA (DNA binding domain)
dG	deoxyguanosin
dG-N²-TAM	α -(N ² -deoxyguanosinyl)tamoxifen
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
EK	endometriální karcinom
EPT	estrogen-progestinová terapie
ER	estrogenní receptor
ER+	pozitivní nález estrogenních receptorů
ERE	úseky odpovědné za vazbu estrogenu (estrogen response elements)
HST	hormonální substituční terapie
HBD	doména vázající hormon
IGF	inzulínu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein)
MAPK	mitogenem aktivované protein kinasy (mitogen-activated protein kinase)
MCF-7	buněčná linie odvozená z prsního karcinomu pro výzkum ER pozitivní rakoviny prsu (Michigan Cancer Foundation-7)
NAT	N,O-acetyltransferasa
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PgR	progesteronový receptor
Pre-M	premenopauzální

PM	postmenopauzální
SERM	selektivní modulátor estrogenních receptorů (selective estrogen receptor modulator)
SSRI	inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (selective serotonin reuptake inhibitor)
SULT	sulfotransferasa
TAM-R	buňky rezistentní na léčbu tamoxifenem
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
UDP	uridindifosfát
WT	nádorové buňky odpovídající na léčbu tamoxifenem (wild type)

Seznam použité literatury

- [1] ANDERSON, W. F.; JATOI, I.; TSE, J.; ROSENBERG, P. S.: *Journal of Clinical Oncology*. 2010, vol. 28, s. 232-239
- [2] CHOVANEC, J.; DOSTÁLOVÁ, Z.; NAVRÁTILOVÁ, J.: *Interní medicína pro praxi*. 2008, vol. 10, s. 84-89
- [3] Centrum prevence [online]. 2011. Civilizační choroby. Dostupné z WWW: <<http://www.centrumprevence.cz/civilizační-choroby>> [cit. 2011-03-31]
- [4] YAO, K. ; JORDAN, V. C.: *The Oncologist*. 1998, vol.3, s. 104-110
- [5] HENDERSON, B. E.; ROSS, R.; BERNSTEIN, L. *Cancer Research*. 1988, vol. 48,s. 246-253
- [6] PRAUSOVÁ, J. Karcinom prsu. [online]. 2003; dostupné z WWW: <old.medik.cz/medik/onkologie/prs.ppt> [cit. 2011-03-15]
- [7] MACGREGOR, J. I.; JORDAN, V. C.: *Pharmacological Reviews*. 1998, vol. 50, s. 151-196
- [8] DALVAI, M.; BYSTRICKY, K.: *Public Library of Science ONE*. 2010, vol. 5, s. 1-9
- [9] LEŚNIEWSKA, M.; MILTYK, W.; ŚWIĄTECKA, J.; TOMASZEWSKA, M.; KUŹMICKI, M.; PAŁKA, J.; WOLCZYNSKI, S.: *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2009, vol. 47, s. 107-112
- [10] JORDAN, V.C.: *British Journal of Pharmacology*. 2006, vol. 147, s. 269-276
- [11] Wikipedia.org [online]. 2011. Adjuvantní chemoterapie. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Adjuvantní_chemoterapie> [cit. 2011-03-01]
- [12] GRONWALD, J.; TUNG, N.; FOULKES, W. D.; OFFIT, K.; GERSHONI, R.; DALY, M.; KIM-SING, CH.; OLSSON, H.; AINSWORTH, P.; EISEN, A.; SOAL, H.; FRIEDMAN, E.; OLOPADE, O.; OSBORNE, M.; WEITZEL, J.; LYNCH, H.; GHADIRIAN, P.; LUBINSKI, J.; SUN, P.; NAROD, S. A.; The Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *International Journal of Cancer*. 2006, vol. 118, s. 2281-2284

- [13] GOETZ, M. P.; KNOX, S. K.; SUMAN, V. J. ; RAE, J. M.; SAFGREN, S. L.; AMES, M. M.; VISSCHER, D. W.; REYNOLDS, C.; COUCH, F. J.; LINGLE, W. L.; WEINSHILBOUM, R. M.; BARR FRITCHER, E. G.; NIBBE, A. M.; DESTA, Z.; NGUYEN, A.; FLOCKHART, D. A.; PEREZ, E. A.; INGLE, J. N.: *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007, vol. 101, s. 113-121
- [14] HYNIE, S. Xenobiochemie (přednáška) 2005; dostupné z WWW: <che1.lf1.cuni.cz/html/Xenobiochemie.pdf> [cit. 2011-03-19]
- [15] BOOCOCK, D. J.; BROWN, K.; GIBBS, A. H.; SANCHEZ, E.; TURTELTAUB, K. W.; WHITE, I. N. H. *Carcinogenesis*. 2002, vol. 23, s. 1897-1901
- [16] JIN, Y.; DESTA, Z.; STEARNS, V.; WARD, B.; HO, H.; LEE, K-H.; SKAAR, T.; STORNILOLO, A. M.; LI, L.; ARABA, A.; BLANCHARD, R.; NGUYEN, A.; ULLMER, L.; HAYDEN, J.; LEMLER, S.; WEINSHILBOUM, R. M., RAE, J. M.; HAYES, D. F.; FLOCKHART, D. A.: *Journal of the National Cancer Institute*. 2005, vol. 97, s. 30-39
- [17] PHILLIPS, D. H.; HEWER, A.; N.HORTON, M.; COLE, K. J.; CARMICHAEL, P.L.; DAVIS, W.; OSBORNE, M. R.: *Carcinogenesis*, 1999, vol. 20, s. 2003-2009
- [18] MARQUES, M. M.; BELAND, F. A.: *Carcinogenesis*. 1997, vol. 18, s. 1949-1954
- [19] BOOCOCK, D. J.; MAGGS, J. L.; WHITE, I. N. H.; PARK, B. K.: *Carcinogenesis*. 1999, vol.20, s. 153-160
- [20] OSBORNE, M. R.; HEWER, A.; HARDCASTLE, I. R.; CARMICHAEL, P. L.; PHILLIPS, D. H.: *Cancer Research*. 1996, vol. 56, s. 66-71
- [21] SHIBUTANI, S.; RAVINDERNATH, A.; SUZUKI, N.; TERASHIMA, I.; SUGARMAN, S. M.; GROLLMAN, A. P.; PEARL, M. L.: *Carcinogenesis*. 2000, vol. 21, s. 1461-1467
- [22] SANCHEZ, C.; SHIBUTANI, S.; DASARADHI, L.; BOLTON, J. L.; FAN, P. W.; McCLELLAND, R. A.: *Journal American Chemical Society*. 1998, vol. 120, s. 13513-13514.
- [23] SCHAIRER, C.; LUBIN, J.; TROISI, R.; STURGEON, S; BRINTON, L., HOOVER, R.: *Journal of the American Medical Association*. 2000, vol. 283, s. 485-491

- [24] HARDCASTLE, I. R.; HORTON, M. N.; OSBORNE, M. R.; HEWER, A.; JARMAN, M.; PHILLIPS, D. H.: *Chemical Research Toxicology*. 1998, vol. 11, s. 369-374
- [25] SINGH, M. N.; STRINGFELLOW, H. F.; WALSH, M. J.; ASHTON, K. M.; PARASKEVAIDIS, E.; ABDO, K. R.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; PHILLIPS, D. H.; MARTIN, F. L.: *Toxicology*. 2008, vol. 249, s. 85-90
- [26] STIBOROVÁ, M.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; HODEK, P.; MRÁZ, J.; FREI, E.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002, vol. 403, s. 41-49
- [27] WOOD, Ch. E.; KAPLAN, J. R.; FONTENOT, M. B.; WILLIAMS, J. K.; CLINE, J. M.: *Clinical Cancer Research*. 2010, vol. 16, s. 946-956
- [28] MedicineNet.com [online]. 2011. Definition of Estrogen/progestin therapy. Dostupné z WWW: <<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=23933>> [cit. 2011-05-06]
- [29] PHILLIPS, D.H.: *Carcinogenesis*. 2001, vol. 22, s. 839-849
- [30] OSBORNE, M. R.; HARDCASTLE, I. R.; PHILLIPS, D. H.: *Carcinogenesis*. 1997, vol. 18, s.539-543
- [31] CREWE, H. K.; NOTLEY, L. M.; WUNSCH, R. M.; LENNARD, M. S.; GILLAM, E. M. J.: *Drug metabolism and disposition*. 2002, vol. 30, s. 869-874
- [32] PHILLIPS, D. H.; HEWER, A.; OSBORNE, M. R.; COLE, K. J.; CHURCHILL, C.; ARLT, V. M.: *Mutagenesis*. 2005, vol. 20, s. 297-303
- [33] TERASHIMA, I.; SUZUKI, N.; SHIBUTANI, S.: *Cancer Research*. 1999, vol. 59, s. 2091-2095
- [34] Biology.about.com [online]. 2011. Endoreduplication. Dostupné z WWW: <<http://biology.about.com/od/geneticsglossary/g/Endoreduplication.htm>> [cit. 2011-04-29]
- [35] SARGENT, L. M.; DRAGAN, Y. P.; BAHNUB, N.; WILEY, J. E.; SATTLER, C. A.; SCHROEDER, P.; SATTLER, G. L.; JORDAN, V. C.; PITOT, H. C.: *Cancer Research*. 1994, vol. 54, s. 3357-3360

- [36] The free dictionary [online]. 2011. Clastogenic. Dostupné z WWW: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/clastogenic>> [cit. 2011-04-29]
- [37] Genes and disease [online]. 1998-. The p53 tumor suppressor protein. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22183/>> [cit. 2011-04-07]
- [38] VANCUTSEM, P. M. ; LAZARUS, P.; WILLIAMS, G. M.: *Cancer Research*. 1994, vol. 54, s. 3864-3867
- [39] DAVIES, R.; OREFFO, V. I. C.; MARTIN, E. A.; FESTING, M. F. W.; WHITE, I. N. H.; SMITH, L. L.; STYLES, J. A.: *Cancer Research*. 1997, vol. 57, s. 1288-1293
- [40] FAN, P.; WANG, J.; SANTEN, R. J.; YUE, W.: *Cancer Research*. 2007, vol. 67, s. 1352-1360
- [41] FAN, P.; YUE, W.; WANG, J. P.; AIYAR, S.; LI, Y.; KIM, T-H.; SANTEN, R. J.: *Endocrinology*. 2009, vol. 150, s. 2036-2045
- [42] LONG, X.; FAN, M.; NEPHEW, K. P.: *Cancer Biology & Therapy*. 2010, vol. 9, s. 389-396
- [43] HAWLE, H.; HESS, D.; MUELLER, A.; THUERLIMANN, B.: *Case Reports in Oncology*. 2010, vol. 3, s. 131-136
- [44] DAVIS, W.; HEWER, A.; RAJKOWSKI, K. M.; MEINL, W.; GLATT, H.; PHILLIPS, D. H.: *Cancer Research*. 2000, vol. 60, s. 2887-2891
- [45] CRONIN-FENTON, D.; LASH, T. L.; SØRENSEN, H. T.: *Future Oncology*. 2010, vol. 6, s. 877-880
- [46] LYNN HENRY, N.; RAE, J. M.; LI, L.; AZZOUZ, F.; SKAAR, T. C.; DESTA, Z.; SIKORA, M. J.; PHILLIPS, S.; NGUYEN, A.; STORNILOLO, A. M.; HAYES, D. F.; FLOCKHART, D. A.; STEARNS, V. *Breast Cancer Research Treatment*. 2009, vol. 117, s. 571-575
- [47] WISEMAN, H.; LEWIS, D. F. V.: *Carcinogenesis*. 1996, vol. 17, s. 1357-1360
- [48] Medicabaze.cz [online]. 2011. Blokátory vápníkových kanálů. Dostupné z WWW: <www.medicabaze.cz/index.php> [cit. 2011-04-28]

