

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJA HORVAT

**DOLOČANJE RAZMERJA 2-HIDROKSI/16 α -HIDROKSI ESTROGENOV V URINU
PRI KARCINOMU JAJČNIKA IN ENDOMETRIJA**

**DETERMINATION OF URINARY RATIO OF
2-HYDROXY/16 α -HYDROXY ESTROGENS IN OVARIAN AND ENDOMETRIAL
CARCINOMA**

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala pod vodstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Meritve so bile opravljene na Ginekološki kliniki v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. za mentorstvo. Hvala za napotke in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi dr. Ireni Mlinarič Raščan, mag. farm. in dr. Juriju Trontlju, mag. farm. za koristne nasvete po pregledu diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi mojim domačim, še posebej očetu, za podporo in finančno pomoč pri študiju. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku moje diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

Ljubljana, september 2010

Darja Horvat

Predsednica diplomske komisije: dr. Irena Mlinarič Raščan, mag. farm.

Član diplomske komisije: dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD	1
1.1 HORMONSKE SPREMEMBE	1
1.1.1 Mehanizem nastanka raka	1
1.1.2 Rak endometrija	2
1.1.2.1 Tipi raka endometrija.....	2
1.1.2.2 Klasifikacija raka endometrija.....	3
1.1.2.3 Dejavniki tveganja in zaščite.....	4
1.1.2.4 Klinična slika in diagnostika.....	5
1.1.2.5 Zdravljenje	6
1.1.3 Rak jajčnika.....	6
1.1.3.1 Tipi epiteljskih tumorjev jajčnikov	6
1.1.3.2 Klasifikacija raka jajčnika	7
1.1.3.3 Dejavniki tveganja in zaščite.....	8
1.1.3.4 Klinična slika in diagnostika.....	9
1.1.3.5 Zdravljenje	10
1.2 STEROIDNI HORMONI	10
1.2.1 Hormoni nadledvičnice	10
1.2.2 Spolni hormoni	10
1.2.3 Steroidogeneza	11
1.3 ESTROGENI HORMONI	13
1.3.1 Vrste estrogenov.....	13
1.3.1.1 Estriol.....	13
1.3.1.2 Estradiol.....	14
1.3.1.3 Estron	15
1.3.2 Presnova estrogena in klinični pomen.....	15
1.3.3 Prenos hormonov po krvi	17
1.3.4 Mehanizem prenosa signala	18

1.3.5 Estrogenski receptorji.....	19
1.3.6 Izločanje steroidnih hormonov z urinom.....	20
1.4 DOLOČANJE ESTROGENOV Z GC-MS.....	20
2. NAMEN DELA.....	22
3. EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1 OPIS PREISKOVANK.....	23
3.2 METODA ELISA	23
3.2.1 Princip metode.....	24
3.2.2 Reagenti in pribor.....	25
3.2.3 Priprava raztopin	26
3.2.4 Postopek na mikrotitrski plošči	27
3.2.5 Lastnosti testa.....	27
3.3 JAFFEJEVA METODA	28
3.4 KEMILUMINISCENČNA METODA.....	28
3.5 STATISTIČNE METODE.....	28
4. REZULTATI	30
5. RAZPRAVA	40
6. SKLEP.....	44
7. LITERATURA	45

POVZETEK

Karcinoma jajčnika in endometrija sta od hormonov odvisni obliki raka. V primeru, da se hormonsko ravnovesje poruši in se poveča koncentracija estrogenov v telesu, prihaja do večjega števila delitev celic in večje možnosti za nastanek naključnih napak in razvoj malignega obolenja. V primeru malignih procesov ovarija in endometrija pride do spremembe v deležu izločanja posameznih frakcij estrogenov.

2-hidroksiestron ima anti-estrogenski učinek, zato ga imenujemo »dober« estrogen. Deluje kot antioksidant in je pomemben za odpravo poškodovanih in rakavih celic, saj zavira proliferacijo celic. 16 α -hidroksiestron pa slabo vpliva na naš organizem in spodbuja razvoj raka. Sposoben je kovalentne vezave z receptorjem estrogena, histoni in DNA. Visoke vrednosti 16 α -hidroksiestrona ob nižjih vrednostih 2-hidroksiestrona so vzrok za nastanek od hormonov odvisnih oblik raka.

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali se izločanje različnih frakcij estrogenov razlikuje glede na vrsto raka, koliko preiskovank odstopa od referenčnih vrednosti za estrogene in, ali lahko glede na vrednosti različnih frakcij estrogenov ločimo karcinom jajčnika oz. endometrija od benignih sprememb.

V raziskavo smo vključili 44 preiskovank, ki smo jim izmerili vrednosti 2-hidroksiestrona, 16 α -hidroksiestrona, razmerja 2-hidroksi/16 α -hidroksi estrogenov in vrednost kreatinina v urinu ter karcinomskega antigena 125 v serumu.

Ugotovili smo, da imajo preiskovanke s karcinomom ovarija v primerjavi s preiskovankami s karcinomom endometrija višje vrednosti razmerja 2-hidroksi/16 α -hidroksi estrogenov in nižje povprečje koncentracij 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona. 75% vseh preiskovank (z benignimi in malignimi obolenji) je imelo znižane vrednosti razmerja 2-hidroksi/16 α -hidroksi estrogenov.

Povzamemo lahko, da je določanje razmerja 2-hidroksi/16 α -hidroksi estrogenov potencialno dobra diagnostična metoda za razlikovanje karcinoma endometrija in ovarija. Nizke vrednosti razmerja (pod 2) so povezane z rakom in povečanim tveganjem za njegov razvoj.

Statistično nismo mogli dokazati razlik v razmerju estrogenov in drugih parametrov med skupinama preiskovank s karcinomom jajčnika in karcinomom endometrija; omenjenih razlik prav tako nismo mogli dokazati med skupinama preiskovank s karcinomom jajčnika in endometrija in tistimi brez karcinoma.

ABSTRACT

Ovarian and endometrial carcinoma are hormones dependent forms of cancer. In case of hormone imbalance and subsequently estrogens concentration in the body is increased, that may lead to increased cell division and higher chance to malignant disease development. In case of malignant processes of ovarium and endometrium, alterations in excretion portion of individual estrogens fractions occur.

2-hydroxyestrone has an anti-estrogene effect, therefore it is also called a »good« estrogene. It acts as an antioxydative agent and it is responsible for elimination of damaged as well as cancerous cells, because it prevent cell proliferation. Moreover, it also effects as estradiol stimulator, i.e. it inhibits proliferation of cancerous cells. On the other hand, 16 α -hydroxyestrone has negative impact on human body and can cause cancerous diseases. It is capable to form covalent bond with estrogen receptors, as well as with histones and DNA. Thus, high values of 16 α -hydroxyestrone alongside with low values of 2-hydroxyestrone can cause hormone dependent forms of carcinoma.

In our investigation, we wanted to find out, if excretion of different estrogen fractions depends on type of cancer, the number of patients with pathological values, and finally , if we can discriminate between malignant and benignant signs on basis of different estrogene fractions values.

In investigation 44 patients were tested and their values of 2-hydroxyestrone, 16 α -hydroxyestrone, the 2-hydroxy/16 α -hydroxy estrogene ratios were measured. In addition values of creatinine in urine as well as concentration of carcinom antigen 125 in serum were also analysed.

We determined that patients with ovarium carcinoma show higher values of 2-hydroxy/16 α -hydroxy estrogene ratios and lower average of concentration of 16 α -hydroxyestrone and 2-hydroxyestrone in comparison to endometrium carcinoma patients. 75% of all patients (with benignant and malignant diseases) had decreased values of ratio 2-hydroxy/16 α -hydroxy estrogene.

We conclude that measurement of 2-hydroxy/16 α -hydroxy estrogene ratio can potentially be a good diagnostic approach for ovarian and endometrial carcinoma determination.

Lower values of this ratio (under 2) can be connected with cancer or higher risks to undergo cancerous disease.

We weren't able to prove significant differences in estrogene ratios as well as other parameters between ovarian carcinoma patients and endometrium carcinoma patients.

Moreover we couldn't prove differences between groups of patients suffering from carcinoma and ones without the disease.

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava normalnega endometrija z endometrioidnim adenokarcinomom.....	4
Slika 2: Primerjava epitela normalnega jajčnika z adenokarcinomom jajčnika.....	7
Slika 3: Steroidogeneza.....	12
Slika 4: Strukturna formula estriola	13
Slika 5: Strukturna formula estradiola	14
Slika 6: Strukturna formula estrona	15
Slika 7: Shematski prikaz presnove estrogena	16
Slika 8: Mehanizem prenosa signala.....	18
Slika 9: Prikaz strukturnih domen molekule jedrnega receptorja	19
Slika 10: Plinski kromatograf s kapilarno kolono.....	21
Slika 11: Princip metode ELISA.....	24
Slika 12: Odvisnost intenzivnosti barve od koncentracije analita.....	24
Slika 13: Multikanalna pipeta	25
Slika 14: Razporeditev raztopin na mikrotitrski plošči	26
Slika 15: Grafični prikaz razlike povprečnih vrednosti koncentracij estrogenov med preiskovankami s karcinomom endometrija in jajčnika.....	34
Slika 16: Grafični prikaz razlike povprečnih vrednosti koncentracij estrogenov pri skupini preiskovank s karcinomom jajčnika in endometrija in skupini z benignimi spremembami	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: FIGO klasifikacija tumorjev endometrija	4
Preglednica II: FIGO klasifikacija tumorjev jajčnika	8
Preglednica III: Rezultati meritev koncentracij estrogenov, CA-125 in kreatinina pri bolnicah s karcinomom ovarijske ali karcinomom endometrija	30
Preglednica IV: Rezultati meritev koncentracij estrogenov, CA-125 in kreatinina pri preiskovankah z nerakavimi obolenji ovarijske ali endometrija.....	32
Preglednica V: Povprečne vrednosti koncentracij estrogenov preiskovank s karcinomom endometrijske in ovarijske	33
Preglednica VI: Število preiskovank, ki odstopajo od referenčnih vrednosti za estrogene ter njihov odstotek glede na število vseh preiskovank.....	34
Preglednica VII: Povprečne vrednosti koncentracij različnih parametrov preiskovank s karcinomom in preiskovank z benignimi obolenji jajčnika ali endometrija.....	35
Preglednica VIII: Rezultati izračunov statističnih parametrov za koncentracije estrogenov pri preiskovankah s karcinomom in brez karcinoma.....	36
Preglednica IX: Rezultati izračunov statističnih parametrov za koncentracije kreatinina pri preiskovankah s karcinomom in brez karcinoma.....	37
Preglednica X: Rezultati izračunov statističnih parametrov za koncentracije karcinomskega antigena 125 pri preiskovankah s karcinomom in brez karcinoma	38
Preglednica XI: Primerjava izračunanih t vrednosti s tabelarnimi vrednostmi.....	39

SEZNAM OKRAJŠAV

Ag	antigen
Ag*Pt	kompleks antigen-protitelo
AP	alkalna fosfataza
CA 125	karcinomski antigen 125
CT	računalniška tomografija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E1	estron
E2	estradiol
E2/E16	razmerje 2-hidroksiestron/16alfa-hidroksiestron
E3	estriol
EIC	intraepitelijski karcinom endometrija
ELISA	encimsko imunski test na trdem nosilcu
ERα	estrogenski receptor alfa
ERβ	estrogenski receptor beta
FIGO	Mednarodna organizacija za ginekologijo in porodništvo
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GC	plinska kromatografija
GC-MS	plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo
HRE	od hormonov odzivna regija
LH	luteinizirajoči hormon
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MSD	masno spektrometrični detektor
n	število preiskovank
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
Pt	protitelo
pNpp	para - nitrofenil fosfat
RNA	ribonukleinska kislina
SBP	protein, ki se veže na spolne steroide
SD	standardna deviacija
SHBG	glikoprotein, ki se veže na spolne hormone
SSBG	globulin, ki se veže na spolne steroide
StAR	steroidogeni akutni regulatorni protein

t	Studentova t-porazdelitev
TeBG	globulin, ki se veže na testosteron in estrogen
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina
\bar{x}	povprečna vrednost
2-OHE1	2-hidroksiestron
2-OHE2	2-hidroksiestradiol
2-MeOHE1	2-metoksiestron
2-MeOHE2	2-metoksiestradiol
4-OHE1	4-hidroksiestron
15α-OHE1	15alfa-hidroksiestron
16α-OHE1, 16α -E1	16alfa-hidroksiestron

1. UVOD

1.1 HORMONSKESPREMEMBE

Endokrini sistem je kompleksna skupina žlez in drugih struktur, ki v kri izločajo hormone in vplivajo na metabolizem in druge procese v organizmu. Okvare in patološke spremembe lahko povzročijo hormonsko neravnovesje, ki slabo vpliva na zdravje in lahko vodi do raka. Najpogostejši od hormonov odvisni obliki raka na rodilih sta rak endometrija in rak jajčnikov.

V zadnjih treh desetletjih se je pogostost rakavih obolenj po vsem svetu podvojila. Med glavne vzroke za povečanje števila obolelih spadajo staranje svetovne populacije, moderen način življenja in škodljivi vplivi okolja. V svetu zbolijo za rakom letno več kot 12 milijonov ljudi, okrog 7,6 milijonov jih zaradi te bolezni tudi umre (1).

V Sloveniji je rak kot vzrok smrti na drugem mestu, takoj za boleznimi srca in ožilja. Letno za njim zbolijo več kot 10 000 prebivalcev, umre pa jih okrog 6 000 (1). Ženske najpogosteje zbole vajo za rakom dojke, rak materničnega telesa je po pogostosti na petem mestu, rak jajčnika pa na devetem.

1.1.1 Mehanizem nastanka raka

Skozi življenje poteče v človeškem telesu več tisoč bilijonov celičnih delitev, zato lahko pride pri kopiranju dednega materiala do spontanih mutacij. Vsaka celica ima kontrolni sistem celičnega cikla, ki je odgovoren za pravilno podvajanje dednega materiala. V primeru, da sistem ne zazna ali ne uspe odpraviti napake, lahko celica sproži programirano celično smrt.

Kljub učinkovitemu nadzornemu sistemu lahko pride do napak. Lahko se vgradi napačen nukleotid (točkovna mutacija), nukleotid se ne vgradi (delecija) ali pa se vgradi dodaten nukleotid (insercija). Mutacije imajo posledice za to celico, lahko pa tudi za prihodnje generacije, saj se takšna napaka lahko prenaša naprej.

Rak je maligna novotvorba, za katero je značilna nenadzorovana delitev celic. Rakasta celica nastane iz normalne celice po spremembi ali poškodbi določenih genov.

Rast in razmnoževanje zdravih celic sta v telesu nadzirana, pri raku pa nadzorni mehanizmi odpovejo, kar privede do nekontrolirane rasti celic. Zaradi nenadzorovane delitve se rakaste celice pogosto razširijo v sosednja tkiva, lahko pa preko krvnih in limfnih žil metastazirajo tudi v oddaljene organe.

Uravnavanje biološke aktivnosti estrogenov in progesteronov poteka na nivoju receptorjev, pa tudi na predreceptorskem nivoju s pomočjo encimov.

V primeru, da se hormonsko ravnotežje poruši in se poveča koncentracija estrogenov v tkivu in s tem tudi njihovo delovanje, prihaja zaradi večje proliferacije do povečanja možnosti naključnih genetskih napak. Tako stanje lahko vodi do hiperplazije endometrija ter raka endometrija in jajčnika. Zaradi povečane koncentracije estrogenov nastaja več metabolitov estrona, ki lahko poškodujejo DNA. Kateholi, ki nastanejo iz estradiola s pomočjo citokromov P450, lahko prav tako poškodujejo DNA in vplivajo na nastanek raka endometrija in jajčnikov. Visoka koncentracija estrogenov v tkivu lahko sproži nastanek raka prek dveh mehanizmov, prek direktnih poškodb DNA z metabolnimi produkti estrogenov ter delovanjem kateholov in s stimulacijo proliferacije (2).

1.1.2 Rak endometrija

Rak endometrija je hormonsko odvisen tumor, odločilno vlogo pri njegovem nastanku imajo estrogeni, tako endogeni kot umetno vneseni v organizem.

Rak endometrija je najpogostejši maligni tumor ženskega genitalnega trakta v razvitem svetu ter četrto najpogostejše maligno obolenje pri ženskah na splošno. Pojavnost je najpogostejša pri ženskah po menopavzi. V letih 1999–2003 je bilo v Sloveniji odkritih 27,5 primerov na 100 000 žensk (3).

1.1.2.1 Tipi raka endometrija

Približno 10 % raka endometrija je dedno pogojenega, večja verjetnost je, da se taka oblika raka pojavi v zgodnejši dobi, najpogosteje v povezavi z dedno obliko nepolipoznega raka debelega črevesa, pri katerem se pojavijo nepravilnosti v genih za popravljanje neujemanja DNA baznih parov v zarodni liniji.

Večina primerov raka endometrija (90 %) je sporadičnih in te lahko razdelimo na podlagi klinično-patoloških in molekularnih karakteristik v dve kategoriji.

V prvo skupino spadajo od estrogenov odvisni primeri raka endometrija (tip I), ki se pojavijo pri mlajših in močnejših ženskah ter ženskah brez otrok v pre- in po- menopavzni dobi. Morfološko gledano je večina tumorjev iz te skupine endometrioidnih adenokarcinomov, ki se razvijejo preko kompleksnih hiperplazij endometrija. Atipična hiperplazija endometrija je nedvomno prekursor večine endometrioidnih karcinomov. Ta tip tumorjev lahko po FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) sistemu razdelimo v več razredov glede na stopnjo diferenciacije. Tumorji tipa I imajo dobro prognozo. Mednje spada 80 % vseh sporadičnih primerov raka endometrija.

20% vseh sporadičnih primerov raka endometrija označujemo kot tip II. To je od estrogenov neodvisni tip, ki se razvije v atrofičnem endometriju, večinoma iz razločnih lezij, metaplazij, označenih kot intraepitelijski karcinom endometrija (EIC). Pojavlja se v morfološko značilni obliki seroznega, papilarnega in svetlo-celičnega adenokarcinoma. Za te primere raka endometrija je značilna slabša diferenciacija z več kot 50 % slabše diferenciranih predelov. Ta oblika raka je agresivna in se pogosto vrašča v miometrij ter se razširja v peritonealne metastaze. Tip II tumorjev ima slabšo prognozo. Zadnje študije pa nakazujejo, da naj bi bil tudi rak endometrija tipa II odvisen od estrogenov (2).

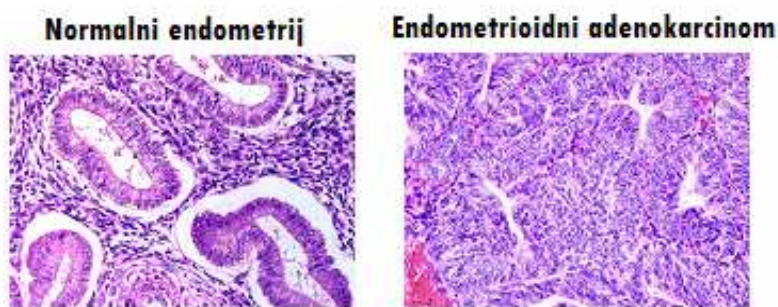
1.1.2.2 Klasifikacija raka endometrija

Histološka klasifikacija

Endometrioidni adenokarcinomi (tip I)

Drugi adenokarcinomi (tip II):

- serozni karcinom
- svetlo-celični karcinom
- nediferencirani karcinom
- drobnocelični karcinom
- mešani karcinom
- mukozni karcinom
- prehodno-celični karcinom
- skvamozno-celični karcinom



Slika 1: Primerjava normalnega endometrija z endometrioidnim adenokarcinomom

Preglednica I: FIGO klasifikacija tumorjev endometrija

STADIJ I	Ia – tumor omejen na endometrij Ib – tumor zajema manj debeline mioometrija Ic – tumor zajema več debeline mioometrija
STADIJ II	IIa – tumor zajema cervikalne žleze IIb – tumor prodira v cervikalno stromo
STADIJ III	IIIa – tumor zajema serozo uterusa, adneксе, pozitivna peritonealna citologija IIIb – tumor metastazira v vagino IIIc – metastaze v medeničnih, paraaortnih bezgavkah
STADIJ IV	IVa – invazija (vdor mikroorganizmov) v sluznico mehurja in rektuma IVb – oddaljene metastaze ali razširitev bolezni v abdomnu zunaj male medenice v ingvinalne bezgavke

1.1.2.3 Dejavniki tveganja in zaščite

Večina dejavnikov tveganja je posredno ali neposredno povezana s prekomerno količino ali izpostavljenostjo estrogenom, zaščitni dejavniki pa so vsi tisti, ki v splošnem zmanjšujejo vplive estrogenov (2).

Med dejavnike tveganja sodita pozna menopavza, zgodnja prva menstruacija in ne-rodnost, saj je pri vseh teh dejavnikih večje skupno število menstrualnih ciklusov.

Nadomestna estrogenska terapija brez dodatka progesterona sodi med eksogene dejavnike tveganja. Večje tveganje za nastanek raka obstaja pri posameznikih iz družin, kjer so te oblike raka že diagnosticirali.

Dejavnik tveganja pred in po menopavzi je tudi debelost. Pred menopavzo je tveganje povezano z večjim številom anovulatornih ciklusov in nezadostnim delovanjem progesterona. Po menopavzi je tveganje večje, ker aromataza v maščobnem tkivu pretvarja androstendion v estron, ki se nato pretvori v aktivnejši estradiol. Debelejše ženske imajo zmanjšano kapaciteto globulina, ki veže spolne hormone (SHBG), zato se pojavlja višek prostega estradiola. Tudi diabetes, v povezavi z debelostjo, se povezuje z rakom endometrija. Med zaščitne dejavnike sodi kajenje, ki vpliva na zgodnejšo menopavzo in pospešuje metabolizem v jetrih in s tem znižuje raven estrogena.

Kombinirana kontracepcija na podlagi estrogenov in progesteronov prav tako zmanjša tveganje za nastanek raka endometrija. S fizično aktivnostjo se vzdržuje telesna teža, s čimer se zmanjša število ovulatornih ciklov in s tem izpostavljenost estrogenom. Tudi s številom nosečnosti se zmanjša skupno število ovulatornih ciklov, zato obstaja obratno sorazmerje med številom nosečnosti ter tveganjem za nastanek raka endometrija.

1.1.2.4 Klinična slika in diagnostika

Rak endometrija na začetku poteka brez simptomov, pogost in dokaj zgoden simptom je neredna vaginalna krvavitev. Po napredovanju bolezni in razširitvi raka na okoliške organe nastopijo bolečine v spodnjem delu trebuha, težave z odvajanjem blata in vode ter povečanje maternice.

Pri diagnostiki je pomemben ginekološki pregled, pri katerem se odvzame tudi bris po Papanikolaou za citološki pregled. Pomembna je tudi preiskava s tipanjem, imenovana palpacija, s katero ginekolog oceni velikost maternice in otipa jajčnike ter parametrij. Z vaginalnim ultrazvokom ginekolog pregleda debelino sluznice v maternični votlini, velikost maternice in jajčnikov. Razširjenost raka po telesu lahko ugotovimo z rentgenom pljuč, skeleta in scintigrafijo, razširjenost po medenici pa z ultrazvokom trebuha in retroperitoneja.

1.1.2.5 Zdravljenje

Zdravljenje je odvisno od tega, s kakšno obliko in stopnjo razvoja raka endometrija imamo opraviti. Glede na klinično-patološke karakteristike lahko rak endometrija, ki se še ni vrasel v miometrij maternice, razvrstimo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo primere z nizkim tveganjem (dobro diferencirani endometrioidni karcinomi), v drugo skupino pa visoko-rizične primere raka endometrija (zmerno ali slabše diferencirani endometrioidni karcinomi).

Najprimernejša načina zdravljenja za rakave primere, ki sodijo v prvo skupino, sta operacija in progestinska terapija. Pri dobro diferenciranih endometrioidnih karcinomih prve skupine se pogosto izražajo progesteronski receptorji. Progestin z vezavo na te receptorje zavira rast celic, saj uravnava količino estrogenskih receptorjev ter povečuje metabolizem steroidnih hormonov. Visoko-rizični primeri raka endometrija iz druge skupine zahtevajo histerektomijo s postoperativno kemoterapijo. Za zdravljenje takih primerov se uporablja tudi radioterapija (2).

1.1.3 Rak jajčnika

Rak jajčnika je maligno obolenje enega ali obeh jajčnikov. Gre za maligne tumorje, ki so primarno maligni (epitelni, stromalni in tumor zarodnih celic) ali sekundarni maligni (so posledica zasevanja malignomov endometrija, gastrointestinalnih tumorjev, raka dojk). Nastopajo v obliki masivnih bul, ki so lahko votlo cistične. Rak enega jajčnika lahko zelo zgodaj zajame tudi drugi jajčnik in razmeroma hitro metastazira po trebušni votlini (4).

Leta 2005 je v Sloveniji za rakom jajčnikov zbolelo 176 žensk, umrlo pa 126. Visoka umrljivost je predvsem posledica velikega deleža napredovalih primerov v času postavitve diagnoze (5).

1.1.3.1 Tipi epiteljskih tumorjev jajčnikov

Epiteljske ovarijske tumorje razvrščamo po histoloških značilnostih v sedem osnovnih razredov. Med histološkimi vrstami fiziološko ni bistvenih razlik. Tumor razdelimo v določen histološki razred glede na celični tip, lokacijo in naravo malignosti.

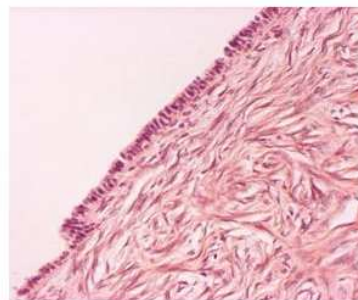
Glede na naravo malignosti ločimo tri vrste tumorjev: benigne, mejno maligne in maligne (invazivne karcinome) (4).

1.1.3.2 Klasifikacija raka jajčnika

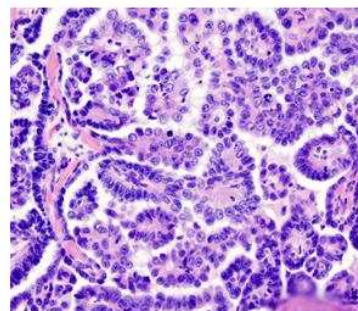
Histološka klasifikacija

1. Serozni cistomi in karcinomi
2. Mucinozni cistomi in karcinomi
3. Endometroidni tumorji
4. Svetlocelični tumorji
5. Nediferencirani karcinomi
6. Mešani epiteljski tumorji
7. Neklasificirani tumorji

Najpogosteje rak vznikne v epitelnem delu jajčnika, redkeje pa v germinativnem ali stromalnem tkivu. Germinalni ovarijski tumorji predstavljajo skoraj petino ovarijskih tumorjev in so večinoma benigni. Med germinalne tumorje spadajo teratomi, disgerminomi, tumor rumenjake vrečke in horiokarcinom.



Epitelij normalnega jajčnika



Adenokarcinom jajčnika

Slika 2: Primerjava epitela normalnega jajčnika z adenokarcinomom jajčnika

Stromalni tumorji so neepitelijski ovarijski tumorji in izločajo spolne hormone. Mednje sodijo tekomi in androblastomi, ki lahko s sekrecijo estrogenov povzročajo spremembo sekundarnih spolnih znakov, ter granulocelularni tumorji. Slednji izločajo velike količine estrogenov in lahko povzročijo hiperplazijo in karcinom endometrija, ter cistično bolezen dojk.

Klasifikacija FIGO

Pri raku jajčnika uporabljamo za določanje stadija bolezni kirurško klasifikacijo FIGO.

Preglednica II: FIGO klasifikacija tumorjev jajčnika

Stadij I	maligni tumor enega ali obeh jajčnikov
Stadij II	maligni tumor jajčnikov z vraščanjem v organe male medenice
Stadij III	maligni tumor jajčnikov z razraščanjem zunaj male medenice
Stadij IV	maligni tumor jajčnikov z oddaljenimi metastazami

1.1.3.3 Dejavniki tveganja in zaščite

Obstaja veliko teorij o vzrokih za razvoj raka jajčnikov. Pogosteje se pojavlja pri starejših ženskah in pri ženskah, ki niso imele otrok. Redkejši pa je pri ženskah, ki so več let jemale oralne kontraceptive ali prejemale hormonsko nadomestno zdravljenje.

Prav tako je redkejši pri ženskah, ki so pozno dobile prvo menstruacijo ali zgodaj prešle v menopavzo (6). Tveganje povečujeta ne-rodnost in neplodnost. Tveganje za mejno maligne in visoko maligne tumorje naj bi bilo do 6,5- krat večje pri neplodnih ženskah. Številne ovulacije so vzročni faktor za razvoj epiteljskega raka jajčnika. Zvišani gonadotropini so neposredno ali posredno preko steroidnih hormonov povezani z razvojem novotvorb jajčnika. Epitelij jajčnika je zaradi ovulacije ciklično poškodovan. Večina rakov nastane iz epitelijskega, predvsem iz celic, ki so citološko in histološko podobne peritonealnim. Estrogeni, ki stimulirajo epitelij, so stromalnega izvora, njihova proizvodnja pa je odvisna od koncentracije gonadotropinov (4).

Po eni od teorij jajčnika med nosečnostjo nekako počivata, saj ne prihaja do ovulacije. Podobno naj bi učinkovali oralni kontraceptivi, ki prav tako zavirajo ovulacijo. Pomembni so tudi dedni dejavniki, saj se občasno rak jajčnikov pojavlja v družinah (6).

Dedni dejavniki povzročajo od 5-13% rakov jajčnika, vsaj 90-95% žensk pa bi naj imelo sporadično obliko raka. Pri zaščitnih dejavnikih iz okolja je pomembna predvsem zdrava prehrana z malo maščob.

1.1.3.4 Klinična slika in diagnostika

Med ginekološkimi raki povzroča rak jajčnikov najmanj očitne in prepoznavne znake, zato ga je težko odkriti v zgodnejšem stadiju.

Najpogostejši znaki zgodnje bolezni so: nejasne bolečine v trebuhu, predvsem v spodnji polovici trebuha, težave pri odvajanju seča in blata ter nehotno uhajanje seča. Nemalokrat so v ospredju težave, ki na videz z bolezenskimi spremembami jajčnikov nimajo nič skupnega. To so težave pri odvajanju blata, meteorizem črevesa, bolečine nad popkom, predvsem v predelu želodca in bolečine po zaužitju hrane. Bolj značilni so žal znaki že napredovane bolezni, in sicer nenadno in občutno povečanje obsega trebuha, pomanjkanje apetita, slabost, bruhanje, zaprtje, hujšanje in otežkočeno dihanje (7).

Pri določanju diagnoze je pomembna anamneza, natančen splošni pregled, vaginalni in rektalni ginekološki pregled, ultrazvok abdomna, vaginalni ultrazvok, priporočljiva je tudi računalniška tomografija (CT) abdomna. Nujne so hematološke in biokemične preiskave krvi in določitev vrednosti tumorskega označevalca CA-125 (4).

Tumorski označevalci so molekule, ki jih izločajo celice malignih tumorjev določene vrste. Najpogosteje jih v povišanih koncentracijah odkrijemo v krvi in urinu, lahko pa tudi v samem tumorju in drugih tkivih. Karcinomski antigen 125 ali krajše CA-125 je beljakovina, ki služi kot tumorski marker. V povišanih koncentracijah se nahaja v rakastih celicah jajčnika in je najpogosteje uporabljen označevalec omenjenega raka.

Ultrazvok je v primerjavi s krvnimi testi veliko bolj natančen pri diagnosticiranju malignih tumorjev jajčnikov. Rezultati, ki so jih objavili v Journal of the National Cancer Institute so pokazali, da je ultrazvok v 93 odstotkih vseh primerov zaznal razliko med benignimi in malignimi tumorji na jajčnikih, medtem ko je bil krvni test natančen le v 83 odstotkih. V raziskavi, v kateri je sodelovalo 1066 žensk, so uporabili krvne teste, ki temeljijo na odkrivanju CA-125.

Ker so simptomi pri raku jajčnika zelo podobni simptomom, ki so značilni tudi za manj "resne" bolezni, raka na jajčnikih v zgodnji fazi odkrijejo samo v 20 odstotkih (7).

1.1.3.5 Zdravljenje

Najuspešnejše in najpogostejše zdravljenje raka jajčnikov je kirurško. Odstranitev notranjih ginekoloških organov - maternice in obeh jajčnikov s tumorji, ter čimbolj korenita odstranitev vseh tumorskih mas v trebušni votlini je smoter take operacije. Nemalokrat je za to potrebna tudi delna odstranitev črevesa ali mehurja. Zdravljenje praviloma vedno, razen v izjemno redkih začetnih stadijih, nadaljujemo s citostatiki.

Prva tri leta po zdravljenju je priporočen kontrolni pregled na vsake štiri mesece, kasneje bolj poredko. Pri vsakem pregledu se poleg anamneze, ginekološkega vaginalnega in rektalnega pregleda določa še vrednost CA-125 v krvi, v pomoč pa je tudi ultrazvok abdomna (4).

1.2 STEROIDNI HORMONI

Med steroidne hormone spadajo hormoni nadledvičnice in spolni hormoni.

1.2.1 Hormoni nadledvičnice

Hormona nadledvičnice sta aldosteron, ki spada med mineralokortikoide in kortizol, ki spada med glukokortikoide. Glukokortikoidi vplivajo na presnovo ogljikovih hidratov in beljakovin, mineralokortikoidi pa uravnavajo koncentracijo elektrolitov v krvi.

1.2.2 Spolni hormoni

Spolni hormoni uravnavajo rast, razvoj in delovanje spolnih organov, proliferacijo sluznice endometrija, razvoj in ohranitev sekundarnih spolnih znakov, v nosečnosti pa tudi rast maternice. Vzdržujejo urogenitalno funkcijo ter vazomotorično stabilnost, ugodno učinkujejo na miokardij, koronarne žile, pretok krvi, koagulacijo in fibrinolizo (8).

Ženski spolni hormoni nastajajo v glavnem v jajčnikih, lahko pa tudi v skorji nadledvične žleze ter posteljici. Njihovo izločanje uravnava gonadotropna hormona sprednjega režnja hipofize, FSH (folikle stimulirajoči hormon) in LH (luteinizirajoči hormon).

Med spolne hormone spadajo estrogeni, gestageni in androgeni.

Estrogeni hormoni so skupina hormonov, bistvenih za normalen spolni razvoj ženske in za zdravo delovanje rodil (9). Nastajajo pretežno v jajčnikih, v manjših količinah pa tudi v nadledvičnih žlezah.

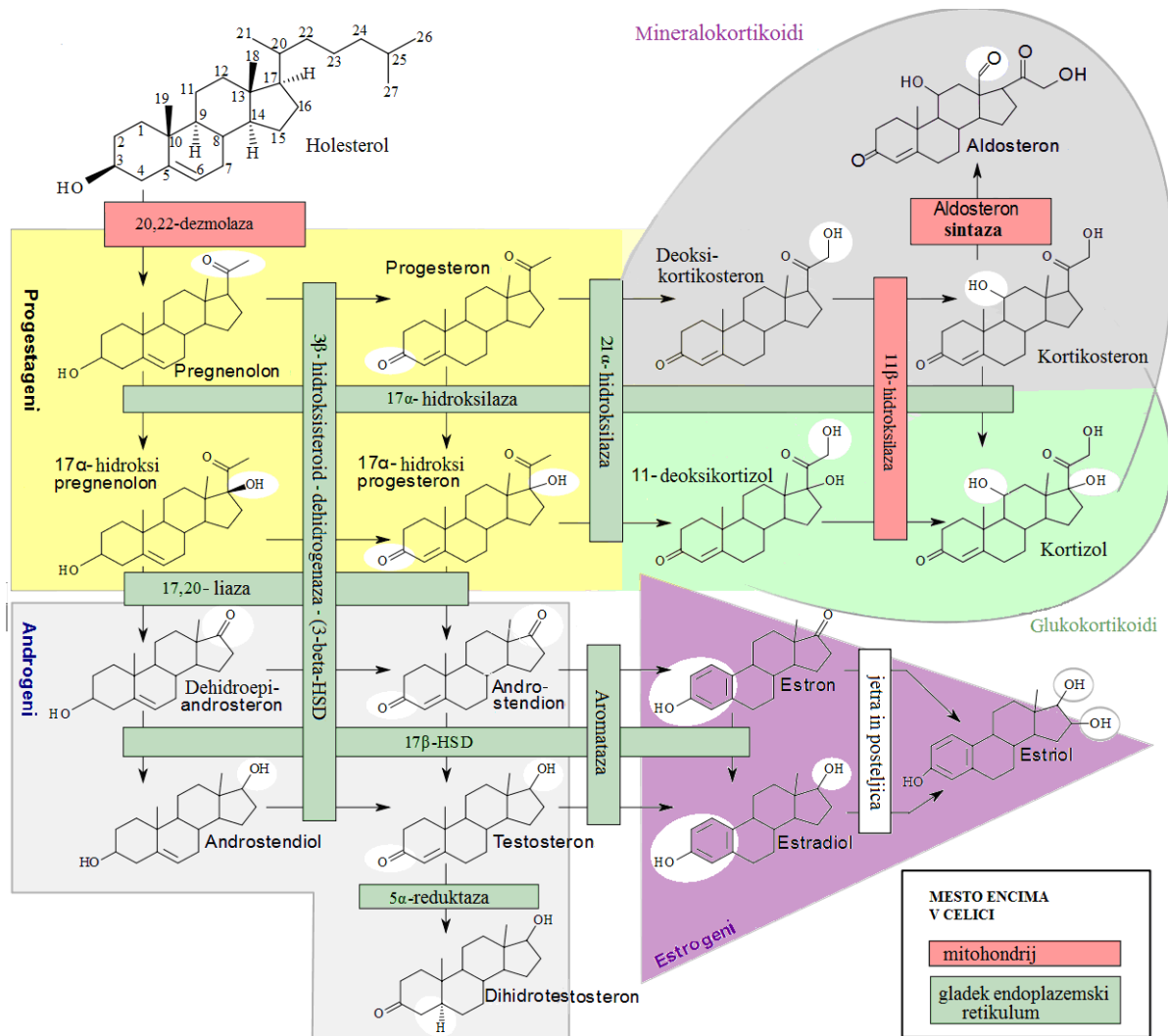
V prvi polovici ovarijskega cikla gestagene izločajo jajčniki in skorja nadledvične žleze, v drugi polovici pa rumeno telesce. Njihova glavna naloga je, da maternico pripravijo na nosečnost, poleg tega pa vplivajo tudi na delovanje možganov, saj povzročajo občutek umirjenosti. Med gestagene spada hormon progesteron.

Androgeni se sintetizirajo in izločajo v skorji nadledvične žleze in v jajčnikih, ter povzročajo moške spolne znake. Pri ženskah so androgeni učinki opazni kot maskulinizacija v smislu postave in obraznih potez, poleg tega se pojavlja povečana poraščenost ter pojav aken. Glavni androgen v reproduktivnem obdobju, ki ga izločajo jajčniki je androstendion, drugi najpomembnejši pa testosteron.

1.2.3 Steroidogeneza

Izhodna spojina za sintezo steroidnih hormonov je holesterol, od njega se razlikujejo le po stranski alkilni skupini, ki je steroidni hormoni nimajo.

Sinteza steroidnih hormonov poteka s pomočjo citokromov P450, ki izkoriščajo NADPH in molekularni kisik. Sinteza se začne z dvojno hidroksilacijo holesterola na C20 in C22, sledi odcep dela stranske verige s šestimi ogljiki. Ta reakcija se katalizira s holesterol dezmolazo (10) imenovano tudi 20,22-dezmozolaza, ki se nahaja v mitohondrijih steroidnih celic, zato je potreben transportni protein, ki prenese holesterol iz nadledvične žleze v mitohondrij. Ta transportni protein se imenuje StAR (steroidogenic acute regulatory protein). Nastane pregnenolon, ki je osnova za sintezo vseh steroidnih hormonov.



Slika 3: Steroidogeneza

Iz pregnenolona se v dveh korakih sintetizira progesteron, 3-hidroksi skupina se oksidira v 3-keto skupino in dvojna vez na C5 se prestavi na C4.

Iz progesterona s hidroksilacijo nastajajo mineralokortikoidi. Najprej pride do hidroksilacije na C21, sledi hidroksilacija na C11, da nastane kortikosteron. Metilna skupina na C18 se oksidira do aldehida rumene barve- aldosterona, najbolj aktivnega mineralokortikoida.

S sekrecijo treh hidroksilacij pa se iz progesterona oblikujejo glukokortikoidi. Prva je hidroksilacija na C17, sledita ji hidroksilaciji na C21 in C11, da nastane kortizol, ki je najbolj aktiven med glukokortikoidi.

Izhodišče za sintezo androgenov sta pregnenolon in progesteron. Pri obeh je prvi korak odcep kratke stranske verige na C17, da na tem mestu nastane keton.

Izraz 17-ketosteroidi se nanaša na vmesno stopnjo spolne steroidne podlage s to funkcionalno skupino. Keton se reducira do hidroksilne skupine in tako nastane testosteron.

Estrogeni se od androgenov razlikujejo po tem, da nimajo metilne skupine na C10, A obroč je aromatičen in, da je hidroksilna skupina na C3 mestu. Nastane 17 β – estradiol, ki je najpomembnejši estrogen.

1.3 ESTROGENI HORMONI

Estrogeni so hormoni z 18 ogljikovimi atomi, ki se sintetizirajo v jajčnikih, del pa tudi zunaj jajčnikov s pretvorbo androstendiona v estron. Estrogen, ki ga v jajčniku izločajo celice granulose, je v večini v obliki 17 β -estradiola, manj pomembna količina estradiola pa nastane s periferno konverzijo estrogena, testosterona in androstendiona.

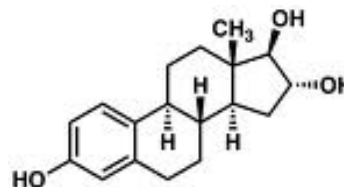
1.3.1 Vrste estrogenov

Izraz estrogen se nanaša na celoten razred hormonov, dejansko pa obstajajo tri vrste estrogenov:

1. ESTRIOL je šibek estrogen in glavni metabolit estradiola in estrona
2. ESTRADIOL je najmočnejši estrogen
3. ESTRON ima podobne lastnosti kot estradiol le, da je precej manj biološko aktiven

1.3.1.1 Estriol

Estriol ali E3 ima od vseh treh estrogenov najšibkejši učinek. Njegova bruto formula je C₁₈ H₂₄ O₃.



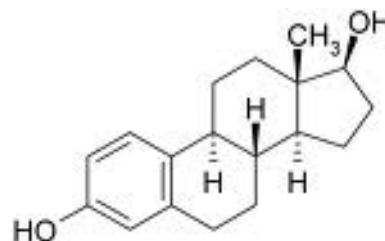
Slika 4: Strukturna formula estriola

Estriol se presnavlja iz estradiola in estrona. Čeprav je šibkejši od njiju, je še vedno biološko aktiven. Je naravni estrogen, ki je povezan z nosečnostjo.

Pri nosečnicah se estriol proizvaja v plodovih jetrih in v posteljici. Merjenje ravni estriola v urinu se uporablja za določanje nosečnosti in za spremljanje napredka nosečnosti. Estriol je bil včasih pomemben samo pri nosečnosti, saj se raven estriola takrat poveča za 1000-krat v primerjavi z običajnimi vrednostmi. Prvotno je bil poznan kot slab estrogen v primerjavi z estradiolom in estronom. Raziskave pa so pokazale, da ima tudi estriol pozitivne učinke in, da nizke koncentracije estriola ne povzročajo od hormonov odvisnih oblik raka. Študije kažejo tudi, da estriol lajša simptome menopavze in je boljši glede varnosti v primerjavi z bolj močnimi estrogeni. To pomeni, da je estriol boljši od zdravil za nadomestno hormonsko zdravljenje. Raziskave tudi kažejo, da je estriol koristen za zdravje srca in sečil po menopavzi, pomaga preprečevati osteoporozo ter, da zmanjšuje poškodbe možganov pri multipli sklerozi. Trditve, da je estriol varnejši od drugih oblik estrogena pa ne veljajo povsem, saj raziskave kažejo, da estriol predstavlja enako tveganje za nastanek raka kot ostali estrogeni (11). Nekateri alternativni zdravniki trdijo, da se estriol dejansko bori z rakom, za razliko od estrogena, ki povečuje tveganje za nekatere vrste raka. Ta trditev ne temelji na dovolj zanesljivi študiji, zato je bolj verjetno, da estriol povečuje tveganje za nastanek raka na skoraj enak način kot druge oblike estrogena. Dokler se ne dokaže nasprotno, velja, da estriol povečuje tveganje za nastanek raka (11).

1.3.1.2 Estradiol

Estradiol ali E2 je pri ženskah prevladujoči spolni hormon. Proizvaja se le tri dni od trideset dnevnega menstrualnega ciklusa. Njegova bruto formula je $C_{18}H_{24}O_2$.



Slika 5: Strukturna formula estradiola

Je najbolj aktiven in najmočnejši estrogen, odgovoren za več kot 400 funkcij v ženskem telesu. Je 12-krat močnejši od estrona in kar 80-krat močnejši od estriola.

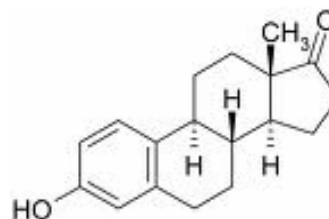
V reproduktivnih letih se večina estradiola proizvede v celicah granuloze iz jajčnikov z aromatizacijo androstendiona v estron. Sledi pretvorba estrona v estradiol, ki ga sintetizira 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza.

Maščobne celice proizvajajo estradiol in so glavni vir estradiola v postmenopavzalnem obdobju. Estradiol proizvajajo tudi možgani, arterijske stene in skorja nadledvične žleze.

Estradiol deluje na tkiva reproduktivnih organov kot rastni hormon, potreben pa je tudi za ohranitev jajčnih celic v jajčniku. Ne vpliva pa le na reproduktivne organe in spolno delovanje, pač pa tudi na druge organe in kosti.

1.3.1.3 Estron

Estron ali E1 spada med naravne estrogene, ki jih izločajo jajčniki in maščobno tkivo. Njegova bruto formula je $C_{18}H_{22}O_2$.



Slika 6: Strukturna formula estrona

Estron se sintetizira preko aromataze iz androstendiona, derivata progesterona. Prisoten je v majhnih koncentracijah, njegova vrednost pa zelo naraste med nosečnostjo.

Njegov derivat estron sulfat ima dolgo življenjsko dobo in deluje kot rezervoar, ki se lahko po potrebi pretvori v bolj aktiven estrogen imenovan estradiol. Estron je edina oblika estrogena, ki je pri ženskah prisotna tudi po menopavzi. Vrednost estrona v menopavzi se pogosto poveča, morda zaradi večje sinteze, ki je povezana s povečanjem telesnih maščob.

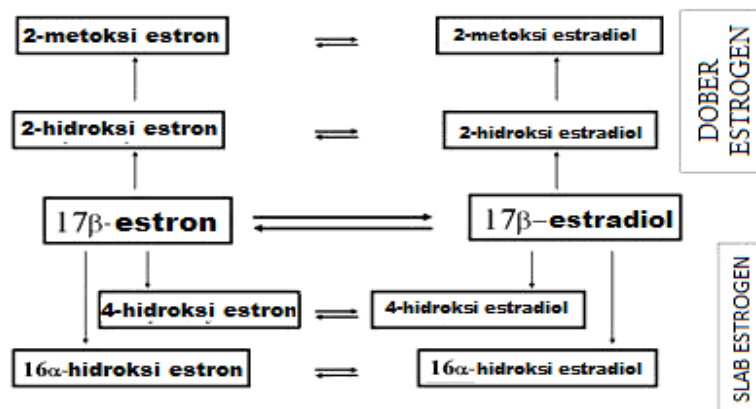
Ugotovljeno je bilo, da imajo debelejše ženske, ki imajo več maščob in proizvedejo več estrona manj simptomov menopavze, vendar večje tveganje za nastanek raka.

1.3.2 Presnova estrogena in klinični pomen

Glavni presnovki estradiola in estrona so hidroksilirani na C2 in C16 položajih.

2-hidroksi estrogen ni biološko aktiven na periferiji, ima pa anti-estrogenski učinek, zato ga imenujemo »dober« estrogen. 2-hidroksi estrogen in 2-metoksi estrogen delujeta kot antioksidanta in sta pomembna za odpravo poškodovanih in rakavih celic.

16 α -hidroksi estrogen je sposoben kovalentne vezave z receptorjem estrogena, histoni in DNA. Zaradi kovalentne vezave z receptorjem pride do biološkega odziva.



Slika 7: Shematski prikaz presnove estrogena

Antiestrogeni v prehrani delujejo na estrogenske receptorje, ki so v jedru tumorske celice, saj zavirajo njihovo delovanje in tako preprečujejo signalizacijo za rast. Med živila z antiestrogenskim učinkom spada predvsem zelenjava, kot je cvetača, brokoli, brstični ohrovt in podobne. Nizka vsebnost maščob v hrani povzroči zmanjšanje estriola in 16α-hidroksiestrona.

Brez antiestrogenov v prehrani prevladujeta 16α-hidroksiestron in 4-hidroksiestron. Ta metabolita slabo vplivata na naš organizem in povzročata poškodbe DNA in spodbujata razvoj raka.

Visoka vrednost 16α-hidroksiestrona ob pomanjkanju vrednosti 2-hidroksiestrona je povezana s povečanim tveganjem za nastanek raka (12).

2-hidroksiestron in 2-hidroksiestradiol imata šibkejši učinek in celo nižata spodbujevalni učinek estradiola na rakave celice, saj zavirata proliferacijo celic.

Ksenoestrogeni so sintetične snovi, ki jih najdemo v zdravilih, kemikalijah, pesticidih, herbicidih in drugih okoljskih onesnaževalcih. Stranski učinek teh snovi je stimulacija estrogena, delujejo kot onkogeni in vzpodbujajo nastajanje 16α-hidroksiestrona (13).

Uporaba peroralnega estriola je lahko povezana s hiperplazijo endometrija in rakom endometrija. Ženske, ki jemljejo peroralni estriol imajo povišane koncentracije 16α-hidroksiestrona. Leta 1998 je bilo dokazano, da 16α-hidroksiestron in 16α-hidroksiestradiol spodbujata rast rakavih celic kot estradiol, če ne še bolj (14).

1.3.3 Prenos hormonov po krvi

Spolni hormoni so lipofilni steroidi, ki se po krvi prenašajo vezani na beljakovine in albumin, ali prosti. Vežalne beljakovine olajšajo prenos spolnih hormonov, vendar ti lahko vstopijo v celico le prosti. Glavni dejavnik, ki določa raven prosto krožečih spolnih hormonov, je serumska koncentracija vežalne beljakovine za spolne hormone, imenovana SHBG (sex hormone-binding globulin). Biološko razpoložljivost spolnih hormonov pa določa stopnja vezave na vežalne beljakovine.

SHBG je glikoprotein, ki se veže na spolne hormone, zlasti na testosteron in estradiol. Poznan je tudi kot TeBG (testosterone-estrogen binding globulin), SSBG (sex steroid binding globulin) ali SBP (sex steroid binding protein) in se specifično veže s hidroksteroidom.

SHBG se proizvaja v jetrih in se od tam sprošča v krvni obtok. V manjših količinah ga proizvajajo tudi možgani, maternica in posteljica. Na sintezo SHBG v krvi vpliva koncentracija androgenov. Povišana koncentracija testosterona zmanjša sintezo SHBG, visoka koncentracija estrogena pa spodbuja njegovo proizvodnjo.

Testosteron in estradiol krožita po krvnem obtoku vezana predvsem na SHBG, manjši odstotek pa na serumski albumin. Le majhen del hormonov, manj kot dva odstotka, ostane nevezanih oziroma prostih in le ti so biološko aktivni, to pomeni, da lahko vstopijo v celico in sprožijo delovanje specifičnih receptorjev. SHBG ima pomembno vlogo pri regulaciji vrednosti prostih steroidov v krvi, saj zavira delovanje biološko aktivnih hormonov in na tak način vpliva na raven spolnih hormonov.

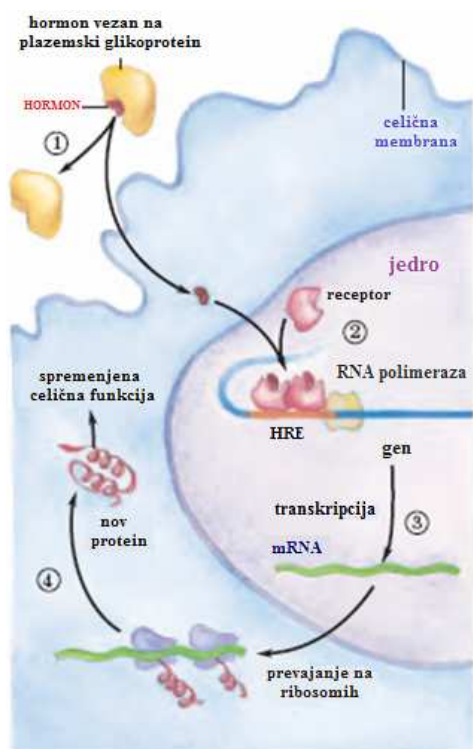
Prenašalci hormonov obstajajo pretežno v nevezani obliki, ki zagotavlja velik presežek prostih vezavnih mest steroidnih hormonov. Več kot 80% SHBG je pri ženskah nevezanega. Spremembe v koncentraciji hormonov se relativno malo poznajo pri prosti frakciji, saj presežek SHBG uravnava razlike v koncentraciji hormonov. V nasprotju s tem pa sprememba koncentracije SHBG močno vpliva na količino steroidov. SHBG veže steroidne hormone z visoko afiniteto, spremembe SHBG koncentracije povzročijo velike spremembe v prostem in z albuminom vezanih frakcijah teh hormonov, saj je afiniteta albumina za vezavo s steroidi nizka.

1.3.4 Mehanizem prenosa signala

Steroidni hormoni so topni v bioloških membranah in zato lahko prehajajo skozi, pred tem pa se morajo vezani hormoni odcepiti od vezalnega proteina. Da pa hormon v neki celici lahko učinkuje, potrebuje ustrezne vezne receptorje, ki se nahajajo v celičnem jedru.

Genomsko delovanje prek steroidnih receptorjev znotraj celice, poteka takole:

1. Hormon sproži biološki odgovor v odzivnih tkivih, ki vsebujejo jedrne receptorje za hormon.
2. Hormon se veže na receptor v jedru z visoko afiniteto in specifičnostjo. Nastane kompleks hormon-receptor.
3. Ob vezavi hormona se receptor konformacijsko spremeni, odkrije se vezavno mesto za DNA. Kompleks se veže na specifična mesta na DNA (HRE- hormone response element) in s tem aktivira prepisovanje določenih genov. Hormon deluje kot transkripcijski faktor, RNA-polimeraza pa sintetizira mRNA (15).



Slika 8: Mehanizem prenosa signala

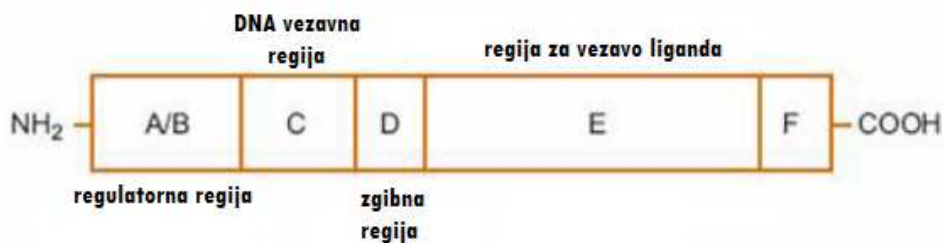
4. Informacija se s pomočjo obveščevalne RNA oz. mRNA prenese v citoplazmo do ribosomov, kamor prenašalna oz. tRNA nosi aminokislino, ki se med seboj vežejo s peptidno vezjo v novo beljakovino. Tako se sintetizira določen protein kot odgovor na signal – hormon.

Ligandi, ki aktivirajo jedrne receptorje so: estradiol, testosteron, aldosteron, kortizol, tiroksin in 1,25-dihidroksiholekalciferol.

1.3.5 Estrogenski receptorji

Estrogenski steroidni receptorji se ob aktivaciji vežejo na DNA in uravnavaajo izražanje specifičnih genov. Vsebujejo za jedrne receptorje karakteristične regije s točno določenimi funkcijami. Gre za konzervativna področja, označena od A do F. Na najbolj variabilni A/B regiji na amino-terminalnem koncu receptorja najdemo regulatorno domeno s transkripcijsko aktivnostjo, sledita C regija, s katero se receptor veže na DNA molekulo, ter E regija, ki ima prav tako transkripcijsko aktivnost in je odgovorna za vezavo hormona in za dimerizacijo receptorske molekule. E regija poskrbi tudi za pravilno lokalizacijo receptorske molekule v jedru celice. Med C in E regijo je zglobna D regija, ki omogoča rotacijo DNA-vezavne domene. Na meji med C in D regijo se nahaja jedrni lokalizacijski signal (JLS), s pomočjo katerega se v jedro po sintezi na ribosomih prenesejo jedrni receptorji. Estrogenski receptorji vsebujejo tudi F regijo s še ne pojasnjeno funkcijo.

Po vezavi hormona se receptorska molekula konformacijsko spremeni, inhibitorni proteini se sprostijo, aktivna receptorska molekula z vezanim ligandom nato spontano dimerizira ter se veže na od hormonov odzivno regijo na DNA molekuli (HRE regija). Poteče prepisovanje tarčnih genov in sinteze proteinov (2).



Slika 9: Prikaz strukturnih domen molekule jedrnega receptorja

Poznana sta dva ločena tipa estrogenskih receptorjev: ER α iz 595 aminokislin in ER β iz 530 aminokislin. Gen za ER α se nahaja na kromosomu 6, gen za ER β pa na kromosomu 14, kar dokazuje, da gre za dve ločeni receptorski molekuli, ki ju kodirajo različni geni. Primerjava obeh estrogenskih receptorjev je pokazala veliko konzervativnost v DNA-vezavni regiji (96% identičnosti) in regiji, ki je odgovorna za vezavo hormona (53-55% identičnosti) (2).

1.3.6 Izločanje steroidnih hormonov z urinom

Glukuronid je predstavnik glikozidov glukuronske kisline, ki nastanejo v jetrih s konjugacijo glukuronske kisline s telesu tujimi substancami in tudi z nekaterimi normalnimi metaboliti (16). Tako se tudi steroidni hormoni v telesu v drugi fazi metabolizma konjugirajo s to kislino. Konjugacija z glukuronsko kislino naredi molekulo bolj vodotopno in s tem olajša izločanje s sečem.

Steroidni hormoni s pomočjo encimsko kataliziranih reakcij oksidacije, redukcije in hidroksilacije preidejo v bolj polarno obliko. Na ta način se lažje izločijo iz organizma.

Reakcija konjugacije steroidnih hormonov poteka z glukuronsko kislino (približno 60%) in s sulfatom (približno 35%). Obe konjugaciji sta encimsko kontrolirani, potekata v jetrih, hormoni pa se izločijo z urinom kot glukuronidi ali sulfati.

Nekateri steroidi ne podležejo konjugaciji, zato govorimo o nekonjugiranih oziroma prosto izločenih steroidih (17).

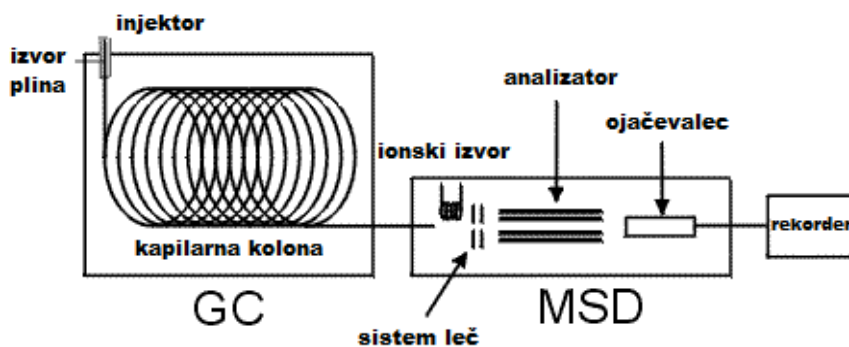
1.4 DOLOČANJE ESTROGENOV Z GC-MS

GC-MS je plinska kromatografija z masno spektrometrijo. Gre za plinski kromatograf s kapilarno kolono, priključen na spektrometer. S to metodo lahko identificiramo 14 naslednjih estrogenov v urinu: estron, estradiol, estriol, 2-OHE1, 2-OHE2, 2-MeOHE1, 2-MeOHE2, 4-OHE1, 15 α -OHE1, 16 α -OHE1, 16-ketoestradiol, 16 epiestriol in 17 epiestriol.

Plinski kromatograf sestavljajo:

- injektor
- kromatografska kolona
- detektor – masni spektrometer

Za kapilarno kolono je dovolj 1 μ L urina, notranji premer kolone je manjši od 1mm, dolžina pa do 50m. Kolone niso polnjene, le stene so prevlečene z ustrezno stacionarno fazo (1-2 μ m silikagela). Do ločevanja pride zaradi majhnih razlik v lastnostih med spojinami, ki različno integrirajo s stacionarno fazo oziroma zaradi različne hitrosti potovanja posamezne spojine po stacionarni fazi.



Slika 10: Plinski kromatograf s kapilarno kolono

V primerjavi z drugimi metodami lahko s to metodo precej natančno identificiramo spojine, vendar je težka sama priprava vzorcev in derivatizacija, zato obstaja večja verjetnost napak. Vzorce je potrebno pred nanosom na kolono hidrolizirati, zaradi nepopolne hidrolize pride do 5-10% izgube hormonov.

2. NAMEN DELA

Estrogen in njegovi metaboliti imajo pomembno vlogo pri nastanku hormonsko odvisnih oblik raka. Metaboliti hidroksilirani na C-2 položaju imajo antiestrogenski učinek, metaboliti hidroksilirani na C-16 α položajih pa so agonisti estrogena. 16 α -hidroksiestron izmerimo v povišanih vrednostih pri ženskah z rakom in tistih z visokim tveganjem za njegov nastanek. Določanje razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron zato služi kot biomarker tveganja za nastanek raka.

V diplomski nalogi bomo zato ovrednotili rezultate meritev koncentracij 2-hidroksiestrona, 16 α -hidroksiestrona, razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron in CA-125.

Ovrednotili bomo tudi rezultate meritev koncentracij kreatinina, saj z njegovim določanjem lahko ocenimo ledvično funkcijo (glomerulno filtracijo), eden od vzrokov za višje koncentracije od normalnih je lahko tumor urogenitalnega trakta.

V raziskavo bomo vključili 44 preiskovank v menopavzi, ki so prišle na operativni poseg zaradi suma na karcinom ovarijske ali endometrijske ciste.

Namen diplomske naloge je ugotoviti:

- Ali se izločanje različnih frakcij estrogenov razlikuje glede na vrsto raka?
- Koliko preiskovank odstopa od referenčnih vrednosti za estrogene, CA-125 in kreatinin?
- Ali lahko glede na vrednosti različnih frakcij estrogenov ločimo karcinom jajčnika oz. endometrija od benignih sprememb?
- Ali se razmerje estrogenov statistično razlikuje med skupinama preiskovank s karcinomom jajčnika in karcinomom endometrija in skupinama preiskovank s karcinomom in brez karcinoma?

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 OPIS PREISKOVANK

V raziskavo smo vključili 44 preiskovank, ki so prišle na operativni poseg zaradi suma na karcinom ovarijske ali karcinom endometrija. Vzorci so bili odvzeti leta 2009 na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Vse preiskovanke so starejše in v postmenopavzi.

Preiskovanke smo razdelili v dve skupini in sicer v skupino z malignimi obolenji endometrija in ovarijske (preiskovanke z endometrioidnim adenokarcinomom, karcinomom endometrija, karcinomom ovarijske in mejno malignim karcinomom ovarijske) in skupino z benignimi spremembami (preiskovanke s serozno cisto, redkoceličnim fibromielomom, endometriotičnimi cistami, folikularno cisto, benignim seroznim cistadenofibromom, fibrotekomom, atretnimi folikli, endometriozo ovarijske, polipom in zgodnjim sekrecijskim endometrijem, ovarijsko strumo, benigno Morganijevo hidatido). Analizirali smo rezultate meritve koncentracij 2-hidroksiestrona, 16 α -hidroksiestrona, razmerja 2-hidroksi/16 α -hidroksi estrogenov in kreatinina v urinu ter karcinomskega antigena 125 v serumu.

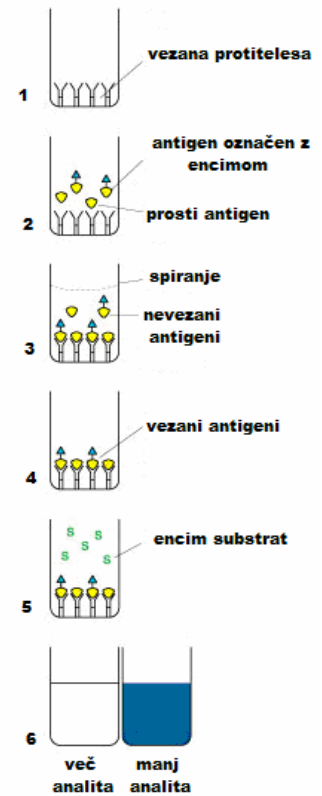
3.2 METODA ELISA

Vrednosti estrogenov so v bioloških vzorcih nizke, zato potrebujemo za njihovo določanje visoko občutljive metode. Za določanje estrogenov uporabljamo metodo ELISA, ki temelji na določanju kompleksov antigen-protitelo. S starejšo metodo ELISA nismo mogli dovolj natančno določati vrednosti estrogenov v urinu postmenopavzalnih žensk, saj je bila metoda premalo občutljiva. Na voljo je nova metoda ELISA, s katero lahko določamo estrogene tudi v vzorcih urina postmenopavzalnih žensk, ki imajo zelo nizke vrednosti estrogenov, saj je njena občutljivost 0,625 ng/mL.

3.2.1 Princip metode

Metoda se izvaja na trdnem nosilcu, je kompetitivni imunski test in temelji na tekmovanju dveh različnih antigenov za vezalno mesto.

1. Na trden nosilec so vezana protitelesa
2. Dodamo antigen označen z encimom ter prosti antigen (vzorec)
3. Nosilec speremo, da odstranimo nevezane antigene
4. Na nosilcu ostanejo le vezani antigeni
5. Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo
6. Koncentracija analita je obratno sorazmerna z intenzivnostjo barve

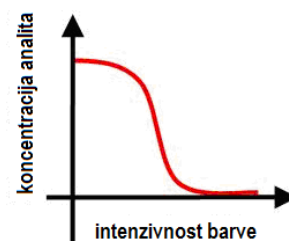


Slika 11: Princip metode ELISA

Označen antigen (Ag^*) in neoznačen antigen iz vzorca (Ag) tekmujeta za omejeno količino protiteles (Pt). Določamo količino vezanega antigena (Ag^*Pt)



Koncentracija Ag je obratno sorazmerna s koncentracijo Ag^*Pt .



Slika 12: Odvisnost intenzivnosti barve od koncentracije analita

3.2.2 Reagenti in pribor

Za ročno izvedbo testa so potrebni naslednji reagenti in pribor:

- Raztopina encima (mešanica β -glukuronidaze in sulfataze)
- Nevtralizacijski pufer
- Raztopina konjugata
- Substrat p-nitrofenilfosfat
- Konjugat 2-hidroksiestron – alkalna fosfataza
- Konjugat 16 α -hidroksiestron – alkalna fosfataza
- Urin za pozitivno kontrolo
- Standardi: 0,625; 2,5; 5; 10 in 20 ng/mL
- Raztopina za redčenje vzorcev
- Tris pufer za spiranje (pH=7,4)
- Mikrotitrna plošča (96 vdolbinic)
- Nastavki za pipete
- Pokrov za ploščo
- Pipeta z nastavljivim volumnom



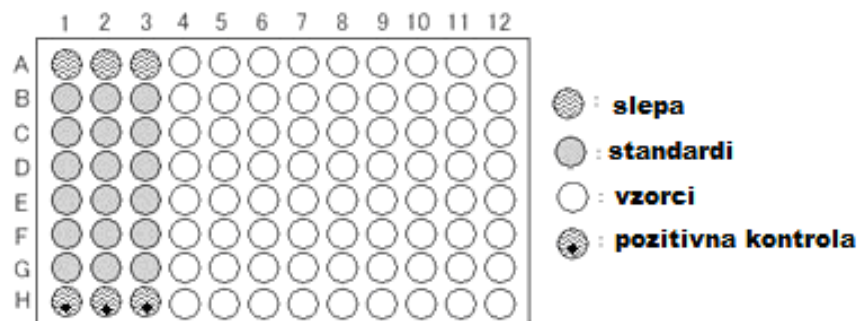
Za hitrejše pipetiranje uporabljamo multikanalno pipeto z nastavljivim volumnom.

Slika 13: Multikanalna pipeta

3.2.3 Priprava raztopin

Če imamo vzorce urina v zamrzovalniku, jih odtajamo na sobni temperaturi in po potrebi premešamo in centrifugiramo, da dobimo bistre vzorce. Reagente in raztopine postavimo na sobno temperaturo.

Mikrocentrifugirke postavimo v stojalo tako, da bodo standardi 16 α -OHE1 in 2-OHE1 v 1, 2 in 3 koloni, v vrstah B, C, D, E, F in G. Položaje A1, A2 in A3 pustimo za slepo raztopino, položaje H1, H2 in H3 pa za pozitivno kontrolo. Vzorce urina nanašamo v kolonah 4-12 in vrsticah A-H. (Razporeditev je potem enaka na mikrotitrski plošči.)



Slika 14: Razporeditev raztopin na mikrotitrski plošči

1. V mikrocentrifugirke za standarde pipetiramo 10 μ L posameznega standarda (0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 in 20 ng/mL 2-OHE1 in 16 α -OHE1).
2. V vsako mikrocentrifugirko dodamo 190 μ L razredčine encima (mešanica β -glukuronidaze in sulfataze) in premešamo. Tako razredčimo standarde in vzorce 20-krat.
3. Sledi inkubacija pri sobni temperaturi (20-25°C) dve uri.
4. Vse skupaj nevtraliziramo z dodatkom nevtralizacijskega pufra (200 μ L) in premešamo. Na ta način razredčimo standarde in vzorce 40-krat. Postopek čim hitreje nadaljujemo na mikrotitrski plošči.

3.2.4 Postopek na mikrotitrski plošči

1. Nosilec oz. ploščo, na katero so že vezani 2-OHE1 in 16 α -OHE1, 6-krat speremo s tris pufrom (pH 7,4)/0,05%. Spiramo tako, da pufer menjamo vsakih 15-20 sekund.
2. Prej pripravljene standarde in vzorce (razredčene 1:40) z multikanalno pipeto prenesemo na sprano ploščo.
3. Ustrezno razredčino 2-OHE1 : alkalna fosfataza pripravimo z redčenjem 2-OHE1: AP konjugata v pufru za redčenje (1:1000) in jo dodamo (75 μ L) v vse vdolbinice za vzorce. Takoj dodamo 75 μ L dekonjugiranega – nevtraliziranega vzorca.
4. Na enak način pripravimo razredčino 16 α -OHE1 : alkalna fosfataza, ki jo dodamo v vse vdolbinice za vzorce (75 μ L) in ji takoj dodamo 75 μ L dekonjugiranega – nevtraliziranega vzorca.
5. Ploščo nekajkrat rahlo premešamo in pokrijemo s pokrovom, ki je priložen v kompletu.
6. Inkubiramo pri sobni temperaturi tri ure. Ploščo hranimo v prostoru, kjer ni mehanskih in temperaturnih nihanj.
7. Po inkubaciji ploščo 6-krat speremo s tris pufrom, po zadnjem spiranju ploščo obrnemo in položimo na papir, da odstranimo tekočino.
8. Takoj (z multikanalno pipeto) dodamo v vse vdolbinice 100 μ L raztopine substrata (para-nitrofenilfosfat).
9. Merimo absorbanco pri 405 nm

3.2.5 Lastnosti testa

Občutljivost metode je 0,625 ng/mL, občutljivost testa po redčenju urina 1:40 pa je za 16 α -OHE1 je približno 0,05 ng/mL, za 2-OHE1 pa približno 0,15 ng/mL.

Znotraj metode je koeficient variacije za 16 α -OHE1 in 2-OHE1 manjši od 4%. Med testi je koeficient variacije manjši od 10%. Ponovljivost rezultatov med serijami redčenj je 100%.

Inkubacijski čas testa je 3 ure pri sobni temperaturi, od tega je približno 30 do 60 minut potrebnih za aktiviranje alkalne fosfataze (obarvanje). Za izvedbo celotnega testa je potrebnih približno šest ur.

Metoda ELISA je občutljiva, poceni in enostavna metoda za določanje razmerja 2-hidroksi/16 α -hidroksi estrogenov.

3.3 JAFFEJEVA METODA

Vrednosti kreatinina določamo z Jaffejevo metodo.

Proteine oborimo z dodatkom raztopine Na-volframata in žveplove (VI) kisline, sicer ti motijo določanje, saj dajejo lažno pozitivne rezultate. Kreatinini se adsorbirajo na Al-silikat. Z raztopino alkalnega pikrata se eluirajo in tvorijo oranžno obarvan kompleks, katerega absorbanco merimo pri 520 nm (18).

Metoda je nespecifična, lažno pozitivne rezultate daje več kot 50 nekreatininskih kromogenov.

3.4 KEMILUMINISCENČNA METODA

Kemiluminiscenca je sevanje svetlobe, kot posledica kemične reakcije. Za določanje karcinomskega antigena v serumu uporabljamo kemiluminiscenčno metodo. Antigen CA-125 sestoji iz dveh antigenskih struktur, ki vežeta monoklonski protitelesi OC-125 in M11.

Vzorcu, katerega CA-125 določamo, dodamo monoklonska protitelesa OC-125. Po spiranju dodamo monoklonska protitelesa M11, ki so označena z akridinom. Akridin sproži kemiluminiscenčno reakcijo, katere jakost je sorazmerna s količino OC-125.

3.5 STATISTIČNE METODE

Za ugotovitev, ali se razmerje estrogenov in drugih parametrov statistično razlikuje med skupinama preiskovank s karcinomom in brez karcinoma, smo uporabili t-test.

Prav tako smo t-test uporabili za ugotovitev značilnosti razlike razmerja estrogenov med skupinama preiskovank z rakom endometrija in rakom ovarijskega jajčnika.

T-distribucija je modifikacija standardizirane normalne distribucije in se uporablja za ugotavljanje lastnosti populacije na osnovi vzorcev. Ko imamo majhno število vzorcev se distribuira po t-distribuciji.

Zaradi majhnega števila vzorcev ne moramo direktno sklepati o populaciji.

V našem primeru imamo različno število statističnih enot in različni varianci, zato smo uporabili naslednje formule:

$$s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

Kjer je:

\bar{x} = povprečna vrednost

s = standardno odstopanje

n = število preiskovank

Za statistično obdelavo smo uporabili program Microsoft Office Excel.

Izračunane t vrednosti smo primerjali s tabelarnimi vrednostmi (95% verjetnost).

4. REZULTATI

V preglednici III so zbrani rezultati meritev estrogenov, CA-125 in kreatinina 16 preiskovank, ki so prišle na operativni poseg zaradi suma na karcinom ovarijske ali karcinom endometrijske. Preiskovanke so v postmenopavzi in imajo različna maligna obolenja: endometrioidni adenokarcinom, karcinom endometrijske, karcinom ovarijske in mejno maligni karcinom ovarijske.

Preglednica III: Rezultati meritev koncentracij estrogenov, CA-125 in kreatinina pri bolnicah s karcinomom ovarijske ali karcinomom endometrijske

Št. preisk.	Diagnoza	E2/E16	2-OHE1 (µg/L)	16α -E1 (µg/L)	CA-125 (U/mL)	Kreatinin (mmol/L)
1	endometrioidni adenokarcinom	0,26	1,43	5,45		4,4
2	karcinom endometrijske	1,11	18,80	17,00	18,5	6,7
3	karcinom ovarijske	0,83	9,38	11,30	21,4	11,8
4	karcinom endometrijske	0,97	15,60	16,10	10,4	18,1
5	endometrioidni adenokarcinom	2,84	15,30	5,39		3,3
6	karcinom endometrijske	0,83	12,50	15,00		5,3
7	endometrioidni adenokarcinom	0,73	2,01	2,76	8,1	2,5
8	karcinom ovarijske	2,00	9,28	4,64	1315,0	7,3
9	karcinom endometrijske	0,39	3,77	9,58		4,2
10	endometrioidni adenokarcinom	0,60	4,76	7,90	6,3	7,3
11	mejno maligni karcinom ovarijske	0,29	4,56	15,70	60,4	7,6
12	karcinom endometrijske	0,57	14,9	26,20		25,8
13	karcinom ovarijske	1,59	5,06	3,19		4,9
14	karcinom ovarijske	0,92	6,97	7,56		
15	karcinom endometrijske	0,78	5,61	7,23		
16	karcinom ovarijske	0,94	7,05	7,47		

Za določanje 2-hidroksiestrona, 16α-hidroksiestrona in njunega razmerja smo analizirali vzorce urina, samo analizo pa smo izvedli na avtomatskem ELISA analizatorju Adaltis Personal Lab (Italija). Analizator lahko istočasno analizira dve mikrotitrski ploščici in je povezan z osebnim računalnikom, ki nam na zaslonu izpiše rezultate analize. Vse faze, razen nanos vzorca na mikrotitrsko ploščo potekajo avtomatizirano. Postopek, ki ga opravi analizator je enak ročnemu postopku.

Vrednosti koncentracij karcinomskega antigena 125 smo v serumu preiskovank določali s kemiluminiscenčno metodo na avtomatskem analizatorju Liaison (Združene države Amerike). Kreatinin smo določali v urinu preiskovank in sicer z Jaffejevo metodo s pomočjo avtomatskega analizatorja Hitachi 917 (Japonska).

V preglednici IV so zbrani rezultati meritev estrogenov, CA-125 in kreatinina preiskovank z benignimi spremembami. Imamo 28 preiskovank z benignimi obolenji, kot so: serozna cista, redkoceličen fibromielom, endometriotična cista, folikularna cista, benigni serozni cistadenofibrom, fibrotekom, atretični folikli, endometrioza ovarijskega jajnika, polip in zgodnji sekretorni endometrij, ovarijska struma in benigna Morganijeva hidatida.

Vse parametre smo določali na enak način, kot je opisano pod preglednico III.

Preglednica IV: Rezultati meritev koncentracij estrogenov, CA-125 in kreatinina pri preiskovankah z nerakavimi obolenji ovarijske ali endometrijske ciste

Št. preisk.	Diagnoza	E2/E16	2-OHE1 (µg/L)	16α -E1 (µg/L)	CA-125 (U/mL)	Kreatinin (mmol/L)
1	serozna cista	1,39	13,60	9,78		3,8
2	serozna cista	0,83	11,90	14,30	5,1	5,0
3	serozna cista	1,82	1,84	1,01	8,1	2,2
4	redkoceličen fibromielom		5,50		39,0	27,3
5	serozna cista	1,56	9,28	5,93		2,6
6	endometrijske ciste	2,14	7,74	3,61	4,4	2,2
7	serozna cista	1,20	14,40	12,00	24,7	5,5
8	folikularna cista	0,92	22,20	24,20	23,0	9,9
9	serozni cistadenofibrom – benigni	1,89	3,17	1,68		1,5
10	serozna cista	2,48	3,92	1,58		2,2
11	fibrotekom	2,09	4,08	1,95	31,0	1,7
12	atretični folikli		34,40		37,9	8,3
13	endometrijske ciste	1,13	19,30	17,10		7,5
14	serozna cista	2,62	15,00	5,72		18,7
15	endometrijske ciste	8,00	1,36	0,17		2,6
16	endometrijska cista	0,26	4,12	15,70	14,3	16,2
17	polip in zgodnji sekrecijski endometrijski		71,60			10,2
18	serozna cista	0,83	12,60	15,10		6,6
19	serozna cista	0,84	19,50	23,30		13,0
20	serozna cista	0,51	4,96	9,68	10,8	7,6
21	ovarijska struma	0,84	15,60	18,50	7,1	5,3
22	serozna cista	1,83	10,60	5,79	0,2	
23	Morganijeva hidatida – benigna	1,19	15,70	13,20	0,2	6,1
24	serozna cista	0,99	15,30	15,50	27,0	6,5
25	serozna cista	0,79	18,40	23,30	18,7	18,4
26	serozni cistadenofibrom – benigni	0,49	3,47	7,07		2,4
27	serozna cista	1,66	6,76	4,07		
28	serozna cista	1,69	15,70	9,28		

V preglednici V smo skupino preiskovank s karcinomom endometrija (n=6) primerjali s skupino preiskovank s karcinomom ovarija (n=5). Primerjali smo povprečne vrednosti koncentracij 2-hidroksiestrona, 16 α -hidroksiestrona in njunega razmerje, ter te vrednosti primerjali z referenčnimi vrednostmi. S t-testom smo izračunali, ali se vrednosti estrogenov statistično razlikujejo med tema dvema skupinama preiskovank.

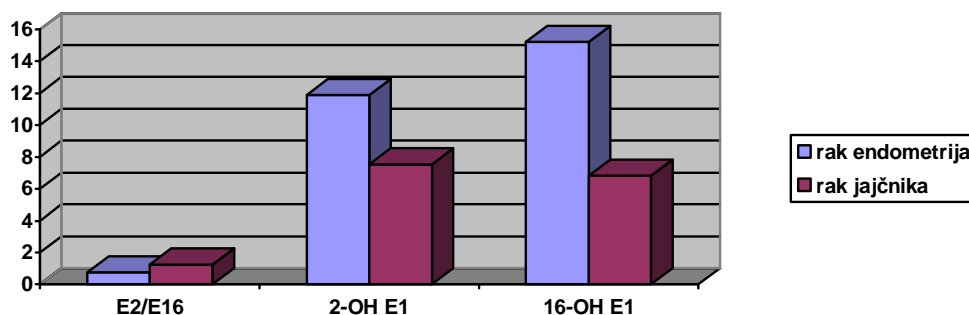
Pri karcinomu endometrija in ovarija so pod povprečnimi vrednostmi 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona ter razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron zapisane vrednosti standardnih deviacij posameznih parametrov, izračunane s pomočjo programa Microsoft Office Excel. Pri t-testu, za katerega smo uporabili isti program, so pod izračunanimi vrednostmi v oklepajih zapisane tabelarične t-vrednosti (95% zaupanje).

Preglednica V: Povprečne vrednosti koncentracij estrogenov preiskovank s karcinomom endometrija in ovarija

	Št.preiskovank	E2/E16	2-OHE1 ($\mu\text{g/L}$)	16 α –E1 ($\mu\text{g/L}$)
Karcinom endometrija	6	0,78 SD=0,26	11,86 SD=5,94	15,19 SD=6,64
Karcinom ovarija	5	1,26 SD=0,51	7,55 SD=1,81	6,83 SD=3,12
Ref. vrednosti		1,67-3	1-30	0,6–10
t- test		0,05 (2,48)	0,07 (2,40)	0,01 (2,35)

Rezultate izračunov povprečne vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron ter povprečne vrednosti koncentracij 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona skupine preiskovank s karcinomom endometrija in ovarija iz preglednice V smo predstavili na grafični način s stolpčnim diagramom (slika 15).

Slika 15: Grafični prikaz razlike povprečnih vrednosti koncentracij estrogenov med preiskovankami s karcinomom endometrija in jajčnika



Iz grafa je razvidno, da imajo preiskovanke z rakom endometrija nižje vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron v urinu, v primerjavi s preiskovankami z rakom jajčnika. Prav tako je razvidno, da preiskovanke z rakom endometrija izločajo višje koncentracije 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona v primerjavi s preiskovankami z rakom jajčnika.

V preglednici VI je navedeno skupno število preiskovank, ki odstopajo od normalnih vrednosti za razmerje 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron, 2-hidroksiestron in 16 α -hidroksiestron. V oklepajih so vrednosti preračunane v odstotek, glede na število vseh preiskovank, katerim so bili izmerjeni ti parametri.

Preglednica VI: Število preiskovank, ki odstopajo od referenčnih vrednosti za estrogene ter njihov odstotek glede na število vseh preiskovank

	Št. vseh preiskov.	Zvišane vrednosti	Znižane vrednosti
E2/E16	41	1 (2,3%)	33 (75,0%)
2-OHE1 (μg/L)	44	2 (4,5%)	0 (0%)
16α -E1 (μg/L)	41	17 (41,5%)	1 (2,4%)

Skupino preiskovank z malignimi obolenji endometrija in ovarija (n=16) smo v preglednici VII primerjali s skupino preiskovank z benignimi spremembami endometrija in ovarija (n=28).

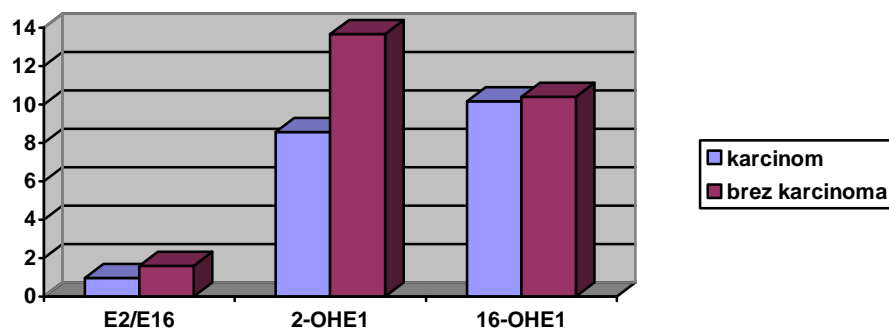
Primerjali smo povprečne vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron, koncentracij 2-hidroksiestrona, 16 α -hidroksiestrona, karcinomskega antigena 125 ter kreatinina in jih primerjali z referenčnimi vrednostmi.

Preglednica VII: Povprečne vrednosti koncentracij različnih parametrov preiskovank s karcinomom in preiskovank z benignimi obolenji jajčnika ali endometrija

	E2/E16	2-OHE1 (μg/L)	16α-E1 (μg/L)	CA-125 (U/mL)	Kreatinin (mmol/L)
Prisoten karcinom	0,98	8,56	10,15	205,7	8,4
Brez karcinoma	1,60	13,64	10,38	16,8	7,7
Ref.vrednosti	1,67 - 3	1 - 30	0,6 - 10	< 35	5,2 – 14,2

Rezultate izračunov povprečnih vrednosti koncentracij razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron in koncentracij 2-hidroksiestrona ter 16 α -hidroksiestrona iz preglednice VII smo predstavili na grafični način s stolpčnim diagramom (slika 16). Iz grafa je razvidno, da preiskovanke brez karcinoma izločajo z urinom več 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona in imajo višje razmerje 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron.

Slika 16: Grafični prikaz razlike povprečnih vrednosti koncentracij estrogenov pri skupini preiskovank s karcinomom jajčnika in endometrija in skupini z benignimi spremembami



Preglednica VIII: Rezultati izračunov statističnih parametrov za koncentracije estrogenov pri preiskovankah s karcinomom in brez karcinoma

	S karcinomom	Brez karcinoma	S karcinomom	Brez karcinoma	S karcinomom	Brez karcinoma
n	E2/E16	E2/E16	2-OHE1 ($\mu\text{g/L}$)	2-OHE1 ($\mu\text{g/L}$)	16 α -E1 ($\mu\text{g/L}$)	16 α -E1 ($\mu\text{g/L}$)
1	0,26	1,39	1,43	13,60	5,45	9,78
2	1,11	0,83	18,80	11,90	17,00	14,30
3	0,83	1,82	9,38	1,84	11,30	1,01
4	0,97	1,56	15,60	5,50	16,10	5,93
5	2,84	2,14	15,30	9,28	5,39	3,61
6	0,83	1,20	12,50	7,74	15,00	12,00
7	0,73	0,92	2,01	14,40	2,76	24,20
8	2,00	1,89	9,28	22,20	4,64	1,68
9	0,39	2,48	3,77	3,17	9,58	1,58
10	0,60	2,09	4,76	3,92	7,90	1,95
11	0,29	1,13	4,56	4,08	15,70	17,10
12	0,57	2,62	14,9	34,40	26,20	5,72
13	1,59	8,00	5,06	19,30	3,19	0,17
14	0,92	0,26	6,97	15,00	7,56	15,70
15	0,78	0,83	5,61	1,36	7,23	15,10
16	0,94	0,84	7,05	4,12	7,47	23,30
17		0,51		71,60		9,68
18		0,84		12,60		18,50
19		1,83		19,50		5,79
20		1,19		4,96		13,20
21		0,99		15,60		15,50
22		0,79		10,60		23,30
23		0,49		15,70		7,07
24		1,66		15,30		4,07
25		1,69		18,40		9,28
26				3,47		
27				6,76		
28				15,70		
\bar{x}	0,98	1,60	8,56	13,64	10,15	10,38
SD	0,67	1,47	5,35	13,62	6,33	7,41
t	0,07	0,07	0,09	0,09	0,92	0,92

S pomočjo programa Microsoft Office Excel smo izračunali povprečne vrednosti, standardno deviacijo in t-test koncentracij 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona ter njunega razmerja za skupino preiskovank s karcinomom in brez karcinoma (preglednica VIII).

Vrednost n predstavlja zaporedno številko meritve, ne preiskovanke.

Preglednica IX: Rezultati izračunov statističnih parametrov za koncentracije kreatinina pri preiskovankah s karcinomom in brez karcinoma

	S karcinomom	Brez karcinoma
n	Kreatinin (mmol/L)	Kreatinin (mmol/L)
1	4,4	3,8
2	6,7	5,0
3	11,8	2,2
4	18,1	27,3
5	3,3	2,6
6	5,3	2,2
7	2,5	5,5
8	7,3	9,9
9	4,2	1,5
10	7,3	2,2
11	7,6	1,7
12	25,8	8,3
13	4,9	7,5
14		18,7
15		2,6
16		16,2
17		10,2
18		6,6
19		13,0
20		7,6
21		5,3
22		6,1
23		6,5
24		18,4
25		2,4
\bar{x}	8,4	7,7
SD	6,6	6,5
t	0,77	0,77

S pomočjo programa Microsoft Office Excel smo izračunali povprečni vrednosti, standardni deviaciji in t-test koncentracij kreatinina za preiskovanke s karcinomom jajčnika in endometrija ter preiskovanke brez karcinoma (preglednica IX).

Vrednost n v tabeli predstavlja zaporedno številko meritve.

Preglednica X: Rezultati izračunov statističnih parametrov za koncentracije karcinomskega antigena 125 pri preiskovankah s karcinomom in brez karcinoma

	S karcinomom	Brez karcinoma
n	CA-125 (U/mL)	CA-125 (U/mL)
1	18,5	5,1
2	21,4	8,1
3	10,4	39,0
4	8,1	4,4
5	1315,0	24,7
6	6,3	23,0
7	60,4	31,0
8		37,9
9		14,3
10		10,8
11		7,1
12		0,2
13		0,2
14		27,0
15		18,7
\bar{x}	205,7	16,8
SD	489,5	13,1
T	1,54	1,54

S pomočjo programa Microsoft Office Excel smo izračunali povprečni vrednosti, standardni deviaciji in t-test koncentracij karcinomskega antigena 125 za preiskovanke s karcinomom jajčnika in endometrija ter preiskovanke brez karcinoma (preglednica X).

Vrednost n v tabeli predstavlja zaporedno številko meritve.

V preglednici XI smo primerjali izračunane vrednosti t-testa estrogenov (preglednica VIII), kreatinina (preglednica IX) in karcinomskega antigena (preglednica X) primerjali s tabelarnimi vrednostmi za t-test (95% zaupanje), za ugotovitev značilnosti razlike razmerja parametrov med skupinama preiskovank s karcinomom in brez karcinoma.

Preglednica XI: Primerjava izračunanih t vrednosti s tabelarnimi vrednostmi

	E2/E16	2-OHE1 ($\mu\text{g/L}$)	16α -E1 ($\mu\text{g/L}$)	Kreatinin (mmol/L)	CA-125 (U/mL)
Izračunana t	0,07	0,09	0,92	0,77	0,35
Tabelarna t (95%)	2,08	2,02	2,02	2,03	2,09

5. RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, ali se izločanje različnih frakcij estrogenov razlikuje glede na vrsto raka, zato smo skupini preiskovank s karcinomom endometrija in jajčnika primerjali med seboj. Ker so koncentracije 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona v krvi zelo nizke, jih določamo v urinu, kjer so koncentracije višje. Preiskovanke s karcinomom endometrija imajo nižje povprečne vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron in višje povprečne vrednosti koncentracij 2-hidroksiestrona in 16 α -hidroksiestrona od preiskovank s karcinomom ovarija (preglednica V).

Preiskovanke s karcinomom endometrija imajo povprečno vrednost razmerja E2/E16 0,78, preiskovanke s karcinomom ovarija pa 1,26. Obe skupini preiskovank odstopata od normalnih vrednosti za razmerje 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron, saj je razmerje E2/E16 pri zdravi postmenopavzalni ženski od 1,67 do 3. Vrednost razmerja pod 1,67 kaže na raka oz. na veliko tveganje za nastanek raka endometrija in jajčnika.

Vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron nižje od 2,0 predstavljajo veliko tveganje za nastanek hormonsko odvisnih oblik raka (12). Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da bi lahko bilo določanje razmerja E2/E16 dober pokazatelj raka ovarija in endometrija, vendar statistično nismo mogli dokazati razlik v razmerju estrogenov med skupinama preiskovank s karcinomom endometrija in karcinomom ovarija.

Povprečna vrednost 2-hidroksiestrona pri preiskovankah s karcinomom endometrija je 11,86 μ g/L, pri preiskovankah s karcinomom jajčnika pa 7,55 μ g/L. Raven 2-hidroksiestrona v urinu zdravih postmenopavzalnih žensk je od 1-30 μ g/L, kar pomeni, da preiskovanke s karcinomom jajčnika in endometrija ne odstopajo od referenčnih vrednosti.

Povprečna vrednost 16 α -hidroksiestrona preiskovank s karcinomom endometrija je 15,19 μ g/L, preiskovank s karcinomom ovarija pa 6,83 μ g/L. Raven 16 α -hidroksiestrona v urinu zdravih postmenopavzalnih žensk je od 0,6-10 μ g/L. Skupina preiskovank s karcinomom endometrija odstopa od referenčnih vrednosti, medtem ko imajo preiskovanke s karcinomom ovarija normalne vrednosti.

Študije kažejo, da so visoke vrednosti 16 α -hidroksiestrona značilne za raka endometrija (19). Iz tega lahko sklepamo, da je določanje estrogenov boljši pokazatelj raka endometrija, kot raka ovarija, vendar smo analizirali zelo majhno skupino preiskovank s karcinomom endometrija (n=6) in ovarija (n=5), zato ne moremo sklepati na značilnost populacije.

Za ugotovitev, ali se razmerje različnih frakcij estrogenov statistično razlikuje med skupinama preiskovank s karcinomom endometrija in ovarijska, smo uporabili t-test. Izračunane t vrednosti za estrogene so nižje od tabelarnih vrednosti t-testa, zato sklepamo, da gre zgolj za slučajno in ne za statistično razliko med skupinama.

Ugotoviti smo želeli, pri kolikih preiskovankah z benignimi in malignimi obolenji endometrija in jajčnika se izločanje estrogenov razlikuje od normalnega izločanja (preglednica VI). Nižje od normalnih vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron je imelo 33 preiskovank od 41 preiskovank z malignimi in benignimi spremembami, kar je 75% vseh preiskovank.

Prenizkih vrednosti 2-hidroksiestrona (pod 1 μ g/L) ni imela nobena preiskovanka, čeprav so nizke vrednosti 2-hidroksiestrona povezane z rakom endometrija (20). Sta pa imeli preiskovanki z diagnozo atrečnih foliklov ter polipom in zgodnjim sekrecijskim endometrijem povišane vrednosti 2-hidroksiestrona (nad 30 μ g/L), vendar to ni klinično pomembno, saj velja 2-OHE1 za »dober« estrogen.

Zvišane vrednosti 16 α -hidroksiestrona je imelo 17 preiskovank od skupaj 41 preiskovank z malignimi in benignimi spremembami endometrija in jajčnika. 16 α -hidroksiestron vzpodbudi celično rast in s tem rast tumorjev (12).

Preiskovanka z endometriotičnimi cistami je imela znižano koncentracijo 16 α -hidroksiestrona (manj kot 0,6 μ g/L), kar pa ni klinično pomembno, saj velja 16-OHE1 za »slab« estrogen.

Zaključimo lahko, da ima večina (75%) preiskovank z benignimi in malignimi spremembami jajčnika in endometrija prenizke vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron, iz tega pa lahko sklepamo, da je določanje tega razmerja dobra metoda za diagnosticiranje takšnih sprememb. S samim določanjem koncentracije 2-hidroksiestrona, brez sočasnega določanja koncentracije 16 α -hidroksiestrona pa v našem primeru ne moremo sklepati na maligno ali benigno obolenje jajčnika oz. endometrija. Tudi samo določanje 16 α -hidroksiestrona ni dovolj dober pokazatelj malignih in benignih obolenj, saj je imelo le 41,5% vseh preiskovank zvišane vrednosti tega parametra.

Ugotavljali smo tudi, kako se rezultati različnih parametrov razlikujejo med skupino preiskovank s karcinomom jajčnika ali endometrija in skupino preiskovank z benignimi obolenji jajčnika ali endometrija (preglednica VII).

Povprečna vrednost razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron preiskovank s karcinomom je 0,98, preiskovank z benignimi obolenji pa 1,60. Obe skupini odstopata od referenčnih vrednosti za razmerje 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron postmenopavzalnih žensk. Takšne vrednosti smo tudi pričakovali, saj je znano, da predstavljajo vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron pod 2,0 veliko tveganje za nastanek hormonsko odvisnih oblik raka (12).

Povprečna vrednost koncentracij 2-hidroksiestrona preiskovank s karcinomom je 8,56 μ g/L, preiskovank z benignimi obolenji pa 13,64 μ g/L. Obe vrednosti sta v intervalu referenčnih vrednosti za 2-hidroksiestron postmenopavzalnih žensk (1-30 μ g/L).

Najmanj se med skupinama preiskovank razlikujeta povprečni vrednosti koncentracij 16 α -hidroksiestrona, povprečna vrednost za preiskovanke s karcinomom znaša 10,15 μ g/L, preiskovank z benignimi obolenji pa 10,38 μ g/L. Povprečni vrednosti 16 α -hidroksiestrona obeh skupin sta izven intervala referenčnih vrednosti za 16 α -hidroksiestron postmenopavzalnih žensk (0,6-10 μ g/L). Visoke vrednosti 16 α -hidroksiestrona so značilne za maligna obolenja (19), zato smo pričakovali, da bodo imele preiskovanke s karcinomom višje vrednosti 16 α -hidroksiestrona, kot preiskovanke z benignimi obolenji, vendar smo obravnavali izredno malo število preiskovank s karcinomom endometrija in ovarija, zato nismo dobili pričakovanih rezultatov.

Nekaterim preiskovankam smo izmerili tudi vrednosti karcinomskega antigena 125 v serumu. Ta se v povišanih koncentracijah nahaja v rakastih celicah jajčnika in je najpogosteje uporabljen označevalec omenjenega raka. Poleg karcinoma jajčnika pa je označevalec lahko povišan tudi pri drugih stanjih, ki niso nujno patološka. Pri preiskovankah s karcinomom je povprečna vrednost CA-125 205,7U/mL, pri preiskovankah z benignimi obolenji pa 16,8U/mL. Vrednost CA-125 je v našem primeru zvišana le pri dveh preiskovankah in sicer pri preiskovanki s karcinomom ovarija in preiskovanki z mejno malignim karcinomom ovarija. Preiskovanke z ostalimi malignimi obolenji pa imajo normalne koncentracije, torej do 35U/mL. Koncentracije tega tumorskega označevalca so odvisne od stadija bolezni, število določitev CA-125 pa v našem primeru ni zadostno, da bi lahko primerjali rezultate skupin. Tega tumorskega označevalca ne moremo uporabljati kot samostojno diagnostično metodo za odkrivanje raka, uporabljamo ga lahko v kombinaciji z drugimi označevalci (npr. HE4) in diagnostičnimi metodami. Ključnega pomena za diagnostiko je ginekološki pregled in vaginalna ultrazvočna preiskava.

Preiskovankam smo izmerili tudi koncentracije kreatinina v urinu. Na koncentracijo kreatinina v bioloških vzorcih ne vplivajo zunanji dejavniki. Koncentracija je sicer odvisna od mišične mase, spola in starosti, hrana pa nima posebnega vpliva nanjo. Izločanje kreatinina je dober pokazatelj ledvične funkcije. Zvišana koncentracija kreatinina je lahko posledica tumorjev urogenitalnega trakta. Pri vseh vrednostih kreatinina v tabelah, smo predpostavili, da preiskovanke izločijo skupno 1L urina na dan.

Preiskovanke s karcinomom jajčnika ali endometrija povprečno izločajo 8,4mmol kreatinina na dan, preiskovanke z benignimi obolenji jajčnika in endometrija pa 7,7mmol/dan. Izračunani povprečni vrednosti sta v intervalu referenčnih vrednosti za kreatinin v urinu (5,2-14,2mmol/dan).

Za ugotovitev, ali se razmerje estrogenov in drugih parametrov statistično razlikuje med skupinama preiskovank s karcinomom in brez karcinoma, smo uporabili t-test. Zato smo izračunali statistične parametre posebej za preiskovanke s karcinomom in tiste z benignimi spremembami in sicer za koncentracije: estrogenov (preglednica VIII), kreatinina (preglednica IX) in karcinomskega antigena 125 (preglednica X). Za dokaz, da se razmerje estrogenov statistično razlikuje med skupinama preiskovank s karcinomom in benignimi obolenji smo naredili statistični izračun. Izračunali smo povprečno vrednost, standardno odstopanje, povprečno sipanje dveh vzorcev in t-porazdelitev za vse prej naštete parametre. Ker so izračunane t vrednosti vseh parametrov nižje od tabelarnih vrednosti t-testa, lahko zaključimo, da gre zgolj za slučajno in ne za statistično razliko (ničelna hipoteza). To pomeni, da je razlika med skupino preiskovank s karcinomom jajčnika ali endometrija in skupino preiskovank z benignimi obolenji zgolj naključna. Problem bi rešili z večjim številom preiskovank, saj bi tako dobili zanesljivejše rezultate in bi lahko bolje predstavili populacijo.

6. SKLEP

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali se izločanje različnih frakcij estrogenov razlikuje glede na vrsto raka in koliko se to izločanje razlikuje od normalnega izločanja.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Izločanje estrogenov se razlikuje glede na vrsto raka, saj ima skupina preiskovank s karcinomom endometrija bistveno nižje povprečne vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron od skupine preiskovank s karcinomom jajčnika.
- Od normalnih vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron je navzdol odstopalo 33 od 41 preiskovank, kar je 75%, 41,5% jih je imelo zvišane koncentracije 16 α -hidroksiestrona.
- Preiskovanke z malignimi obolenji imajo bistveno nižje vrednosti razmerja 2-hidroksiestron/16 α -hidroksiestron ($\bar{x}=0,98$) od preiskovank z benignimi obolenji ($\bar{x}=1,60$). Prav tako imajo preiskovanke z malignimi obolenji nižje vrednosti »dobrega« 2-hidroksiestrona ($\bar{x}=8,56$) v primerjavi s preiskovankami z benignimi obolenji ($\bar{x}=13,64$). Povprečni vrednosti koncentracij 16 α -hidroksiestrona se med skupinama preiskovank minimalno razlikujeta.
- Statistično nismo mogli dokazati razlik v razmerju estrogenov in drugih parametrov med skupinama preiskovank s karcinomom jajčnika in karcinomom endometrija. Prav tako nismo mogli statistično dokazati razlik med skupinama preiskovank s karcinomom jajčnika in endometrija in tistimi brez karcinoma.

Obravnavali smo izredno malo število preiskovank s karcinomom jajčnika oz. endometrija, zato nismo povsod dobili pričakovanih rezultatov.

7. LITERATURA

1. Statistični urad Republike Slovenije: Teden boja proti raku 2010: http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=2982, (dostopano: avgust 2010).
2. Ložič E.: Študije izražanja estrogenskih in progesteronskih receptorjev pri raku endometrija, Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2008, 3-11, 16-21.
3. Bajc G.: Študije izražanja 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze AKR1C3 pri raku endometrija, Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2007, 4.
4. Andoljšek A.: Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija, Diplomsko naloga, Fakulteta za farmacijo, 2010, 1-18.
5. Rak rodil / XVI: Seminar in memoriam dr. Dušana Reje, Ljubljana 2008.
6. Vizita: Diagnosticiranje raka na jajčnikih, <http://vizita.si/clanek/ginekologija/diagnosticiranje-raka-na-jajcnikih.html>, (dostopano: avgust 2010).
7. Onkologija, seminar, Ginekološki raki, avgust 2010, <http://www.medenosrce.net/tiskaj.asp?id=297>, (dostopano: avgust 2010).
8. Pinter B.: Spolni hormoni in njihovi biološki učinki, Med Razgl 2001; 40: 415–421.
9. Britansko zdravniško združenje, Družinska zdravstvena enciklopedija, Državna založba Slovenije, Ljubljana 1992.
10. Škrablin T.: Metabolizem holesterola, Medicinska fakulteta, Ljubljana 1999.
11. Swedish, Patient & Visitor Information: Estriol, <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=af362d97-4f80-4453-a175-02cc6220a387&chunkid=21703>, (dostopano: avgust 2010).
12. Sheppard P. How to Prevent Cancer, <http://www.angelchiro.com/PreventingCancer.pdf>, (dostopano: avgust 2010).
13. Estrogen Balance, <http://www.estrogen-balance.com/>, (dostopano: avgust 2010).
14. Collins J. J.: Is Estriol Safer Than Estradiol?, <http://www.yourmenopausetype.com/menopausequestionsandanswers/04232000.html>, (dostopano: avgust 2010).
15. Lenasi H.: Funkcije proteinov- Proteini, vključeni v biosignaliziranje, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, januar 2009.

16. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, farmacevtska družba Lek: Slovenski medicinski slovar.
17. Bezak V., Martinec T.: Androgeni anabolični steroidi in doping, Fakulteta za farmacijo, Seminar pri predmetu toksikologija, december, 2005.
18. Marc J.: Navodila in dnevniki za vaje iz klinične biokemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Visokošolski strokovni študij laboratorijske biomedicine, 2. letnik.
19. Fishman J., Schneider J., Herscope R. J., Bradlow H. L.: Increased estrogen 16-alpha-hydroxylase activity in women with breast and endometrial cancer, *J. Steroid Biochem*, 1984, 20:1077-1081.
20. Minton B. L.: DIM Lowers Potential of Cancer Cell Metastasis, Invasion and Angiogenesis, http://www.naturalnews.com/023364_cancer_estrogen_research.html, (dostopano: september 2010).
21. Taborin M.: Posnetek stanja telesnih parametrov naključnega vzorca pripadnikov Slovenske vojske, *Diplomska naloga*, Ljubljana 2007, str.: 21-23.
22. Takač I.: Etiologija, epidemiologija in histopatologija raka endometrija, *Medicinski razgledi* 2000; 39: 191–198.
23. Casagrande J. T., Pike M. L., Ross R. K., Louis W. E., Roy S., Henderson B. E.: Incessant ovulation and ovarian cancer, *Lancet* 1979.
24. Bebar S.: Povzetek smernic zdravljenja ginekoloških malignomov, *Onkologija/priporočila*, št.1, junij 2006.
25. Akhmedkhalov A., Zeleniuch-Jacquotte A., Toniolo P.: Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer, *Ann NY Acad Sci* 2001.
26. Katere hormone poznamo, http://med.over.net/za_bolnike/mosko_zensko_zdravje/mosko_zdravje.php?full=1&id=19709&title=Katere_hormone_poznamo, (dostopano: avgust 2010).
27. Published by Red Mark Productions: *The Role of Hormones in Mammalian Reproduction*, January 24, 2008.
28. Th. Steimer: Steroid hormone metabolism, Division of Clinical Psychopharmacology, University Institute of Psychiatry, Geneva, Switzerland.
29. Frankli O., Wright J. V.: Estriol: Its Weakness is Its Strength, Life Extension Scientific Advisory Board Member, *Life Extension*, Avgust 2008.
30. COX Pharmacy, Hormone Replacement FAQ, http://www.coxpharmacy.com/compounding/bhrt_faq.asp, (dostopano: avgust 2010).

31. The Medical News, Estradiol News and Research,
<http://www.news-medical.net/?tag=/Estradiol>, (dostopano: avgust 2010).
32. Žakelj Mavrič M.: Derivati holesterola, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo, Predavanja iz biokemije II, študijsko leto 2009/2010.
33. Kelly J. A., Vankrieken L.: Sex Hormone Binding Globulin and the Assessment of Androgen Status, Diagnostic Products Corporation, All Rights Reserved, november 1997.
34. Zbornik zveze in društev za boj proti raku Slovenije, Poročilo o delu ZDBPR za leto 2008.
35. Vertot N.: Teden boja proti raku 2010,
http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=2982, (dostopano: avgust 2010).
36. Boyer, Rodney F.: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005, 39, 282-300.
37. R. T. Falk, S. C. Rossi, T. R. Fears, D. W. Sepkovic, A. Migella, H. Adlercreutz, J. Donaldson, H. L. Bradlow, R. G. Ziegler: A New ELISA Kit for Measuring Urinary 2-Hydroxyestrone, 16 α -Hydroxyestrone, and Their Ratio: Reproducibility, Validity, and Assay Performance after Freeze-Thaw Cycling and Preservation by Boric Acid, julij 1999.
38. ESTRAMET 2/16 ELISA, Instruction for Use, maj, 2003.
39. Immuna Care Corporation, <http://www.immunacare.com/index.html>, (dostopano: avgust 2010).
40. Hofler J., Kettlety T., Wolaniuk D., Smith S., Schmidt E., Smith G., Rosiere T.: ARCHITECT CA 125 II: A Chemiluminescent Microparticle Assay, Fujirebio Diagnostics Inc, Abbott Diagnostics Division, Helsinki, Finska, junij 2004.
41. Kmetec V., Studentova t-distribucija, Fakulteta za farmacijo, Predavanja iz biomedicinske informatike za študente laboratorijske biomedicine, študijsko leto 2006/2007.
42. Kristl A., Plinska kromatografija, Fakulteta za farmacijo, Predavanja iz instrumentalnih tehnik v biomedicinskih laboratorijih za študente laboratorijske biomedicine, študijsko leto 2006/2007.
43. Mandić D.: Primerjava serumskega in foliklovega anti-Mullerjevega hormona med spontanimi in spodbujenimi ciklusi pri pacientkah v postopku zunajtelesne oploditve, Diplomsko naloga, Fakulteta za farmacijo, 2009, 39.

44. McCann S. E., Wactawski-Wende J., Kufel K.: Changes in 2-Hydroxyestrone and 16 α -Hydroxyestrone Metabolism with Flaxseed Consumption: Modification by COMT and CYP1B1 Genotype, <http://cebp.aacrjournals.org/content/16/2/256.full>, (dostopano: september 2010).