

SZTEROID-PROFILOK ENDOKRIN ÉS IDEGRENDSZERI KÓRKÉPEKBEN

PhD értekezés tézisei

Poór Viktória

Kémiai Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Juricskay Istvánné, Dr. Kilár Ferenc

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Bioanalitikai Intézet

2007

BEVEZETÉS

Napjainkban, a nőket leginkább veszélyeztető betegségek közé tartozik az emlőrák, a csontritkulás és a depresszió. Kialakulásukban számos kockázati tényező ismert. Az emlőrák és a csontritkulás esetében széleskörűen kutatott a női nemi hormonok érintettsége. A klinikai és kísérleti adatok mellett szólnak, hogy az emlődaganatok kialakulásában az ösztrogéneknek jelentős szerepe van. Továbbá ismert tény, hogy a menopauza után jelentkező csontritkulás kialakulásában egyik fő kockázati tényező a petefészek-működés leállásának következtében kialakuló ösztrogénhiány. A női nemi hormonszintek változásaira vezethető vissza a terhességi, a szülés utáni, a menstruáció előtti és a klimax idején fennálló depresszió. Újabb klinikai és szövettényészeteken végzett vizsgálatok azonban felvetik az androgének szerepét is emlőrák, csontritkulás és pszichés zavarok esetében.

Az egészséges és patofiziológias állapotokban jelentős szteroid hormonok és metabolitjaik mérésére többféle módszer ismeretes, mint pl. a kolorimetriai-, a fluorimetriai- és a kromatográfiás módszerek, ill. az immunoesszék. Szérumból, plazmából és egyes komponensek esetében nyálból és vizeletből történő egyedi szteroid mérések (általában immunoesszék) gyorsan végezhetőek, könnyen kivitelezhetőek és többnyire automatizálhatók, de csak a keringésben lévő szteroidokról adnak egy-egy pillanatnyi információt.

A vizeletszteroid-profil, ill. -spektrum néven ismert gázkromatográfiás módszer több szteroid csoport egyidejű mérését teszi lehetővé. A szteroid-profil mérések kiemelkedő kutatója C. H. L Shackleton. Az általa kidolgozott módszerek ma is világszerte elfogadottak és a szteroid analízis alapjául szolgálnak. A 24 órán át gyűjtött vizeletből történő gázkromatográfiás mérés átfogó képet nyújt a szteroidok metabolikus útjairól és a szintézisben résztvevő enzimek működéséről is, kiküszöbölve az egyes szteroidokra jellemző napi ingadozásokból adódó mérési eltéréseket. Előnyei közé tartozik, hogy a mintavételi eljárás fájdalommentes és kevesebb stresszel jár, mint a vérvétel, ami fontos szempont a gyermekek, ill. a stresszel kapcsolatos betegségek vizsgálatánál.

A vizeletszteroid-profil módszer több endokrin megbetegedés differenciál diagnosztikájában és kutatásában kiemelkedő fontossággal bír. Magyarországon egyedülállóan a PTE ÁOK Bionalitikai Intézetében végezzük a méréseket, a szteroid-profil módszerrel dolgozó laboratóriumokat összefogó nemzetközi szervezet tagjaként.

Munkánk során olyan komplex endokrin hátterű, főként nőket érintő betegségekben (emlőrák, csontritkulás, depresszió) vizsgáltunk vizeletszteroid-profilokat, melyek patofiziológiája nem teljesen felderített, és kapcsolatos a szteroid metabolizmus módosulásával.

CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt években vizelet szteroid-profilokat vizsgáltunk különböző kórképekben. Vizsgálni kívántuk, létezik-e a kórképekre specifikusan jellemző szteroid-profil, ill. egyes metabolitok egymáshoz viszonyított aránya alapján enzimműködésbeli változás, továbbá a detektált változások értelmezhetők-e a diagnosztika, ill. terápia szintjén.

1. A 90-es évek közepén laboratóriumunkban, menopauzában lévő emlőrákos nők vizeletszteroid-profiljait elemezték. Ezt a projektet folytattuk, olyan emlőrákos betegek esetében, akiknél a menopauza előtt és a menopauza körül alakult ki a betegség. Célunk volt a metabolizmus változásainak megismerése a menopauza különböző szakaszaiban.
2. Vizsgálni kívántuk az androgének és a 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim (11β -HSD) érintettségét a posztmenopauzában kialakuló csontritkulásban.
3. Célunk volt a dehidroepiandroszteron (DHEA) és a kortizol szint változásának vizsgálata depressziós betegeknél, figyelembe véve a nemi és életkori sajátosságokat, továbbá lehetséges markerként használható metabolit arányok felderítése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. BETEGANYAG

Munkánk során 24 óráig gyűjtött vizeletmintákkal dolgoztunk. A betegcsoportokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikáinak betegei közül választottuk ki, a klinikák orvosainak segítségével.

A betegek a vizeletgyűjtés megkezdése előtt szteroid metabolizmust befolyásoló gyógyszeres kezelésben nem részesültek, és hozzájárultak a kutatásban való részvételhez.

Kontroll csoportként a legtöbb esetben azonos nemű és hasonló életkorú egészséges személyek közreműködését kértük.

2. SZTEROID-PROFIL MEGHATÁROZÁS

A gázkromatográfiás mérések előtt több munkafolyamatból álló mintaelőkészítést végeztünk, melynek lépései: a szteroidok kivonása a vizeletből, a konjugátumként ürülő metabolitok felszabadítása enzimatisz hidrolízissel, ill. a származékképzés, melynek során a hőbomlást és az illékonytást befolyásoló poláris csoportok (hidroxil és keto csoportok) átalakítása történik. Az alkalmazott származékképző reagens roncsolhatja a gázkromatográfiás mérésekhez használt kapilláris oszlopot, ezért a feleslegét oszlopkromatográfiával távolítottuk el a mintákból.

A szteroidok származékait folyadék halmazállapotban jutattuk a gázkromatográfba. A metabolitok elválasztása apoláros állófázist tartalmazó kapilláris oszlopokon történt, hőmérsékleti program és lángionizációs detektálás alkalmazásával. A metabolitokat relatív retenciós idők alapján azonosítottuk. A mennyiségi meghatározás belső standard módszerrel történt.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Három endokrin, ill. idegrendszeri, a szteroid metabolizmust érintő kórképben elemeztük a betegek 24 órás vizeletszteroid-profiljait. A betegek mintáiban mért metabolitok 24 órás mennyiségét ($\mu\text{mol}/24$ óra), a fontosabb szteroid termelést jellemző metabolit összegeket és enzimműködést jellemző metabolit arányokat a minta eloszlásának megfelelő statisztikai próbákkal hasonlítottuk össze hasonló korú egészséges kontrollok szteroid értékeivel.

1. Eredményeink szerint, eltérő változásokat tapasztaltunk a menopauza különböző szakaszaiban lévő emlőrákos nőknél. A különböző menopauzás stádiumban lévő betegeknél több androgén metabolit szintjében igazolódott szignifikáns csökkenés: a premenopauzában az androszteron (An) szintjében ($p < 0,05$), az An és etiokolanolon (Et) metabolitok összegében ($p < 0,05$), míg a perimenopauzában az 5α -androsztándiol (5α -AD) és androszténdiol ($\Delta 5$ -AT) ($p < 0,05$) értékében. A menopauza előtt megbetegedő emlőrákos nőknél tapasztalt eltérések a tesztoszteron és androszténdion, a perimenopauzás emlőrákos nőknél pedig a fő mellékvese androgén DHEA metabolizmus változását jelzik, megerősítve azt a feltételezést, hogy az androgének is szerepet játszanak az emlőrákos folyamatban.

Egyes szövettanyészeteken végzett vizsgálatok szerint az androgének magas ösztrogén szint mellett ösztrogén ellenes hatást fejthetnek ki, lehetséges, hogy a relatíve magas ösztrogén szinttel rendelkező premenopauzás nőknél hiányuk megnövelheti a rák kialakulásának kockázatát?

A premenopauzás betegeknél szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fő kortizol metabolitok összegében ($p < 0,01$), és több kortizol metabolit (tetrahidrokortizon-THE, tetrahidrokortizol-THF, allotetrahidrokortizol-aTHF és β -kortolon- β CL, $p < 0,05$) szintjében, míg a perimenopauzában nem találtunk változásokat a normál értékekhez képest.

Lényeges különbségre mutat rá, tehát egyedül a premenopauzában tapasztalt kortizol metabolit szintek csökkenése, és csak a posztmenopauzában tapasztalt progeszteron metabolit, a pregnándiol (PD) csökkenése, ráirányítva a figyelmet a glükokortikoidok ill., a progeszteron eltérő szerepére a menopauza különböző szakaszaiban kialakuló emlőrákos folyamatokban.

2. Irodalmi adatok szerint az androgének pozitív hatást fejtenek ki a csontsűrűségre. A menopauza után lévő csonttriturált nők esetében a szakirodalomból ismert szérumból és plazmából történő mérések alapján azt vártuk, hogy az androgén metabolitok szintje alacsonyabb lesz a kontroll értékekhez képest.

Szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az Et ($p < 0,05$), a DHEA ($p < 0,01$) és a gyenge androgén hatású 11-keto-androszteron (11-O-An) ($p < 0,05$) szintjében, a 11-deoxi-17-ketoszteroidok és metabolitjaik összegében ($p < 0,05$) és az An és Et metabolitok összegében ($p < 0,05$). Ezek az eredmények utalhatnak arra, hogy a női nemi hormonok mellett az androgének is szerepet játszanak a csontvesztés folyamatában a menopauza után. Bizonyos feltételezések szerint az androgének csontvesztést akadályozó hatása jelentősen érvényesül a menopauza utáni ösztrogénhiányos állapotban. Hatásukat kifejtethetik ösztrogénné alakulva, illetve közvetlenül, androgén receptorokon keresztül.

A menopauza után kialakuló csonttriturálás kezelésére többféle lehetőség létezik. Az optimális eredmény eléréséhez sok tényezőt kell figyelembe venni. Irodalmi adatok alapján a hormonpótló kezelések a leghatékonyabbak a betegség megelőzésében és kezelésében. Az általunk tapasztalt DHEA szint csökkenés szintén felveti a lehetőségét annak, hogy megfelelő körülményekkel ez a komponens terápiásan alkalmazható lehet a posztmenopauzás csonttriturálásban, a komponens szintjének mérése, ill. csontsűrűségre gyakorolt hatásának vizsgálata bizonyos esetekben segítheti a megelőzést, hatékonyabbá teheti a kezelést.

A tapasztalt kortizol metabolitok csökkenése (THE, $p < 0,01$, β -CL, α -kortolon- α -CL, $p < 0,05$) ellentmondásosnak tűnik a glükokortikoidok ismert, csonttriturálást indukáló hatásával. Lehetséges, hogy ez csökkenés nem más, mint a szervezet belső kompenzációja, mely a csonttriturálás irányába ható hormon csökkenéséhez vezetett?

A 11β -HSD enzim működését jellemző metabolit arányban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két csoport között. A mellékvese által termelt kortizol szintjét a perifériás szövetekben a 11β -HSD enzim rendszer szabályozza. Az elmúlt években 2 izoenzimjét azonosították. Mindkét izoenzim genetikai defektje, vagy megváltozott működése humán megbetegedéseket idézhet elő. A 11-oxo-kortizol (kortizon) és 11-hidroxi kortizol metabolitok aránya az enzim működését jellemzi.

3. Eddigi információk alapján azt vártuk, hogy a DHEA és a kortizol szint, ill ezen metabolitok egymáshoz viszonyított aránya módosulni fog a depressziós betegek esetében. Szakirodalmi adatok főleg a DHEA esetében néhol ellentmondásosak, nehezen összevethetők az alkalmazott módszerek, választott korcsoportok és nemek különbözősége miatt.

Fontos különbségekre mutattak azonban rá eredményeink az egyes nemek esetében. A kortizol szint emelkedése ($p < 0,01$) a depressziós nőknél és a DHEA szint csökkenése ($p < 0,01$) a depressziós férfiaknál utalhat arra, hogy a hipotalamusz-agyalapimirigy-mellékvese tengely működése eltérően módosul a két nemnél, és a két szteroid hatása eltérőképpen érvényesül. A fentiek ellenére egyik nemnél sem mutatkozott eltérés a kortizol és a DHEA egymáshoz viszonyított arányában a kontroll értékekhez képest.

Vizeletszteroid metabolit arányok alapján igazolódott, hogy a 11β -HSD enzimrendszer működése nemtől függetlenül módosult ($p < 0,01$) a depresszióban. A betegeknél több kortizon alakult át aktív kortizollá, mint a kontrolloknál.

Eredményeink felvetik, hogy hasznos lehet a depresszió hátterében álló biokémiai változások felderítéséhez a nemek elkülönített vizsgálata. Érdekes információkkal szolgálhat, annak vizsgálata, hogy a változások mértéke és a depresszió tüneteinek súlyossága között van-e kapcsolat. Csökkent DHEA szint megfontolandó lehetőséget vet fel az alkalmazott gyógyszeres kezelés szempontjából.

ÖSSZEFOGLALÁS

Összegezve eredményeinket, a vizsgált betegségeknél több esetben tapasztaltunk változásokat a szteroid profilban az azonos nemű és hasonló korú egészséges kontrollokéhoz képest.

A több szteroid csoport egyidejű vizsgálatára alkalmas szteroid-profil módszer előnye, hogy áttekinthető képet ad a napi szteroid szintéziséről beleértve a mirigyek anyagcseréjét és a perifériás anyagcserét is. Az egyes metabolitok szintjében és egymáshoz viszonyított arányában bekövetkezett változások ráirányítják a figyelmet az adott enzimek és szteroid csoportok szerepére, így segítséget nyújthatnak az egészségestől eltérő állapotok felismerésében, kezelésében.

Fontosabb eredményeink:

1. Rámutattunk, hogy a menopauza különböző szakaszaiban megbetegedett emlőrákos nőknél eltérő hormonális változások figyelhetők meg. A pre- és perimenopauzában bizonyos androgén metabolitok szintjében igazolódott csökkenés. További lényeges eltérések a glükokortikoid, illetve a progeszteron metabolizmus különbségei az egyes szakaszokban.
2. A posztmenopauzás csonttritkulás esetében számos androgén metabolit szintjében igazolódott szignifikáns csökkenés alapján megállapítottuk, hogy a menopauza utáni csontvesztésben a szexuálszteroidok csontrendszerre gyakorolt hatása nemcsak az ösztrogénekkal áll összefüggésben. A kortizol és metabolitjai esetében nem várt csökkenés látszólag ellentmondásos azzal a ténnyel, hogy glükokortikoidok emelkedett szintje csonttritkulást indukálhat.
3. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy a depressziós betegeknek bekövetkező szteroid metabolizmus változásban nemi különbségek vannak. Az eltérések magyarázata lehet, hogy a hipotalamusz-agyalapimirigy-mellékvese tengely működése eltérően módosul a két nemnél, de ennek igazolása további vizsgálatokat igényel. Igazoltuk, hogy a

depressziós betegeknél a kortizol-kortizon átalakulást szabályozó 11β -HSD enzim működése nemtől függetlenül módosult, eltolódott a kortizon→kortizol átalakulás irányába.

4. Depressziós férfiak és csonttritkulásban szenvedő nőknél tapasztalt csökkent DHEA szintek felvetik a komponens terápia alkalmazásának a lehetőségét.

Látható azonban, hogy az egyes metabolitok szintjében tapasztalt hasonló változások, az egyes betegségeknél különböző tünetekkel járnak, tehát a módszer alkalmas a változások detektálására, de az egyes komponensek szerepének feltárásához és pontosításához további szövetspecifikus vizsgálatok szükségesek.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **V. Poór**, S. Juricskay, I. Szabó, K. Kett, Urinary steroids in premenopausal women with breast cancer at the time of surgery, *Chromatographia* 2002; 56: 45-148
IF 1,23
2. **V. Poór**, S. Juricskay, Á. Gáti, P. Osváth, T. Tényi, Urinary steroid metabolites and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in patients with unipolar recurrent major depression (URMD), *Journal of Affective Disorders* 2004; 81: 55-59
IF 2,703
3. **V. Poór**, A. Bufa, I. Bíró, F. Wilhelm, S. Juricskay, Examination of sex steroids in the urines of postmenopausal women with osteoporosis, *Chromatographia* 2004; 59: 1-4
IF 1,145
4. **V. Poór**, A. Bufa, I. Bíró, Szabó I., F. Wilhelm, I. Juricskay és P. Gócze, Androgén hatású szexuáliszteroidok csökkenése szerepet játszik a posztmenopauzában kialakult fokozott csontvesztésben *Oszteológiai Közlemények* 2004; 3: 155-157
5. **V. Poór**, A. Bufa, I. Bíró, E. Telegdy, T. Tényi, Á. Gáti, P. Osváth, F. Wilhelm, S. Juricskay, Urinary steroid measurement in some endocrine and psychiatric disease, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12: 763-771
IF 4,382

Az értekezés alapjául szolgáló absztraktok

1. **V. Poór**, S. Juricskay, T. Tényi, Á. Gáti, P. Osváth, Changes in the steroid metabolism in patients with major depression, 14th, European College of Neuropsychopharmacology, Isztambul, Turkey, 2001, *The journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 2001; 11(3): S343,

2. **V. Poór**, S. Juricskay, E. Telegdy, Urinary steroids in men with male-pattern alopecia, 6th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 2001
3. **V. Poór**, S. Juricskay, I. Szabó, K. Kett, Urinary steroids in premenopausal women with breast cancer at the time of surgery, Balaton Symposium on High-Performance separation methods, Siófok, Hungary, 2001
4. **V. Poór**, S. Juricskay, The role of steroid metabolism in women with breast cancer in different menopausal status, Comprehensive study, 6th International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies, Pasteur Institute, Paris, France, 2002
5. E. Telegdy, **V. Poór**, S. Juricskay, B. Farkas, Examination of urinary steroid metabolites in men with male-pattern alopecia, EHRS 2002-Hair workshop, Brussels, 2002
6. A. Bufa, I. Bíró, **V. Poór**, F. Wilhelm, S. Juricskay, Examination of Sex Steroids in the Urines of Postmenopausal Women with Osteoporosis, 5th Balaton Symposium on High-Performance separation methods, Siófok, Hungary, 2003
7. I. Bíró, **V. Poór**, A. Bufa, Á. Gáti, I. Fenyvesi, S. Juricskay, T. Tényi, Urinary steroids in young women with eating disorders, 7th International Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, Hungary, 2004
8. **V. Poór**, S. Juricskay, A. Bufa, I. Bíró, E. Telegdy, T. Tényi, Á. Gáti, P. Osváth, F. Wilhelm, Urinary steroid measurements in some endocrine and psychiatric diseases, Advances in Chromatography and Electrophoresis-Conferentia Chemometria, Budapest, Hungary, 2003
9. **V. Poór**, A. Bufa, I. Bíró, I. Szabó, F. Wilhelm, I. Juricskay, P. Gőcze, A postmenopausális osteoporosis egyik oki tényezője az androgén hatású

sexuálissteroidok csökkenése lehet, Magyar Szülészeti és Nőgyógyászati Endokrinológiai Társaság (MSzNET), Harkány, 2004

10. A. Bufa, I. Bíró, F. Wilhelm, **V. Poór**, F. Kilar, P. Gócze, Vizelet szteroid profil vizsgálatok jelentősége a posztmenopauzában. Magyar Menopauza társaság VI. Országos Kongresszusa, Siófok, 2005
11. S. Fekete, P. Osvath, V. Vörös and **V. Poor**, Urinary steroid metabolites in patients with violent suicidal and nonsuicidal depressive disorders. European Psychiatry, In Press, Corrected Proof