

# Endokrynnne uwarunkowania zmian w gruczole piersiowym

## *Endocrine aspects of breast tissue pathology*

Włodzimierz Baranowski, Jacek Doniec

*W pracy dokonano przeglądu piśmiennictwa dotyczącego działania estrogenów oraz ich pochodnych w metabolizmie tkanek sutka. Omówiono aktywność i mechanizmy regulacji aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie estrogenów w komórkach gruczołu piersiowego. Ponadto przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów receptorowych i pozareceptorowych (epigenetycznych) onkogennego działania estrogenów w gruczole piersiowym. Podkreślono te aspekty metabolizmu estrogenów, które mogą mieć praktyczne zastosowanie w klinice.*

**Słowa kluczowe:** gruczoł piersiowy, estrogeny, progestageny, rak

(Przegląd Menopauzalny 2005; 1: 10–14)

Gruczoł piersiowy pod względem budowy histologicznej i czynnościowej składa się z dwóch zasadniczych elementów tkankowych – nabłonka wydzielniczego (parenchymalnego) oraz otaczającego ten nabłonek podścieliska, zawierającego tkankę łączną, tkankę tłuszczową oraz sieć naczyń krwionośnych i limfatycznych [1].

Część wydzielnicza (parenchymalna) zawiera 2 rodzaje komórek – nabłonkowe i mioepitelialne. Komórki nabłonkowe tworzą wewnętrzną wyściółkę przewodów wyprowadzających i pęcherzyków mlecznych, produkujących mleko (galaktosynteza). Elementy mioepitelialne, leżące na zewnątrz przewodów wyprowadzających i pęcherzyków, posiadają właściwości obkurczania się i odpowiadają za pasaż mleka. Ponadto stanowią źródło produkcji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix* – ECM). Komórki podścieliska są drugim źródłem ECM [1].

Ponad 85% nowotworów złośliwych piersi u kobiet powstaje z komórek nabłonkowych przewodów wyprowadzających (raki przewodowe) i/lub nabłonka pęcherzyków (raki zrazikowe) [cyt. za 1].

W aspekcie onkologicznym ważne jest ustalenie zakresu hormonozależności gruczołu piersiowego ponieważ, z klinicznego punktu widzenia, stanowi to jeden

z najbardziej kontrowersyjnych problemów związanych ze stosowaniem hormonalnej substytucji u kobiet po menopauzie [2, 3].

Rola hormonów steroidowych w proliferacji komórek gruczołu piersiowego, mimo intensywnych badań ostatnich lat z zastosowaniem technik biologii i genetyki molekularnej pozostaje niejasna. Gruczoł piersiowy najwyższą aktywność mitotyczną wykazuje w fazie lutalnej (sekrecyjnej) cyklu płciowego, a więc przy relatywnie wysokich stężeniach estrogenów i progesteronu [4]. Wysoka aktywność mitotyczna w tej fazie cyklu płciowego jest równoważona wysoką aktywnością apoptotyczną [5].

W świetle danych literaturowych [6] wydaje się, że w gruczole piersiowym występują 2 rodzaje odpowiedzi na stymulację estrogenami:

- ▶ Stymulacja pośrednia poprzez estrogenozależne (ER-dodatnie) komórki podścieliska, które produkują czynniki wzrostowe bezpośrednio aktywujące podziały komórek nabłonkowych.
- ▶ Stymulacja bezpośrednia poprzez komórki zawierające ER $\alpha$  pobudzone niskimi stężeniami estradiolu, co stymuluje biosyntezę receptorów progesteronowych (PR) i różnicowanie się komórek nabłonkowych.

Klinika Ginekologii Wojskowego Instytutu Medycznego Ministerstwa Obrony Narodowej;  
kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Włodzimierz Baranowski



► Ponadto procesy proliferacyjne w gruczole piersiowym są regulowane przez prolaktynę, hormon wzrostu, hormony tarczycy (T3 i T4), insulinę i kortyzol. Ważną rolę regulacyjną odgrywają czynniki wzrostowe i ich receptory (głównie IGF-1 i receptory dla IGF-1) [7].

Badania, w których używano myszy z zablokowanym genem kodującym białko receptora estrogenowego typu alfa (ERKO) wykazały, że receptor estrogenowy typu beta (ER $\beta$ ), przy braku ER $\alpha$ , nie jest mediatorem stymulowanej przez estrogeny proliferacji komórek nabłonkowych. Przywrócenie ER $\alpha$  w podścielisku, ale nie w komórkach nabłonkowych, jest wystarczające do indukcji wzrostu przewodów mlecznych [8, 9]. W badaniach lokalizacji poszczególnych typów receptorów estrogenowych wykazano, że tylko nieliczne komórki ulegające podziałom wykazują obecność ER $\beta$ . Wykazano ponadto, że ponad 60% komórek proliferujących nie posiada ani ER $\alpha$ , ani ER $\beta$  [10]. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach stwierdzono, że gruczoły piersiowe u szczurów zawierają ok. 70% komórek ER $\beta$  pozytywnych niezależnie od fazy rozwojowej gruczołu. Odsetek komórek ER $\alpha$  pozytywnych zależy od stanu rozwojowego gruczołu piersiowego – w okresie pokwitania stwierdza się ok. 30% ER $\alpha$  pozytywnych komórek, w czasie ciąży odsetek ten maleje do niespełna 5, a podczas laktacji następuje indukcja biosyntezy ER $\alpha$  i jest on stwierdzany nawet w 70% komórek [10]. W czasie ciąży, a więc okresie intensywnej proliferacji komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego, stwierdza się jedynie nieliczne komórki nabłonka wykazujące jednocześnie ekspresję obu receptorów (ER $\alpha$ , jak i ER $\beta$ ). Po porodzie, w trakcie laktacji, która jest okresem niskiej proliferacji komórek sutka i okresem niewrażliwości sutka na estrogeny, odsetek komórek zawierających jednocześnie ER $\alpha$  i ER $\beta$  jest wysoki, bo sięga 60%. Ta obecność obu typów receptora estrogenowego (kolokalizacja), z jednoczesną niewrażliwością na estrogeny, jest najprawdopodobniej związana z blokowaniem przez izoformy ER $\beta$  aktywności ER $\alpha$  [11]. Trwają badania, mające na celu ustalenie czy jednoczesny pomiar ekspresji ER $\alpha$  i ER $\beta$  może przyczynić się do większej precyzji wnioskowania klinicznego u pacjentek z rakiem piersi i tłumaczyć fenomen obecności ER w komórkach ER-negatywnych. To tłumaczyłoby również zjawisko niewrażliwości na estrogeny komórek ER-pozytywnych, ponieważ w tym mechanizmie ER $\beta$  jest naturalnym blokerem aktywności ER $\alpha$ .

Stworzono również koncepcję, że w warunkach fizjologicznych komórki zawierające ER $\alpha$ , przy fizjologicznych stężeniach estradiolu, nie odpowiadają proliferacją na stymulację przez czynniki wzrostowe. Po menopauzie i dramatycznym obniżeniu się stężenia estradiolu, dochodzi do stymulacji przez ER $\alpha$ , w nieobecności estradiolu, biosyntezy receptorów dla czynników wzrostowych. Jeśli takie zjawisko zaistnieje, dochodzi do stałej aktywacji ER przez kinazę tyrozynową stymu-

lowaną czynnikami wzrostu i utraty fizjologicznej regulacji [7, 12]. W oparciu o ten mechanizm łatwo wytłumaczyć skuteczność SERM w profilaktyce i leczeniu raka gruczołu piersiowego. Wykazano, że TAM blokując ER blokuje produkcję czynników wzrostu w komórkach stromalnych, co niestety, oprócz czasowego zablokowania wzrostu nowotworu, powoduje wzrost gęstości receptorów dla czynników wzrostowych, co w dalszych etapach skutkuje wysoką wrażliwością na nawet niskie stężenia czynników wzrostowych. [13].

Obok mechanizmów receptorowych w metabolizmie gruczołu piersiowego niezwykle istotny jest stan dynamicznej równowagi pomiędzy poszczególnymi estrogenami i ich metabolitami. W prawidłowej tkance sutka przemiany estrogenów i relacje pomiędzy estrogenami uwarunkowane są aktywnością enzymatyczną dwóch zasadniczych szlaków – tak zwanym *szlakiem aromatazy i szlakiem sulfatazy*.

W tkankach sutka obecność aromatazy – enzymu katalizującego reakcję aromatyzacji androgenów (testosteronu i androstendionu) do estrogenów (odpowiednio do estradiolu i estronu) stwierdzono na poziomie mRNA i białka enzymatycznego [14].

Aktywność sulfatazy, enzymu należącego do klasy sulfataz arylowych i katalizującego odłączenie reszty siarczanowej od estrogenów, w warunkach fizjologicznych stwierdza się we frakcji mikrosomalnej i mitochondriach komórek gruczołu piersiowego. Niewykluczona jest także lokalizacja jądrowa tego enzymu. Aktywność sulfatazowa warunkuje przemianę nieaktywnego metabolicznie siarczanu estronu do wolnego estronu, który może podlegać dalszym przemianom [15].

W liniach komórkowych hormonozależnych raków sutka (MCF-7, T-47D) stwierdzono wysoką aktywność sulfataz zarówno na poziomie mRNA genu, jak i białka enzymatycznego. W liniach uznanych za hormonalnie niezależne (MDA-MB-231) obserwowano zjawisko wysokiej ekspresji genu, przy niskiej aktywności enzymatycznej, co wskazywałoby na promowany przez estrogeny mechanizm aktywacji tych enzymów na poziomie białka enzymatycznego. Potwierdzeniem hormonalnego mechanizmu regulacji aktywności sulfataz jest fakt wzrostu aktywności po homogenizacji, a więc przy uwolnieniu frakcji mikrosomalnej. Związki z grupy selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (SERM), tzw. czyste antyestrogeny oraz progestageny (pochodne 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteronu, pochodne norprogesteronu) wywierają efekt hamujący aktywność sulfatazową. Podobną aktywność hamującą sulfatazy wykazuje tibolon i jego metabolity, przy czym efekt ten jest najwyraźniejszy w hormonalnie zależnych komórkach raka sutka [15].

Wzajemne proporcje wewnątrzkomórkowe pomiędzy estronem a estradiolem w gruczole piersiowym ustala aktywność dwóch typów: typ I i typ II dehydrogenazy 17 $\beta$ -hydroksysteroidowej. W warunkach fizjo-



logicznych dominuje aktywność dehydrogenazy 17 $\beta$ -hydroksysteroidowej typu II (typ oksydacyjny – katalizuje odłączenie protonu – H<sup>+</sup> od reszty hydroksylowej w pozycji 17 z utworzeniem w tej pozycji reszty ketonowej), a więc równowaga reakcji enzymatycznej przesuwana się w kierunku biosyntezy estronu. Ta aktywność jest najwyższa w fazie sekrecyjnej cyklu płciowego, a prawdopodobnym wzmacniaczem (ang. – *enhancer*) tej reakcji jest progesteron [14–16].

W komórkach raka sutka, w relacji do aktywności enzymatycznej w prawidłowych komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego, zaobserwowano dominację (nadekspresję) drugiego typu (typ redukcyjny) dehydrogenazy 17 $\beta$ -hydroksysteroidowej (katalizuje przyłączenie protonu (H<sup>+</sup>) do grupy ketonowej w pozycji 17 i utworzenie rodnika hydroksylowego), co powoduje przesunięcie równowagi reakcji w kierunku biosyntezy estradiolu z estronu. Ta nadekspresja typu redukcyjnego dehydrogenazy jest szczególnie wysoka w hormonozależnych nowotworach sutka. W tkankach raka sutka uzyskanych od kobiet po menopauzie leczonych uprzednio progestagenami (lynestrenol) wykazano znamienne wyższą aktywność dehydrogenazy typu oksydacyjnego (typ II) w relacji do tkanek raka sutka uzyskanych od kobiet nieleczonych progestagenami. Wykazano ponadto, że aktywność tego enzymu jest zależna od statusu receptorowego komórek raka sutka (wyższa w guzach ER- i PR-dodatnich) [14, 15, 16].

W badaniach eksperymentalnych z użyciem hormonozależnych linii komórkowych (MCF-7, T-47D) zaobserwowano wyższą aktywność formy redukcyjnej (typ I) dehydrogenazy 17 $\beta$ -hydroksysteroidowej (17 $\beta$ -HSD). W linii komórek guzów hormonalnie niezależnych (MDA-MB-231, MDA-MB-468) stwierdzono dominację formy oksydacyjnej (typ II). Wydaje się wysoce prawdopodobne, że mechanizm tego zjawiska związany jest z działaniem na poziomie receptora dla progesteronu, ponieważ największą redukcję aktywności enzymatycznej 17 $\beta$ -HSD typu II stwierdzono w komórkach o wysokiej zawartości tego receptora (komórki linii T-47D). Stwierdzono ponadto, że aktywność 17 $\beta$ -HSD, niezależnie od typu, jest wyraźnie redukowana przez progestageny (szczególnie MPA i NETA), chociaż obserwowano równoczesny wzrost obu typów 17 $\beta$ -HSD pod wpływem podawania wyżej wymienionych progestagenów, szczególnie w komórkach linii MCF-7 raka sutka. Z klinicznego punktu widzenia, godny uwagi jest fakt wzrostu aktywności 17 $\beta$ -HSD typu oksydacyjnego pod wpływem metabolitu tibolonu o działaniu progestagennym. Być może jest to wytłumaczenie pozytywnego, w swojej wymowie klinicznej, braku wzrostu gęstości mammograficznej przy terapii tibolonem [15].

Wydaje się, że jednym z kluczowych elementów metabolicznych w kancerogenezie gruczołu sutkowego jest przemiana aktywnych estrogenów do nieaktyw-

nych pochodnych sprzężonych z resztą kwasu siarkowego. Związki te nie oddziałują z receptorem estrogenowym, w związku z powyższym nie wykazują aktywności metabolicznej i jako nieaktywne metabolity estrogenów mogą być usuwane z komórki. W tkankach sutka stwierdzono aktywność trzech typów sulfotransferaz. Pierwszy typ – EST (ang. – *estrogen sulfotransferase*), najbardziej specyficzny dla estrogenów, działa w nanomolowych stężeniach substratu (estrogenów), typ drugi (HST od ang. – *hydroxysteroid sulfotransferase*) i trzeci (PST od ang. – *phenol sulfotransferase*) działają dopiero przy stężeniach estrogenów rzędu mikromoli i w warunkach fizjologicznych pełnią marginalną rolę [16].

Linie komórkowe guzów hormonozależnych (MCF-7, T-47D, ZR-75-1) wykazują wyższe, w relacji do linii komórkowych guzów hormonalnie niezależnych, aktywności sulfotransferaz, ocenianych łącznie jako EST, HST i PST. Paradoksalnie jednak, w linii komórkowej MDA-MB-486, a więc w komórkach raka sutka niezależnych hormonalnie, stwierdzono również wysoką aktywność sulfotransferazową, porównywalną do aktywności tych enzymów w liniach uznanych za hormonozależne. Podsumowując można powiedzieć, że w warunkach fizjologicznych wyraźnie zaznaczona jest aktywność EST, co powoduje blokowanie proliferacji. W komórkach nowotworowych (linie komórkowe, nowotwory u kobiet) aktywność EST jest śladowa, a przeważa aktywność HST i PST, które to enzymy działają jedynie przy mikromolowych, a więc niefizjologicznych stężeniach estrogenów [14, 15].

Do chwili obecnej nie są znane molekularne mechanizmy regulacyjne aktywności sulfotransferaz (metylacja promotora genu?, regulacja ekspresji poprzez mechanizm receptorowy (ER, PR)?). Z klinicznego punktu widzenia cenną informację przynoszą opublikowane ostatnio wyniki badań, w których wykazano wzrost aktywności sulfotransferaz przy niskich stężeniach progestagenów. Wyższe stężenia tych hormonów powodują znamienne obniżenie aktywności sulfotransferaz, promując procesy proliferacyjne. Praktycznie ważną informacją jest fakt, że korzystne działanie zwiększające aktywność sulfotransferaz wywiera medrogeston oraz tibolon i jego metabolit Org30126 – dane te uzyskano w badaniach linii MCF-7 i T-47D raka sutka [14–16].

W ostatnich latach, w związku z postępami technik biologii molekularnej związanych z możliwością detekcji i ilościowej oceny stopnia uszkodzeń DNA (32P *postlabeling technique*) wiele prac poświęcono działaniom metabolitów estrogenów i ich potencjalnemu wpływowi na proces kancerogenezy w gruczole piersiowym. Jednymi z najczęściej opisywanych metabolitów estrogenów są pochodne katecholowe w postaci tzw. katecholesterogenów. Katecholesterogeny (CE) powstają w wyniku reakcji utleniania katalizowanej



przez enzymy z klasy oksydoreduktaz, w których funkcje koenzymu pełnią różne formy cytochromu P450. W zależności od cytochromu reakcja może prowadzić do powstania 2-hydroksypochodnych: 2-hydroksyestradiolu (2-OHE2) i 2-hydroksyestronu (2-OHE1) lub 4-hydroksypochodnych: 4-hydroksyestradiolu (4-OHE2) i 4-hydroksyestronu (4-OHE1) [17]. Pochodne 2-hydroksy powstają przy udziale cytochromu P450 1A1 lub P450 1A2, a ich głównym miejscem wytwarzania jest wątroba. W dalszej drodze metabolicznej ulegają kolejnym reakcjom utleniania do semichinonów i chinonów. Te ostatnie przy udziale transferazy glutationowej mogą być sprzężane z glutationem, tworząc nieaktywne pochodne lub łączą się silnym wiązaniem typu kowalencyjnego z zasadami purynowymi, najczęściej z guaniną, rzadziej z adeniną, tworząc tzw. stabilne addukty DNA. W opinii większości autorów ta ścieżka metaboliczna nie stanowi większego zagrożenia onkologicznego, ponieważ stabilne addukty DNA są łatwo rozpoznawalne przez systemy naprawy DNA i sprawnie usuwane [18].

Pochodne 4-hydroksy powstają przy udziale cytochromu P450 3A4 i P450 1B1, a ich głównym miejscem wytwarzania są narządy estrogenozależne (endometrium, gruczoł piersiowy, jajnik). Dalszy metabolizm tych związków prowadzi do powstania wysoce re-

aktywnych chinonów, które reagując z DNA wytwarzają również addukty, ale mało stabilne, które przy procesie usuwania z DNA zabierają ze sobą zasady (adeninę i guaninę), prowadząc do depurinizacji DNA, co w konsekwencji powoduje mutacje z możliwymi konsekwencjami onkologicznymi. Enzymem chroniącym przed nadmiernym wytwarzaniem pochodnych 4-hydroksy jest katecholo-O-metylotransferaza (COMT), katalizująca przyłączenie grupy metylowej do grupy hydroksylowej w pozycji czwartej. W tkance nowotworowej aktywność tego enzymu jest znacznie niższa [17, 18].

Innym metabolitem estrogenów o potencjalnym wpływie onkogennym jest produkt utleniania (przy udziale cytochromu P450 3A4) w postaci 16 $\alpha$ -hydroksyestradiolu lub 16 $\alpha$ -hydroksyestronu. Związki te wykazują wysoki potencjał pobudzający proliferację komórek ER-pozytywnych, głównie poprzez mechanizm receptorowy [18].

W badaniach epidemiologicznych stwierdzono, że iloraz stężeń 2-OH pochodnych do 16 $\alpha$ -hydroksypochodnych może stanowić wartościowy test, wykazujący predyspozycje do zachorowania na raka sutka. Wysokie wartości tego ilorazu (wykazujące przewagę 2-OH pochodnych) wskazują na mniejsze ryzyko zachorowania na raka piersi [18].

### Summary

*Physiology and pathology of breast tissues are reviewed in term of hormonal regulation. The breast tissue enzymes activity and its regulation mechanism(s) – so called "the intracrine concept" – are discussed. Additionally, the state of the art of the receptor mechanisms as well as epigenetic action of estrogen metabolites like catecholestrogens and its metabolites (2-hydroxy-, 4-hydroxy-, 16 $\alpha$ -hydroxy-derivatives) with potential carcinogenic action is described. Data on perspectives of specific estrogen metabolites for clinical application and for epidemiological (screening) tests are also presented.*

*Key words: breast, estrogens, progestagens, cancer*

### Piśmiennictwo

1. Nandi S, Guzman R, Yang J. *Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3650-7.
2. Million Women Study Collaborators, *Breast cancer and hormonal-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet 2003; 362: 419-27.
3. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA 2002; 288: 321-33.
4. Longacre TA, Bartow SA. *A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle*. Am J Surg Pathol 1986; 10: 382-93.
5. Gompel A, Chaouat M, Hugol D, et al. *Steroid hormones and proliferation, differentiation and apoptosis in breast cells*. Maturitas 2004; 49: 16-24.
6. Wiesen JF, Young P, Werb Z, et al. *Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development*. Development 1999; 126: 335-44.
7. Foidart JM, Masson V, Goffin F, et al. *Interaction of epithelial, endothelial and stromal cells during growth invasion and metastasis of breast tumors*. In: Menopause. The state of the art in research and management. Ed. H. P. G. Schneider, Parthenon 2003, 52-7.



8. Couse JF, Korach KS. *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocrinol Rev 1999; 20: 358-417.
9. Cunha GR, Young P, Hom YK, et al. *Elucidation of the role of stromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development by tissue recombination experiments.* J Mammary Gland Biol Neoplasia 1997; 2: 393-402.
10. Saji S, Jensen EV, Nilsson S, et al. *Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland.* Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 337-42.
11. Saji S, Sakaguchi H, Andersson S, et al. *Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland.* Endocrinology 2001; 142: 3177-3186.
12. Marsh SK, Bansal GS, Zammit C, et al. *Increased expression of fibroblast growth factor 8 in human breast cancer.* Oncogene 1999; 18: 1053-60.
13. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. *Mechanisms of estrogen action.* Physiol Rev 2001; 4: 1535-64.
14. Pasqualini JR, Chetrite GS. *Progesterone and progestins: risk or protection.* In: *Menopause. The state of the art in research and management.* Ed. H. P. G. Schneider, Parthenon 2003, 65-71.
15. Pasqualini JR. *Differential effects of progestins on breast tissue enzymes.* Maturitas 2003; 46 suppl 1: 45-54.
16. Pasqualini JR, Ebert C, Chetrite GS. *The SEEM: Selective Estrogen Enzyme Modulators in breast cancer.* Gynecol Endocrinol 1999; 13 suppl. 6: 1-8.
17. Service RF. *New role for estrogen in cancer.* Science 1998; 279: 1631-1633.
18. Cavalieri E, Frenkel K, Liehr J, et al. *Estrogens as endogenous genotoxic agents – DNA adducts and mutations.* J Natl Cancer Instit Monographs 2000; 27: 75-93.

## Adres do korespondencji

prof. dr hab. med. **Włodzimierz Baranowski**  
Klinika Ginekologii  
Wojskowego Instytutu Medycznego  
Ministerstwa Obrony Narodowej  
ul. Szaserów 128  
00-909 Warszawa  
e-mail: wbaranowski@yahoo.com

