

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Sara Grubišić-Čabo

INHIBITORI AROMATAZE (CYP19) - STRUKTURNE MODIFIKACIJE I VAŽNOST U
TERAPIJI

Diplomski rad

Akademska godina: 2018./2019.

Mentorica:

prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić

Split, travanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Sara Grubišić-Čabo

INHIBITORI AROMATAZE (CYP19) – STRUKTURNE MODIFIKACIJE I VAŽNOST U
TERAPIJI

Diplomski rad

Akadska godina: 2018./2019.

Mentorica:

prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić

Split, travanj 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Biokemija lijekova
Tema rada je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na . sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i . sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić
Pomoć pri izradi: -

INHIBITORI AROMATAZE (CYP 19) – STRUKTURNE MODIFIKACIJE I VAŽNOST U TERAPIJI

Sara Grubišić-Čabo, broj indeksa 121

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada je proučavanje mogućeg nastanka karcinoma dojke, uzrokovanog metaboličkim promjenama na estrogenim hormonima, a pod utjecajem enzimskih sustava koji u tim reakcijama sudjeluju. Prikazani su glavni metabolički putovi estrogenih hormona kao i metaboličke promjene lijekova koji se koriste u liječenju karcinoma dojke s posebnim naglaskom na inhibitore aromataze. Opisane su reakcije I. i II. faze biotransformacije kroz koje prolazi najpotentnija treća generacija inhibitora aromataze – anastrozol, letrozol i eksemestan. Anastrozol podliježe N-dealkilaciji, hidroksilaciji i glukuronidaciji. Letrozol podliježe N-dealkilaciji, te pod utjecajem enzima CYP ostaje produkt koji se zove karbinol koji potom podliježe procesu glukuronidacije. Eksemestan podliježe redukciji keto skupine u položaju 17, oksidaciji metilenske grupe u položaju 6, te glukuronidaciji. Opisane su i najvažnije interakcije anastrozola, letrozola i eksemestana.

Ključne riječi: estrogeni, karcinom dojke, inhibitori aromataze, CYP enzimi

Rad sadrži: 61 stranica, 16 slika, 2 tablice, 58 reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Maja Valić predsjednica
2. prof. dr. sc. Davorka Sutlović član
3. prof. dr. sc. Marica Medić – Šarić član – mentor

Datum obrane: 29. travanj 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnicama Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Drug Biochemistry
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. . and Faculty Council of School of Medicine, session no. .
Mentor: Full professor Marica Medić-Šarić, PhD,
Technical assistance:

AROMATASE INHIBITORS (CYP19) – STRUCTURAL MODIFICATIONS AND IMPORTANCE IN THERAPY

Sara Grubišić-Čabo, index N^o 121

Summary: The aim of this graduate thesis is to study the possible emergence of breast cancer caused by metabolic changes on estrogen hormones and under the influence of the enzymatic systems involved in these reactions. The main metabolic pathways of estrogenic hormones have been described as well as the metabolic changes of the drugs used in the treatment of breast cancer with particular emphasis on aromatase inhibitors. The reactions of biotransformation of phases I and II of the most potent third generation of aromatase inhibitors - anastrozole, letrozole and exemestane have been described. Anastrozole is subjected to N-dealkylation, hydroxylation and glucuronidation. Letrozole is subjected to N-dealkylation, and under the influence of the CYP enzymes remains a product called carbinol which is then subjected to the glucuronidation process. The exemestane is subjected to reduction of the keto group at position 17, oxidation of the methylene group at position 6, and glucuronidation. The most important interactions of anastrozole, letrozole and exemestane are also described.

Key words: estrogen, breast cancer, aromatase inhibitors, CYP enzymes

Thesis contains: 61 pages, 16 figures, 2 tables, 58 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Full professor Maja Valić – PhD, chair person
2. Full professor Davorka Sutlović – PhD, member
3. Full professor Marica Medić-Šarić – PhD, supervisor

Defence date: April 29, 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 1.

Zahvala

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Medić-Šarić na pomoći i uloženom vremenu za izradu ovog diplomskog rada.

Također se želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Spolni hormoni i njihov utjecaj na dojku	2
1.2. Karcinom dojke.....	3
1.3. Čimbenici rizika pri nastanku karcinoma dojke	4
1.4. Statistika karcinoma dojke.....	5
1.5. Povijesni pregled.....	7
1.6. Inhibitori aromataze (CYP19).....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijali	13
3.1.1. Eksemestan.....	14
3.1.2. Anastrozol	17
3.1.3. Letrozol	21
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Reakcija aromatizacije	24
3.2.2. Biotransformacija estradiola	24
3.2.3. Toksični učinci estradiola	25
3.2.4. Reakcije detoksikacije estradiola.....	26
3.2.5. Najvažnije metaboličke reakcije inhibitora aromataze.....	29
3.2.6. N-dealkilacija	29
3.2.7. Hidroksilacija	30
3.2.8. Aromatska hidroksilacija	31
3.2.9. Redukcija keto skupine	32
3.2.10. Oksidacija nezasićenih ugljikovodika nearomatske dvostruke veze	33
3.2.11. Glukuronidacija	34
4. REZULTATI.....	36

4.1. Prikaz biotransformacije inhibitora aromataze	37
4.1.1. Anastrozol	37
4.1.2. Letrozol	38
4.1.3. Eksemestan.....	38
4.2. Prikaz interakcija inhibitora aromataze s drugim lijekovima	39
5. RASPRAVA	41
5.1. Eksemestan	42
5.2. Anastrozol.....	43
5.3. Letrozol.....	44
6. ZAKLJUČAK	46
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	49
8. SAŽETAK	55
9. SUMMARY	57
10. ŽIVOTOPIS	59

1.1. Spolni hormoni i njihov utjecaj na dojku

Dojka predstavlja najveću kožnu žlijezdu, smještenu na prsnom mišiću, a izuzetno važnu za brojne funkcije u žena. Izgrađena je iz masnog, žljezdanog i vezivnog tkiva. Sačinjavaju je funkcionalne jedinice kojih je obično od 15 do 25 i nazivaju se režnjevi. Svaki od režnjeva ima svoj glavni izvodni kanal tzv. laktiferni kanal koji postupno prelazi u segmentalni kanal, a on zatim u subsegmentalni kanal koji je povezan s terminalnom duktulo-lobularnom jedinicom (engl. *Terminal Duct Lobular Unit*, TDLU). TDLU predstavlja proliferacijski najaktivniji segment i žarište je većine bolesti dojke. Laktiferni kanali okruženi su glatkim mišićjem. Vanjski dio stijenke funkcionalnih jedinica građen je od epitelnih stanica koje čine bazalnu membranu i odvajaju žljezdano i vezivno tkivo te omogućuju izmjenu tvari. Epitel od kojeg je kanalni sustav načinjen obavijen je mioepitelnim stanicama. Kod raka dojke dolazi do promjene svojstava epitelnih i mioepitelnih stanica, a podjela prema invazivnosti temelji se na zahvaćenosti bazalne membrane.

Spolni hormoni koji utječu na fiziologiju dojke su hormoni jajnika, estrogeni i progesteron. Njihovo lučenje potiču hormoni adenohipofize, folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH). Njihova biosinteza kreće od kolesterola do pregnenolona, a reakcije kataliziraju brojni enzimski sustavi u našem organizmu. Do sekrecije FSH i LH dolazi zbog lučenja hormona koji oslobađa gonadotropine (GnRH). GnRH sudjeluje u kontroli i regulaciji gonadalne funkcije te humane reproduktivne sposobnosti, sprječava involuciju žutog tijela, što se normalno događa na kraju mjesečnog ciklusa. Sredinom ciklusa bilježe se najveće koncentracije estrogena, dok progesteron dominira drugom polovicom ciklusa. U drugoj fazi ciklusa nastaje žuto tijelo čije stanice opet luče estrogen i progesteron.

Estrogene ponajviše luče jajnici dok manje količine može lučiti i kora nadbubrežne žlijezde, a prilikom trudnoće lučenje preuzima i posteljica. Prirodni estrogeni su steroidne strukture, a najznačajniji su estradiol, estron i estriol. Estradiol nastaje u jajnicima, a estron i estriol metabolizmom estradiola u jetri ili iz androgenih prekursora perifernih tkiva, pogotovo masnog tkiva. Prilikom sinteze spolnih hormona u konačnici se sintetiziraju androstendion i testosteron koje enzim aromataza, CYP19, prevodi u ženske spolne hormone. Estrogeni stimuliraju spolno sazrijevanje žena i razvoj sekundarnih spolnih obilježja. Najznačajniji fiziološki učinci estrogena su promjene na spolnom sustavu (potiču formiranje sekundarnih spolnih obilježja kod žena, u dojkama potiču rast dojki i sustava za stvaranje mlijeka u njima, stimuliraju rast spolnih organa te tijekom menstruacijskog ciklusa potiču rast žlijezda endometrija i vezivne strome u maternici, a u jajovodu povećavaju broj i aktivnost stanica s

trepetljikama), promjene u središnjem živčanom sustavu (zajedno s progesteronom inhibiraju oslobađanje FSH i LH iz hipofize te utječu i na razinu izlučivanja GnRH), promjene u ostalim sustavima i organima (u kostima smanjuju koštanu resorpciju, uzrokuju zadržavanje vode i elektrolita, povećavaju HDL, trigliceride i smanjuju LDL, povećavaju količinu kolesterola u žuči, a smanjuju pokretljivost crijeva, u jetri potiču sintezu proteina, povisuju razine faktora zgrušavanja, antitrombina III, plazminogena i povisuju adhezivnost trombocita, povisuju feomelanin, a snizuju eumelanin, povećavaju debljinu kože i čine je glađom.)

Progesteron je glavni gestageni hormon koji služi i kao prekursor estrogena i androgena. Također nastaje iz kolesterola u jajnicima, testisima i kori nadbubrežne žlijezde, a u trudnoći ga luči i posteljica. Najvažniji učinak progesterona je priprema maternice za trudnoću i sprječavanje kontrakcije maternice. U endometriju djeluje na sluznicu te povećava sekretornu funkciju, u dojka potiče rast žljezdanog tkiva te u bubregu potiče povećano izlučivanje natrija iz organizma (1).

1.2. Karcinom dojke

Karcinom dojke je najčešće dijagnosticiran karcinom diljem svijeta te kod žena drugi najčešći uzrok smrti povezanih s tumorom (2). Usprkos toj statistici, smrtnost od karcinoma dojke se značajno smanjila nakon 1970-ih godina prošlog stoljeća. Smatra se da je taj pad djelomično rezultat napretka u adjuvantnoj terapiji. Estrogen i progesteron su glavni regulatori rasta i diferencijacije tkiva dojke. To su steroidni hormoni koji se primarno proizvode u jajnicima. Oni pokazuju svoje stanične učinke spajajući se i aktivirajući specifične nuklearne receptore - estrogenske (ERs) i progesteronske (PRs) receptore (3). Oko 80% svih karcinoma dojke su estrogen receptor pozitivni (4) te endokrina terapija tu predstavlja glavnu okosnicu liječenja (5). Cilj hormonske (endokrine) terapije je reducirati proizvodnju estrogena ili blokirati stanične učinke estrogena vezujući se na tumor-estrogen receptor (6).

U liječenju karcinoma dojke danas se koriste različiti pristupi:

- 1) Supresija funkcije jajnika (engl. *Ovarian Function Suppression*, OFS) se obično postiže s gonadotropin otpuštajućim hormonskim (engl. *Gonadotropin Releasing Hormone*, GnRH) agonistima - buserelin, leuprorelin, triptorelin, goserelin
- 2) Selektivni estrogen receptor modulatori (engl. *Selective Estrogen Receptor Modulators*, SERM) – tamoksifen, raloksifen
- 3) Inhibitori aromataze (engl. *Aromatase Inhibitors*, AI) – anastrozol, letrozol, eksemestan

4) Selektivni estrogen receptor snižavatelji (engl. *Selective Estrogen Receptor Down-regulators*, SERD) - fulvestrant (4)

Dvije su glavne strategije liječenja karcinoma dojke:

- a) Blokada estrogen-receptor tumorskih stanica - koja se postiže sa SERM-ovima
- b) Blokada ključnog enzima u biosintezi estrogena - aromataze, koja se postiže s inhibitorima aromataze (4)

Odabir lijeka u hormonskoj terapiji temelji se na menopauzalnom statusu bolesnice. Bolesnice koje su u menopauzi liječe se tamoksifenom i AI, a dužina trajanja terapije ovisi o podnošljivosti navedenih lijekova. Preporuka je korištenje tamoksifena 2 do 3 godine, a zatim upotreba AI do najviše 5 godina. Bolesnicama koje nisu u menopauzi preporuča se korištenje tamoksifena 5 do 10 godina, a ako u međuvremenu uđu u menopauzu, liječenje se treba nastaviti inhibitorima aromataze (AI). Liječenje tamoksifenom zahtijeva redovite kontrole stanja debljine endometrija i morfologije jajnika, a prilikom liječenja AI liječnik bi trebao procijeniti korist uzimanja bifosfonata zbog gubitka koštane mase. Korištenje AI zahtijeva točno određivanje početka menopauze i dodatak vitamina D, kojim se regulira homeostaza kalcija u organizmu (7).

1.3. Čimbenici rizika pri nastanku karcinoma dojke

Najčešći čimbenici rizika pri nastanku karcinoma dojke su su nasljedni i genski faktori (5-10%). Mutacije u određenim genima kao što su BRCA1 (engl. *BReast CAncer 1*), BRCA2 (engl. *BReast CAncer 2*) te osobna ili obiteljska povijest bolesti karcinoma dojke ili jajnika zauzimaju posebno mjesto. Ostali uzroci su vanjski čimbenici rizika kao što su:

- a) ranija dob kod pojave menarhe (prve menstruacije)
- b) kasnija dob kod pojave menopauze
- c) kasnija životna dob pri prvoj trudnoći, ne rađanje djece ili rađanje manjeg broja djece
- d) vanjski unos hormona - oralni kontraceptivi i hormonska nadomjesna terapija (8)
- e) nezdravi način života - unos alkohola i povećana tjelesna težina (9)

f) ionizirajuća zračenja - rizik nastanka bolesti uvjetovan učestalom mamografijom (10)

g) dob - svega $\frac{1}{4}$ svih karcinoma dojke javlja se kod žena ispod 50-e godine života te >5% ispod 35-e godine života (10)

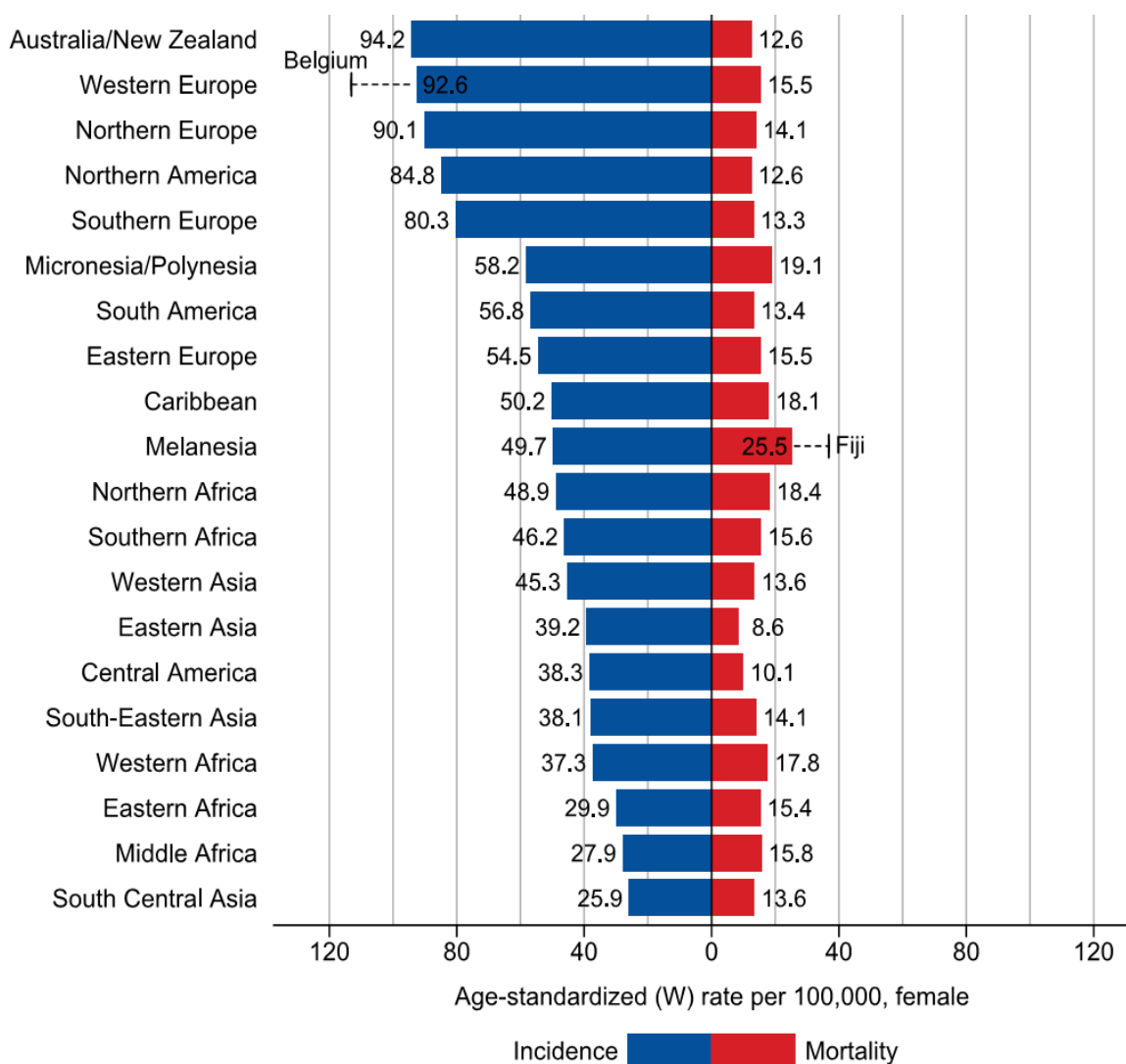
h) spol - predominantno obolijevaju žene dok oko 1% oboljelih su muškarci, većinom zbog hormonalne neravnoteže. Neravnoteža se može javiti kod ginekomastije i ciroze te genskih predispozicija ili pozitivne obiteljske povijesti bolesti (8).

Kako točno ovi rizični čimbenici utječu na nastanak karcinoma dojke još nije u potpunosti poznato, ali najčešće se povezuju s povećavanom izloženošću estrogenima i to je možda dio odgovora (11). Studije rađene na ženama u postmenopauzalnoj dobi, ukazuju da su cirkulirajuće i izlučene količine endogenog estradiola i estrona povezane s povećanim rizikom nastanka karcinom dojke (12) iako to varira ovisno o tipu tumorskog receptora (11). Primjerice, starija dob pri prvoj trudnoći povećava rizik za razvoj hormon receptor negativnih tumora (11).

Dojenje i fizička aktivnost se smatraju protektivnim čimbenicima za nastanak bolesti (8).

1.4. Statistika karcinoma dojke

Učestalost pojave karcinoma dojke, praćena u SAD-u tijekom 2016. godine, govori o 246.660 slučajeva od kojih je 40.450 povezano sa smrtnim ishodom (3). Najčešća pojava karcinoma dojke zabilježena je u Australiji i Novom Zelandu gdje iznosi 94,2%, potom u zapadnoj Europi, sjevernoj Europi, sjevernoj Americi, a najmanja je zabilježena u južnoj i centralnoj Aziji gdje iznosi 25,9%. Belgija je država s najvećom svjetskom učestalošću pojave karcinoma dojke, dok je Fiji država s najvećim svjetskim stopama smrtnosti od karcinoma dojke (8).



Slika 1. Prikaz regio-specifičnih područja u svijetu po učestalosti i smrtnosti žena oboljelih od karcinoma dojke, standardiziran po stopama starosti na 100.000 žena u 2018. godini. Plava područja označavaju učestalost pojave bolesti, a crvena područja smrtni ishod (8).

U Hrvatskoj je učestalost pojave raka dojke 2015.godine iznosila 89,2 dobnostandardiziranih stopa / 100 000 ljudi dok je mortalitet iznosio 27,1 (13).

	Grube stope / 100 000	Stand. stope (EU) / 100 000
INCIDENCIJA RAKA		
• Ukupna	535,3	369,9
• Muškarci	590,0	442,2
• Žene	484,3	323,0
INCIDENCIJA RAKA VRATA MATERNICE	12,9	11,0
INCIDENCIJA RAKA DOJKE	126,3	89,2
INCIDENCIJA RAKA TRAHEJE, BRONHA I PLUĆA		
• Ukupno	71,7	48,3
• Muškarci	108,3	79,8
• Žene	37,5	23,9
MORTALITET OD RAKA		
• Ukupni	333,3	207,5
• Muškarci	395,8	287,7
• Žene	275,0	151,2
MORTALITET OD RAKA VRATA MATERNICE	5,1	3,4
MORTALITET OD RAKA DOJKE	47,7	27,1
MORTALITET OD RAKA TRAHEJE, BRONHA I PLUĆA		
• Ukupno	67,1	44,3
• Muškarci	103,6	75,5
• Žene	33,1	20,4

Slika 2. Prikaz učestalosti i mortaliteta od različitih oblika raka u Hrvatskoj 2015. Godine (13).

1.5. Povijesni pregled

George T. Beatson je prvi otkrio ulogu estrogena u tkivu dojke te je postavio temelje današnje hormonske terapije. Primjetio je da, odstranjivanje jajnika zečevima rezultira smanjenjem laktacije. Nadahnut tim saznanjem, 15. lipnja 1895. godine izvršio je ooforektomiju pacijentici u premenopauzi s indiciranim karcinomom dojke. Pacijentica je preživjela još 4 godine s potpunom remisijom (14).

1923. godine Edgar Allen i Edward Doisy otkrili su estrogen hormon kojeg producira jajnik, a regulira tkivo dojke (15).

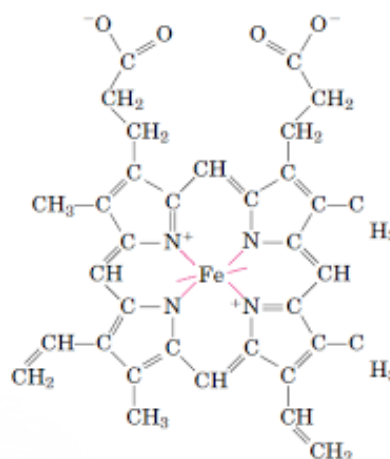
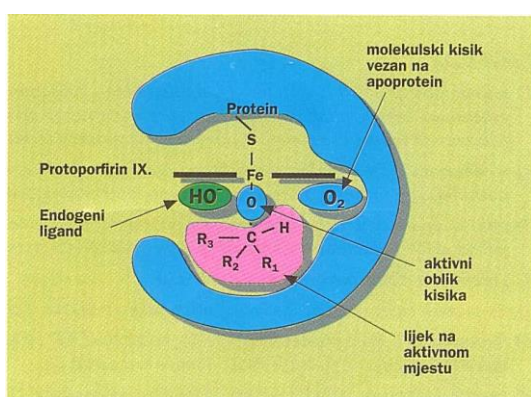
1967. godine M. J. Harper i A. L. Walpole su otkrili tamoksifen (SERM-selektivni estrogen receptor modulator) (16).

1982. godine održan je prvi internacionalni simpozij o enzimu aromatazi (17).

1.6. Inhibitori aromataze (CYP19)

Inhibitori aromataze kao lijekovi, vodeći su dio endokrine strategije liječenja žena u postmenopauzi s estrogen-ovisnim karcinomom dojke (17). Estrogen se u žena u premenopauzi primarno stvara u jajnicima, dok se kod žena u postmenopauzi stvara dominantno iz ne-ovarijskih izvora preko enzima aromataze. Ljudski *CYP19* gen lociran na kromosomu 15q21.2 kodira mikrosomalni enzim aromatazu, citokrom P450 19 ili CYP19 (18). Aromataza se može naći u raznim tkivima kao što je potkožno masno tkivo, jetra i mišići (3). Stoga, ovi lijekovi, inhibitori aromataze, ciljano smanjuju estrogen proliferacijske učinke, blokirajući djelovanje enzima CYP19 (6).

Mikrosomalni enzim aromataza ili CYP19 pripada superporodici enzima citokrom P450 ili enzima CYP. Enzimi CYP, skupno su ime za velik broj različitih skupina hemtiolnih enzima. Smatra se da superporodica gena koji kodiraju enzime citokrom P450 postoji već više od milijardu godina. Enzimi CYP su po enzimskom djelovanju tipične monooksigenaze, koje mogu djelovati kao oksidaze i peroksidaze, a kataliziraju i reduktivne reakcije. Enzimi CYP imaju molekulsku masu oko 57 kDa te su građeni od oko 500 aminokiselinskih ostataka i sadrže jedan ekvivalent hemske skupine po polipeptidnom lancu. Iz navedenog proizlazi da su to hemproteini kod kojih je apoprotein, preko sumpora iz cisteinskog ostatka, aksijalno koordiniran na atom željeza porfirinskog prstena (protoporfirin IX) što je i zajednička značajka svih enzima CYP(19).



Slika 3. Shematski prikaz aktivnog mjesta i protoporfirinske strukture enzima CYP.

Na slici 3. shematski je prikazano aktivno mjesto i protoporfirinska struktura enzima CYP, a naznačena su mjesta vezivanja lijeka-supstrata, molekulskog kisika, aktivnog oblika kisika i endogenog liganda-molekule vode, odnosno hidrosil-iona. U stanicama sisavaca enzimi CYP

nalaze se u membranskim frakcijama kao što su endoplazmatski retikulum i unutarnja membrana mitohondrija. Osim u navedenim dijelovima stanice, aktivnost enzima CYP je zapažena i u membranama jezgre, plazme i Golgijeva aparata (19).

Inhibitori aromataze se mogu podijeliti prema kemijskoj strukturi i mehanizmu djelovanja u dva glavna razreda: Tip 1 i Tip 2 (4).

Tip 1 su steroidni spojevi koji se spajaju na supstrat-vezujuće mjesto na enzimu i ovisno o prisustvu ili odsustvu supstrata vode do reverzibilne ili ireverzibilne inhibicije enzima.

Tip 2 su nesteroidni spojevi koji su u kompetitivnoj interakciji s protoporfirinskom strukturom enzima CYP19 tj. aromatazom (20). Razvijene su tri generacije inhibitora aromataze, a prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Tri generacije inhibitora aromataze ovisno o njihovim kemijskim strukturama i djelovanju (4).

Tip	Kemijska struktura	Djelovanje	Prva generacija	Druga generacija	Treća generacija
1	Steroidna	Stalno	Testolakton	Formestan	Eksemestan
2	Nesteroidna	Reverzibilno	Aminoglutetimid	Fadrozol	Anastrozol Letrozol

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom radu su istraživani inhibitori aromataze (CYP19), lijekovi široko zastupljeni u liječenju hormon pozitivnog karcinoma dojke, s naglaskom na najpotentniju treću generaciju ovih inhibitora. Iz navedenih razloga važno je poznavati njihov metabolizam i utjecaj na enzimske sustave u humanom organizmu.

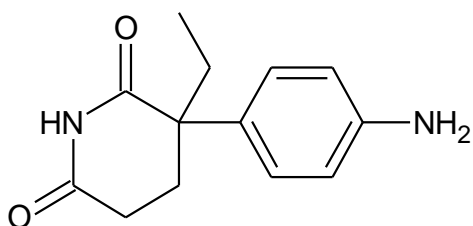
Cilj ovog diplomskog rada je proučavanje mogućeg nastanka karcinoma dojke, uzrokovanog metaboličkim promjenama na estrogenim hormonima, a pod utjecajem enzimskih sustava koji u tim reakcijama sudjeluju. Stoga su u ovome diplomskom radu temeljito opisani i prikazani glavni metabolički putovi estrogenih hormona kao i metaboličke promjene lijekova koji se koriste u liječenju karcinoma dojke s posebnim naglaskom na inhibitore aromataze. U tom smislu proučit će se uloga enzimskih sustava (enzimi CYP, posebice CYP19) koji sudjeluju u metaboličkim reakcijama u našem organizmu i koji su direktno odgovorni za nastanak nekih oblika karcinoma dojke. Uloga tih enzima objasnit će se putem metaboličkih reakcija u kojima sudjeluju, a prikazat će se mogući putevi aktivacije, toksičnosti i detoksikacije estrogenih hormona.

3. MATERIЈALI I METODE

3.1. Materijali

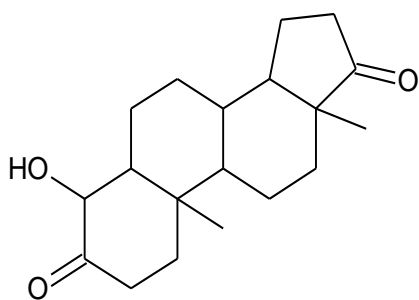
Inhibitori aromataze su razvijeni kroz tri generacije, od kojih danas samo treća generacija nalazi najučestaliju primjenu. Kako su povijesno lijekovi prve i druge generacije značajni, iako danas zamijenjeni lijekovima treće generacije, samo će se ovdje kratko spomenuti.

Aminoglutetimid je najznačajniji predstavnik prve generacije i najstariji je nesteroidni inhibitor aromataze. Početno se koristio kao antiepileptički lijek. Blokira pretvorbu kolesterola u pregnenolon i tako smanjuje produkciju nekoliko steroida, uključujući kortizol (21). Naknadna aktivacija osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda uzrokuje hipersekreciju adrenokortikotropnog hormona (ACTH) vodeći ka potrebi za povećanjem doze lijeka i potrebi za kortikosteroidnom suplementacijom. Zbog tih nuspojava aminoglutetimid je zamijenjen bolje podnošljivim i više učinkovitim inhibitorima aromataze (22) te se danas više ne koristi.

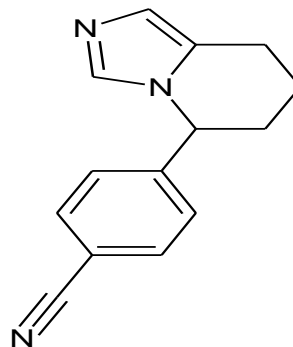


Aminoglutetimid

Druga generacija inhibitora aromataze uključuje **formestan**, steroidne strukture i nesteroidni **fadrozol (E)**. Danas se također više ne koriste zbog niske učinkovitosti i velikog broja nuspojava.



Formestan

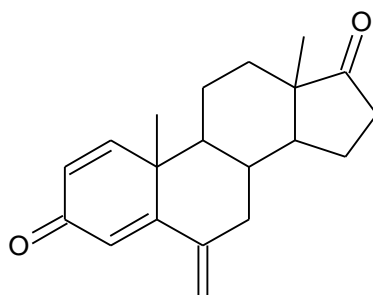


Fadrozol

Trećoj generaciji inhibitora aromataze pripadaju široko korišteni lijekovi koji su znatno selektivniji, više potentni i bolje podnošljivi od prve dvije generacije (20). Nekoliko je studija pokazalo superiornost treće generacije inhibitora aromataze u odnosu na tamoksifen. Adjuvantna terapija s trećom generacijom lijekova je smanjila rizik od povrata bolesti pogotovo u pacijentica s uznapredovalim stadijem karcinoma dojke (4). Treću generaciju čine **eksemestan** steroidne strukture i nesteroidni **anastrozol** i **letrozol** (20).

3.1.1. Eksemestan

Eksemestan je ireverzibilni steroidni inhibitor aromataze koji djeluje kao lažni supstrat za aromatazu i selektivno potiskuje estrogene na bilo kojem mjestu (23). Kemijski je opisan kao 6-metilenandrosta-1,4-dien-3,17-dion. Njegova molekulska formula je $C_{20}H_{24}O_2$. Aktivni sastojak je bijeli do blago žuti kristalni prah s molekulskom masom 296,41. Eksemestan je dobro topljiv u N, N-dimetilformamidu, topljiv u metanolu i praktički netopljiv u vodi (24).



Eksemestan

Mehanizam djelovanja i indikacije

Eksemestan je ireverzibilan, steroidni inhibitor aromataze, strukturno nalik prirodnom supstratu androstendionu. Djeluje kao lažni supstrat za enzim aromatazu, djeluje putem intermedijera koji se nepovratno veže na aktivno mjesto enzima te uzrokuje njegovu inaktivaciju, učinak poznat kao "suicidna inhibicija". Eksemestan značajno smanjuje cirkulirajuću koncentraciju estrogena kod žena u postmenopauzi, ali nema vidljiv učinak na biosintezu kortikosteroida ili aldosterona nadbubrežne žlijezde. Koristi se adjuvantno kod žena u postmenopauzi, s ranim estrogen-pozitivnim karcinomom dojke, a koje su već

adjuvantno primale tamoksifen. Indiciran je i za terapiju uznapredovalog karcinoma dojke žena u postmenopauzi čija bolest je uznapredovala nakon terapije s tamoksifenom (24).

Farmakokinetika

Apsorpcija: Nakon oralne primjene radio-obilježenog eksemestana, najmanje 42% lijeka je apsorbirano iz gastrointestinalnog trakta. Nakon doručka s visokim udjelom masti razina eksemesta u plazme se povećala za otprilike 40%.

Distribucija: Eksemestan se u velikoj mjeri distribuira u tkiva. Izrazito se veže, gotovo 90%, za proteine plazme. Vezana frakcija je neovisna o ukupnoj koncentraciji. Albumin i α 1-kiselinski glikoprotein pridonose vezanju. Raspodjela eksemestana i njegovih metabolita u krvne stanice je zanemariva.

Metabolizam i izlučivanje: Nakon davanja radio-obilježenog eksemestana zdravim ženama u postmenopauzi, kumulativne količine lijeka koje se izlučuju u urinu i fecesu su bile slične ($42 \pm 3\%$ u mokraći i $42 \pm 6\%$ u fecesu) tijekom jednotjednog vremena prikupljanja. Količina lijeka nepromijenjenog u urinu bila je manja od 1% doze.

Eksemestan se u velikoj mjeri metabolizira. Razine nepromijenjenog lijeka u plazmi se smatraju manjima od 10% ukupne primjenjene doze lijeka. Metabolizam eksemestana započinje reakcijama prve faze, oksidacijom metilenske skupine u položaju 6 i redukcijom keto skupine na položaju 17, s naknadnim stvaranjem mnogih sekundarnih metabolita. Metaboliti su inaktivni ili inhibiraju aromatazu sa smanjenom potencijom u usporedbi s izvornim lijekom. Ispitivanja na izoliranim organima ljudske jetre su pokazala da je enzim CYP3A4 glavni izoenzim uključen u oksidaciju eksemestana (24).

Interakcije

Eksemestan se metabolizira uz CYP3A4 i aldoketoreduktaze. Ne inhibira niti jedan od glavnih izoenzima CYP, uključujući CYP1A2, 2C9, 2D6, 2E1 i 3A4. U kliničkoj farmakokinetičkoj studiji ketokonazol nije pokazao značajan utjecaj na farmakokinetiku eksemestana. Iako nema drugih formalnih studija o interakcijama eksemestana s drugim lijekovima, značajni učinci na klirens eksemestana inhibitorima CYP izoenzima, izgledaju malo vjerojatno. Međutim, moguće smanjenje razine eksemestana u plazmi od strane poznatih induktora enzima CYP3A4 ne mogu se isključiti. Eksemestan se ne smije davati istodobno s estrogenima jer bi oni mogli utjecati na njegovo farmakološko djelovanje (24).

Farmakodinamika

- Učinak na estrogene: Višestruke doze eksemestana u rasponu od 0,5 do 600 mg/dan dane su ženama u postmenopauzi s uznapredovalim stadijem raka dojke. Supresija estrogena u plazmi (estradiol, estron, i estron sulfat) je uočena počevši s dnevnom dozom od 5 mg eksemestana, s maksimalnom supresijom od najmanje 85% do 95% postignutom u dozi od 25 mg. Eksemestan u dozi od 25 mg dnevno smanjuje aromatizaciju cijelog tijela (mjereno ubrizgavanjem radioaktivno obilježenog androstendiona) za 98% u žena u postmenopauzi s rakom dojke. Poslije 4 pojedinačne doze eksemestana od 25 mg, dogodila se maksimalna supresija cirkulirajućih estrogena, 2 do 3 dana nakon doziranja i trajala je 4 do 5 dana.

- Učinak na kortikosteroide: U ispitivanjima višestrukih doza do 200 mg dnevno, selektivnost eksemestana je procijenjena ispitivanjem njegovog učinka na hormone kore nadbubrežne žlijezde. Eksemestan nije utjecao na izlučivanje kortizola ili aldosterona na početku ili kao odgovor na ACTH u bilo kojoj dozi. Dakle, nije potrebna zamjenska nadomjesna terapija glukokortikoidima ili mineralokortikoidima u terapiji s eksemestanom.

- Ostali endokrini učinci: Eksemestan se ne veže značajno na steroidne receptore, osim blagog afiniteta za androgeni receptor (0,28% u odnosu na dihidrotestosteron). Dnevne doze eksemestana do 25 mg nisu imale značajan učinak na cirkulirajuće razine testosterona, androstendiona, dehidroepiandrosteron sulfata, ili 17-hidroksi-progesterona. Povećanje razine testosterona i androstendiona bilo je promatrano u dnevnim dozama od 200 mg ili više. Smanjenje vezanja spolnih hormona ovisnih o dozi o globulin (SHBG) promatran je s dnevnim dozama eksemestana od 2,5 mg ili više. Lagano, povišenje o dozi neovisnog lutenizirajućeg hormon (LH) i folikul stimulirajućeg hormona (FSH) u serumu opaženo je čak i pri niskim dozama kao posljedica povratne informacije na razini hipofize (24).

Usporedba s tamoksifenom

U nekim studijama eksemestan u kombinaciji s OFS (lijekovima koji izazivaju supresiju funkcije jajnika, danas su to obično GnRH agonisti) je reducirao rizik povrata bolesti u žena u premenopauzi s ranim estrogen receptor pozitivnim (ER+) karcinomom dojke, dok tamoksifen u kombinaciji s OFS nije pokazao tako dobre rezultate (25).

Nuspojave eksemestana

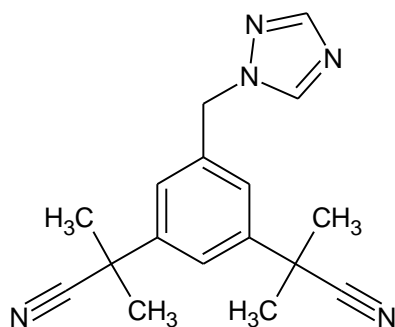
Najčešće nuspojave koje se javljaju primjenom eksemestan su smanjenje mineralne gustoće kostiju (BMD), obično povezano sa statusom vitamina D u organizmu i istodobnom primjenom s estrogenima.

Smanjenje mineralne gustoće kostiju (BMD) tijekom vremena zamjećeno je pri primjeni eksemestana. Tijekom adjuvantnog liječenja eksemestanom, žene s osteoporozom ili s rizikom od osteoporoze trebaju denzitometrijski ispitati mineralnu gustoću kostiju na početku liječenja.

Rutinska procjena razine 25-hidroksi vitamina D prije početka liječenja inhibitorima aromataze trebala bi se raditi zbog visoke prevalencije nedostatka vitamina D, posebice u žena s ranim rakom dojke (EBC). Žene s nedostatkom vitamina D trebaju primiti dodatne količine ovog vitamina (24).

3.1.2. Anastrozol

Kemijski je opisan kao 1,3-benzendiacetonitril (1H-1,2,4-triazol-1-metil). Njegova molekularna formula je $C_{17}H_{19}N_5$, a njegova strukturna formula je prikazana strukturom ispod teksta. Anastrozol je prljavo bijeli prah molekulske mase 293,4. Umjereno je topljiv u vodi, dobro topljiv u metanolu, acetonu, etanolu i tetrahidrofuranu, a vrlo dobro topljiv u acetonitrilu (0,5mg / mL na 25 °C). Topljivost je neovisna o pH (26).



Anastrozol

Anastrozol je kao inhibitor aromataze odobren u EU, SAD-u i drugim zemljama diljem svijeta. Primjenjuje se u adjuvantnoj terapiji u žena u postmenopauzi s ranim stadijem hormon receptor pozitivnog karcinoma dojke. Koristi se i kao prva linija liječenja žena u

postmenopauzi s hormon receptor pozitivnim ili hormon receptor nepoznatim statusom karcinoma dojke koji je lokalno uznapredovao ili je metastazirao (26). Također je odobren kao adjuvantna terapija karcinoma dojke u žena koje su već adjuvantno primale tamoksifen 2-3 godine. Odobren je i za uznapredovali karcinom dojke, i u pacijentica u postmenopauzi čija bolest je uznapredovala nakon tretmana s tamoksifenom (27).

Farmakokinetika

Metabolizam anastrozola odvija se u jetri, primarno reakcijama prve faze metabolizma, N-dealkilacijom i hidroksilacijom. Od reakcija druge faze metabolizma najčešće podliježe reakciji glukuronidacije, stvarajući topljive glukuronide. Nakon pojedinačne, radioaktivno označene doze anastrozola, 83-85% lijeka je pronađeno u urinu, a znatno manje u fecesu. Tri glavna metabolita su triazol, hidroksi-anastrozol glukoronid i anastrozol glukoronid (28). Triazol je glavni metabolit plazme i inaktivan je te ne utječe na aktivnost aromataze. Anastrozol posjeduje dugo djelovanje s poluživotom eliminacije u plazmi 40-50 sati što ukazuje na dovoljnu konzumaciju lijeka jednom dnevno. U EU anastrozol je kontraindiciran u pacijentica s umjerenim ili ozbiljnim hepatičnim problemima (29) dok u SAD-u kod iste skupine pacijenata nije potrebna prilagodba doze (28). *In vitro* i druge kliničke studije su pokazale malu mogućnost interakcija između anastrozola i lijekova koji se metaboliziraju enzimima citokrom P450 (28). Kod pacijentica s karcinomom dojke nije bilo kliničkih značajnih interakcija između anastrozola i tamoksifena (30).

Interakcije

-Estrogeni- Ne smije se kombinirati s estrogenima jer takvi lijekovi mogu smanjiti farmakološko djelovanje anastrozola (26).

Farmakodinamika

Anastrozol je benziltriazolni derivat koji se kompetitivno veže na protoporfirinski dio strukture enzima aromataze smanjujući tako sintezu estrogena (31). Potentni, je i selektivni AI i nema učinaka ili ih ima minimalno na hormone nadbubrežne žlijezde (32, 33). U zdravih žena u postmenopauzi ponovljene doze od 1mg/dan dovele su do supresije estradiola, na 24 sata nakon zadnje doze i to do nivoa koji su bili vrlo blizu limitu detekcije (32). U zdravih žena u postmenopauzi, inicijalna doza od 3 mg reducirala je serumsku koncentraciju estradiola za otprilike 70%, dok su višestruke doze reducirale serumsku koncentraciju estradiola za oko

80% od početnih nivoa, ali nisu imale klinički značajnih učinaka na proizvodnju steroidnih hormona kore nadbubrežne žlijezde. Minimalna doza anastrozola koja pokazuje maksimalni učinak smanjenja koncentracije estradiola iznosi 1mg/dan (32, 33).

Brojne su studije provedene s anastrozolom, u svrhu ispitivanja njegovog učinka. Ovdje će se spomenuti neke od najznačajnijih.

ATAC studija

ATAC studija (engl. *Arimidex (Anastrozol) Tamoxifen Alone or in Combination*, ATAC) je provedena primjenom samo anastrozola i u kombinaciji s tamoksifenom. Ova studija se provodila 10 godina kod žena u postmenopauzi, s potvrđenim ranim stadijem raznih tipova karcinoma dojke. Uspoređivana je učinkovitost i sigurnost anastrozola (1 mg) s tamoksifenom (20 mg) na dvije grupe pacijentica. Oba su lijeka primjenjivana oralno svaki dan, kroz 5 godina i to kao adjuvantna terapija. Studija je pokazala znatne prednosti anastrozola, pred tamoksifenom. U grupi pacijentica koje su koristile anastrozol, značajno je produžena remisija (engl. *Disease-Free Survival*, DFS), te je značajno smanjeno vrijeme povrata bolesti (engl. *Recurrence*, R) i pojave udaljenih metastaza (engl. *Distant Recurrence*, DR), u odnosu na grupu koja je koristila tamoksifen. Anastrozol je pokazao značajno manje ozbiljnih nuspojava od tamoksifena. Za hormon receptor pozitivni karcinom dojke rezultati su također bili bolji u grupi pacijentica koje su primale anastrozol, u odnosu na grupu koja je primala tamoksifen u sva tri parametra: remisije, vremena povrata bolesti i vremena pojave metastaza. U hormon receptor pozitivnih pacijentica, apsolutna razlika u vremenu do povrata bolesti između anastrozola i tamoksifena se povećala tijekom vremena (2,7% u 5 godina i 4,3% u 10 godina), a stope recidiva ostale su značajno manje kod anastrozola nego li kod tamoksifena nakon dovršenja tretmana, iako je sveukupni benefit bio manji nakon 8 godina. Slab je dokaz manjeg broja smrti nakon povrata bolesti u anastrozolskoj grupi u usporedbi sa tamoksifenskom grupom u hormon receptor pozitivnoj podgrupi, ali je mala razlika u sveukupnoj smrtnosti.

Tijekom aktivnog liječenja pacijenatica s anastrozolom primijećen je veći broj fraktura iako je nakon cjelokupnog tretmana incidencija fraktura bila slična u obje grupe. U grupi koja je primala anastrozol primijećen je veći broj fraktura kralježnice, dok je pojava frakture kuka bila slična u obje grupe.

U grupi koja je primala tamoksifen primjećen je veći broj karcinoma endometrija i melanoma u odnosu na grupu koja je primala anastrozol, Veći broj pojava karcinoma pluća i kolorektalnog karcinoma u grupi koja je koristila anastrozol nije značajan, u odnosu na grupu koja je primala tamoksifen.

Sveukupno, nuspojave vezane za liječenje su bile manje česte u grupi koja je koristila anastrozol, u odnosu na grupu koja je koristila tamoksifen, ali stope nuspojava su bile slične u obje grupe nakon što je liječenje završeno (34).

Ostale značajne studije

- Tri studije su proučavale hoće li prelazak na adjuvantno liječenje anastrozalom, nakon 2-3 godine liječenja tamoksifenom, pokazati napredak u terapiji. Studije su također pokazale prednosti liječenja anastrozalom u odnosu na tamoksifen. Pacijentice koje su se prebacile na anastrozol su imale za 1/3 manje šansi za povrat bolesti, razvitak karcinoma na drugoj dojci ili smrt, u odnosu na pacijentice koje su kontinuirano primale tamoksifen (35, 36, 37, 38).

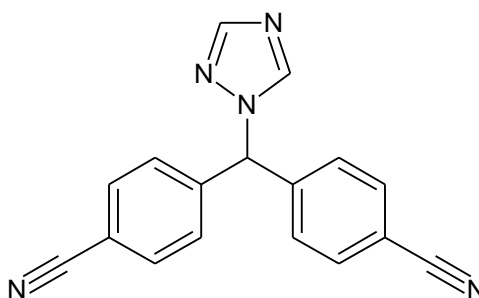
- Ova studija je dizajnirana da se promotri 5-godišnje korištenje tamoksifena, s razlikom da se jednoj grupi produžio tretman anastrozalom 1mg/dan, u periodu od 3 godine, a drugoj grupi nije. Pacijentice u grupi s produženim tretmanom su imale manji broj povrata bolesti, od druge grupe bez produženog tretmana. Razlika u smrtnosti između dvije grupe nije bila značajna, ali je pojava metastaza bile značajno manja u grupi koja je primala anastrozol u produženoj terapiji (39).

Nuspojave anastrozola

Najčešće nuspojave koje se vežu za anastrozol su hiperkolesterolemija, anoreksija, glavobolja, sindrom karpalnog tunela, somnolencija, poremećaji osjeta (uključujući parestezije, gubitak osjeta okusa, promjene osjeta okusa), naleti vrućine, mučnina, proljev, povraćanje, porast alkalne fosfataze, alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze, osip, alopecija, alergijske reakcije, artralgiya, artritis, osteoporoza, bolovi u kostima, mialgija, suhoća rodnice, krvarenje iz rodnice, astenija (40).

3.1.3. Letrozol

Kemijski je opisan kao 4,4'-(1H-1,2,4-Triazol-1-il-metilen) dibenzonitril, a strukturna formula je prikazan strukturom ispod. Letrozol je bijeli do žućkasti kristalični prah, praktički bez mirisa, dobro topljiv u diklormetanu, blago topljiv u etanolu te skoro netopljiv u vodi. Njegova molekulska masa iznosi 285,31. Empirijskom formulom može se prikazati kao $C_{17}H_{11}N_5$. Raspon taljenja proteže se od 184 °C do 185 °C (41).



Letrozol

Letrozol se najčešće primjenjuje u adjuvantnoj terapiji žena u postmenopauzi, kod kojih je indiciran hormon receptor pozitivni karcinom dojke. Indiciran je i kao proširena adjuvantna terapija za rani karcinom dojke istih žena koje su već 5 godina adjuvantno primale tamoksifen, a koristi se i kao prva linija liječenja žena u postmenopauzi s hormon receptor pozitivnim ili hormon receptor nepoznatim statusom karcinoma dojke koji je lokalno uznapredovao ili je metastatski. Također je indiciran za terapiju uznapredovalog karcinoma dojke u žena u postmenopauzi koje su imale progresiju bolesti nakon antiestrogenske terapije (41).

Farmakokinetika

Letrozol se brzo i potpuno apsorbira iz probavnog trakta i na apsorpciju ne utječe hrana. Polagano se metabolizira do inaktivnog metabolita karbinola (4,4'-metanol-bis-benzonitril), a kao glukuronid se izlučuje putem bubrega. Oko 90% radioaktivno označenog letrozola se dokazuje u urinu, a poluvrijeme eliminacije mu je oko 2 dana. Letrozol se slabo veže za proteine plazme i ima veliki volumen distribucije (približno 1,9 L/kg). Od radioaktivno obilježenih produkata dokazanih u urinu, najmanje 75% bio je glukuronid metabolita karbinola, oko 9% dva neidentificirana metabolita, a 6% je nepromijenjen letrozol. U humanim mikrosomima sa specifičnom CYP aktivnošću, izoenzim CYP3A4 je odgovoran

za 1. fazu metabolizma letrozola i njegovu pretvorbu u karbinol (metabolička reakcija oksigenacije), dok je CYP2A6 odgovoran kako za stvaranje karbinola tako i njegovog analoga ketona (41).

Interakcije

Tamoksifen - Istovremenom primjenom letrozola i tamoksifena u dozi od 20 mg dnevno, smanjena je koncentracija letrozola u plazmi za 38% u odnosu na prosjek (studija P015). Međutim, terapijski učinak letrozola nije narušen, ako se letrozol primjenjuje odmah nakon tamoksifena (41).

Farmakodinamika

U pacijentica u postmenopauzi s uznapredovalim stadijem raka dojke, dnevne doze od 0,1 mg do 5 mg letrozola su smanjile koncentracije estrogenih hormona (estradiola, estrona i estron sulfata) u plazmi za 75% do 95%. Maksimalnom supresija estrogena je postignuta kroz dva-tri dana, a ovisna je o primjenjenoj dozi letrozola (0,5 mg i više).

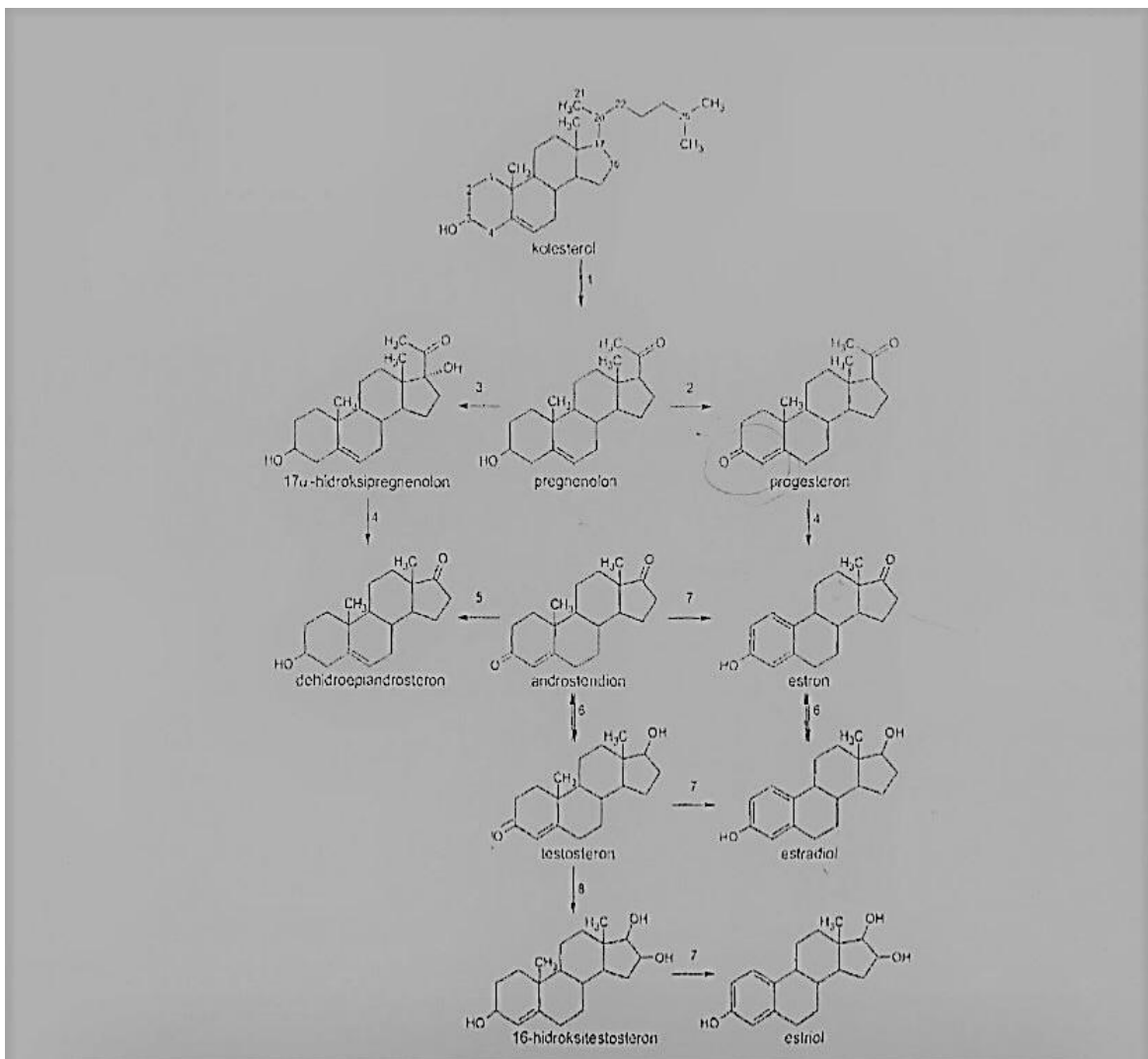
Letrozol je vrlo specifičan inhibitor aromataze. Ne utječe na nadbubrežnu sintezu steroida i ne treba se u terapiji kombinirati s glukokortikoidima ili mineralokortikoidima. Nisu zabilježene promjene u plazmatskim koncentracijama androgena (androstendiona i testosterona) kod zdravih žena u postmenopauzi, a nakon davanja pojedinačnih doza od 0,1, 0,5 i 2,5 mg letrozola. To ukazuje da blokada biosinteze estrogena ne dovodi do nakupljanja androgenih prekursora. (41).

Nuspojave letrozola

Najčešće nuspojave letrozola su hiperkolesterolemija, smanjenje apetita, povećanje apetita, depresija, glavobolja, omaglica, palpitacije, valunge, hipertenzija, mučnina, dispepsija, konstipacija, proljev, bolovi u abdomenu, povraćanje, hiperhidroza, alopecija, osip, suhoća kože, artralgiya, mialgiya, bol u kostima, osteoporoza, prijelomi kostiju, artritis, krvarenje iz rodnice, umor, periferni edemi, bol u prsnom košu, povećanje tjelesne težine (42).

3.2. Metode

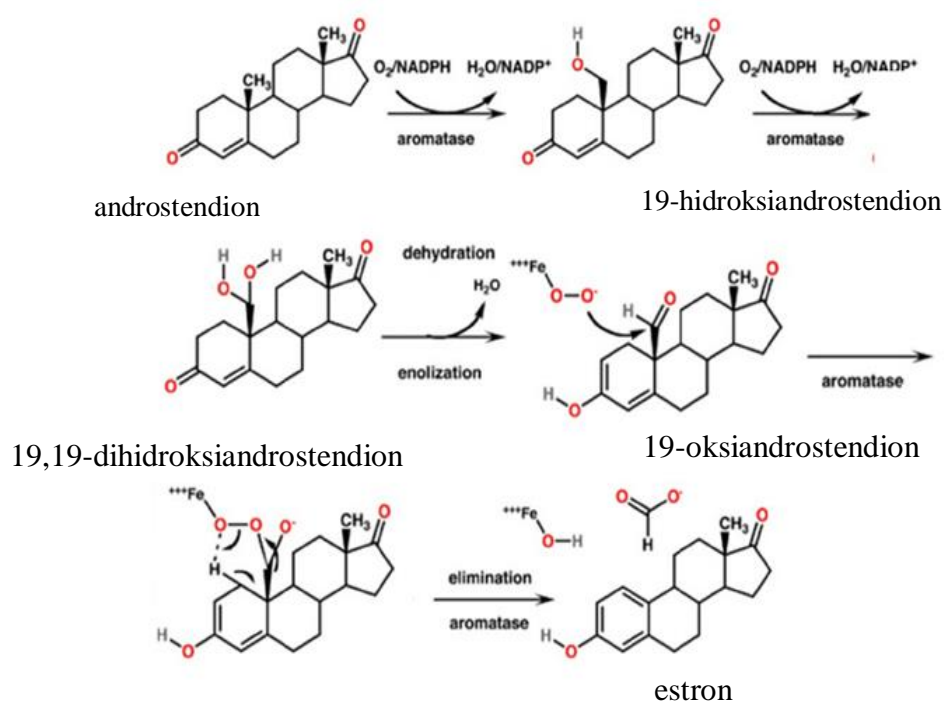
U ovom diplomskom radu pozornost je posvećena metaboličkim promjenama estrogena i lijekova, inhibitora aromataze, u ljudskom organizmu. Važno je za početak prikazati biosintezu i metabolizam spolnih hormona iz kolesterola. U tom procesu, naglasak je na reakciji aromatizacije pri kojoj iz muških spolnih hormona (androgena) – testosterona i 16-hidroksitestosterona, uz pomoć enzima aromataze (CYP19), nastaju ženski spolni hormoni – estradiol i estriol.



Slika 4. Prikaz biotransformacije spolnih hormona iz kolesterola (19).

3.2.1. Reakcija aromatizacije

Reakcija aromatizacije androgenih hormona (testosterona, androstendiona) u estrogene (estradiol, estron) može se razmatrati kroz tri uzastopna koraka, od kojih prvi određuje brzinu reakcije. Prva dva koraka predstavljaju oksigenaciju supstrata, a trećim se uklanja formaldehid i aromatizira prsten A. Smatra se da sve tri reakcije katalizira isti enzim CYP19 (aromataza), ali je moguće da su uključeni i razni drugi enzimi, posebice u prve dvije reakcije. Sama reakcija prikazana je slikom 5 (19).



Slika 5. Reakcija aromatizacije steroidnih hormona (19).

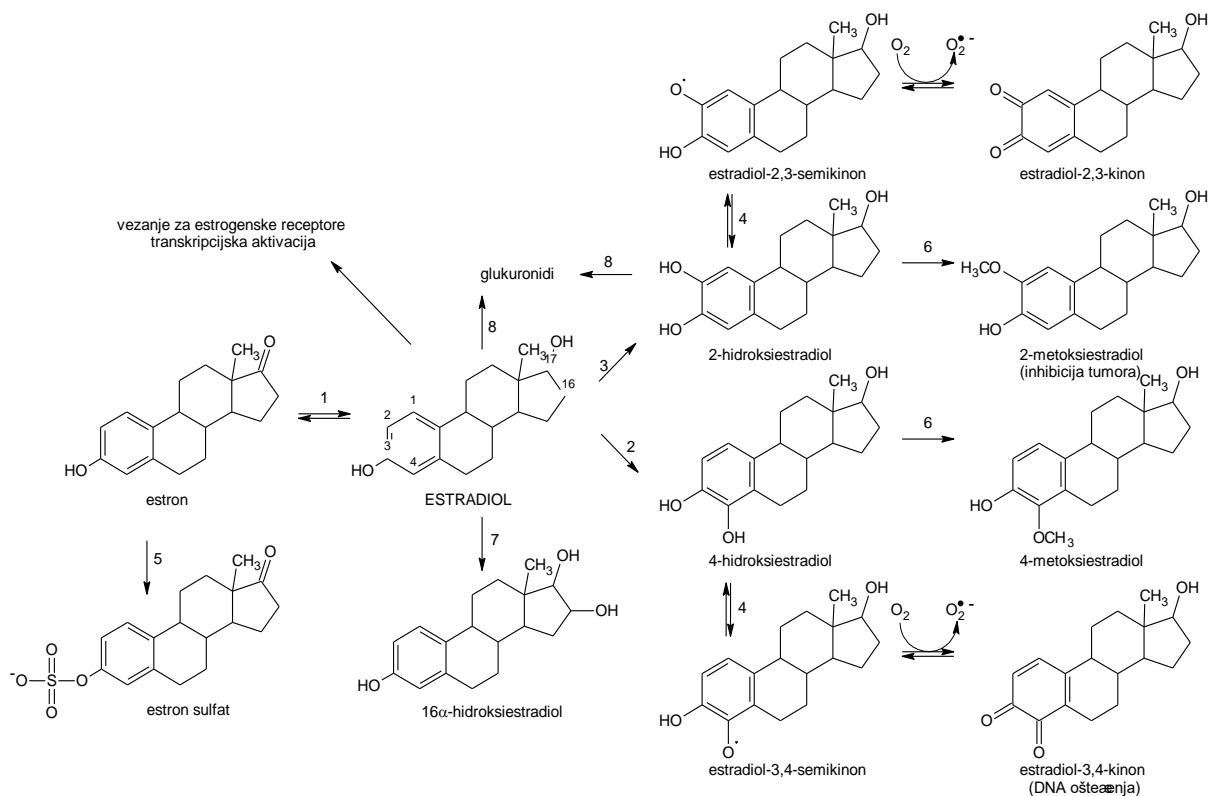
3.2.2. Biotransformacija estradiola

Metaboličke reakcije u kojima kao supstrat sudjeluje estradiol prikazane su slikom 6. Učinkom 17 β -hidroksisteroidne-dehidrogenaze, estradiol prelazi u estron (reakcija 1) koji se reakcijama konjugacije (metabolička reakcija sulfokonjugacije) prevodi u odgovarajući sulfat (reakcija 5). Nastali sulfat se kao hidrofilan produkt lako izlučuje urinom iz organizma (19).

3.2.3. Toksični učinci estradiola

Enzimi CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 te enzimi potporodice CYP3A (CYP3A4, CYP3A5 i CYP3A7) kataliziraju reakcije C2- (reakcija 3), C4- (reakcija 2) i C1 α -hidroksilacije (reakcija 7) estradiola, koje se povezuju s toksičnim učincima. Od navedenih enzima posebice su aktivni CYP1A1 i CYP1B1. Mnoga su istraživanja ukazala na povezanost između izloženosti estrogenim hormonima i pojave tumora dojke te na povezanost s reakcijama biotransformacije katalizirane enzimima citokrom P450, posebice s aktivnosti enzima CYP1A1 i CYP1B1. Smatra se, premda to nije eksperimentalno potvrđeno, da toksični karcinogeni metaboliti estradiola nastaju nakon oksidacije diola, produkata reakcija hidroksilacije, u reaktivne kinone (npr. u C2-C3 odnosno C3-C4 orto-kinone, reakcija 4). U slučaju estradiola karcinogena svojstva su pokazali u *in vitro* uvjetima C2-hidroksi i C4-hidroksi metaboliti estradiola. Za toksičan učinak značajna je reakcija hidroksilacije u položaju C4-pretežito katalizirana enzimom CYP1B1. Hidroksilirani metabolit (katehol), koji nastaje hidroksilacijom u položaju C4-, slab je supstrat metiltransferaze (enzim COMT), te se daljnjim reakcijama oksidacije može prevesti u reaktivni 3,4-kinon i semikinone (reakcija toksikacije).

Aktivnost enzima CYP1A1 i CYP1B1 mogu inducirati tvari iz okoliša (npr. pušenje, izloženost dioksinu i policikličkim aromatskim ugljikovodicima) i povećati rizik karcinogenosti estradiola povezan s reakcijama biotransformacije (19).



Reakcije		Enzimi
1	C17 β -oksidacija	17 β -HSD
2	C4-hidroksilacija	CYP1A1, CYP1A2, CYP3A
3	C2-hidroksilacija	CYP1A1, CYP1A2, CYP3A
4	oksidacija u kinone	PO
5	sulfokonjugacija	SULT
6	metilacija	COMT
7	C16 α -hidroksilacija	CYP1A1, CYP1A2, CYP3A
8	glukuronidacija	UGT

Slika 6. Biotransformacija i toksični učinci estradiola (19).

3.2.4. Reakcije detoksikacije estradiola

Estradiol i potencijalno toksični dioli detoksikiraju se u ljudi reakcijama konjugacije, učinkom enzima COMT (C2-C3-diol i C3-C4-diol) i UGT (estradiol i C2-C3-diol) te se prevode u konjugate s metilnom ili glukuronskom skupinom i izlučuju iz organizma.

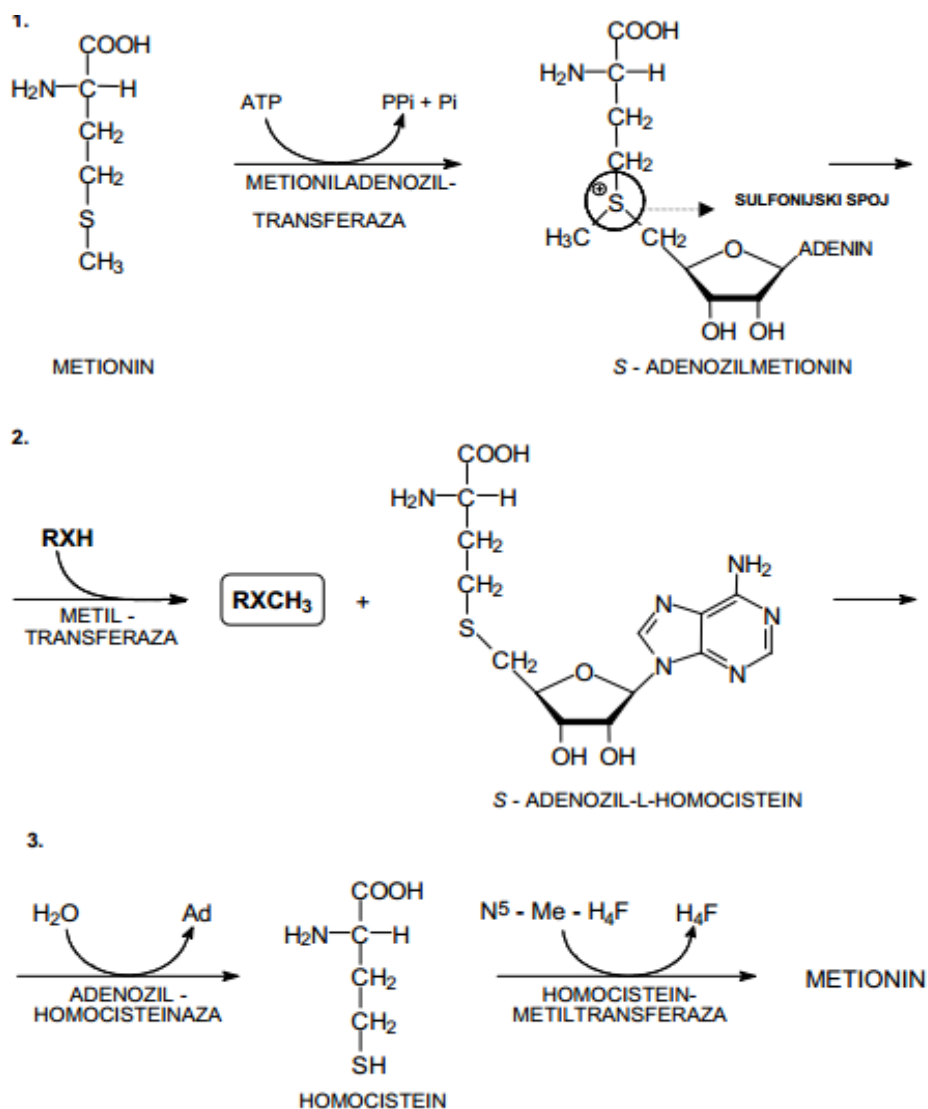
Hidroksilirani metabolit (katehol), koji nastaje hidroksilacijom u položaju C2-, premda potencijalno karcinogen, dobar je supstrat metiltransferaze te se reakcija C2-hidroksilacije i daljnja reakcija O-metilacije mogu smatrati reakcijama detoksikacije estradiola. Također je nađeno da velika aktivnost enzima COMT smanjuje karcinogeni potencijal C4-hidroksiliranog metabolita estradiola, ali isto tako smanjena aktivnost COMT enzima (inhibicija, genetski polimorfizam) uvećat će potencijal hidroksiliranih metabolita da izazovu toksične reakcije.

Sam mehanizam metilacije se može objasniti u 3 koraka:

1) Biosinteza SAM-a iz metionina, u reakciji koju katalizira metionin-adenoziltransferaza, enzim za prenošenje metilne skupine, $-CH_3$ skupina metionina nije dovoljno reaktivna pa se metaboličkim reakcijama, pomoću ATP-a, prevodi u aktivni oblik tzv. sulfonijski spoj.

2) Prijenos aktivirane metilne skupine, vezane na atom sumpora (kao $-CH_3$), s donora SAM-a na heteroatom supstrata (RXH). Ovom reakcijom nastaje S-adenozilhomocistein, tioeter adenzina.

3) U ovom koraku uz adenzilhomocisteinazu najprije nastaje homocistein, odvajanjem adenzinskog ostatka koji se dalje fosforilira u ATP. Potom se regenerira metionin iz nastalog homocisteina uz enzim homocistein-metiltransferazu i aktiviranu N5-metiltetrahidrofolnu kiselinu (donor metilne skupine) (19).



Slika 7. Mehanizam reakcije metilacije (19).

Reakcije konjugacije s metilnom skupinom kao konjugirajućim agensom, mogu se po svojim značajkama smatrati intermedijarnim reakcijama I. i II. faze. Supstrati u reakcijama metilacije su kemijske tvari ili njihovi metaboliti sa strukturom fenola ($-\text{OH}$), tiola ($-\text{SH}$), aromatskih i alifatskih amina ($-\text{NH}_2$), azida ($=\text{NH}$) i tercijarnih N-atoma ($-\text{N}=\text{N}$). Metilacijama se navedene funkcionalne skupine zaštićuju. Enzimi koji kataliziraju reakcije metilacije ksenobiotika su metiltransferaze (MT), a točan naziv dobivaju prema heteroatomu na koji se prenosi metilna skupina, kao npr. O-, N- i S-metiltransferaze. Smještene su u endoplazmatskom retikulum, ali i u citosolu ukoliko kataliziraju metilaciju endogenih tvari. Najvažniji enzimi koji kataliziraju metilacije ksenobiotika su katehol-O-metiltransferaza i feniletanolamin-N-metiltransferaza. Donori $-\text{CH}_3$ skupine u reakcijama metilacija su koenzimi S-adenozilmetionin (SAM), tetrahidrofolna kiselina (THF) i biotin (vitamin B-

skupine). Produkti reakcije metilacije se značajno razlikuju od produkata ostalih reakcija II. faze jer su lipofilniji odnosno manje polarni i manje topljivi u vodi. Reakcije metilacije su često reverzibilne reakcijama demetilacija, ali uz katalitičko djelovanje različitih enzima (19).

3.2.5. Najvažnije metaboličke reakcije inhibitora aromataze

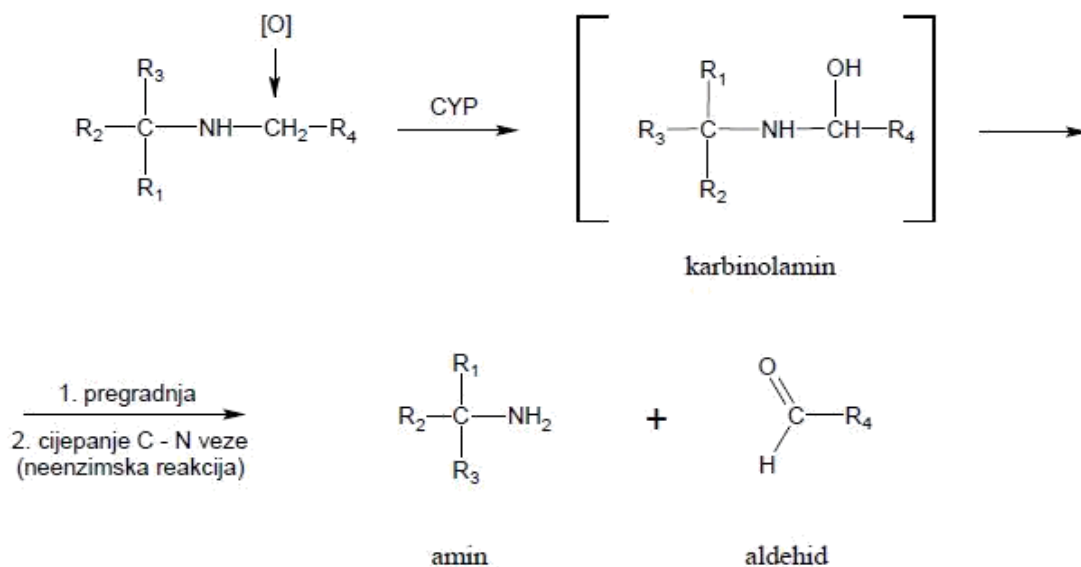
Kao najistaknutije metaboličke reakcije kroz koje prolaze anastrozol, letrozol i eksemestan treba izdvojiti: N-dealkilaciju, hidroksilaciju, aromatsku hidroksilaciju, redukciju keto skupine i oksidaciju nezasićenih ugljikovodika nearomatske dvostruke veze (metilenske skupine) kao najznačajnije reakcije 1.faze te glukuronidaciju kao najznačajniju reakciju 2.faze.

3.2.6. N-dealkilacija

Reakcije N-oksidacije se dijele na reakcije bez kidanja C-N veze i uz kidanje C-N veze. Reakcije uz kidanje C-N veze nazivaju se još i reakcijama dealkilacije, a supstrati u ovim reakcijama su najčešće primarni alifatski i alkilarilamini koji imaju na α -C-atomu barem jedan nesupstituiran vodikov atom. Ako se tom reakcijom uklanja strukturno manji amin iz molekule lijeka, ovaj proces oksidativnog cijepanja C-N veze zove se oksidativna deaminacija. Međutim, ukoliko se reakcijom odvaja manji alkilni ostatak od većeg dijela molekule amina, proces se naziva oksidativna dealkilacija. Ovisno o supstratu, reakcije kataliziraju enzimi flavin-monooksigenaze (FMO) i citokromi P450 (CYP).

Reakcija N-oksidacije uz kidanje C-N veze naziva se oksidativnom deaminacijom ili oksidativnom dealkilacijom ovisno o veličini odcijepljenog alkilnog ostatka. N-dealkilacija je preferirana metabolička reakcija kod lijekova, koju kataliziraju enzimi citokrom P450. Pretpostavljeni mehanizam reakcije N-dealkilacije provodi se u 4 koraka. Početak reakcije zajednički je s N-oksidacijom bez kidanja C-N veze. Jedan elektron se s atoma dušika prenosi na aktivni centar enzima tj. na oksigenirani oblik atoma željeza u protoporfirinskom prstenu enzima citokrom P450; pretpostavljeni kompleks enzima s kisikom $[\text{FeO}^{3+}]$ pri čemu nastaje radikal-kation amina. Ako nastali radikal-kation nije stabilan, a na α -C-atomu se nalazi nesupstituirani vodikov atom, dolazi do deprotonacije i brze pregradnje radikal-kation amina u ugljik-radikal. Ugljik-radikal može se oksigenirati aktivnim oblikom kisika do nestabilnog

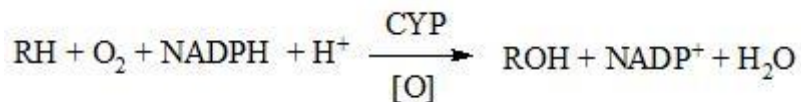
karbinolamina. Naposljetku, nastali nestabilni karbinolamin se pregrađuje u odgovarajući amin i aldehid (ili keton) kidanjem veze N- α -C-atom (Slika 8.) (19).



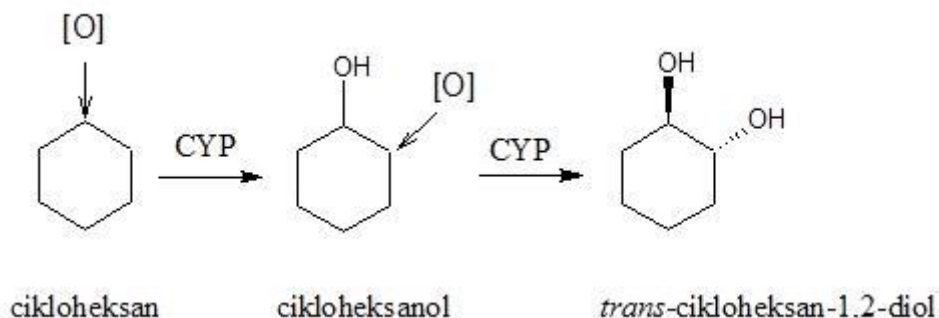
Slika 8. Mehanizam oksidativne N-dealkilacije uz kidanje C-N veze (19).

3.2.7. Hidroksilacija

Reakcije hidroksilacije u alkohole ili fenole, najzastupljenije su među reakcijama oksidacije. Pretežito su katalizirane najvećim enzimskim sustavom citokromom P450. Shematski prikaz reakcije hidroksilacije katalizirane enzimima citokrom P450:



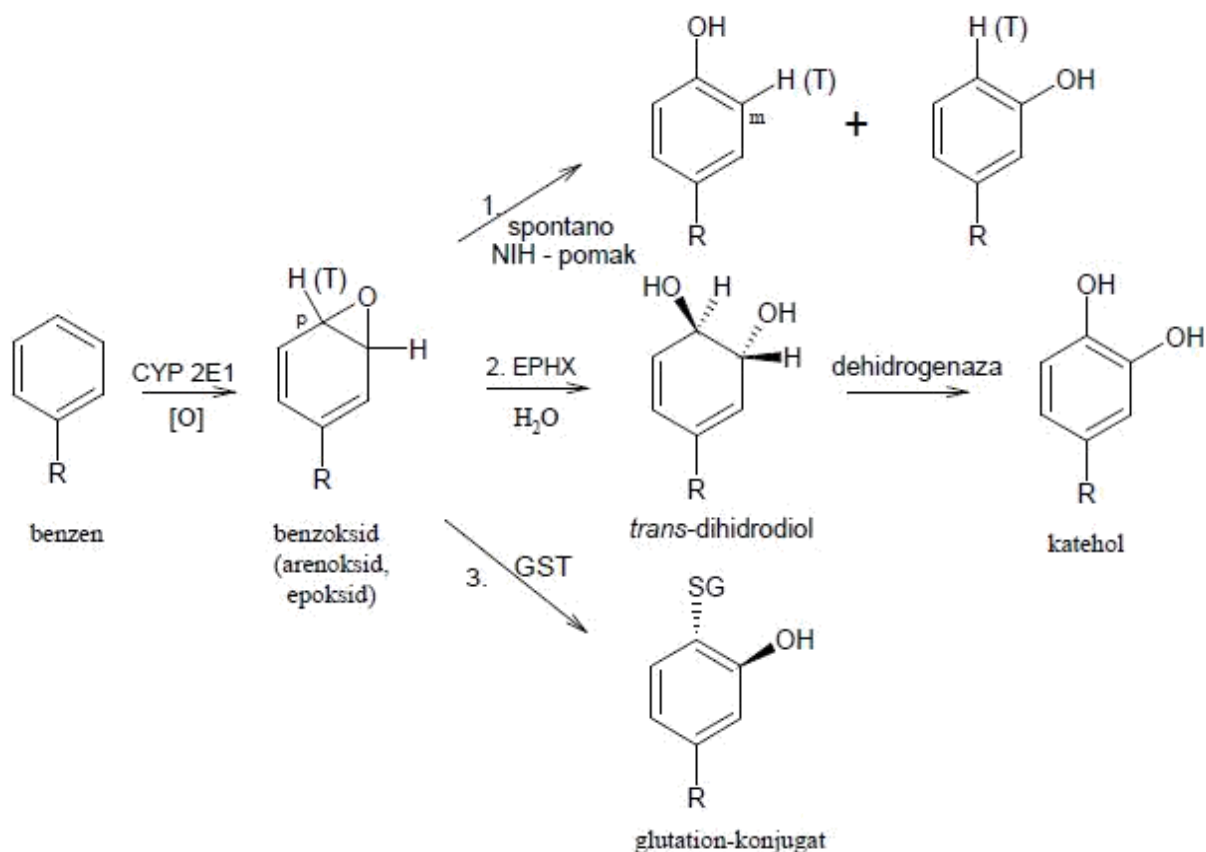
Atom kisika koji se uvodi u molekulu lijeka dolazi od molekuskog kisika, a u stanicu ulazi disanjem, te se aktivira u reaktivan oblik nizom oksidacijsko-redukcijskih reakcija. Ugljikovi atomi kao dijelovi alkilnih lanaca, cikličkih i aromatskih struktura te atomi dušika, sumpora i fosfora se najčešće mogu hidroksilirati. Produkti hidroksilacije C-atoma u zasićenom prstenu monohidroksi- i dihidroksi- derivati (trans-dioli) (19). Opći prikaz reakcije hidroksilacije C-atoma u prstenastom sustavu (Slika 9.):



Slika 9. Mehanizam hidroksilacije C-atoma u prstenastom sustavu. (19)

3.2.8. Aromatska hidroksilacija

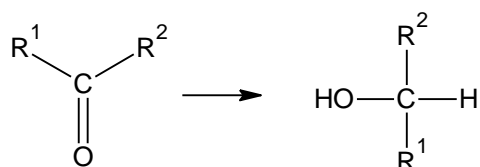
Hidroksilacija aromatskih ugljikovodika (arena) odvija se preko intermedijarnog benzenoksida (arenoksida, epoksida) koji se u kiselim uvjetima može izomerizirati u fenol, prvi stabilni metabolit benzena. Ovisno o kemijskoj stabilnosti, nastali benzenoksidi (arenoksidi) se daljnjim reakcijama spontano pregrađuju u arenole (fenole) (reakcija 1), hidratiziraju pri čemu nastaju trans-dihidrodioli (reakcija 2) ili konjugiraju s glutationom (reakcija 3). Reakcija 1 odvija se spontano (neenzimski) te je često praćena intramolekulskim prijenosom supstituenta na susjedni C-atom, npr. atoma vodika ili halogena ili otpuštanjem supstituenta s molekule supstrata. Prijenos supstituenta na susjedni ugljikov atom naziva se NIH-pomakom. Arenoksid se može otvoriti pri čemu nastaju izomerni fenoli. Prijenos supstituenta s molekule arenoksida može se pratiti pomoću atoma tricija kojim se supstituira jedan atom vodika na jednom ugljikovom atomu koji čini arenoksid. Reakcija 2 se naziva reakcija hidratacije, enzimski proces kojeg katalizira enzim epoksid-katalaza (EPHX). Reakcija se odvija nukleofilnim napadom molekule vode na jedan od dva elektrofilna ugljikova atoma epoksidnog prstena pri čemu nastaju trans-dihidrodioli. Nastali trans-dihidrodioli se dalje oksidiraju dehidrogenazama uz nastanak katehola. Stabilni i nestabilni kateholi stvaraju toksične spojeve. Stabilni se kateholi mogu ponovno oksigenirati do toksičnijih diolepoksida djelovanjem enzima CYP2E1. Nestabilni kateholi se peroksidazama oksidogeniraju u toksične benzokinone i semikinone (Slika 10.) (19).



Slika 10. Mehanizam aromatske hidroksilacije (19).

3.2.9. Redukcija keto skupine

Karbonilni spojevi (aldehidi, ketoni) su obično toksičniji od njihovih metabolita-alkohola tako da se redukcija karbonilnih spojeva smatra reakcijom njihove detoksikacije. Redukcijom aldehida nastaju primarni alkoholi dok redukcijom ketona nastaju sekundarni alkoholi. Redukcije ketona kataliziraju karbonil-reduktaze (CBR), aldo-keto-reduktaze (AKR) i aldehyd-reduktaze (ALR). Supstrati ovih enzima su kinoni policikličkih aromatskih ugljikovodika i raznih lijekova. Fiziološki supstrati karbonil-reduktaza su prostaglandini i steroidi. Redukcijom asimetričnih ketona nastaju sekundarni alkoholi s kiralnim C-atomom. Mnoge redukcije odvijaju se s izvjesnim stupnjem stereoselektivnosti (19).

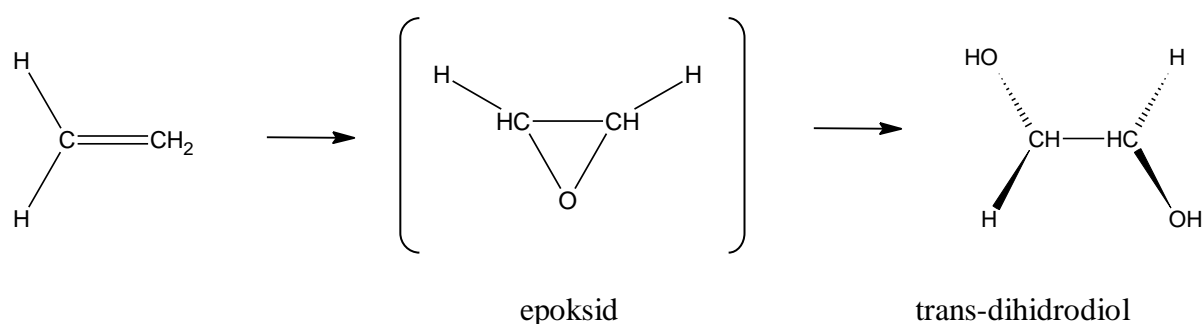


Slika 11. Redukcija ketona u sekundarni alkohol (19).

3.2.10. Oksidacija nezasićenih ugljikovodika nearomatske dvostruke veze

Ksenobiotici koji sadrže nearomatske dvostruke veze mogu se epoksidirati analogno oksidaciji aromatskih tvari. Slično kao što se arenoksidi mogu izomerizirati u fenole, alifatski epoksidi se mogu izomerizirati u odgovarajuće enole. Nastajanje enola može pratiti intramolekulski prijenos supstituenata (slično NIH-pomaku), na položaju na kojem se odvija reakcija. Slično arenoksidima i epoksidi alifatskih spojeva mogu biti toksični, a detoksiciraju se reakcijama biotransformacije kao i arenoksidi. Oksidacijom nekih alifatskih alkena i alkina nastaju metaboliti koji su dovoljno reaktivni da se mogu kovalentnim vezama vezati na hemsku skupinu enzima citokrom P450 koji katalizira reakciju. Ovom reakcijom dolazi do inaktivacije enzima, a proces se naziva suicidalna inaktivacija ili inhibicija temeljena na mehanizmu reakcije.

Epoksidacijom C=C veze endogenih supstrata i nekih ksenobiotika te hidrolizom nastalih epoksida, kao produkti nastaju vicinalni dihidrodoli.



Slika 12. Epoksidacija C=C veze (19).

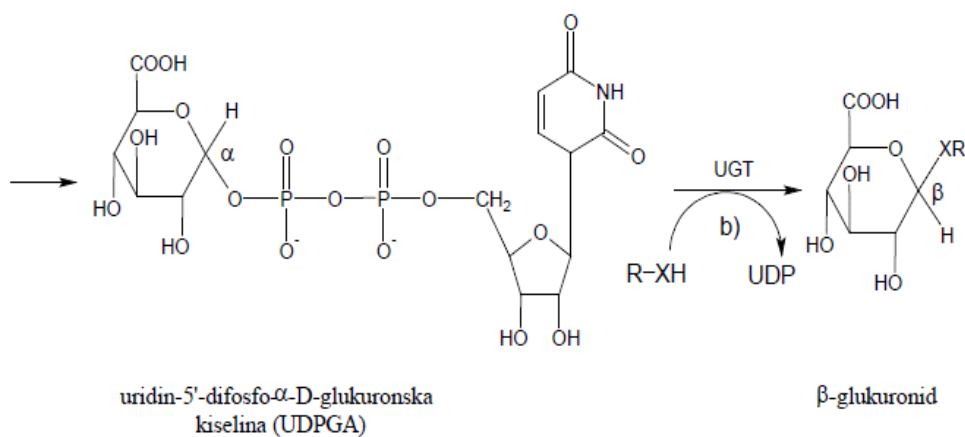
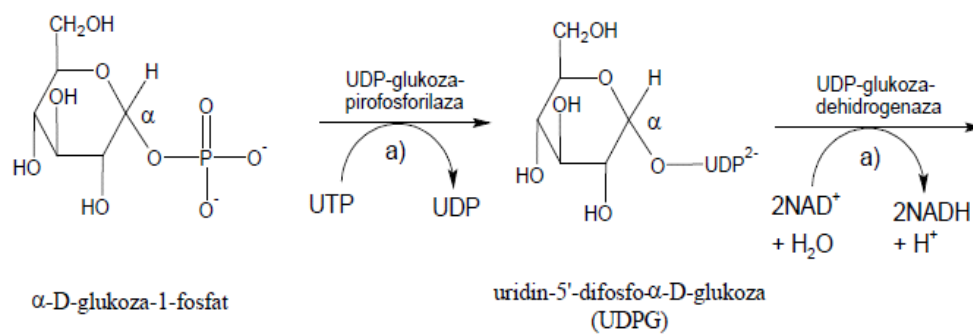
3.2.11. Glukuronidacija

Glavni put biotransformacije ksenobiotika predstavljaju reakcije glukuronidacije. Pospješuju eliminaciju mnogih lipofilnih ksenobiotika i endobiotika, a karakterizira ih prijenos glikozilne skupine s uridindifosfat-glukuronske kiseline (UDPGA) na različite endogene i egzogene supstrate i njihove metabolite. Enzimi koji kataliziraju reakciju glukuronidacije nazivaju se uridindifosfo-glukuronozil-transferaze (UGT). Klasificirani su u četiri porodice: UGT1, UGT2, UGT3 i UGT8. Smješteni su u endoplazmatskom retikulumu stanica jetre i drugih tkiva. Kao produkti reakcije nastaju glukuronidi koji su kiselih svojstava i kod fiziološkog pH u potpunosti ionizirani, što im omogućava lako izlučivanje iz organizma putem urina ili žuči. Reakcija se odvija u dva koraka:

a) Biosinteza uridindifosfo-glukuronske kiseline iz α -D-glukoze-1-fosfata. Reakciju katalizira UDP-glukoza-pirofosforilaza pri čemu nastaje uridin-5'- α -D-glukoza koja se potom oksidira u UDPGA djelovanjem UDP-glukoza-dehidrogenaze.

b) Prijenos glukuronozilnog ostatka nukleofilnom supstitucijom na supstrat (HXR) reakcijom koju katalizira UGT.

Osnovna značajka reakcije glukuronidacije je inverzija konfiguracije koja je rezultat nukleofilnog napada atoma bogatog elektronima. UDPGA u svojoj strukturi ima α -konfiguraciju dok produkti, glukuronidi, imaju β -konfiguraciju. α -konfiguracija onemogućava djelovanje β -glukuronidaze (Slika 13.) (19).



Slika 13. Mehanizam reakcije glukuronidacije (19).

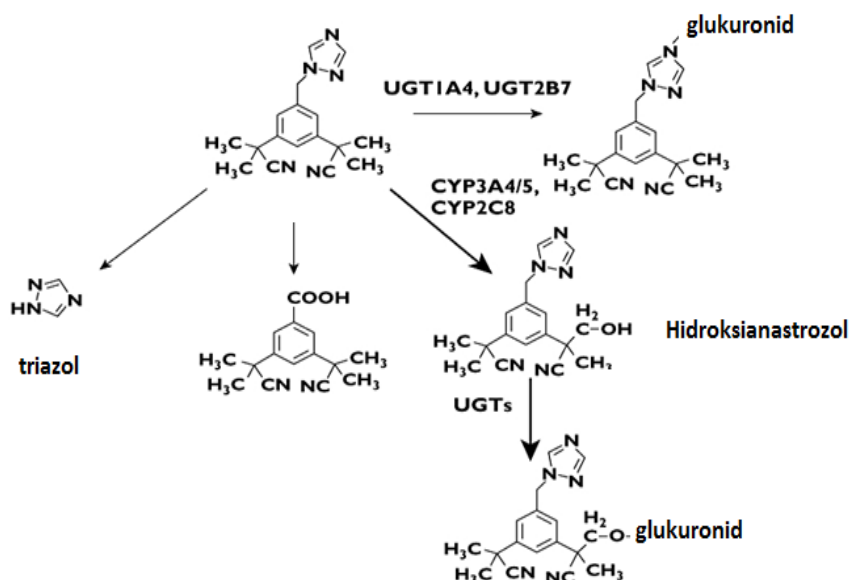
4. RESULTATI

4.1. Prikaz biotransformacije inhibitora aromataze

Kao što je već spomenuto, ovisno o kemijskoj strukturi i mehanizmu djelovanja, inhibitori aromataze dijele se na steroidne i nesteroidne spojeve. Iako povijesno zanimljive, prve dvije generacije inhibitora aromataze danas se više ne koriste. One su zamijenjene superiornijom trećom generacijom kojoj pripadaju anastrozol, letrozol i eksemestan. Anastrozol i letrozol su nesteroidni spojevi dok je eksemestan steroidne strukture. Kako bi mogli više razumjeti princip djelovanja tih lijekova, trebalo bi pobliže objasniti njihov proces biotransformacije u ljudskom organizmu.

4.1.1. Anastrozol

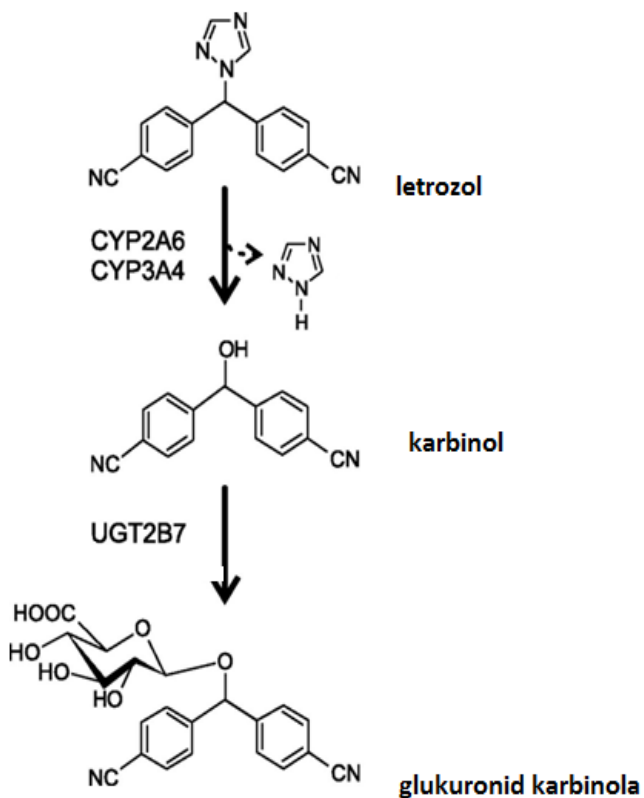
Anastrozol podliježe N-dealkilaciji te se pritom odvaja triazolni prsten. Anastrozol se hidrosilira pretežito enzimom CYP3A4 te nastaje hidroksianastrozol. Jednom formiran, poslije podliježe glukuronidaciji te nastaje hidroksianastrozol glukuronid. Treći metabolit nastaje N-glukuronidacijom anastrozola (43).



Slika 14. Prikaz biotransformacije anastrozola (43).

4.1.2. Letrozol

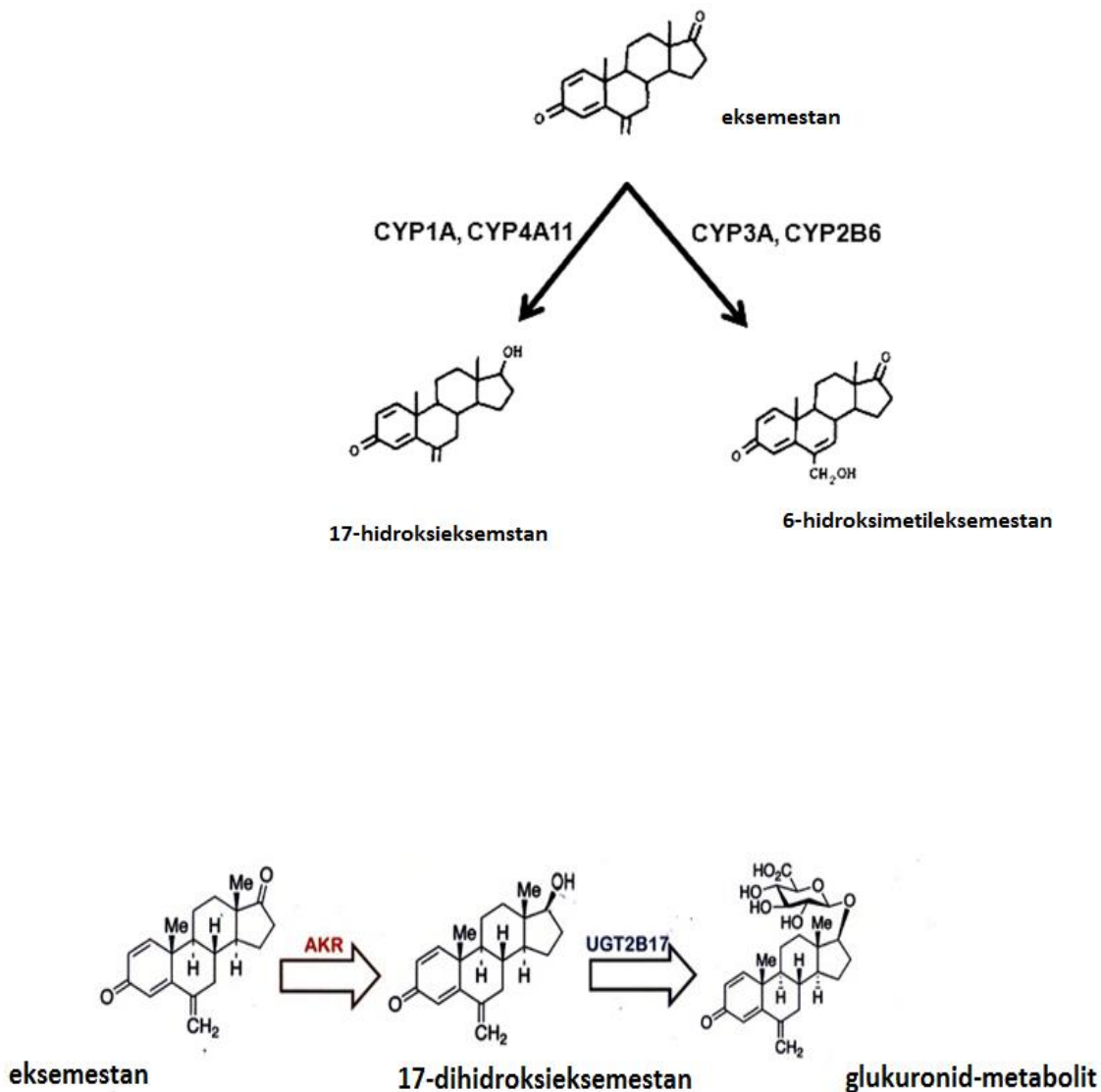
Letrozol podliježe N-dealkilaciji pri čemu se izdvaja triazol, a pod utjecajem enzima CYP2A6 i CYP3A4 ostaje produkt koji se zove karbinol. Kemijski se može opisati kao 4,4' – (hidroksimetilen)dibenzonitril. Karbinol potom podliježe procesu glukuronidacije (44).



Slika 15. Prikaz biotransformacije letrozola (44).

4.1.3. Eksemestan

Najznačajnije reakcije 1. faze za eksemestan su redukcija keto skupine u položaju 17 i oksidacija metilenske grupe u položaju 6 (45). Nakon redukcije keto skupine, produkt 17-dihidroeksemestan lak je supstrat UGT enzimima i podliježe procesu glukuronidacije (46).



Slika 16. Prikaz biotransformacije eksemestana (45,46).

4.2. Prikaz interakcija inhibitora aromataze s drugim lijekovima

Za potrebe prikaza interakcija inhibitora aromataze s drugim lijekovima korišten je javno dostupan pretraživač interakcija Interactions Checker na internetskoj stranici <https://www.drugs.com/>. Prema njihovoj klasifikaciji, prema važnosti interakcija, interakcije se dijele na velike, umjerene i male. Ta podjela se odnosi na njihov stupanj kliničke značajnosti. Interakcije velike važnosti imaju veliki klinički značaj (47), te kao najbitnije

predstavljene su u ovom radu. Upotrebljavajući ključne riječi za pretragu interakcija dobiveni su rezultati koji su prikazani u tablici.

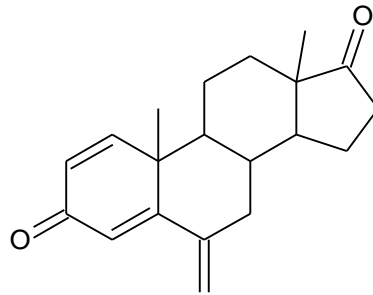
INHIBITOR AROMATAZE	INTERAKCIJA VELIKE VAŽNOSTI
anastrozol	talidomid
letrozol	talidomid, citalopram, bolesti jetre
eksemestan	talidomid

Tablica 2. Prikaz interakcija velike važnosti inhibitora aromataze

Eksemestan, anastrozol i letrozol u kombinaciji s talidomidom mogu potencirati rizik tromboembolije. Točan mehanizam je nepoznat, ali najvjerojatnije je uzrokovan brojnim faktorima. Talidomid je povezan s razvojem duboke venske tromboze, te malignost sama po sebi je još jedan česti uzrok. Letrozol, kao parcijalni CYP 2C19 inhibitor, može povećati plazma koncentracije citaloprama. Klinički gledano, visoka koncentracija citaloprama u plazmi može povećati rizik produžetka QT intervala i pojavi torsade de pointes aritmijama. Letrozol se dosta metabolizira preko jetre pa predstavlja opasnost u pacijenata s teškim oštećenjem jetre. Svi inhibitori aromataze ne smiju se istodobno davati sa estrogenima i njegovim derivatima (48, 49, 50).

Inhibitori aromataze (AI) su velika skupina lijekova koja se primjenjuje za hormonsko liječenje u rutinskoj kliničkoj praksi. Blokiranjem enzima aromataze ovi lijekovi smanjuju stvaranje estrogena u perifernim tkivima i unutar tumora. Dijele se u dvije skupine, ovisno o njihovoj strukturi i reverzibilnosti učinka, a obuhvaćaju reverzibilne nesteroidne inhibitore (anastrozol i letrozol) i ireverzibilne steroidne inhibitore (eksemestan). Ireverzibilni inhibitori se vežu za aromatazu kovalentnom vezom te uzrokuju njenu ireverzibilnu inaktivaciju zbog čega se zovu još i aromatazni inaktivatori (51, 52).

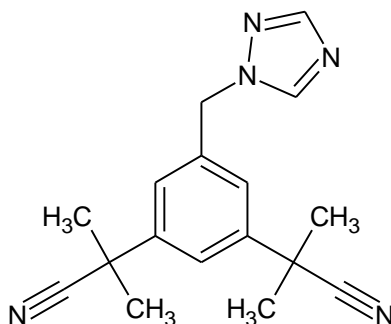
5.1. Eksemestan



Eksemestan

U RH može se naći kao Aromasin 25 mg, Eksemestan JGL 25 mg, Eksemestan Mylan 25 mg, Etadron 25 mg, Exedral 25 mg, Peramit 25 mg. Eksemestan je kontraindiciran u bolesnica s poznatom preosjetljivošću na djelatnu tvar ili na neku od pomoćnih tvari, kod trudnica, dojilja te kod žena u premenopauzi. Potreban je oprez pri primjeni lijeka eksemestana kod bolesnica s oštećenom funkcijom jetre ili bubrega. Pospanost, somnolencija, astenija i omaglica opisane su tijekom primjene lijeka. Potrebno je upozoriti bolesnice da, ako primijete navedene nuspojave, njihove fizičke i/ili mentalne sposobnosti potrebne za upravljanje vozilima ili strojevima mogu biti smanjene. Ne treba se kombinirati istodobno s estrogenima, te s lijekovima koji sadrže estrogene, budući da bi oni mogli poništiti njegovo farmakološko djelovanje. Doziranje eksemestana je jedna tableta od 25 mg jedanput na dan, najbolje nakon obroka (53).

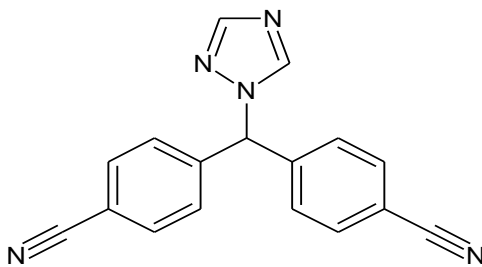
5.2. Anastrozol



Anastrozol

U RH se može naći kao Anastris 1 mg, Anastrozol JGL 1 mg, Anastrozol PLIVA 1 mg, Anastrozol SANDOZ 1 mg, Aremed 1 mg, Arimidex 1 mg, Armotraz 1mg, Astralis 1 mg, Ivel (Anastrozol Genera) 1mg, Strazolan (Anastrozol Genepharm) 1 mg. Anastrozol je kontraindiciran u trudnica i dojilja te u bolesnica s poznatom preosjetljivošću na anastrozol ili neku od pomoćnih tvari u sastavu lijeka. Ne smije se primjenjivati kod žena u premenopauzi. Menopauzu je potrebno utvrditi biokemijski (luteinizirajući hormon [LH], folikulostimulirajući hormon [FSH], i/ili razine estradiola) u svake bolesnice u koje postoji dvojba u svezi s menopauzalnim statusom. Liječenje tamoksifenom ili lijekovima koji sadrže estrogen ne smije se provoditi istodobno s Anastrozom jer bi se time moglo umanjiti njegovo farmakološko djelovanje. Anastrozol nije bio ispitan u bolesnica s rakom dojke koje imaju umjerno ili teško oštećenje funkcije jetre. Izloženost anastrozolu može biti povećana u pacijentica s oštećenjem jetre. Mora se primjenjivati s oprezom u pacijentica s umjerenim i teškim oštećenjem funkcije jetre. Anastrozol nije bio ispitan u bolesnica s rakom dojke koje imaju teško oštećenje funkcije bubrega. Izloženost anastrozolu nije povećana u pacijentica s teškim oštećenjem funkcije bubrega. Anastrozol se mora s oprezom primjenjivati u pacijenata s umjerenim i teškim oštećenjem funkcije bubrega. Ne preporučuje se primjena anastrozola kod djece i adolescenata, jer u toj dobnoj skupini još nije utvrđena njegova sigurnost primjene i djelotvornost. Preporučena doza Anastrozola za odrasle, uključujući i starije, je jedna tableta od 1 mg jednom dnevno (40).

5.3. Letrozol



Letrozol

U RH se može naći kao Avomit 2,5 mg, Femara 2,5 mg, Lametta 2,5 mg, Letrilan 2,5 mg (Letrozol Edicta), Letrofar 2,5 mg, Letrozol JGL 2,5 mg, Letrozol Kabi 2,5 mg, Letrozol Sandoz 2,5 mg, Lezelan 2,5 mg (Letrozol Mylan i Genera 2,5 mg), Lortanda 2,5 mg, Siletris 2,5 mg. Primjena letrozola u liječenju djece i adolescenata se ne preporučuje. Sigurnost i djelotvornost u osoba mlađih od 17 godina nisu ustanovljene. U pacijentica s bubrežnom insuficijencijom s klirensom kreatinina ≥ 10 ml/min nije potrebno prilagođavanje doze. Nema dovoljno dostupnih podataka za slučajeve bubrežne insuficijencije s klirensom kreatinina nižim od 10 ml/min. U bolesnica s blagom do umjerenom insuficijencijom jetre (Child-Pugh stadij A ili B) nije potrebno prilagođavanje doze. Nema dovoljno dostupnih podataka za pacijentice s teškim oštećenjem jetre. Bolesnice s teškim oštećenjem jetre (Child-Pugh stadij C) moraju biti pod strogim nadzorom. Kao i prethodno dva opisana inhibitora aromataze, i letrozol se mora koristiti samo kod žena u postmenopauzi. Doziranje je 2,5 mg jednom dnevno (42).

Iako se hormonska terapija pokazala vrlo učinkovitom u liječenju karcinoma dojke, njezin učinak je ograničen učestalom pojavom intrinzične (*de novo*) ili stečene rezistencije. Većina metastatskih karcinoma dojke nakon početnog odgovora na hormonsku terapiju postane rezistentna na istu što se nažalost vrlo često očituje progresijom bolesti (54,55).

Kod velikog broja pacijentica čija je bolest dijagnosticirana u ranom stadiju (gotovo 30%) razvit će rezistencija na hormonsko liječenje, a ista će se razviti i kod gotovo svih bolesnica čija je bolest dijagnosticirana u uznapredovalom stadiju (56). Ova se rezistencija obično iskazuje kao povrat bolesti, najčešće metastatske naravi. Budući da liječenje metastaza još uvijek predstavlja izazov u medicini, a s vrlo malim šansama za izlječenje, pronalaženje novih lijekova, poput npr. SERD-ova (fulvestrant), predstavlja izuzetnu važnost u terapiji

karcinoma dojke. U prvoj liniji liječenja žena u postmenopauzi, s uznapredovalim karcinomom dojke fulvestrant se pokazao čak učinkovitiji od inhibitora aromataze, a smatra se da ne postoji ni križna rezistencija između fulvestranta i inhibitora aromataze (57,58).

6. ZAKLJUČAK

1. Karcinom dojke je najčešće dijagnosticiran karcinom diljem svijeta te kod žena drugi najčešći uzrok smrti povezanih s tumorom. U liječenju karcinoma dojke danas se koriste različiti pristupi: supresija funkcije jajnika, selektivni estrogen receptor modulatori, inhibitori aromataze te selektivni estrogen receptor regulatori.

2. Inhibitori aromataze dio su endokrine terapije liječenja hormon pozitivnih karcinoma dojke. Oni blokiraju enzim aromatazu koja sudjeluje u reakcijama biotransformacije androgenih hormona u ženske spolne hormone.

3. Estrogen se u žena u premenopauzi primarno stvara u jajnicima, dok se kod žena u postmenopauzi stvara dominantno iz ne-ovarijskih izvora preko enzima aromataze.

4. U slučaju estradiola karcinogena svojstva su pokazali u *in vitro* uvjetima C2-hidroksi i C4-hidroksi metaboliti estradiola. Za toksičan učinak značajna je reakcija hidroksilacije u položaju C4-pretežito. Hidroksilirani metabolit (katehol) se daljnjim reakcijama oksidacije može prevesti u reaktivni 3,4-kinon i semikinone (reakcija toksikacije). Estradiol i potencijalno toksični dioli detoksiciraju se u ljudi reakcijama konjugacije te se prevode u konjugate s metilnom ili glukuronskom skupinom i izlučuju iz organizma. Hidroksilirani metabolit (katehol), koji nastaje hidroksilacijom u položaju C2-, premda potencijalno karcinogen, dobar je supstrat metiltransferaze te se reakcija C2-hidroksilacije i daljnja reakcija O-metilacije mogu smatrati reakcijama detoksikacije estradiola.

5. Inhibitori aromataze su razvijeni kroz tri generacije, od kojih danas samo treća generacija nalazi najučestaliju primjenu. Njoj pripadaju nesteroidni anastrozol i letrozol te eksemestan steroidne strukture.

6. U našem organizmu anastrozol podliježe N-dealkilaciji, hidroksilira se pretežito enzimom CYP3A4 te nastaje hidroksianastrozol. Jednom formiran, poslije podliježe glukuronidaciji te nastaje hidroksianastrozol glukuronid. Treći metabolit nastaje N-glukuronidacijom anastrozola.

7. U našem organizmu letrozol podliježe N-dealkilaciji. Pod utjecajem enzima CYP2A6 i CYP3A4 ostaje produkt koji se zove karbinol koji potom podliježe procesu glukuronidacije.

8. U našem organizmu eksemestan podliježe redukciji keto skupine u položaju 17 i oksidaciji metilenske grupe u položaju 6. Nakon redukcije keto skupine, produkt 17-dihidroeksemestan lak je supstrat UGT enzimima i podliježe procesu glukuronidacije.

9. Ne preporuča se istodobna kombinacija inhibitora aromataze s estrogenima

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. U: Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology (13.izdanje). Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 1035-1050
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30
3. Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *Ochsner Journal.* 2017;17:405-411
4. Lumachi F, Santeufemia DA, Basso SMM. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem.* 2015;6(3):231-239
5. Augereau P, Patsouris A, Bourbouloux E, Gourmelon C, Lacourtoisie SA, Rigaud DB i sur. Hormonresistance in advanced breast cancer: a new revolution in endocrine therapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2017;9(5):335-346
6. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N i sur. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12:701-20
7. Tomek R, Beketić Orešković L, Vrdoljak E, Soldić Ž, Podolski P, Pleština S i sur. Kliničke upute za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od invazivnog raka dojke. *Liječ Vjesn.* 2012;134:1-5
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;0:1-31
9. McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist.* 2003;8:326-334
10. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E i sur. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practise Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2015;26(5):8-30
11. Colditz GA. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(4):768-72
12. Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):239-47
13. Šekerija M. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; Registar za rak Republike Hrvatske 2018; Bieten 40
14. Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet.* 1896;148(3803):162-165

15. Allen E, Doisy EA. Landmark article Sept 8, 1923: an ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA*. 1983;250(19):2681-2683
16. Harper MJ, Walpole AL. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fertil*. 1967;13(1):101-119
17. Miller WR, Anderson TJ, Evans DB, Krause A, Hampton G, Dixon JM. An integrated view of aromatase and its inhibition. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2003;86:413-421
18. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L i sur. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res*. 2005;65:11071-11082
19. Rendić S, Medić-Šarić M. *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
20. Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS. The pharmacology of letrozole. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2003;87:35-45
21. Budzar AU. *Endocrine Therapies in Breast Cancer*. New York: Oxford University Press. 2007:29-36
22. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U, Basso SM. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr Med Chem*. 2013;20:596-604
23. Deeks ED, Scott LJ. Exemestane: a review of its use in postmenopausal with breast cancer. *Drugs*. 2009;69:889-918
24. U.S. Food & Drug Administration. Aromasin (exemestane): approval date(s) and history, letters, labels, reviews for NDA 020753 [online]. Available from URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/1999/20753LBL.pdf [Accessed 2019 April 17]
25. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Lang I, Ciruelos E, Bellet M i sur. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:436-446
26. U.S. Food & Drug Administration. Arimidex (anastrozole): approval date(s) and history, letters, labels, reviews for NDA 020541 [online]. Available from URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/020541s031lbl.pdf [Accessed 2019 April 17]
27. Sanford M, Plosker GL. Anastrozole. A review of its Use in Postmenopausal Women with Early-Stage Breast Cancer. *Drugs*. 2008;68(9):1319-1340

28. AstraZeneca Pharmaceuticals LP. Arimidex® (anastrozole) tab-lets: prescribing information [online]. Available from URL: <http://www.fda.gov/cder/approval/index.htm> [Accessed 2008 Jan 22]
29. European Medicines Agency. Arimidex (anastrozole): summary of product characteristics [online]. Available from URL: <http://www.arimidex.net/gUserFiles/FullPI091007.pdf> [Accessed 2008 Jan 22]
30. The ATAC Trialists' Group. Pharmacokinetics of anastrozole and tamoxifen alone, and in combination, during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer in postmenopausal women: a sub-protocol of the 'Arimidex and Tamoxifen Alone or in Combination' (ATAC) trial. *Br J Cancer*. 2001;85(3):317-24
31. McEvoy GK. AHSF Drug Information. Bethesda (MD): American Society of Health System Pharmacists, Inc, 2007
32. Plourde PV, Dyroff M, Dukes M. Arimidex: a potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;30(1):103-11
33. Yates RA, Dowsett M, Fisher GV, et al. Arimidex (ZD1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers. *Br J Cancer*. 1996;73(4):543-8
34. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M i sur. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early – stage breast cancer: 10 – year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:1135-41
35. Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5138-47
36. Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J. Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2664-70
37. Jakesz R, Jonat W, Gnant M. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet*. 2005;366(9484):455-62
38. Jonat W, Gnant M, Boccardo F. Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2006;7(12):991-6
39. Jakesz R, Greil R, Gnant M, et al. Extended adjuvant therapy with anastrozole among postmenopausal breast cancer patients: results from the randomized Austrian Breast and Colorectal Cancer Group trial 6a. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(24):1845-53

40. Arimidex 1 mg tablete. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-10-02-391.pdf> [Pristupljeno 2019 Travanj 17]
41. U.S. Food & Drug Administration. Femara (letrozole): approval date(s) and history, letters, labels, reviews for NDA 020726 [online]. Available from URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/020726s035lbl.pdf [Accessed 2019 April 17]
42. Femara 2,5 mg tablete. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/PIL/UP-I-530-09-10-02-188.pdf> [Pristupljeno 2019 Travanj 17]
43. Kamdem LK, Liu Y, Stearns V, Kadlubar SA, Ramirez J, Jeter S i sur. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;70(6):854-869
44. Precht JC, Ganchev B, Heinkele G, Brauch H, Schwab M, Mürdter TE. Simultaneous quantitative analysis of letrozole, its carbinole metabolite, and carbinol glucuronide in human plasma by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(1):301-308
45. Kamdem LK, Flockhart DA, Desta Z. In vitro Cytochrome P450 – Mediated Metabolism of Exemestane. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(1):98-105
46. Wang LZ, Goh SH, Wong ALA, Thuya WL, Lau JYA, Wan SC i sur. Validation of a Rapid and Sensitive LC-MS/MS Method for Determination of Exemestane and Its Metabolites, 17 β - Hydroxyexemestane and 17 β – Hydroxyexemestane – 17 – O - β – D- Glucuronide: Application to Human Pharmacokinetics Study. *Plos One*. 2015;10(3):e0118553
47. Drug Interaction Report. Drugs.com. Dostupno na: https://www.drugs.com/interactions-check.php?drug_list=133-0,862-0,1488-0,1764-0.
48. Drug Interaction Report. Drugs.com. Dostupno na: <https://www.drugs.com/drug-interactions/exemestane,aromasin.html>
49. Drug Interaction Report. Drugs.com. Dostupno na: <https://www.drugs.com/drug-interactions/anastrozole,arimidex.html>
50. Drug Interaction Report. Drugs.com. Dostupno na: <https://www.drugs.com/drug-interactions/letrozole,femara.html>
51. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada. 2013.
52. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(24):2431-42

53. Aromasin 25 mg tablete. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: [file:///C:/Users/Jadranka/Downloads/SPC_UP-I-530-09-12-02-554%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Jadranka/Downloads/SPC_UP-I-530-09-12-02-554%20(3).pdf) [Pristupljeno 2019 Travanj 17]
54. Robertson JF, Nicholson RI, Hayes DF, ur. *Endocrine Therapy of Breast Cancer*. London: Martin Dunitz; 2002
55. Zhao M, Ramaswamy B. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):248-62.
56. Cardoso F, Costa A, Norton L, Senkus E, Aapro M, André F, i sur. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). *Breast*. 2014;23(5):489-502
57. Robertson JF. Selective oestrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(8):695-706
58. Ellis MJ, Llombart-Cussac A, Feltl D, Dewar JA, Jasiówka M, Hewson N i sur. Fulvestrant 500 mg Versus Anastrozole 1 mg for the First-Line Treatment of Advanced Breast Cancer: Overall Survival Analysis From the Phase II FIRST Study. *J Clin Oncol*. 2015;33(32):3781-7.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj ovog diplomskog rada je proučavanje mogućeg nastanka karcinoma dojke, uzrokovanog metaboličkim promjenama na estrogenim hormonima, a pod utjecajem enzimskih sustava koji u tim reakcijama sudjeluju. Stoga su u ovome diplomskom radu temeljito opisani i prikazani glavni metabolički putovi estrogenih hormona kao i metaboličke promjene lijekova koji se koriste u liječenju karcinoma dojke s posebnim naglaskom na inhibitore aromataze.

Materijali i metode: Najpotentnijoj trećoj generaciji inhibitora aromataze pripadaju anastrozol, letrozol i eksemestan. Za svakog od njih, opisane su indikacije, farmakokinetika, farmakodinamika, kemijska svojstva i nuspojave. Uspoređeni su s tamoksifenom, dotadašnjim standardom za liječenje hormon receptor pozitivnog karcinoma dojke. Opisane su reakcije I. i II. faze biotransformacije kroz koje prolaze sva tri navedena lijeka.

Rezultati: Anastrozol podliježe N-dealkilaciji te se pritom odvaja triazolni prsten. Anastrozol se hidroksilira pretežito enzimom CYP3A4 te nastaje hidroksianastrozol. Jednom formiran, poslije podliježe glukuronidaciji te nastaje hidroksianastrozol glukuronid. Treći metabolit nastaje N-glukuronidacijom anastrozola. Letrozol podliježe N-dealkilaciji pri čemu se izdvaja triazol, a pod utjecajem enzima CYP2A6 i CYP3A4 ostaje produkt koji se zove karbinol. Karbinol potom podliježe procesu glukuronidacije. Najznačajnije reakcije 1. faze za eksemestan su redukcija keto skupine u položaju 17 i oksidacija metilenske grupe u položaju 6. Nakon redukcije keto skupine, produkt 17-dihidroeksemestan lak je supstrat UGT enzimima i podliježe procesu glukuronidacije. Opisane su i najvažnije interakcije inhibitora aromataze.

Zaključak: Inhibitori aromataze dio su endokrine terapije liječenja hormon pozitivnih karcinoma dojke. Oni blokiraju enzim aromatazu koja sudjeluje u reakcijama biotransformacije androgenih hormona u ženske spolne hormone, a to je posebno važno kod žena u postmenopauzi jer se kod njih estrogen dominantno stvara iz ne-ovarijskih izvora preko enzima aromataze.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Aromatase inhibitors (CYP19) – structural modifications and importance in therapy

Objective: The aim of this graduate thesis is to study the possible emergence of breast cancer, caused by metabolic changes on estrogen hormones, under the influence of the enzyme systems involved in these reactions. Therefore, the main metabolic pathways of estrogen hormones as well as the metabolic changes of drugs used in the treatment of breast cancer with a special emphasis on aromatase inhibitors have been described and presented in this graduate study.

Materials and Methods: The most potent third generation of aromatase inhibitors are anastrozole, letrozole and exemestane. For each of them, have been described indications, pharmacokinetics, pharmacodynamics, chemical properties and side effects. They have been compared to tamoxifen, which was standard for treating the hormone receptor positive breast cancer before aromatase inhibitors. The reactions of biotransformation changes phases I and II have also been described for all three of these drugs.

Results: Anastrozole is subjected to N-dealkylation where he separates the triazole ring. Anastrozole is hydroxylated predominantly with the CYP3A4 enzyme and hydroxyanastrozole is formed. Once formed, it is subsequently subjected to glucuronidation and hydroxyanastrozole glucuronide is formed. The third metabolite is formed by N-glucuronidation of anastrozole. Letrozole is subjected to N-dealkylation, process where triazole is released, and under the influence of the CYP2A6 and CYP3A4 enzymes remains a product called carbinol. Carbinol is then subjected to the glucuronidation process. The most significant reactions of Phase 1 for exemestane are reduction of the keto group at position 17 and oxidation of the methylene group at position 6. After the reduction of the keto group, the 17-dihydroexemestane product is a good substrate to UGT enzymes and is subjected to the glucuronidation process. The most important interactions of aromatase inhibitors are also described.

Conclusion: Aromatase inhibitors are part of endocrine therapy for treating hormon positive breast cancer. They block the enzyme aromatase that occurs in the reactions biotransformations of androgenic hormones in female sex hormones and is especially important for postmenopausal women because they predominantly derive estrogen from non-ovarian sources through the aromatase enzyme.

10. ŽIVOTOPIS

Osnovni podatci:

Ime i prezime: Sara Grubišić-Čabo

Datum rođenja: 4. siječnja 1994.

Mjesto rođenja: Šibenik, Republika
Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Ante Šupuka 27,
22000 Šibenik

Broj telefona: +385 91 768 7455

e-adresa: saragcabo@gmail.com

Obrazovanje:

2013. - 2019. Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2010. Royal school Hampstead, London- tečaj engleskog jezika

2008. - 2012. Opća gimnazija "Antun Vrančić", Šibenik

2000. - 2008. Osnovna škola "Juraj Šižgorić", Šibenik

Radno iskustvo:

veljača 2018. - rujan 2018. Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna „Dobri“.

Nagrade i priznanja:

- Osvojeno prvo mjesto na natjecanju u kliničkoj suradnji studenata farmacije i medicine u Splitu 10. i 11. lipnja 2017. godine.

- Osvojeno prvo mjesto na natjecanju u kliničkim vještinama s temom „Karcinom dojke praćen komorbiditetima - terapija današnjice“ u Zagrebu 18. i 19. svibnja 2018. godine.

- Nagrada za znanstveni rad "Antioksidacijska svojstva i sastav ekstrakta zelenog čaja u ovisnosti o načinu pripreme" na 6. Simpoziju studenata farmacije i biokemije „FARMEBS 2017“.

Znanja i vještine:

- engleski jezik (C1), talijanski jezik (B2), njemački jezik(A1)
- vozačka dozvola B kategorije
- rad u programima Microsoft Office i Esculap 2000