

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MEDAR

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTEINOV CYP1B1 IN  
COMT PRI RAKU ENDOMETRIJA**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MEDAR

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTEINOV CYP1B1 IN  
COMT PRI RAKU ENDOMETRIJA**

**EVALUATION OF CYP1B1 AND COMT PROTEIN LEVELS  
IN ENDOMETRIAL CANCER**

DIPLOMSKO DELO  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom izr. prof. dr. Tee Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu, univ. dipl. kem. in somentorici izr. prof. dr. Tei Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem. za vso pomoč pri mojem diplomskem delu.

Vsem članom komisije se iskreno zahvaljujem, da so bili na koncu, ko se je mudilo, na moji strani.

Posebna zahvala gre Neli Hevir. Neli, hvala za spodbudne besede, koristne nasvete in usmerjanje pri praktičnem delu in pisanju diplomskega dela.

Iskrena hvala moji družini za potrpežljivost in podporo skozi ves čas študija. Hvala vsem prijateljem, bivšim sošolkam in sošolcem, ki so mi kakorkoli pomagali na poti do diplome.

Še ena posebna zahvala pa gre Jasni in Sebastianu.

### **Izjava**

**Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom izr. prof. dr. Tee Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem.**

MAJA MEDAR

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: asist. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE .....	I
POVZETEK/ABSTRACT .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
KAZALO SLIK .....	VII
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
1 UVOD .....	1
1.1 KARCINOGENEZA – nastanek rakastih celic .....	1
1.2 RAK ENDOMETRIJA .....	1
1.2.1 Epidemiologija .....	1
1.2.2 Oblike raka endometrija .....	2
1.2.3 Dejavniki tveganja in zaščite, simptomi in zdravljenje raka endometrija .....	4
1.2.4 Vloga spolnih hormonov pri raku endometrija .....	6
1.2.4.1 Endogeni in eksogeni estrogeni .....	6
1.2.4.2 Mehanizmi karcinogenosti estrogenov .....	8
1.3 METABOLIZEM ESTROGENOV .....	9
1.3.1 Fazi metabolizma estrogenov .....	10
1.3.2 Učinki produktov metabolizma estrogenov .....	11
1.3.2.1 2- in 4-hidroksi estrogeni (2-OHE1(E2) in 4-OHE1(E2)) .....	11
1.3.2.2 16 $\alpha$ -hidroksi estrogena (16 $\alpha$ -OHE1(E2)) .....	12
1.3.2.3 Semikinoni, kinoni (SQ, Q) in superoksidni radikali .....	12
1.3.2.4 2- in 4- metoksi estrogeni (2-MeOE1(E2) in 4-MeOE1(E2)) .....	12
1.3.3 Citokromi P450 (CYP) .....	13
1.3.3.1 CYP1B1 .....	13
1.3.4 COMT .....	14
2 NAMEN DELA .....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 MATERIALI .....	17
3.1.1 Kemikalije .....	17
3.1.2 Protitelesa in standardi .....	18
3.1.3 Laboratorijski material .....	19
3.1.4 Laboratorijska oprema .....	19
3.1.5 Raztopine in pufri .....	20
3.2 VZORCI .....	22
3.3 METODE .....	24
3.3.1 Izolacija proteinov .....	24
3.3.2 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi .....	25
3.3.3 Obarjanje proteinov z acetonom .....	26
3.3.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE) .....	27
3.3.6 Western prenos proteinov na membrano .....	29
3.3.7 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL) .....	31
3.3.8 Kvantitativno ovrednotenje filmov .....	32
3.3.9 Barvanje gela z barvilm "Coomassie Brilliant Blue" .....	32
3.3.10 Imunohistokemija .....	33

4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	37
4.1 OPTIMIRANJE METODE ZA IZOLACIJO PROTEINOV .....	37
4.2 IZBIRA USTREZNIH POGOJEV ZA ZAZNAVANJE PROTEINOV .....	39
CYP1B1, COMT IN $\beta$ -AKTINA.....	39
4.2.1 Preizkušanje specifičnosti protiteles proti CYP1B1 in COMT, ter določanje .....primernih koncentracij primarnih in sekundarnih protiteles za zaznavanje proteinov	39
4.2.2 Izbira reagenta za detekcijo z ojačano kemiluminiscenco (ECL) in primerjava . vpliva časa izpostavitev filma na membrani .....	41
4.3 ZAZNAVANJE PROTEINA CYP1B1 V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN KONTROLNEGA ENDOMETRIJA .....	42
4.3.1 Pogoji zaznavanja proteina CYP1B1 .....	50
4.3.2 Statistična obdelava rezultatov razmerja CYP1B1/ $\beta$ -aktin.....	51
4.4 DOLOČANJE PRISOTNOSTI CYP1B1 IN COMT NA RAVNI CELIC Z IMUNOHISTOKEMIJSKO METODO .....	52
4.4.1 Določanje primerne koncentracije protiteles .....	53
4.4.2 Vzorci, ocena obarvanja in statistična obdelava rezultatov .....	55
4.5 PRIMERJAVA Z OBJAVLJENIMI REZULTATI.....	58
5 SKLEP .....	60
6 LITERATURA .....	62
7 PRILOGE.....	66
7.1 PRILOGA 1: Rezultati zaznavanja proteinov CYP1B1 in $\beta$ -aktina. ....	66
7.2 PRILOGA 2: Rezultati zaznavanja proteinov CYP1B1 in COMT na celični ravni (imunohistokemijska metoda).....	68

**POVZETEK/ABSTRACT****UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTEINOV CYP1B1 IN COMT PRI RAKU ENDOMETRIJA**

Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. Njegov nastanek je povezan s prekomernim delovanjem estrogenov v odsotnosti progesterona ali progestinov. Estradiol je ligand za estrogenske receptorje, ter na ta način stimulira celično delitev, je pa tudi substrat za encime prve faze metabolizma, pri kateri lahko nastanejo karcinogeni metaboliti, odgovorni za različne poškodbe DNA. V okviru diplomske naloge smo ugotavljali ali je količina proteinov CYP1B1 in COMT (predstavnikov prve oksidacijske in druge konjugacijske faze metabolizma estrogenov) pri raku endometrija spremenjena. Prisotnost CYP1B1 in hišnega proteina  $\beta$ -aktina smo določali v 28 parih vzorcev tumorskega in okolnega kontrolnega tkiva endometrija. Najprej smo proteine izolirali, nato pa uporabili SDS-PAGE elektroforezo, prenos western in detekcijo s kemiluminiscentno svetlobo. Po primerjavi razmerja proteinov CYP1B1/ $\beta$ -aktin v tumorskem in kontrolnem tkivu smo določili statistično značilno razliko ( $p<0,05$ ). Količina CYP1B1 je bila v tumorskem tkivu manjša kot v kontrolnem tkivu, kar nakazuje, da ta protein v rakavem tkivu endometrija morda nima tako pomembne vloge, pomemben pa je lahko pri iniciaciji karcinogeneze v predrakavem oziroma v hiperplastičnem tkivu. Tudi na ravni celic smo z imunohistokemijskim barvanjem določili statistično značilno razliko ( $p<0,05$ ). V 9 tumorskih in netumorskih vzorcih endometrija smo zaznali manj CYP1B1 v rakavem endometriju. Razlika v količini CYP1B1 v tumorskem in kontrolnem tkivu endometrija je bila zanemarljiva. Na celični ravni smo v 17 vzorcih raka endometrija in 9 vzorcih kontrolnega endometrija, preverili tudi prisotnost proteina COMT. Ugotovili smo, da je v tumorskem tkivu količina proteina COMT manjša kot v kontrolnem tkivu, razlika pa v tem primeru ni bila statistično značilna. Tudi s primerjavo tumorskih in netumorskih vzorcev nismo našli razlik v količini COMT. Rezultati kažejo, da je rak endometrija lahko povezan z zmanjšanim zaščitnim delovanjem proteina COMT. Za potrditev naših rezultatov, bi bilo v prihodnje raziskavo smiselno izvesti še na večjem številu vzorcev.

**EVALUATION OF CYP1B1 AND COMT PROTEIN LEVELS IN ENDOMETRIAL CANCER**

Endometrial carcinoma is an estrogen-dependent form of cancer. It is a disease primarily driven by cumulative exposure to estrogens unopposed by progesterone or progestins. 17 $\beta$ -estradiol is a ligand of the estrogen receptor and a substrate of the phase I oxidative metabolism enzymes. It stimulates cell proliferation via the estrogen receptor and causes DNA damage via its carcinogenic oxidation products. In our study we evaluated, if the presence of the enzymes CYP1B1 and COMT (representatives of estrogen oxidative metabolism phase I and conjugating phase II enzymes) is altered in cancerous tissue. The presence of CYP1B1 and a housekeeping protein  $\beta$ -actin was analyzed in 28 pair samples of cancerous and adjacent control endometrium. We isolated the proteins and analyzed them by SDS-PAGE electrophoresis, Western blot analysis and enhanced chemiluminescence detection. Comparing cancerous and control tissue CYP1B1/ $\beta$ -actin ratio, we found a statistically significant difference ( $p<0,05$ ). The quantity of CYP1B1 in cancerous tissue was lower compared to control endometrium, which indicates that CYP1B1 has less important role in cancerous endometrium, while in pre-cancerous or hyperplastic tissue CYP1B1 may be involved in initiation of carcinogenesis. Also immunohistological staining of 9 pair samples of cancerous and non-cancerous endometrium revealed lower levels of CYP1B1 at the cellular level. The difference was statistically significant ( $p<0,05$ ). We found almost no difference between samples of cancerous and control endometrium. We also evaluated COMT levels in 17 samples of endometrial cancer and 9 samples of control endometrium by immunohistological staining. We found lower levels of COMT protein in cancerous tissue compared to control endometrium and almost no difference between paired samples of cancerous and non-cancerous endometrium. This data indicates lower protective effect of COMT in endometrial cancer. However, further studies on a larger number of samples are needed to confirm our results.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

2-MeOE1(E2) / 4-MeOE1(E2)	2-metoksi / 4-metoksi estron (estradiol)
2-OHE1(E2) / 4-OHE1(E2)	2-hidroksi / 4-hidroksi estron (estradiol)
16 $\alpha$ -OHE1(E2)	16 $\alpha$ -hidroksi estron (estradiol)
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza
A	absorbanca
Ala	alanin
APS	amonijev persulfat
Arg	arginin
Asn	asparagin
BSA	goveji serumski albumin
CE1 / CE2	katehol estron / katehol estradiol
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CYP 450	citokrom P450
DAB	3, 3', 3` diaminobenzidin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E1	estron
E2	estradiol
ECL	ojačana kemiluminiscenca
ER	estrogenski receptor
G1/ G2/ G3	visoka/ srednja/ nizka stopnja histološke diferenciacije
Gly	glicin
GSH	glutation
GSTP	glutation S-transferaza P
HepG2	nesmrtna celična linija človeških jetrnih celic (hepatom)
HER-2/neu	receptor 2 za človeški epidermalni rastni faktor ("human epidermal growth factor receptor 2")
HRP	hrenova peroksidaza

JEG3	nesmrtna celična linija placentnih celic (horiokarcinom)
<i>K-RAS</i>	retrovirusni onkogen ("Kirsten rat sarcoma virus")
<i>P16 , P53</i>	gena, ki kodirata protein 16 in protein 53
Leu	levcin
MB-COMT	membranski COMT
MCF-7	celična linija raka dojke
Met	metionin
MSI	mikrosatelitna nestabilnost
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PAP	peroksidaza anti peroksidaza kompleks
PBS	fosfatni pufer ("phosphate-buffered saline")
PTEN	homolog fosfataze in tenzina
PVDF	poliviniliden difluorid
Q	kinon
REP	raztopina za ekstrakcijo proteinov
ROS	reaktivne kisikove spojine
S-COMT	citosolna, topna oblika COMT
SDS	natrijev dodecil sulfat
Ser	serin
SQ	semikinon
SULT	sulfotransferaza
SZO	svetovna zdravstvena organizacija
T, N	vzorec tumorskega in kontrolnega okolnega tkiva endometrija
TCA	triklorocetna kislina
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	trishidroksietilaminometan
UDP-glukuronil transferaza	uridin-difosfat-glukuronil-transferaza
Val	valin

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Biosinteza estrogenov iz androstendiona in testosterona.....	7
<b>Slika 2:</b> Mehanizem karcinogeneze inducirane z estrogeni .....	9
<b>Slika 3:</b> Metabolizem estrogenov in nastanek DNA aduktov .....	11
<b>Slika 4:</b> Aparatura za SDS PAGE .....	29
<b>Slika 5:</b> Priprava "sendviča" za prenos proteinov na membrano .....	31
<b>Slika 6:</b> Splošna reakcija detekcije z ojačano kemiluminiscenco .....	32
<b>Slika 7:</b> Specifičnost protiteles proti CYP1B1 .....	40
<b>Slika 8:</b> Specifičnost protiteles proti COMT .....	41
<b>Slika 9:</b> Detekcija CYP1B1: Primerjava vpliva časa izpostavitve filma kemiluminiscentni svetlobi .....	42
<b>Slika 10:</b> Zaznavanje proteinov CYP1B1 in $\beta$ -aktina v 28 parih vzorcev raka endometrija in okolnega kontrolnega tkiva.....	48
<b>Slika 11:</b> Graf z logaritemsko skalo razmerja tumor (CYP1B1/ $\beta$ -aktin)/kontrola (CYP1B1/ $\beta$ -aktin) za 25 vzorcev.....	49
<b>Slika 12:</b> Graf z logaritemsko skalo razmerja tumor (CYP1B1/ $\beta$ -aktin)/kontrola (CYP1B1/ $\beta$ -aktin) za 25 vzorcev glede na diferenciacijo tkiva .....	50
<b>Slika 13:</b> Stolpični grafikon razmerja CYP1B1/ $\beta$ -aktin za 25 parov vzorcev .....	51
<b>Slika 14:</b> Graf vrednosti razmerij CYP1B1/ $\beta$ -aktin za tumorske in kontrolne vzorce, s prikazanima povprečnima vrednostima in standardnima napakama .....	52
<b>Slika 15:</b> Imunohistokemijsko barvanje CYP1B1 parafinskih rezin raka endometrija in kontrolnega endometrija .....	54
<b>Slika 16:</b> Imunohistokemijsko barvanje COMT parafinskih rezin raka endometrija in kontrolnega endometrija .....	55
<b>Slika 17:</b> Grafa vrednosti ocen obarvanosti za CYP1B1 in COMT v neparnih tumorskih in kontrolnih žleznih epitelijskih celicah, s prikazanimi povprečnimi vrednostmi in standardnimi napakami .....	57
<b>Slika 18:</b> Grafa vrednosti ocen obarvanosti za CYP1B1 in COMT v parnih tumorskih in netumorskih žleznih epitelijskih celicah, s prikazanimi povprečnimi vrednostmi in standardnimi napakami .....	57

**KAZALO PREGLEDNIC**

<b>Preglednica I:</b> Primerjava genetskih sprememb pri tipu I in tipu II raka endometrija .....	3
<b>Preglednica II:</b> Podatki o vzorcih raka endometrija.....	23
<b>Preglednica III:</b> Podatki o vzorcih endometrija bolnic z miomi.....	23
<b>Preglednica IV:</b> Primerjava koncentracij proteinov v vzorcih T26 in N26 v PBS, v REP po odstranjevanju topila v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem in v REP po obarjanju z acetonom, ter odstranjevanju topila v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem.....	37
<b>Preglednica V:</b> Koncentracije in mase proteinov, izoliranih iz 28 vzorcev tumorskega in okolnega kontrolnega tkiva.....	38
<b>Preglednica VI:</b> Razmerje CYP1B1 tumor/ kontrolni endometrij za posamezen vzorec ....	48
<b>Preglednica VII:</b> Povprečne ocene obarvanosti žleznih epitelijskih in stromalnih celic v parafinskih rezinah vzorcev raka endometrija in kontrolnega endometrija za CYP1B1 in COMT .....	56
<b>Preglednica VIII:</b> Rezultati kvantitativnega vrednotenja filmov s programom UVI-Band.....	67
<b>Preglednica IX:</b> Ovrednotenje obarvanosti žleznih epitelijskih in stromalnih celic v parafinskih rezinah vzorcev raka endometrija in kontrolnega endometrija za CYP1B1 in COMT za posamezen vzorec .....	69

## 1 UVOD

### 1.1 KARCINOGENEZA – nastanek rakastih celic

Karcinogeneza je dolgotrajen in zapleten proces. Sestavlja ga tri osnovne stopnje: iniciacija, promocija in progresija. Po iniciaciji karcinogenih sprememb še ne govorimo o rakasti celici, kajti za to je potrebna še faza promocije, ko se spremenjena celica deli in tako izraža vse pridobljene nove lastnosti. Dejavnike, ki so sposobni izzvati nastanek rakaste celice, imenujemo karcinogeni dejavniki (1).

Karcinogene snovi delimo v dve skupini:

1. Genotoksični karcinogeni (iniciatorji):

- Primarni: delujejo direktno na DNA.
- Sekundarni: delujejo na DNA posredno, preko svojih reaktivnih metabolitov.

2. Epigenetski karcinogeni:

- Promotorji: niso karcinogeni sami po sebi, vendar povečajo verjetnost nastanka raka iz gensko poškodovanih celic. V to skupino spadajo tudi hormoni, ki so pomembni pri od hormonov odvisnih oblikah raka.
- Ko-karcinogeni: niso karcinogeni sami po sebi, vendar povečajo učinek genotoksičnih snovi ob hkratni prisotnosti obeh (2).

### 1.2 RAK ENDOMETRIJA

Rak endometrija (maternične sluznice) je od hormonov odvisna oblika raka. V to skupino spadajo tudi rak dojke, jajčnika, prostate, testisov, ščitnice in osteosarkom. Imajo skupen mehanizem karcinogeneze, v katerega so vpleteni hormoni, endogeni in eksogeni, ki povečajo število delitev celic in povečajo verjetnost nastanka naključnih genetskih napak (3).

#### 1.2.1 Epidemiologija

Rak endometrija je bolezen žensk po menopavzi. V svetu je 91 % na novo obolelih žensk

starejših od 50 let. Največja pojavnost je v Severni Ameriki (22,0) in Evropi (11,8-12,5/ 100 000 žensk). Leta 2002 so v svetu odkrili 198 783 novih primerov te bolezni, kar predstavlja 3,9 % vseh rakavih obolenj pri ženskah. Petletno relativno preživetje je v ZDA 86 %, v Evropi pa 78 % (4).

V Sloveniji je rak endometrija peto najpogosteje rakavo obolenje pri ženskah in je prvi med raki ženskega reproduktivnega trakta. Leta 2007 je zbolelo 296 žensk (28,90/ 100 000 prebivalk), umrlo pa 45. Ocena za leto 2010 napoveduje 31 na novo zbolelih žensk na 100 000 prebivalk (5). V obdobju 1991-2005 je zbolelo 3 942 žensk. Več kot 70 % bolnic je zbolelo med 50. in 74. letom starosti. Petletno relativno preživetje je bilo 83 % (6).

### 1.2.2 Oblike raka endometrija

Najzgodnejša stopnja v razvoju raka endometrija je žlezna hiperplazija. Zaradi nepravilnih krvavitev se endometrij ne izloči v celoti, zato je preostalo tkivo izpostavljeno trajnemu delovanju estrogenov in lahko se razvijejo žarišča kompleksne hiperplazije, ki lahko kasneje povsem nadomestijo navadno hiperplazijo. Kompleksna hiperplazija se razlikuje od navadne predvsem v enotni arhitekturi žlez. Mehanizem nastanka raka iz hiperplazije še ni povsem pojasnjen (7).

V približno 90 % primerov se rak endometrija razvije naključno, v preostalih 10 % pa gre za dedno obliko bolezni. Glede na klinične in histopatološke značilnosti rak endometrija, ki se razvije naključno, delimo v dve skupini (8, 9).

**Tip I** je endometroidni rak endometrija, ki obsega 80 % vseh rakov endometrija. Najpogosteje ga ugotovimo pri perimenopavznih in zgodnje pomenopavznih ženskah. Povezan je z učinkovanjem estrogenov in najpogosteje vznikne iz hiperplazije. Pogosto so ti tumorji dobro in zmerno diferencirani (G1 ali G2), redko invazivno rastejo v miometrij in imajo dobro prognozo. Ta tip raka je povezan s številnimi znanimi dejavniki tveganja, kot so delovanje estrogenov v odsotnosti progesterona in/ali progestinov, policistični ovariji in debelost.

**Tip II** ali neendometrioidni rak endometrija (velikokrat serozni ali svetlocelični) večkrat ugotovimo pozno po menopavzi. Ni povezan z učinkovanjem estrogenov, ne vznikne iz hiperplastično spremenjenega endometrija, temveč nastane *de novo* v atrofičnem endometriju. Nemalokrat je slabo diferenciran (G3) z globokim prodom v miometrij in ima slabo napoved izida zdravljenja (10, 11).

Za oba tipa so značilne tudi genetske spremembe. Pri tipu I je najpogosteje spremenjen tumor zavirajoči gen *PTEN*, druga pomembna sprememba pa je mikrosatelitna nestabilnost. Le-ta je posledica mutacij v popravljalnih genih ("mismatch repair genes"), ki niso več sposobni kodiranja normalnih popravljalnih proteinov. Pri tipu II je najbolj pogosta mutacija tumor zavirajočega gena *P53* ("varuh genoma"), ki preprečuje delitev celic s poškodovano DNA in povečana ekspresija gena *HER2/NEU*. *HER2/NEU* je onkogen, ki kodira transmembranski receptor, vključen v celično sporočanje. Genetske spremembe se pojavljajo tudi na onkogenu *K-RAS*, ki je vključen v celično sporočanje, na *P16* tumor zavirajočem genu, ki uravnava celični cikel, pa tudi na proteinih β-kateninu in E-kadherinu, ki sta odgovorna za normalno adhezijo celic (8, 9).

**Preglednica I:** Primerjava genetskih sprememb pri tipu I in tipu II raka endometrija.

Sprememba	Posledica	Tip I (%)	Tip II (%)
mutacija <i>K-RAS</i>	rast in diferenciacija tumorja	15-30	0-5
prekomerno izražanje <i>HER2/NEU</i>	progresija in dediferenciacija tumorja	10-20	9-30
mutacija β-katenina in E-kadherina	napake v stikih med celicami, potencial za tvorbo metastaz	31-47	0-3
inaktivacija <i>PTEN</i>	nenadzorovana rast in migriranje celic	35-50	10
mutacija <i>P53</i>	delitev nenormalnih celic	10-20	90
inaktivacija <i>P16</i>	nenadzorovana celična rast	10	40
mikrosatelitna nestabilnost (MSI)	genetska nestabilnost	20-40	0-5

Prir. po (8, 9).

### 1.2.3 Dejavniki tveganja in zaščite, simptomi in zdravljenje raka endometrija

#### Dejavniki tveganja, za nastanek raka endometrija:

- zgodnja prva menstruacija in pozna menopavza:

V študiji, ki so jo izvajali v obdobju 1976-2004 in je vključevala 121 700 žensk ("Nurses' Health Study", 12), so ugotovili, da so ženske, ki so prvo menstruacijo dobole pri starosti  $\leq 11$  let, imele za 34 % večje tveganje, kot ženske, ki so jo dobole pri starosti  $\geq 15$  let. Ženske, pri katerih je menopavza nastopila pri starosti  $\geq 55$  let, pa so imele za 53 % večje tveganje, kot tiste, ki so bile ob nastopu menopavze stare 45-49 let. Oba dejavnika povečujeta tveganje zaradi daljšega življenjskega obdobja, ko je ženska izpostavljena delovanju endogenih estrogenov. Poleg tega je za zgodnjo in pozno reproduktivno fazo življenja, značilno moteno delovanje progesterona zaradi anovulatornih ciklov.

- debelost:

V maščobnem tkivu poteka pretvorba androstendiona v estron, ki se nato pretvori v aktivnejši estradiol. Ženske s povečano telesno težo imajo zmanjšano kapaciteto globulina, ki veže spolne hormone ("sex hormone binding globulin" – SHBG), zato se pojavlja relativni presežek prostega estradiola. Najbolj ogrožene so ženske, pri katerih je maščobno tkivo zbrano v zgornjem delu telesa.

- zdravila (tamoksifen):

Zdravilo pri ženskah z rakom dojke zavira proliferativni učinek estrogenov in s tem napredovanje raka. Tamoksifen na tkivo mlečnih žlez deluje kot antagonist ER, na endometrij pa kot agonist ER. Ocenjujejo, da letno za rakom endometrija zboli 16 od 10 000 uporabnic tamoksifena.

- peroralna kontracepcija sredstva z vsebnostjo estrogenov, brez progestinov
- nadomestna hormonska terapija brez dodanih progestinov (7, 12, 13).

#### Dejavniki zaščite, ki zmanjšajo tveganje za nastanek raka endometrija:

- nosečnost (med nosečnostjo so ženske zaradi povečane sinteze progesterona zaščitene pred delovanjem estrogenov)
- večje število porodov (več nosečnosti)
- zadnji porod v kasnejših letih starosti:

Karageorgi in sod. so v študiji (12) ugotovili, da so ženske, ki so rodile zadnjega otroka pri starosti  $\geq 40$  let, imele za 49 % manjše tveganje, kot tiste, ki so zadnjega otroka rodile med 25-29 letom starosti. Starost ženske pri prvem porodu ni bila v povezavi s tveganjem.

- kombinirani peroralni kontraceptivi s progestini:

Kombinirani peroralni kontraceptivi pri neprekinjenem 5-letnem jemanju zmanjšajo tveganje raka endometrija za 54 %, pri neprekinjeni uporabi 12 let in več pa za 72 %.

Zaščita deluje 10 let po prenehanju jemanja.

- kajenje:

Kajenje deluje zaščitno, še posebej pri ženskah s čezmerno telesno težo. Vendar pa je to zaščitno delovanje zanemarljivo v primerjavi s številnimi škodljivimi učinki in tveganji kajenja (12, 13).

## **Simptomi**

Do 20 % bolnic z rakom endometrija nima ob ugotovitvi bolezni nobenih simptomov. Najpogostejši simptom invazivne bolezni je krvavitev v postmenopavzi. Napredovalo bolezen napovedujejo bolečine v spodnjem delu trebuha in gnojen ali krvavkast izcedek iz nožnice. Nekroza tumorja lahko povzroči porast temperature in znake peritonealnega draženja (14).

## **Zdravljenje**

Način zdravljenja raka endometrija se določi glede na stadij bolezni, histološki tip in diferenciranost tumorskih celic ter splošno bolničino stanje. Standardna je kirurška odstranitev maternice z adneksi, z odstranitvijo medeničnih bezgavk (pelvična limfadenektomija) in odvzemom vzorca za citološko analizo. Kirurško zdravljenje lahko opravijo pri 80 % rakavih bolnic. V zadnjih letih se v kirurškem zdravljenju vse bolj uveljavlja kombinirani laparoskopsko-vaginalni pristop: v laparoskopskem delu ocenijo stanje v trebušni votlini, napravijo pelvično limfadenektomijo, sprostijo adnekse in podvežejo maternične žile; maternico odstranijo skozi nožnico. Bolnice, ki jim splošno stanje ne dopušča operacije, zdravijo s kombinacijo teleradioterapije in brahiradioterapije. Obstaja

tudi možnost zdravljenja s progestini, ki je uspešno pri tumorjih z estrogenskimi in progesteronskimi receptorji (13).

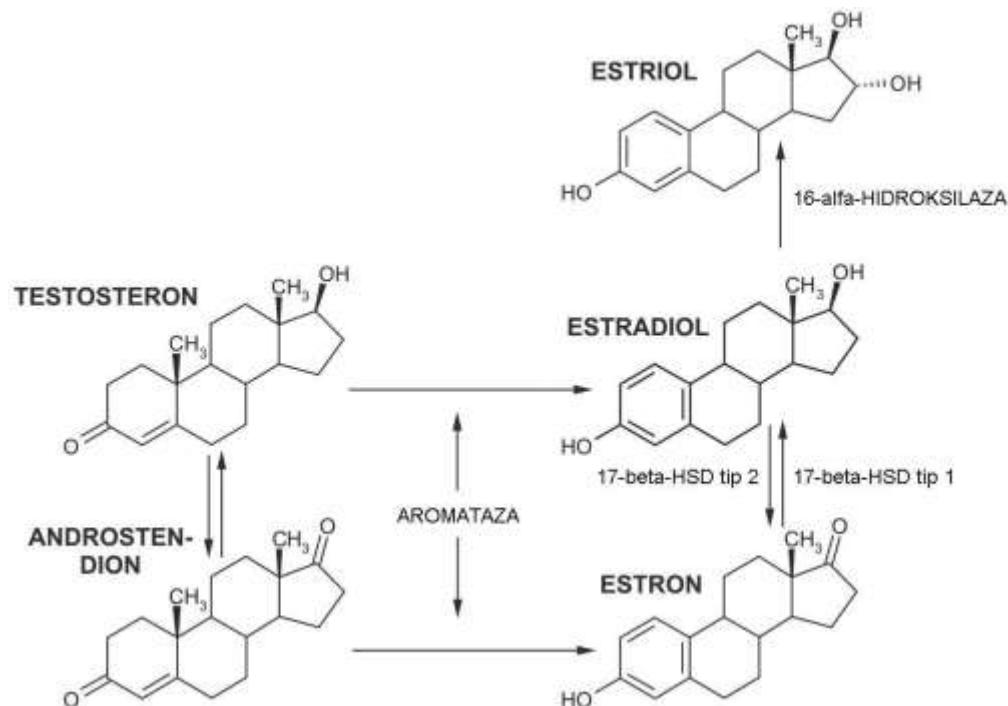
#### 1.2.4 Vloga spolnih hormonov pri raku endometrija

Po splošno sprejeti hipotezi zvišana koncentracija endogenih ali eksogenih estrogenov ob znižani koncentraciji endogenih ali eksogenih progestagenov vodi do delitev endometrijskih celic in s tem večje možnosti naključnih napak pri podvojevanju DNA, ki lahko vodijo do hiperplazije endometrija in raka endometrija. Estrogeni spodbujajo proliferacijo žleznega epitelija, medtem ko progesteron nasprotuje delovanju estrogenov in preusmerja celice strome in žleznega epitelija v diferenciacijo (11). V endometrijskih rakavih celicah estrogeni preko rastnih faktorjev povečujejo ožiljenje tumorja, medtem ko ga progesteron zmanjšuje. Estrogeni tudi inducirajo izražanje gena za telomerazo, ki omogoča neuravnnavano rast rakavih celic. Gen za telomerazo je v večini normalnih diferenciranih celic utišan, zato encim ne nastaja. Encim telomeraza pa nastaja v rakavih celicah, kjer zagotavlja neskončno število celičnih delitev. Progesteron nasprotuje delovanju estrogenov in zmanjšuje izražanje gena za telomerazo (1, 10).

##### 1.2.4.1 Endogeni in eksogeni estrogeni

###### Endogeni estrogeni

Pri ženskah pred menopavzo so glavni vir estrogenov, ki krožijo v telesu, celice granuloze jajčnikov. Izhodna spojina za sintezo estrogenov je holesterol. Po menopavzi pa estrogeni nastajajo s pretvorbo androgenov nadledvične žleze in jajčnikov. Pretvorba androgenov v estron poteka v perifernih tkivih, še posebej v koži, mišičnem in maščobnem tkivu, v kosteh, ter v rakavem tkivu dojk ali endometrija. Nenosredna prekurzorja estrogenov sta androgena – androstendion ali testosteron (2, 16). Njuno pretvorbo v estrogene katalizira encim aromataza (18). Glavni endogeni estrogeni pri človeku so estradiol, estron in estriol (2). Pretvorbo estrona v aktivni estradiol katalizira encim  $17\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 1 ( $17\beta$ -HSD tip 1), ki deluje kot reduktaza. Pretvorbo estradiola v estron pa katalizira  $17\beta$ -HSD tip 2, ki deluje kot oksidaza (11, 18).



**Slika 1:** Biosinteza estrogenov iz androstendiona in testosterona. Prir. po (17).

Estrogeni so močno lipofilni, zato se po krvi prenašajo v obliki sulfata (estrone), ali pa se vežejo na globuline za vezavo spolnih hormonov (estradiol) ali na albumin. V ciljnih organih se sulfatni del odstrani s steroid-sulfatazo (17). Najmočnejši proliferativni učinek na endometrij ima estradiol. Estronev učinek je blag, estriol pa ga sploh nima (7).

Posledica povečane periferne pretvorbe androgenov v estrogene ali vnosa eksogenih estrogenov je povečana serumska koncentracija estrogenov. Le-ta pa povečuje tveganje za nastanek raka dojke in maternice (16, 19). Pri ženskah, pri katerih so se razvile novotvorbe, je bila plazemska koncentracija E2, androgenov nadledvične žlez in testosterona višja, kot pri ženskah, pri katerih se novotvorbe niso razvile (16).

### Eksogeni estrogeni

Eksogeni estrogeni se uporabljajo v različne namene:

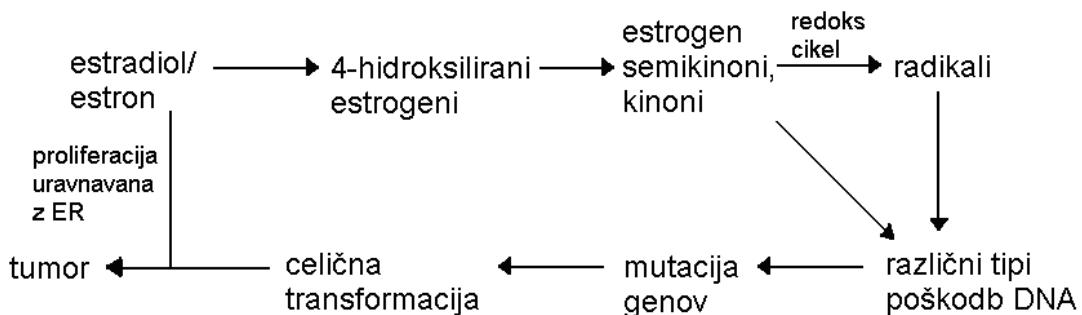
- odrasle ženske s primarno amenorejo – estrogeni v kombinaciji s progesteronom spodbujajo umetni ciklus
- spolno zrele ženske – kontraceptivi

- menopavza ali obdobje po njej – estrogenska nadomestna terapija ublaži simptome menopavze in izgubo kostne mase (2).

Estrogensko nadomestno zdravljenje lajša simptome menopavze, preprečuje osteoporozo, Alzheimerjevo bolezen in morda tudi srčno-žilne bolezni, ter znižuje tveganje za benigni adenom in rak debelega črevesa za 30-40 %. Leta 2002 so predčasno prekinili klinično študijo Pobude za zdravje žensk ("The Women's Health Initiative" – WHI), v kateri so ugotavljali koristi in tveganja dolgoročne uporabe kombiniranega hormonskega nadomestnega zdravljenja (estrogeni + progestini) pri postmenopavznih ženskah z nespremenjeno maternico. Do prekinitve je prišlo, ker so pri ženskah, ki so prejemale estrogensko nadomestno terapijo, ugotovili občutno povečano tveganje za razvoj invazivnega raka dojke in večjo pojavnost srčno-žilnih bolezni in možganske kapi, v primerjavi z ženskami, ki so prejemale placebo. Slabost študije je bila, da so v študijo vključili starejše ženske, ki so bile že več let v menopavzi. Kasneje je Nacionalni toksikološki program Nacionalnega inštituta za okoljevarstveno-zdravstvene vede ("The National Toxicology Program of National Institute of Environmental Health Sciences") razglasil, da so endogeni in eksogeni steroidni estrogeni karcinogeni, ki povzročajo rak dojke in endometrija (10, 13, 21).

#### **1.2.4.2 Mehanizmi karcinogenosti estrogenov**

Karcinogenezesa je postopen proces, ki se začne z genotoksičnim delovanjem (iniciacija), sledi pa mu povečana celična proliferacija (promocija). Estradiol in njegovi oksidativni metaboliti so karcinogeni, odgovorni za iniciacijo in napredovanje tumorja. Estradiol ima dvojno vlogo. Je substrat za encime prve faze metabolizma, kjer nastanejo 2-hidroksilirani in 4-hidroksilirani estrogeni. Ti lahko vstopajo v reakcije, v katerih nastajajo reaktivni kinoni in radikali, ki lahko povzročijo različne poškodbe DNA. Estradiol pa je tudi ligand za ER, ki na ta način stimulira celično delitev in izražanje genov (19, 23).



Slika 2: Mehanizem karcinogeneze inducirane z estrogeni. Prir. po (19).

Poleg učinkov estrogenov preko vezave na ER in učinkov njihovih oksidativnih metabolitov, ima na karcinogeno vpliv še tretji mehanizem, pojav anevploidnosti (pojav spremenjenega števila kromosomov) (18). Njegov nastanek inducirajo estrogeni, ki povzročajo tudi strukturne spremembe kromosomov. Anevploidnost je del genske nestabilnosti, ki inducira celično transformacijo in je potrebna za razvoj raka (19).

### 1.3 METABOLIZEM ESTROGENOV

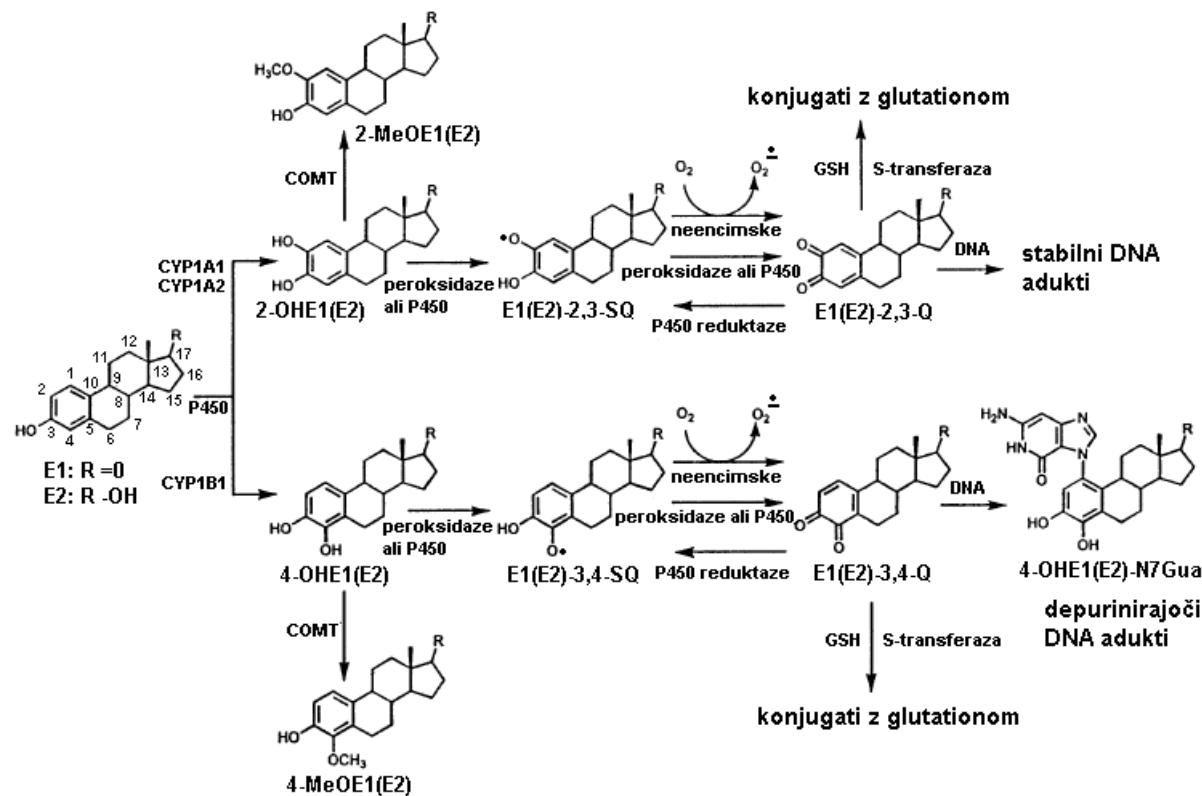
Endogeni in eksogeni estrogeni se metabolizirajo z encimi 1. in 2. faze v reakcijah oksidacije z encimi citokrom P450, glukuronidacije z UDP-glukuronil transferazami, sulfatiranja s sulfotransferazami (SULT) in konjugacije z glutation S-transferazo (GSTP1) in O-metiliranja s COMT. Estrogeni se po metabolnih pretvorbah v estrogensko neaktivne metabolite iz telesa izločijo z urinom (24).

Plazemske koncentracije estrogenov so nizke, tkivne koncentracije estrogenov pa s koncentracijo cirkulirajočih estrogenov niso direktno povezane (26). Pri postmenopavznih ženskah je koncentracija E2 v rakavem tkivu dojke 10 - 50-krat višja od plazemske koncentracije, kar kaže na lokalno sintezo E2. Ta je substrat za CYP1B1, zato zvišana tkivna koncentracija E2 vodi v povečano nastajanje genotoksičnih metabolitov, ki povzročijo nastanek raka (30). Več kot 80 % celokupnih estrogenov v tkivu dojke predstavlja hidroksilirana oblika, 4-hidroksilazno aktivnost pa so našli v normalnem in tumorskem tkivu dojke (22, 26).

### 1.3.1 Fazi metabolizma estrogenov

Metabolizem estrogenov sestavlja dve stopnji: 1. oksidacijska faza in 2. konjugacijska faza. V 1. fazi poteka oksidacija estrogenov. Med encimi, ki delujejo v tej fazi (več specifičnih izoblik CYP in različne peroksidaze), sta tudi encima CYP1A1 in CYP1B1, ki katalizirata oksidacijo estrogenov v katehol estrogene (CE): 2-hidroksi estrogene (2-OHE) in 4-hidroksi estrogene (4-OHE). Le-te encimi oksidirajo v estrogen semikinone (E-2,3-SQ, E-3,4-SQ) in nadalje v kinone (E-2,3-Q, E-3,4-Q). Močno reaktivni Q v reakciji Michaelove adicije tvorijo produkte z deoksiribonukleozidi. Kot mnogi kemični karcinogeni, imajo tudi Q sposobnost tvorbe kovalentnih vezi z DNA, pri čemer nastajajo Q-DNA adukti (npr. 4-OHE-N7-gvanin). SQ in Q nato vstopajo v redoks cikel, v katerem nastajajo reaktivne kisikove spojine (ROS), ki povzročajo oksidativne poškodbe DNA.

V 2. fazi encimi ublažijo genotoksičnost estrogenskih metabolitov. COMT katalizira metiliranje CE v metoksi estrogene (2-MeOE, 4-MeOE), na ta način pa zmanjša nastajanje Q. GSTP1 katalizira reakcijo konjugacije Q z glutationom (GSH), v kateri nastanejo GSH-E konjugati, SULT pa katalizira reakcijo sulfatiranja, v kateri nastanejo sulfati estrogenov. Na ta način se zmanjša prisotnost Q, s tem pa tudi zmanjša verjetnost nastanka poškodb DNA (23).



Slika 3: Metabolizem estrogenov in nastanek DNA aduktov. Prir. po (23, 25).

### 1.3.2 Učinki produktov metabolizma estrogenov

Metabolizem E2 in E1 poteka preko dveh glavnih poti:  $16\alpha$ -hidroksilacije (slika 1) ter 2- in 4-hidroksilacije, pri čemer nastanejo 2-OHE1(E2) in 4-OHE1(E2) (25). Estrogeni in njihovi metaboliti inducirajo MSI, ROS in neoplastične transformacije žleznih celic endometrija v naslednjem zaporedju: 4-OHE1(E2) > E1(E2) > 2-OHE1(E2) (15).

#### 1.3.2.1 2- in 4-hidroksi estrogeni (2-OHE1(E2) in 4-OHE1(E2))

Na modelu sirijskega zlatega hrčka so ugotovili karcinogenost 4-OHE2, ki je povzročil nastanek raka na ledvicah, za 2-OHE2 pa karcinogenega učinka niso potrdili (22). Pri miših, ki so prejemale 4-OHE2, je bila pojavnost endometrijskega adenokarcinoma 9-krat večja, kot pri miših, ki so prejemale E2 (15). 4-OHE1(E2) imata enako afiniteto do ER kot E1(E2), vendar je njuna disociacija iz ER počasnejša. 2-OHE1(E2) imata manjšo afiniteto do ER kot

E1(E2) in zato ne delujeta estrogeno. Pri raku dojke 4-OHE1(E2) povečujeta tveganje za njegov nastanek, medtem ko imata 2-OHE1(E2) zaščitno vlogo (26).

### **1.3.2.2 16 $\alpha$ -hidroksi estrogena (16 $\alpha$ -OHE1(E2))**

Tudi 16 $\alpha$ -OHE1(E2) povezujejo s povečanim tveganjem za nastanek raka dojke. Je genotoksičen, povzroča nenormalne delitve celic in naj bi se celo kovalentno vezal na ER (26).

### **1.3.2.3 Semikinoni, kinoni (SQ, Q) in superoksidni radikali**

CE se najprej oksidirajo v SQ, ki so radikali. Ti lahko reagirajo s tripletnim kisikom, pri čemer nastajajo Q in superoksidni radikali, ki lahko v redoks ciklu nastajajo konstantno, že iz majhnih količin CE. Ti metaboliti porušijo redoks ravnotežje, in povzročajo oksidativne poškodbe DNA, pa tudi lipidno peroksidacijo, če pride do redukcije superoksidnih radikalov v vodikov peroksid in nadalje v hidroksilne radikale (22, 30). Q pa so elektrofilni intermediati, ki se kovalentno vežejo na DNA in tvorijo depurinirajoče adukte. Apurinska mesta v kritičnih genih lahko spodbudijo mutacije, ki sprožijo nastanek raka. Tak mehanizem je mogoč v več vrstah raka, vključno z rakom dojk, endometrija, jajčnikov, prostate in morda možganov (25).

### **1.3.2.4 2- in 4- metoksi estrogeni (2-MeOE1(E2) in 4-MeOE1(E2))**

Nastanek teh metabolitov katalizira COMT. 2-MeOE1(E2) je protitumorni endogeni metabolit E1(E2), povečana metilacija 4-OHE1(E2) pa poveča izločanje hormonsko aktivnega in prokarcinogenega CE1(E2) metabolita iz telesa. Oba omenjena učinka COMT ščitita pred razvojem od estrogenov odvisnega raka tarčnih organov, vključno z rakom endometrija. Tu ima zaščitno vlogo tudi progesteron, ki inducira izražanje COMT v celicah endometrija (15).

### 1.3.3 Citokromi P450 (CYP)

Citokromi P450 predstavljajo multigensko družino konstitutivnih in inducibilnih encimov. Imajo glavno vlogo pri oksidativni metabolni aktivaciji in detoksifikaciji ksenobiotikov in endogenih spojin, ki so aktivne v celičnem uravnavanju in celičnem sporočanju, vključno z arahidonsko kislino, steroidnimi hormoni in maščobnimi kislinami. Večina teh encimov je primarno prisotna v jetrih, nekatere oblike pa so prisotne tudi v specifičnih ekstrahepatičnih tkivih.

Reakcijo hidroksilacije estrogenov katalizira več encimov iz družine CYP. CYP1A1 in CYP1B1 v jetrih nista izražena v velikih količinah (26). Oba pa sta prisotna v ekstrahepatičnih tkivih, kjer katalizirata oksidacijo estrogenov (15, 26). CYP1A1 deluje kot 2, 4 ali 16 $\alpha$ -hidroksilaza, vendar je 2-hidroksilazna aktivnost najbolj izražena. CYP1B1 deluje kot 2 in 4-hidroksilaza, najbolj izražena pa je 4-hidroksilazna aktivnost. CYP1B1 ne prispeva k 16 $\alpha$ -hidroksilaciji. Izmed jetrnih CYP encimov, imata največjo 16 $\alpha$ -hidroksilazno aktivnost CYP2C19 in CYP3A5. Pomembno vlogo v jetrih ima CYP1A2, ki je izmed vseh CYP encimov prisotnih v jetrih, najbolj aktiven pri 2-hidroksilaciji, prispeva pa tudi k 4-hidroksilaciji (26).

#### 1.3.3.1 CYP1B1

CYP1B1 je sestavni del aktivacijskega sistema, ki spodbuja nastajanje raka (27). Močno izražen je v estrogenskih tarčnih tkivih, vključno z mlečnimi žlezami, jajčnikom in maternico (24). Je encim s specifično 4-hidroksilazno aktivnostjo, ki je odgovorna za nastanek 4-OHE2. Le-ta je prevladujoč v rakavih tkivih (24, 25). Gen, ki kodira CYP1B1 je izražen konstitutivno, inducira pa ga lahko 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD), ki je pogost onesnaževalec v okolju. Gen za CYP1B1 se nahaja na kromosому 2 in kodira protein z maso 61 kDa. Identificirani so širje polimorfizmi: Val 432-Leu, Arg 48-Gly, Ala 119-Ser in Asn 453-Ser (30).

Visoko 4-hidroksilazno aktivnost ima alel C, ki kodira Arg48 različico CYP1B1, povezujejo pa ga s povečanim tveganjem za nastanek raka dojke in endometrija. S povečanim tveganjem za nastanek te bolezni, povezujejo tudi alel G (Ala119) polimorfno obliko CYP1B1 (29). Tveganje za nastanek raka endometrija, ne pa tudi raka dojke, je bilo občutno višje pri CYP1B1 genotipu Val432 (27).

Na MCF-7 celični liniji raka dojke so dokazali, da je krisoeriol (luteorin-3'-metoksi eter, naraven metoksiflavonoid) kemopreventivna naravna spojina, ki selektivno inhibira CYP1B1 in preprečuje nastajanje karcinogenega 4-OHE2. Nima pa učinka na nastajanje 2-OHE2 in na izražanje genov CYP1A1, CYP1B1 ali COMT. Krisoeriol je sestavina Rooibos čaja (*Aspalathus linearis*), zelene (*Apium graveolens*) in listov škrlatnega naprstca (*Digitalis purpurea*). Je bioaktivni flavonoid z antioksidativnim, protivnetnim, bronhodilatatornim, antimutagenim delovanjem in z inhibitornim učinkom na  $17\beta$ -HSD tipa 1 (24).

### 1.3.4 COMT

COMT je glavni encim, vpleten v detoksifikacijo CE v ekstrahepatičnem tkivu (15). Spada v naddružino encimov metiltransferaz. Je encim 2. faze metabolizma, ki katalizira prenos metilne skupine iz S-adenozil metionina, ki je kofaktor, na hidroksilno skupino številnih kateholnih substratov, vključno s CE. CE imajo zaradi takojšnjega O-metiliranja, kratek razpolovni čas. Ta pa se podaljša, ko je kapaciteta COMT zmanjšana ali inhibirana zaradi presežka kateholov (20). Kapaciteta COMT v perifernih tkivih je zelo velika. COMT je znotrajcelični encim, razporejen po celiem telesu. Najbolj je aktiven v jetrih, ledvicah in gastrointestinalnem traktu. Substrati za COMT so L-dopa, kateholamini (dopamin, noradrenalin, adrenalin), njihovi hidroksilirani metaboliti, kateholestrogeni, askorbinska kislina in dihidroksiindolni intermediati melanina. Glavna funkcija encima COMT je izločanje biološko aktivnih ali toksičnih kateholov in nekaterih drugih hidroksiliranih metabolitov. V prvem trimesečju nosečnosti COMT ščiti placente in razvijajoči se zarodek pred aktiviranimi hidroksiliranimi spojinami. COMT uravnava količino aktivnega dopamina in noradrenalina v različnih delih možganov in je zato povezan z razpoloženjem in drugimi

psihičnimi procesi. Najbolj je raziskan v povezavi s Parkinsonovo boleznijo, pri kateri so COMT inhibitorji del zdravljenja (primer take učinkovine je entakapon) (31).

Obstaja en gen za COMT, ki se nahaja na kromosomu 22 in kodira obe obliki encima: topni citosolni S-COMT in membranski MB-COMT (31). MB-COMT ima na N-koncu proteina 50 aminokislinskih ostankov več kot S-COMT, zato se obliki razlikujeta v molekulski masi. S-COMT ima molekulsko maso 23 kDa, MB-COMT pa 26 kDa. S-COMT je prevladujoča oblika v večini celic. Obstaja ena polimorfna oblika gena *COMT*, katere rezultat je substitucija Val108 z Met108. Ta zamenjava je pomembna, saj je substitucija z metioninom povezana s slabšo encimsko aktivnostjo (20). Alel za slabo aktivno obliko COMT je bolj pogost pri ženskah z rakom dojke, kot pri zdravih kontrolah, še posebej pri ženskah z menopavznimi simptomi (31). Kljub temu pa med polimorfizmom COMT in rakom dojk in endometrija ni statistično značilne povezave (27). Zmanjšana količina COMT v žleznih epitelijskih celicah endometrija vodi v nastajanje ROS, MSI in neoplastičnih transformacij, nastanek katerih inducirajo E2 in CE2. COMT namreč z metiliranjem 2-OHE2 in 4-OHE2 zmanjša koncentracijo E2 in CE2 in s tem ščiti pred njunimi učinki, pri tem pa nastaneta 2-MeOE2 in 4-MeOE2 (15).

## **2 NAMEN DELA**

Namen diplomske naloge je proučiti prisotnost proteinov CYP1B1 in COMT pri raku endometrija. Primerjali bomo njuno prisotnost v rakavem in kontrolnem tkivu endometrija bolnic z rakom endometrija tipa I. Karcinogeneza raka endometrija je še slabo raziskana, znano pa je, da je povezana tudi s 1. oksidacijsko in 2. konjugacijsko fazo metabolizma estrogenov. V teh reakcijah sodelujejo tudi encima CYP1B1 in COMT. Ker je za tumor značilna porušena homeostaza, smo postavili hipotezo, da je pri raku endometrija porušeno ravnotežje encimov 1. in 2. faze metabolizma estrogenov, oziroma glavnih predstavnikov CYP1B1 in COMT.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Kemikalije

brezvodni etanol	Sigma
aceton	Merck
akrilamid	Sigma
APS	Sigma
Bradfordov reagent	Carl Roth
BSA	Sigma
CHAPS	Sigma
"Coomassie Brilliant Blue"	Sigma
"DAB Plus Substrate System"	Thermo Scientific
glicerol	Kemika
glicin	Merck
gvanidinijev hidroklorid	Sigma
HCl	Merck
izopropanol	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KCl	Sigma
metanol	Carl Roth
miliQ voda	Millipore
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kemika
Na-citrat	Kemika
NaCl	Merck
ocetna kislina	Merck
"PBS-Tween Solution"	Svanovir®

posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne
"RapidStepTM ECL Reagent"	Merck
razvijalec ("Paper Developer")	Ilford
10 % SDS	Carl Roth
"SignalBoostTM" , CAT # 407207S	Merck
tiourea	Sigma
TEMED	Sigma
Tris-HCl	Carl Roth
Tween 20	Sigma
urea	Kemika
utrjevalec ("Rapid Fixer")	Ilford
vodikov peroksid 30 %	Carl Roth
“West pico” reagent	Pearce

### 3.1.2 Protitelesa in standardi

kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo	Jackson ImmunoResearch
kozji serum	Jackson ImmunoResearch
mišja protitelesa “peroksidaza anti peroksidaza kompleks” (PAP)	Jackson ImmunoResearch
monoklonska kunčja protitelesa proti CYP1B1	Abcam, AB33586
monoklonska mišja protitelesa proti COMT	Abnova H00001312-B01
monoklonska mišja protitelesa proti β-aktinu	Sigma, A3854
proteinski standard (PageRuler TM Prestained Protein Ladder)	Fermentas
kunčja protitelesa “peroksidaza anti peroksidaza kompleks” (PAP)	Jackson ImmunoResearch

### 3.1.3 Laboratorijski material

plastične epruvete	BD FalconTM
film	CL – XposureTM Film, Pierce
kasetnik za razvijanje filmov	Kodak
kivete	Plastibrand®
lakmusov papir	Macherey Nagel
membrana	Immobilon PVDF membrane, Millipore, 0,45µm
mikrocentrifugirke	Eppendorf

### 3.1.4 Laboratorijska oprema

analitska tehnica	E. Mettler, B5, 226645
aparatura za elektroforezo	Mini-Protean II (Bio-Rad) Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad)
aparatura za prenos proteinov	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)
centrifuga z vakuumsko črpalko	Thermo ELECTRON CORPORATION SPD131DDA (centrifugiranje), REFRIGERATED VAPOR TRAP RVT4104 (črpalka)
centrifugi	SIGMA 2K15 EPPENDORF 5415 D
eksikator	Vacutech, Lactovide
magnetno mešalo	Magnetic Stirrer R1000
mikroskop	CARL ZEISS, JENA; OPTI-COM
mikrovalovna pečica	SHARP R-220A
naprava za vorteksiranje	Tehnica Železniki
pH meter	Mettler Toledo
pipete	Gilson Pipetman

sonifikator	MSE
spektrofotometer	UV 1101, Biotech Photometer
stresalnik	Orbital Shaker OS-10 (BIOSAN)
tehntica	SARTORIUS Basic BL 1500s
termo blok	Neo BLOCK 1, 2-2503, Neolab
usmernik	PS 250-2 , SIGMA Techware
zamrzovalnik	Bosch, Sanyo

### 3.1.5 Raztopine in pufri

#### 0,1 M PBS, pH=7,3

140 mM NaCl	8,2 g
2,7 mM KCl	0,2 g
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4 g
1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
bidestilirana voda	do 1 L

#### 0,3 M gvanidinijev hidroklorid

gvanidinijev hidroklorid	2,865 g
95 % etanol	100 ml

#### 5 % mleko za blokiranje nespecifične vezave

mleko v prahu	2,5 g
T-TBS	do 50 ml

#### 5-kratni elektroforezni pufer, pH=8,3

Tris-HCl	15 g/L
glicin	72 g/L
SDS	5 g/L
miliQ voda	do 1 L

**10-kratni TBS pufer, pH=7,5**

200 mM Tris-HCl	24,2 g
5 M NaCl	292,2 g
destilirana voda	do 1 L

**Raztopina za ekstrakcijo proteinov**

7 M urea	0,42 g
2 M tiourea	0,152 g
4 % CHAPS	0,04 g
bidestilirana voda	do 1 ml

**Pufer za prenos proteinov, pH=8,1**

Tris-HCl	5,82 g
glicin	2,83 g
metanol	200 ml
miliQ voda	do 1 L

**Pufer za pripravo vzorcev**

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
glicerol	0,80 ml
10 % SDS	1,6 ml
2-β-merkaptoetanol	0,4 ml
destilirana voda	4,0 ml
0,05 % bromfenol modro	0,2 ml

**T-PBS**

SVANOVIR 20-kratni	
PBS-Tween Solution	50 ml
miliQ voda	do 1 L

**T-TBS pufer, pH=7,5**

TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
destilirana voda	do 1 L

**Raztopina za barvanje gelov**

"Comassie blue R-250"	2,5 g
metanol ali etanol	455 ml
bidestilirana voda	455 ml
ocetna kislina	90 ml

**3.2 VZORCI**

Proteine CYP1B1 in COMT smo določali v vzorcih kontrolnega in tumorskega tkiva 28 bolnic z rakom endometrija. Imeli smo dve kontrolni skupini. Prvo je sestavljalo okolno tkivo istih 28 bolnic (preglednica II), drugo pa 9 bolnic, ki so imele miome (preglednica III). Zadnjo kontrolno skupino smo uporabili pri imunohistokemijski analizi. Proteine smo izolirali iz vzorcev tkiva endometrija, iz katerih so predhodno že izolirali RNA. Vzorce smo dobili na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Vzeti so bili ob histerekтомiji ob soglasju pacientk in Komisije RS za medicinsko etiko. Vzorci so bili po odvzemuh potopljeni v raztopino za stabilizacijo RNA (RNA-later, Qiagene) in shranjeni pri temperaturi -20°C. Histopatološka klasifikacija posameznega vzorca raka endometrija je bila narejena na Ginekološki kliniki v skladu s histološkim razvrstitvenim sistemom za adenokarcinom endometrija SZO (preglednica II).

**Preglednica II:** Podatki o vzorcih raka endometrija.

vzorec	5	7	11	14	16	18	19	20	21	22
leta	39	50	60	73	69	79	74	76	53	36
diagnoza	G2/G3	G1	G1	G2	G1/G2	G1	G1/G2	G2/G3	G2	G1/G2

vzorec	23	25	26	27	31	33	40	44	46
leta	45	54	72	62	69	77	71	73	50
diagnoza	G1/G2	G3	G1/G2	x	G2/G3	G3	G1	G1	G2/G3

vzorec	47	49	50	52	53	54	55	56	57
leta	27	70	73	75	50	71	75	55	43
diagnoza	G1/G2	G1	G1	G2/G3	G2/G3	G1	G2	G1/G2	G1

G1-G3: razvrstitev glede na histološko diferenciacijo tkiva (G1-visoko diferenciran, G2-zmerno diferenciran, G3-slabo ali povsem nediferenciran). Leta: starost bolnic ob histerektomiji, x: podatek ni na voljo.

**Preglednica III:** Podatki o vzorcih endometrija bolnic z miomi.

vzorec	M1	M2	M3	M5	M6
leta	42	47	43	45	50
diagnoza	Uterus myomatosus	Myoma uteri	Uterus myomatosus	Uterus myomatosus	Uterus myomatosus
faza	neproliferativna	pozna sekretorna	zgodnja sekretorna	proliferativna	zgodnja sekretorna

vzorec	M9	M10	M11	M25
leta	47	48	43	60
diagnoza	Uterus myomatosus	Myoma uteri	Uterus myomatosus	Myoma uteri
faza	proliferativna	proliferativna	zgodnja sekretorna	atrofični endometrij

Leta: starost bolnic.

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Izolacija proteinov

##### Reagenti:

- 100 % etanol
- izopropanol
- 0,3 M gvanidinijev hidroklorid v 95 % etanolu
- raztopina za ekstrakcijo proteinov

##### Postopek:

Proteine smo izolirali iz vzorcev, iz katerih je bila predhodno izolirana RNA s TriReagentom. V vseh primerih so vzorcem dodali po 1 ml tega reagenta. Vzorci so bili shranjeni pri -20°C.

Vzorce smo odtalili in centrifugirali (12 000 g, 15 min, 4°C). Vsebina se je razdelila na tri faze: zgornja vodna faza je vsebovala preostanek RNA, ki ga pri izolaciji niso uspeli odstraniti, vmes je bil bel obroček DNA, spodnja faza pa je bila raztopina roza barve, ki je vsebovala proteine, ki smo jih želeli izolirati. S pipeto smo previdno odstranili vodno fazo. Preostalima fazama smo dodali absolutni etanol (0,3 ml /1 ml TriReagenta) in tako oborili DNA. Nato smo mešanico nežno pretresli in pustili 2-3 minute pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje (2 000 g, 5 min, 4°C). Usedlino z oborjeno DNA smo shranili pri -20°C.

Supernatant smo prestavili v večjo epruveto in proteine oborili z dodatkom izopropanola (1,5 ml/ 1 ml TriReagenta). Vzorce smo pri sobni temperaturi počasi stresali 10 minut. Nato smo jih centrifugirali (12 000 g, 10 min, 4°C) in odpipetirali supernatant, v katerem se je nahajal izopropanol. Oborino smo spirali z 0,3 M gvanidinijevim hidrokloridom v 95 % etanolu (2 ml /1 ml TriReagenta). Spirali smo tako, da smo vzorcu dodali gvanidinijev hidroklorid, stresali 20 minut pri sobni temperaturi, nato centrifugirali (7 500 g, 5 min, 4°C) in odstranili supernatant. Postopek smo ponovili trikrat. Nato smo vzorce resuspendirali v absolutnem

etanolu. V vsako epruveto smo dodali 2 ml 100 % etanola in z vrtinčastim stresanjem usedlino odlepili od površine epruvete. Vzorce smo pri sobni temperaturi stresali 20 minut. Sledilo je centrifugiranje (10 000 g, 8 min, 4°C). S pipeto smo nato odstranili ves etanol, usedlino pa sušili v eksikatorju 10 minut. Vzorce smo čez noč shranili pri -20°C.

Vzorcem smo dodali REP. Volumen (med 50 in 350 µl) smo prilagodili količini usedline. Vzorce, ki se niso popolnoma raztopili, smo sonificirali trikrat po 10 sekund. Sledilo je določanje koncentracije proteinov.

### 3.3.2 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

#### Reagenti:

- standardna raztopina BSA (c=1 mg/ml)
- 900 µl PBS (pH=7,3)
- 100 µl Bradfordov reagent

#### Vzorec:

- 1 µl vzorca
- 900 µl PBS (pH=7,3)
- 100 µl Bradfordovega reagenta

#### Postopek:

Bradfordova metoda je relativna metoda, zato je potrebna umeritvena krivulja. Zanjo smo pripravili standarde BSA v sedmih različnih koncentracijah. 1, 3, 5, 7, 10, 12 in 15 µl BSA smo dodali 1 ml pripravljeni raztopine PBS in Bradfordovega reagenta. Vzorce smo pripravili tako, da smo 1 µl raztopine proteinov dodali 1 ml raztopine PBS in Bradfordovega reagenta. Pripravili smo tudi kivet s slepim vzorcem (namesto 1 µl vzorca, smo dodali 1 µl REP), s katerim smo umerili spektrofotometer. Vsebino kivet smo dobro premešali. Absorbanco BSA standardov in vzorcev smo merili pri valovni dolžini 600 nm. Narisali smo umeritveno krivuljo. Na podlagi izmerjenih absorbanc vzorcev in umeritvene krivulje, smo določili koncentracijo proteinov v našem vzorcu.

### 3.3.3 Obarjanje proteinov z acetonom

**Reagent:**

- 100 % aceton

**Vzorci:**

Iz vzorcev tkiva endometrija izolirani proteini, resuspendirani v 1 % SDS.

**Postopek:**

Ta postopek smo uporabili za proteine, ki so jih pred nami izolirali po drugem postopku. Namesto REP so uporabili 1 % SDS za resuspendiranje usedline, temu pa je sledilo obarjanje s 65 % TCA. Po centrifugiranju so odstranili supernatant in vzorec resuspendirali v PBS s pH 8,0. Vzorce so shranili pri -20°C. Poleg vzorcev v PBS so shranili tudi njihove suhe ostanke, ki se v 1 % SDS niso raztopili.

Najprej smo 100 % aceton ohladili na -20°C, vzorce pa odtalili. Ohlajeni aceton smo dodali vzorcem v razmerju 4:1. Z vrtinčastim stresanjem smo vsebino dobro premešali. Vzorce smo 2 uri pustili pri -20°C. Nato smo jih centrifugirali (16 000 g, 15 min, 4°C). Supernatant smo zavrgli, usedlino pa posušili v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem. Vzorce smo nato raztopili v REP in jim določili koncentracijo.

### 3.3.4 Odparevanje topila v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem

**Aparatura:**

Thermo ELECTRON CORPORATION SPD131DDA (za centrifugiranje),  
REFRIGERATED VAPOR TRAP RVT4104 (vakumska črpalka)

**Postopek:**

Ta postopek smo uporabili za odparevanje topila. Gre za združeni napravi. Zgoraj je centrifuga, pod njo pa se nahaja vakumska črpalka. Vzorce smo odtalili, mikrocentrifugirke pa odprte vstavili v rotor centrifuge, da je medij lahko izhlapeval. Napravo smo ohladili na

-100°C. Vključili smo črpalko, da se je ustvaril vakuum in zagnali centrifugo. Topilo smo odparevali 60 minut.

Osušene vzorce smo raztopili v REP. Volumen dodane raztopine (med 50 in 200 µl) je bil odvisen od količine vzorca. Določili smo koncentracijo proteinov.

### 3.3.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE)

#### Reagenti:

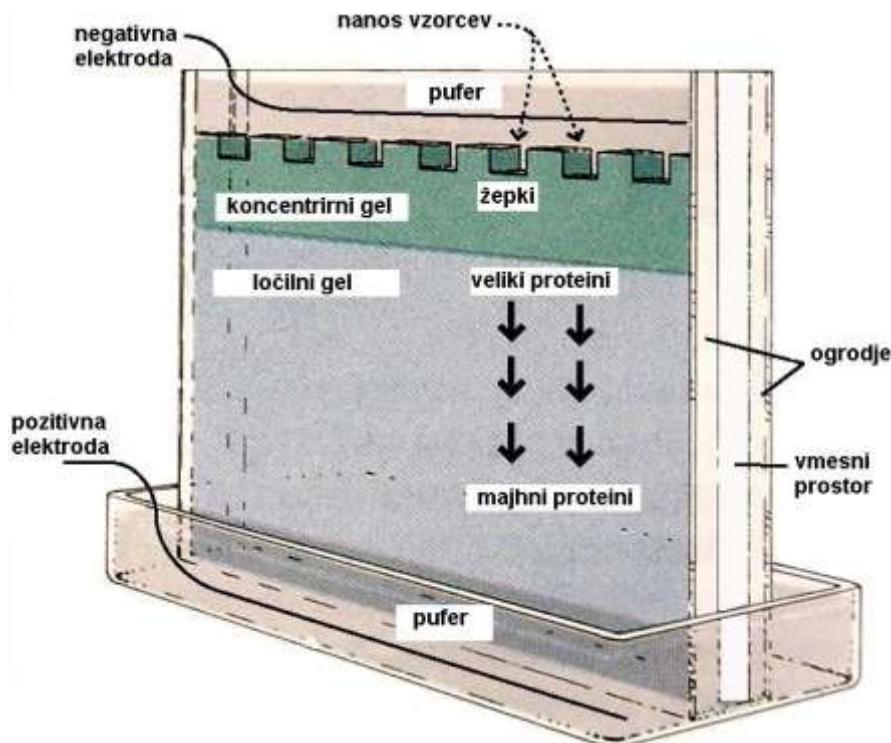
- **12 % ločilni gel:**
  1. 3,35 ml destilirane vode
  2. 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8
  3. 4 ml 30 % akrilamid/ bis akrilamid
  4. 100 µl 10 % SDS
  5. 50 µl 10 % amonijevega persulfata (APS)
  6. 5 µl TEMED
- **4 % koncentrirni gel**
  1. 6,1 ml destilirane vode
  2. 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8
  3. 1,3 ml 30 % akrilamid/ bis akrilamid
  4. 100 µl 10 % SDS
  5. 50 µl 10 % amonijevega persulfata
  6. 10 µl TEMED
- pufer za pripravo vzorcev
- 5x elektroforezni pufer, pH=8,3
- 20 % etanol
- proteinski standard (PageRuler TM Prestained Protein Ladder)

#### Postopek:

Na začetku smo za SDS PAGE uporabili Mini-Protean II elektroforezno aparaturo, kasneje

pa smo delali štiri gele hkrati, za kar smo uporabili Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad). Po navodilih proizvajalca smo sestavili aparaturo. Pripravili smo 12 % ločilni gel. V erlenmajerico smo po navedenem vrstnem redu dodajali posamezne reagente. APS in TEMED (pred dodajanjem smo ga dobro premešali) smo dodali na koncu, saj premrežita gel in povzročita njegovo strjevanje. Na koncu smo vse skupaj dobro premešali. Gel smo vlili do določene višine, preko njega pa 20 % etanol do vrha. S tem smo preprečili izsušitev gela. Pustili smo ga 30-45 minut, da se je strdil. Vmes smo pripravili 4 % koncentrirni gel po navedenem vrstnem redu. Etanol smo popivnali s filter papirjem, ter s pipeto vlili koncentrirni gel. Vanj smo vstavili glavniček, da so nastali žepki. Tudi koncentrirni gel smo pustili 30-45 minut, da se je strdil. Odstranili smo glavniček, nosilec z gelom pa vstavili v kadičko in ga prelili z elektroforeznim pufrom. Nato smo nanašali vzorce (slika 4).

Volumnu vzorca, ki je ustrezal 60 µg proteinov, smo dodali bidestilirano vodo do 16 µl. Nato smo vsakemu dodali še 6 µl pufra za pripravo vzorcev. Poleg vzorcev smo v en žepek nanesli tudi 5 µl proteinskega standarda. Vzorec placente smo pred nanosom segrevali 10 minut pri 95°C v termo bloku, da so se proteini dokončno denaturirali, za ostale vzorce pa to ni bilo potrebno, saj so bili raztopljeni v REP. Kadičko smo povezali z virom napetosti, okrog nje pa dali led. Proteini so potovali v smeri od katode (-) proti anodi (+). Najdaljšo pot so naredili majhni proteini. Elektroforeza je potekala približno 60 minut pri napetosti 200 V.



**Slika 4:** Aparatura za SDS PAGE. Prir. po (32).

### 3.3.6 Western prenos proteinov na membrano

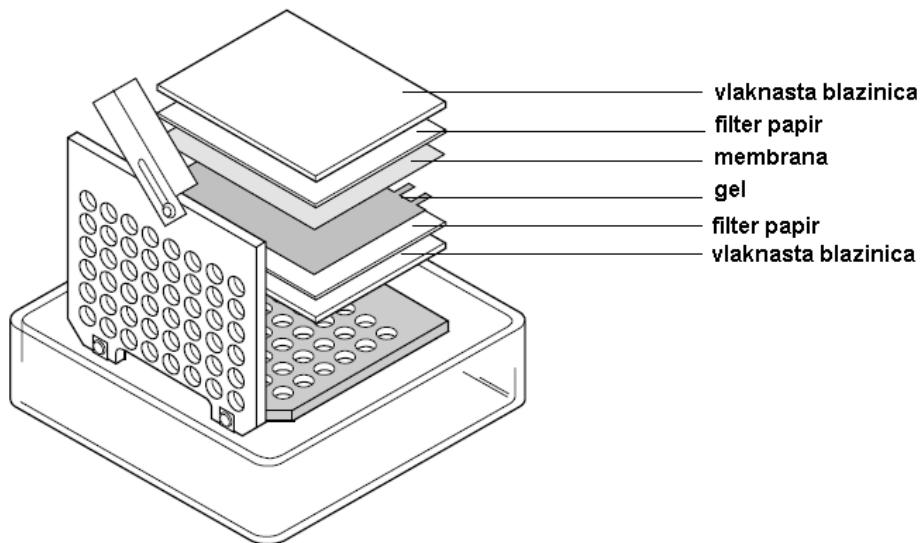
#### Reagenti:

- 100 % metanol
- miliQ voda
- pufer za prenos proteinov, pH=8,1
- 5x TBS (pH=7,5)
- T-TBS
- 5 % mleko za blokiranje nespecifične vezave
- membrana (Immobilon, PVDF, 0,45 µm)
- primarna protitelesa:
  - monoklonska kunčja protitelesa proti CYP1B1, redčena 1:20 000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS
  - monoklonska mišja protitelesa proti COMT, redčena 1:1 000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS

- monoklonska mišja protitelesa proti  $\beta$ -aktinu, redčena 1:3 000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS
- sekundarna protitelesa:
  - kozja protitelesa proti mišjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo, v primeru  $\beta$ -aktina in COMT redčena z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS 1:5 000
  - kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo, redčena 1:20 000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS

**Postopek:**

Po končani elektroforezi smo gel potopili v pufer za prenos proteinov. Izrezali smo membrano in filter papir v velikosti gela. Membrano smo aktivirali tako, da smo jo za 15 sekund potopili v metanol, nato za 2 minuti v miliQ vodo in nazadnje za nekaj minut v pufer za prenos. Filter papir in blazinice, priložene aparaturi, smo namočili v pufer za prenos. Sestavili smo "sendvič". Na črno ploščico ogrodja smo položili blazinico. Nanjo smo položili filter papir, gel, membrano, filter papir in blazinico (slika 5). Pazili smo, da med gelom in membrano ni bilo zračnih mehurčkov. V kadičko smo dali enoto z zamrznjeno destilirano vodo in magnetni mešalček. Postavili smo jo v plastično posodo, to pa na magnetno mešalo. Kadičko smo napolnili z ohlajenim pufrom za prenos in jo obložili z ledom. Priklopili smo jo na vir napetosti in začeli s prenosom. Prenos je potekal v smeri od katode (-) proti anodi (+). Uporabili smo Mini Trans Blot aparaturo, ki smo jo sestavili po navodilih proizvajalca (Bio-Rad). Kadar smo imeli štiri gele (točka 3.3.5), smo uporabili dve aparaturi naenkrat. Prenos je potekal 1 uro in 15 minut pri napetosti 100 V in toku 140 mA.



**Slika 5:** Priprava "sendviča" za prenos proteinov na membrano. Prir. po (33).

Membrano smo potopili v posodico s 5 % mlekom, ter stresali 2 uri. Na membrano smo vlili primarna protitelesa v 1 % mleku. Pustili smo čez noč na stresalniku v hladni sobi ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Membrano smo spirali s T-TBS, 4-krat po 5 minut. T-TBS smo odlili in membrano prelili s sekundarnimi protitelesi v 1 % mleku. Inkubacija je potekala 2 uri pri sobni temperaturi. Membrano smo spirali s T-TBS 4-krat po 5 minut.

### 3.3.7 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL)

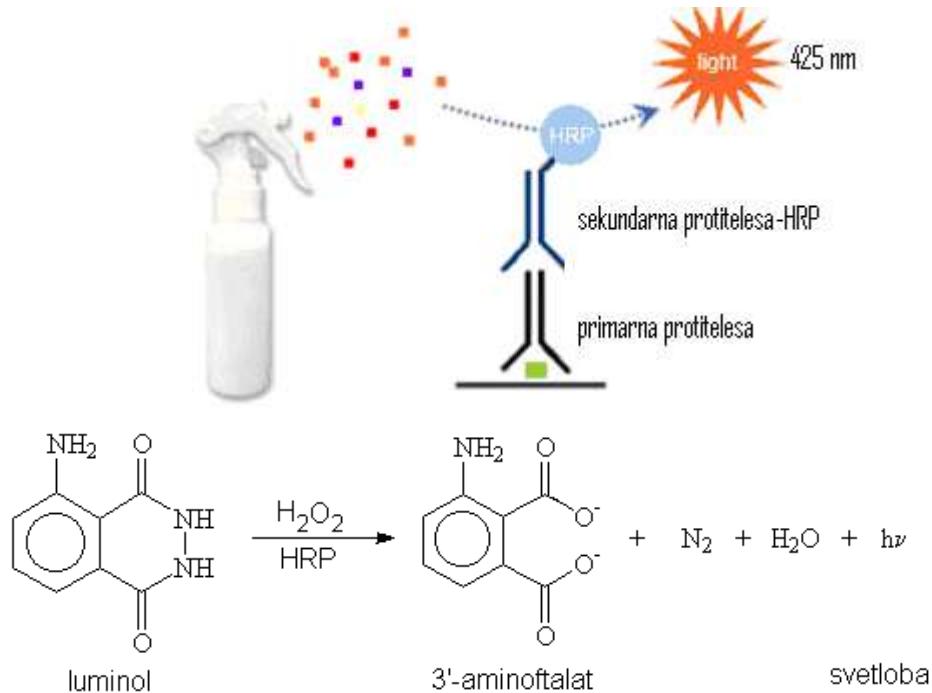
#### Reagenti:

- "RapidStepTM ECL Reagent"
- razvijalec
- utrjevalec

#### Postopek:

Membrano smo vzeli iz T-TBS in jo prestavili v petrijevko. Enakomerno smo jo poškropili z reagentom in počakali 1 minuto. Reagent je vseboval vodikov peroksid in luminol. Reakcijo med reaktantoma je katalizirala hrenova peroksidaza (HRP), vezana na sekundarnih

protitelesih. Luminol je po oksidaciji razpadel in pri tem oddal svetlobo, ki smo jo zaznali na filmu kot temno liso. Sproščanje energije v obliki svetlobe, kot posledica kemijske reakcije, imenujemo kemiluminiscenca (slika 6).



**Slika 6:** Splošna reakcija detekcije z ojačano kemiluminiscenco. Nastanek svetlobe po oksidaciji luminola z vodikovim peroksidom v prisotnosti hrenove peroksidaze. Prir. po (34, 35).

### 3.3.8 Kvantitativno ovrednotenje filmov

Po ECL reakciji smo filme kvantitativno ovrednotili. Uporabili smo napravo UVIPro Platinum, UVItec. Film smo slikali z uporabo programa UVI-Image, prikaz rezultatov pa smo dobili s pomočjo programa UVI-Band. Prikazala se je mreža, katero smo uskladili z lisami na filmu, tako da je vsak kvadrat mreže zajemal eno liso na filmu. Rezultat je bil numerično in slikovno ovrednoten film, za vsako liso posebej.

### 3.3.9 Barvanje gela z barvilkom "Coomassie Brilliant Blue"

#### Reagenti:

- "Coomassie Brilliant Blue":

- 0,1 % "Coomassie Brilliant Blue" R-250
- 40 % metanol
- 10 % ocetna kislina
- 7 % ocetna kislina

**Postopek:**

Po končanem prenosu proteinov smo gel potopili v petrijevko s "Comassie Brilliant Blue" in ga pustili čez noč pri sobni temperaturi. Barvilo se je nespecifično vezalo na proteine, saj s pozitivno nabitim amino skupinami tvori stabilne komplekse. Naslednji dan smo gel prelili s 7 % ocetno kislino. Ocetno kislino smo tekom dneva še 2-krat zamenjali, da se je gel popolnoma razbarval. S tem smo odstranili presežno, nevezano količino barvila. Razbarvan gel smo poskenirali in ga posušili.

**3.3.10 Imunohistokemija****Reagenti:**

- ksilen
- 100 % etanol
- 96 % etanol
- 80 % etanol
- 70 % etanol
- bidestilirana voda
- T-PBS
- 30 % vodikov peroksid
- 0,01 M Na-citrat, pH=6,0
- kozji serum, redčen 1:5 z 1-kratnim T-PBS
- primarna protitelesa:
  - mišja protitelesa proti COMT, redčena 1:20 oz. 1:33 s kozjim serumom
  - kunčja protitelesa proti CYP1B1, redčena 1:200 s kozjim serumom
- sekundarna protitelesa:

- kozja protitelesa proti mišjim protitelesom, redčena 1:100 z 1-kratnim T-PBS
- kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom, redčena 1:100 z 1-kratnim T-PBS
- PAP (peroksidaza anti peroksidaza kompleks):
  - mišja PAP protitelesa, redčena 1:500 z 0,05 M Tris-HCl (za COMT)
  - kunčja PAP protitelesa, redčena 1:500 z 0,05 M Tris-HCl (za CYP1B1)
- 0,05 M Tris-HCl, pH=7,4
- bidestilirana voda
- DAB (3,3'-diaminobenzidin)
- hematoksilin
- Pertex®

**Postopek:**

Vzorci so bile parafinske rezine tkiva (5 µm), posušene na pozitivno nabitem predmetnem stekelcu pri 50°C preko noči. Dobili smo jih na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Vzorce smo postavili v stojalo. Vsak vzorec je imel svojo kontrolo, na katero nismo nanesli primarnih protiteles in se zato ni smela obarvati. V digestoriju smo napolnjeno stojalo potopili v kadičko s ksilenom za 5 minut in nato še v drugo kadičko s ksilenom za 5 minut. S tem smo odstranili parafin. Nato smo vzorce, še vedno v digestoriju, rehidrirali v alkoholih s padajočimi koncentracijami (100 % etanol, 96 % etanol, 80 % etanol, 70 % etanol) in stresali v bidestilirani vodi. V vsako od teh kadičk smo stojalo potopili za 5 minut. Sledilo je spiranje vzorcev z 1-kratnim T-PBS, 5 minut s počasnim stresanjem. Nato smo vzorce potopili v raztopino 6 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 194 ml 1-kratnega T-PBS ter stresali 40 minut. S tem smo blokirali vse endogene peroksidaze. Sledilo je spiranje z 1-kratnim T-PBS, 5 minut s počasnim stresanjem. Nato smo v kadičko nalili 0,01 M Na-citrat s pH 6,00 in jo zavili v plastično folijo, ter na vrhu s škarjami naredili majhno luknjo, da je lahko izhajala para. Postavili smo jo v mikrovalovno pečico in pustili 20 minut pri počasnem vretju. S tem smo denaturirali proteine in izpostavili antigene. Vzorce smo nato 30 minut ohlajali pri sobni

temperaturi. Ponovno je sledilo spiranje vzorcev z 1-kratnim T-PBS, 5 minut s počasnim stresanjem.

Nato smo vsako predmetno stekelce posebej vzeli iz kadičke in ga obrisali s papirnato brisačo. Pri tem smo pazili, da se nismo dotaknili vzorca, na kar smo bili pozorni tudi pri nadalnjem delu. Stekelce smo položili v škatlo v vodoraven položaj. Na vzorec smo s pipeto po kapljicah nanesli 100 µl kozjega seruma. Da se v času inkubiranja vzorci ne bi posušili, smo jih prekrili s koščkom parafilma, na dno škatle pa smo položili mokre papirnate brisače in s tem zagotovili vlago. Vzorce smo inkubirali v zaprti škatli, eno uro v hladni sobi pri 4°C. Na ta način smo vzorce blokirali in preprečili nespecifično vezavo sekundarnih protiteles. Kozji serum smo nato odlili, obrisali predmetna stekelca in jih položili v škatlo. Na vzorce smo s pipeto po kapljicah nanesli 100 µl raztopine primarnih protiteles. Na kontrolne vzorce smo nanesli 100 µl kozjega seruma brez primarnih protiteles. Vzorce smo inkubirali čez noč v zaprti, vlažni škatli v hladni sobi pri 4°C. Naslednji dan smo vzorce spirali v 1-kratnem T-PBS, 2-krat po 5 minut na stresalniku s počasnim stresanjem. Predmetna stekelca smo obrisali in na vzorce s pipeto po kapljicah nanesli 100 µl raztopine sekundarnih protiteles. Inkubirali smo jih 1 uro v vlažni škatli pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje vzorcev z 1-kratnim T-PBS, 2-krat po 5 minut s počasnim stresanjem. T-PBS smo s stekelc odlili in jih obrisali. Na vzorce smo s pipeto po kapljicah nanesli 100 µl raztopine PAP protiteles. Vzorce smo inkubirali 30 minut v zaprti, vlažni škatli pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje v 1-kratnem T-PBS, 2-krat po 5 minut s počasnim stresanjem.

Nato smo pripravili barvilo DAB (3,3'-diaminobenzidin). To barvilo se v prisotnosti peroksidazeobarva rjava. Komplet je vseboval vsebnik z DAB in vsebnik s pufrom in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pred nanosom smo, glede na število vzorcev, zmešali obe komponenti (20 µl DAB/ 1 ml pufra) in pripravili potrebno količino barvila. Za vsak vzorec smo potrebovali 100 µl DAB raztopine v pufru. Predmetna stekelca smo obrisali in jih postavili v škatlo v vodoravnem položaju. Vzorce smo inkubirali, dokler nismo opazili rjavegaobarvanja (5-15 minut). Ves čas smo proces spremljali pod mikroskopom. Ko se je tkivoobarvalo, smo zaustavili reakcijo tako, da smo predmetna stekelca vstavili v nosilec v kadički z bidestilirano vodo. Vzorce smo v vodi inkubirali 2-krat po 5 minut s počasnim stresanjem. Delo smo nadaljevali v

digestoriju. Nosilec z vzorci smo za 45 sekund potopili v hematoksilin, ki je obarval ozadje. Nato smo vzorce 1,5 minute spirali v vodi (po 75 sekundah v eni kadički, smo jih prestavili v drugo kadičko z vodo še za 75 sekund). Sledila je dehidracija. Najprej smo vzorce potopili v bdestilirano vodo, nato pa v alkohole naraščajočih koncentracij (70 % etanol, 80 % etanol, 95 % etanol, 100 % etanol). V vsaki kadički smo vzorce pustili 5 minut. Nato smo vzorce potopili v ksilen. Po petih minutah smo predmetna stekelca položili na papirnato brisačo in počakali, da so se posušila. Na vzorec smo nanesli kapljico Pertex®, nanje pa zlepili krovno stekelce. Pri tem smo pazili, da ni bilo zračnih mehurčkov. Vzorce smo čez noč pustili v digestoriju, da so se do konca posušili. Preparate smo opazovali pod mikroskopom in jih fotografirali. Ovrednotili smo jih tako, da smo jakost obarvanja ocenili z ocenami 1, 2 ali 3 ("Scoring"). Glede na obarvanost smo sklepalni na vsebnost COMT in CYP1B1.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 OPTIMIRANJE METODE ZA IZOLACIJO PROTEINOV

Izolirali smo proteine iz vzorcev tumorskega tkiva in okolnega kontrolnega tkiva endometrija 11 bolnic z rakom endometrija. Proteine smo resuspendirali v REP. Le-ta vsebuje ureo, tioureo in CHAPS. Vse tri sestavine denaturirajo proteine, saj porušijo šibke interakcije med aminokislinskimi preostanki, tiourea pa dodatno reducira disulfidne vezi. Na vzorcih T in N26 smo primerjali postopek resuspendiranja proteinov v 1 % SDS in REP. Po Bradfordovi metodi smo izmerili absorbanco in s pomočjo umeritvene krivulje izračunali njuni koncentraciji v PBS, v REP po odstranjevanju topila v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem in v REP po obarjanju z acetonom. Koncentracije smo primerjali in ugotovili, da je bila ta občutno višja v REP, s čimer smo potrdili uspešnost te metode po obarjanju z acetonom. Ugotovili smo, da se v 1 % SDS proteini slabše topijo, s časom pa se spreminja njihova koncentracija, zato je potrebno pred delom ponovno izmeriti absorbanco in izračunati koncentracijo. V REP pa so se proteini hitreje in v celoti raztopili, bili pa so tudi bolj obstojni. V primeru raztopljanja v 1 % SDS je bil izkoristek slabši, saj je po SDS sledilo še obarjanje proteinov v TCA in raztopljanje v PBS ker je v SDS koncentracija proteinov prenizka za nadaljnje delo (postopek je opisan v poglavju 3.3.3).

**Preglednica IV:** Primerjava koncentracij proteinov v vzorcih T26 in N26 v PBS (1), v REP po odstranjevanju topila v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem (2) in v REP po obarjanju z acetonom, ter odstranjevanju topila v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem (3).

vzorec	T26-1	N26-1	T26-2	N26-2	T26-3	N26-3
absorbanca	0,001	0,008	0,106	0,095	0,490	0,337
konc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0,03	0,25	1,20	0,90	15,30	10,60

T: tumorsko tkivo, N: kontrolno tkivo.

30 parov vzorcev proteinov iz tumorskega in okolnega kontrolnega tkiva endometrija, predhodno raztopljenih v 1 % SDS, smo oborili z acetonom. Oborjene proteine smo posušili v vakuumu s hkratnim centrifugiranjem ter posušeno usedlino raztopili v REP.

41 parom (T in N) vzorcev proteinov, raztopljenih v REP, smo na podlagi izmerjene A izračunali koncentracije in na podlagi volumna vzorcev izračunali mase izoliranih proteinov. Izračunali smo tudi potreben volumen posameznega vzorca, ki je ustrezal masi 60 µg proteinov, za nanos na gel. V žepke gela smo lahko nanesli le 16 µl vzorca, zato vzorcev s prenizko koncentracijo nismo mogli uporabiti. Glede na to smo za nadaljnje delo izbrali 28 parov vzorcev (njihove koncentracije in mase prikazuje Preglednica V).

**Preglednica V:** Koncentracije in mase proteinov, izoliranih iz 28 vzorcev tumorskega in okolnega kontrolnega tkiva.

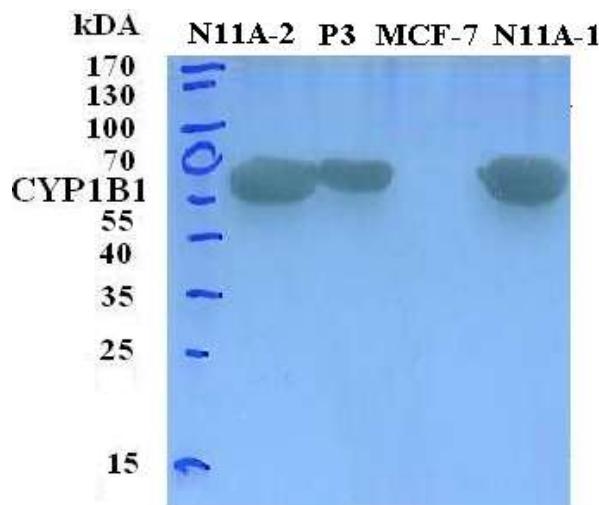
vzorec	c(µg/µl)	m(µg)	vzorec	c(µg/µl)	m(µg)	vzorec	c(µg/µl)	m(µg)
T5	11,1	3652	T23	12,8	964	T49*	15,2	12127
N5	13,0	1295	N23	8,6	602	N49*	10,3	2170
T7	9,0	2498	T25	6,0	1807	T50*	16,8	6402
N7	10,5	2831	N25	10,1	605	N50*	7,9	1589
T11	9,0	4414	T26	15,3	3068	T52*	7,2	2914
N11	10,9	765	N26	10,6	2230	N52*	11,2	6714
T14	8,1	3581	T27	14,6	1605	T53*	12,7	1049
N14	9,5	858	N27	10,5	1259	N53*	11,2	8413
T16	8,1	3907	T31	7,6	1212	T54*	13,4	7707
N16	5,8	293	N31	8,5	425	N54*	13,0	4565
T18	13,1	1969	T33	9,1	1201	T55*	13,3	7996
N18	5,2	1563	N33	11,4	1595	N55*	11,5	4893
T19	7,2	573	T40	7,0	350	T56*	9,3	5307
N19	5,1	355	N40	5,7	398	N56*	7,4	3116
T20	9,1	2227	T44	14,5	869	T57*	10,6	3447
N20	12,0	897	N44	14,9	744	N57*	8,8	3419
T21	10,5	2511	T46*	5,9	4154			
N21	9,8	886	N46*	7,6	379			
T22	6,9	483	T47*	5,7	5386			
N22	14,1	1060	N47*	5,4	1339			

\* Vzorci, iz katerih smo proteine izolirali sami. T: tumorsko tkivo, N: kontrolno tkivo.

## 4.2 IZBIRA USTREZNIH POGOJEV ZA ZAZNAVANJE PROTEINOV CYP1B1, COMT IN $\beta$ -AKTINA

### 4.2.1 Preizkušanje specifičnosti protiteles proti CYP1B1 in COMT, ter določanje primernih koncentracij primarnih in sekundarnih protiteles za zaznavanje proteinov

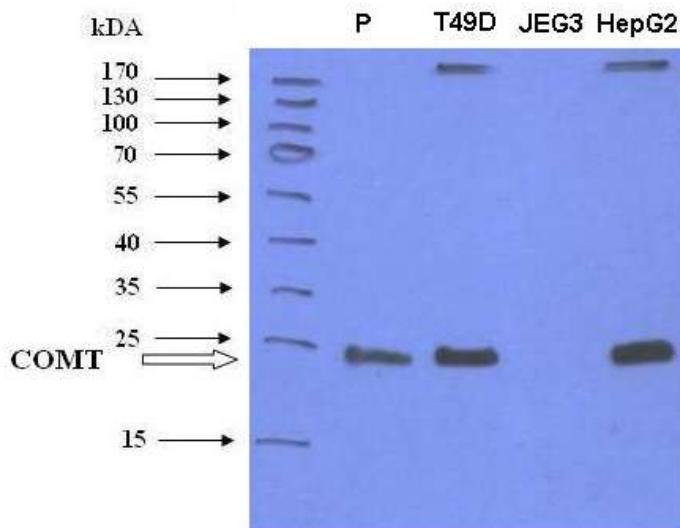
Najprej smo preizkusili specifičnost protiteles proti CYP1B1 na enem vzorcu placente, dveh vzorcih kontrolnih tkiv in enem vzorcu celične linije raka dojke MCF-7. Uporabili smo primarna monoklonska kunčja protitelesa proti CYP1B1, redčena 1:10 000, ter kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom označena s HRP, redčena 1:20 000. Na filmu smo dobili specifične lise za kontrolna vzorca in vzorec placente, s čimer smo dokazali specifičnost protiteles proti CYP1B1. Zaradi težav pri nanašanju vzorca pa lise za MCF-7 nismo zaznali (slika 7). Ker so bile lise močne, smo preverili, če bo detekcija uspešna tudi pri večji redčitvi protiteles. Preizkusili smo primarna protitelesa 1:20 000 in sekundarna 1:20 000. Dobili smo lepe lise, zato smo se odločili, da bomo pri našem delu uporabljali redčitvi 1:20 000.



**Slika 7:** Specifičnost protiteles proti CYP1B1. Slika filma po detekciji z ojačano kemiluminiscenco, po inkubaciji membrane v primarnih monoklonskih kunčjih protitelesih proti CYP1B1, redčena 1:10 000, sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom označena s HRP, redčena 1:20 000. N11-A: kontrolni endometrij, P3: placentna, MCF-7: celična linija raka dojk.

Redčenje primarnih mišjih monoklonskih protiteles proti hišnemu proteinu  $\beta$ -aktinu (1:3 000) in sekundarnih kozjih protiteles proti mišjim protitelesom (1:5 000) smo izbrali na podlagi predhodnih rezultatov (Hevir in sod.).

Protitelesa proti COMT smo najprej preizkusili na vzorcih placente in treh celičnih linijah, JEG3, HepG2 in T47D. Uporabili smo monoklonska mišja protitelesa proti COMT, redčena 1:1 000 in kozja protitelesa proti mišjim protitelesom, redčena 1:5 000. Na filmu smo dobili lepe lise za placente, T49D in HepG2, pri JEG3 pa ne, s čimer smo dokazali specifičnost protiteles proti COMT (slika 8).



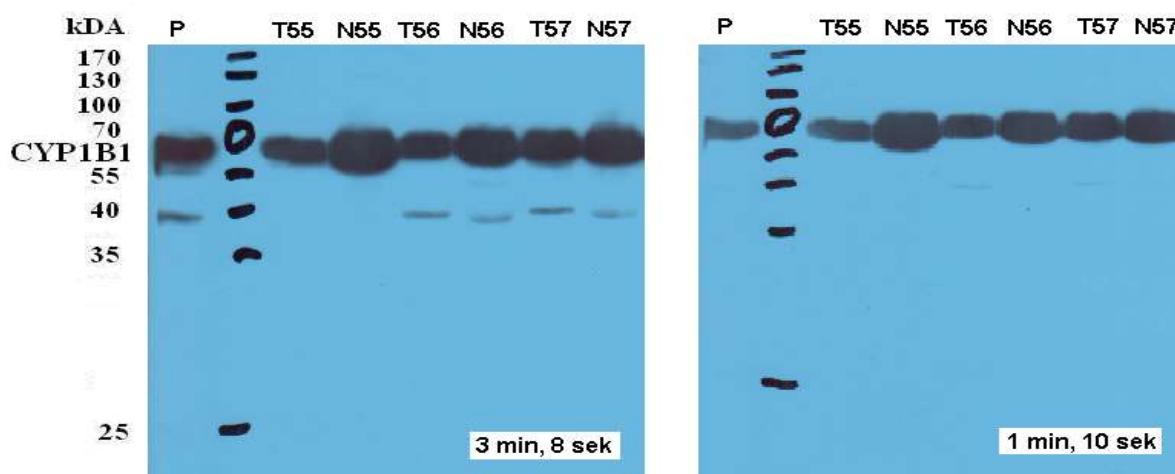
**Slika 8:** Specifičnost protiteles proti COMT. Slika filma po detekciji z ojačano kemiluminiscenco, po inkubaciji membrane v primarnih monoklonskih mišjih protitelesih proti COMT, 1:1 000 in sekundarnih monoklonskih kozjih protiteles proti mišjim protitelesom, označenih s HRP, 1:5 000. P: placenta, T49D: nesmrtna celična linija raka dojk, JEG3: nesmrtna celična linija horionskih resic, HepG2: nesmrtna celična linija človeških jetrnih celic.

Nato smo enake koncentracije protiteles proti CYP1B1 in COMT uporabili še za inkubacijo membrane z našimi vzorci, vendar v tem primeru proteina COMT nismo zaznali. Vzroke smo iskali v sekundarnih protitelesih in času inkubiranja. Membrano smo zato sprali s TTBS in jo čez noč inkubirali v sekundarnih protitelesih. Tudi po prekonočni inkubaciji lis na filmu nismo zaznali. Vzrok je lahko v metodi izolacije proteina po predhodni izolaciji RNA s Tri reagentom, ki je vseboval fenol in gvanidin tiocianat. Kasneje so Hevir in sod. z drugimi protitelesi zaznali COMT tudi v vzorcih raka endometrija in okolnega kontrolnega tkiva.

#### 4.2.2 Izbira reagenta za detekcijo z ojačano kemiluminiscenco (ECL) in primerjava vpliva časa izpostavitve filma na membrani

Eno izmed membran smo inkubirali v primarnih protitelesih proti CYP1B1, redčenih 1:10 000 in sekundarnih protitelesih, označenih s HRP, redčenih 1:20 000. Preizkusili smo "RapidStep™ ECL Reagent" (Calbiochem) ter "SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer

Kit" (Merck). Slednji zagotavlja 10-krat večjo občutljivost, manj korakov pri delu, ter 10-krat manjšo porabo protiteles, vendar pa je dražji, ter v njem protiteles ne smemo zamrzniti za večkratno uporabo (36). Rezultati s "SignalBoost™" niso bili zadovoljivi, saj smo zaznali nespecifično vezavo ter nespecifične lise. Z "RapidStep™" so se na filmu razvile specifične lise, zato smo se odločili, da ga bomo uporabljali pri nadaljnjem delu. Primerjali smo tudi čas izpostavitve filma kemiluminiscentni svetlobi: 10, 5, 3 in 1 minuto in ugotovili, da 1 min izpostavitev zadostuje (slika 9). Vse filme za detekcijo CYP1B1 smo kemiluminiscentni svetlobi izpostavljali 1 minuto, za detekcijo  $\beta$ -aktina pa 3 minute (dele filmov za posamezne vzorce prikazuje slika 9).



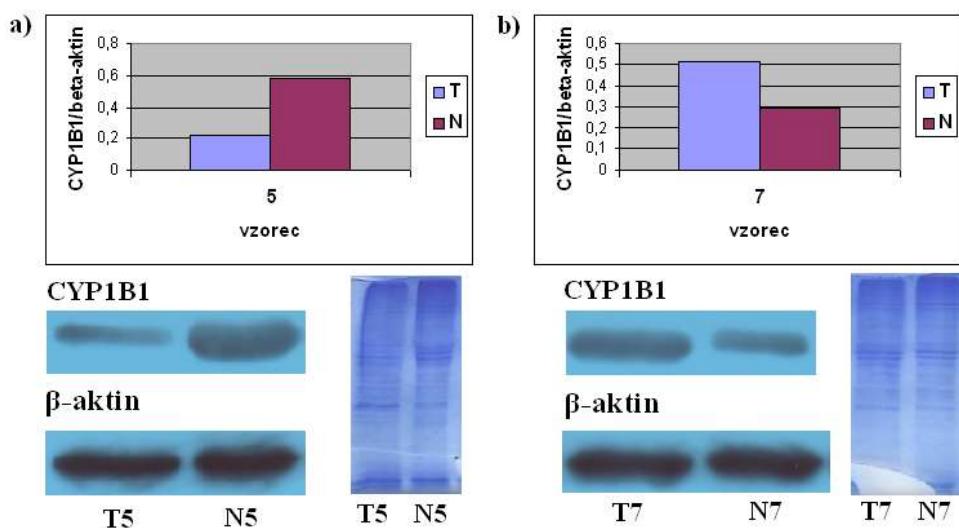
**Slika 9:** Detekcija CYP1B1: Primerjava vpliva časa izpostavitve filma kemiluminiscentni svetlobi. Reagent za detekcijo z ojačano kemiluminiscenco: "RapidStep™ ECL Reagent". Primarna monoklonska kunčja protitelesa proti CYP1B1, redčena 1:20 000, sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo, redčena 1:20 000. Min: čas izpostavljanja filma kemiluminiscentni svetlobi. Sek: čas potopitve filma v razvijalec (dokler ne zaznamo lis). P: placentă. T: tumorsko tkivo. N: kontrolno tkivo.

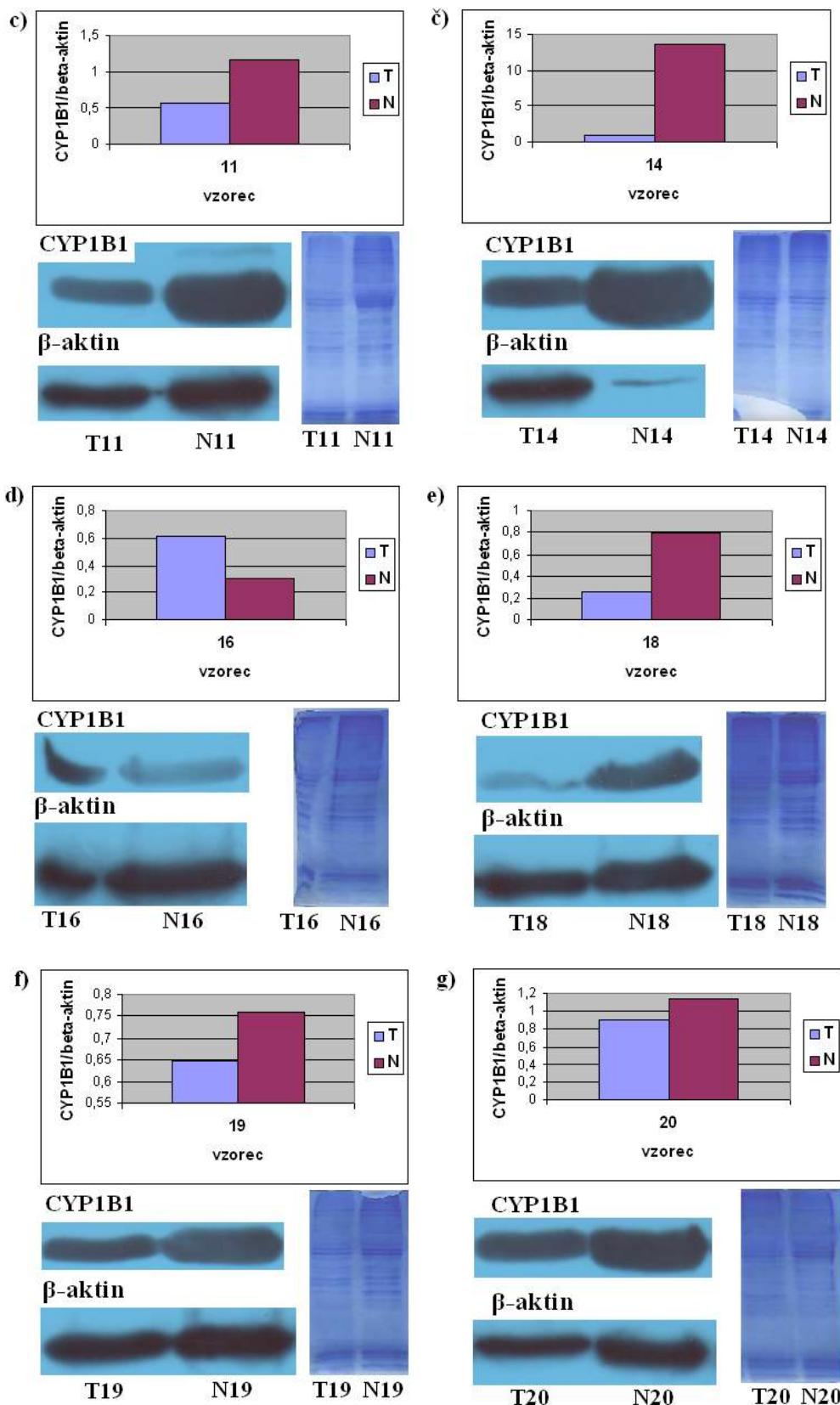
#### 4.3 ZAZNAVANJE PROTEINA CYP1B1 V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN KONTROLNEGA ENDOMETRIJA

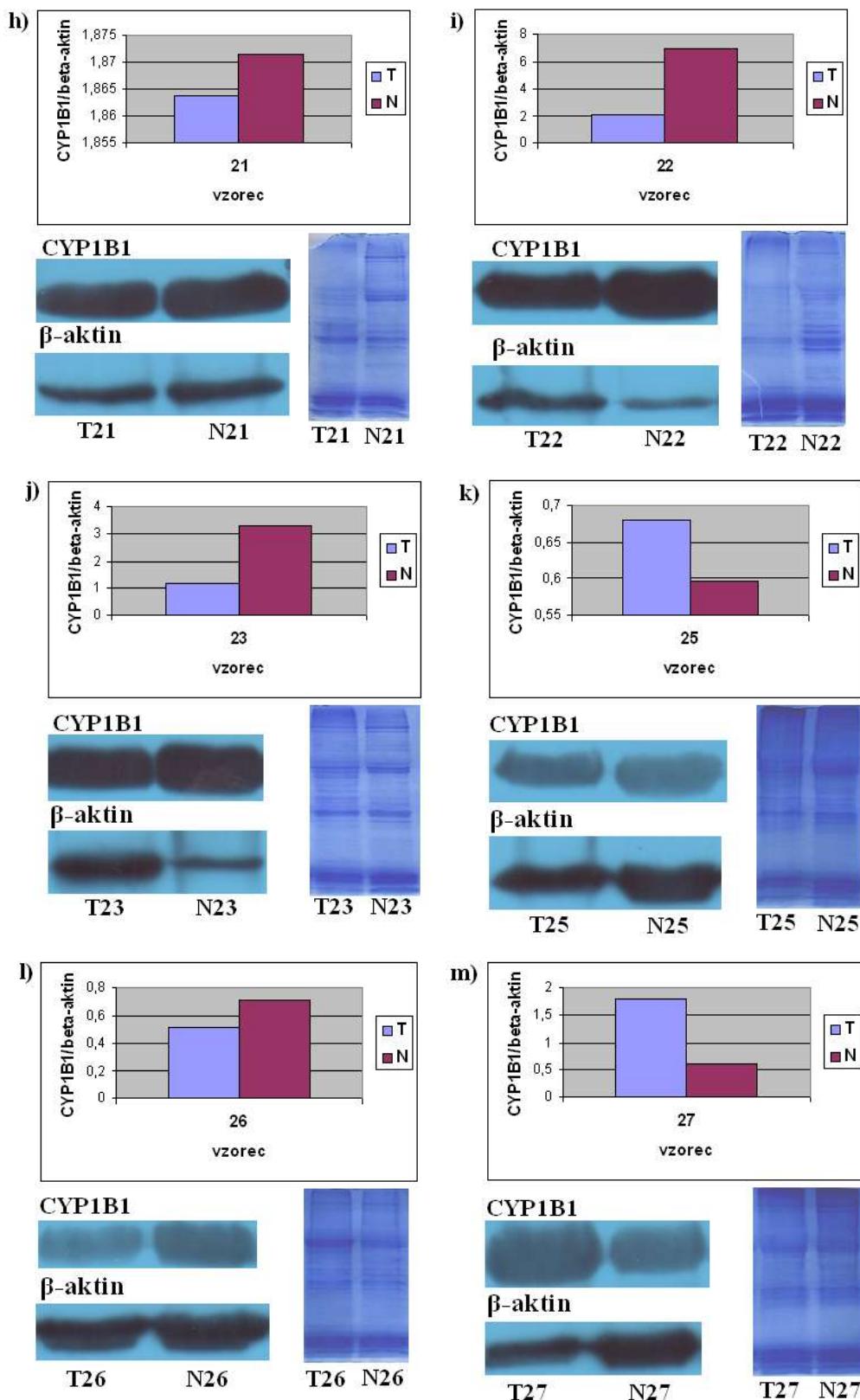
Protein CYP1B1 smo proučevali v 28 parih vzorcev raka endometrija in okolnega kontrolnega tkiva. Kvantitativno smo ovrednotili lise za CYP1B1 in za  $\beta$ -aktin.  $\beta$ -aktin je

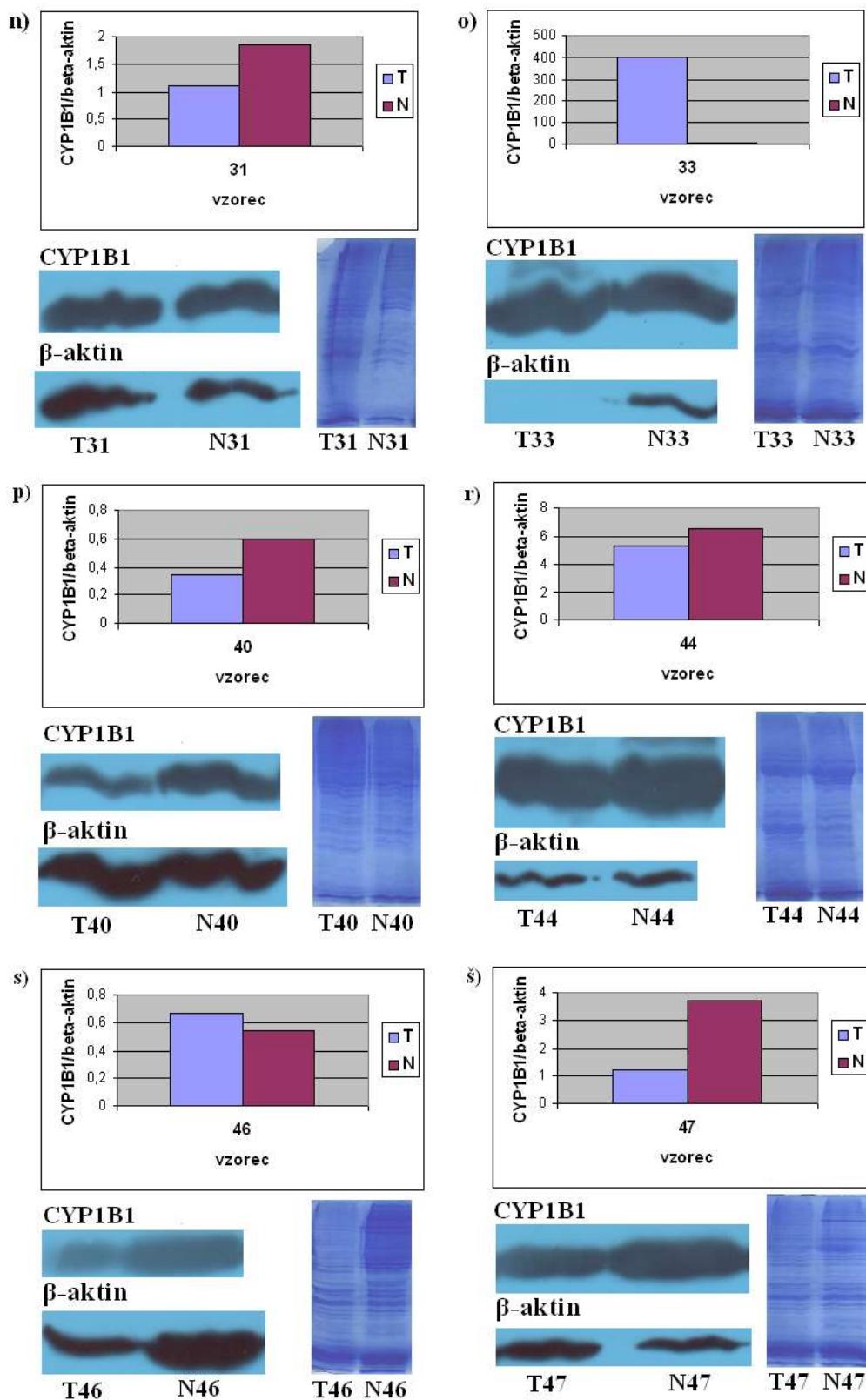
eden od hišnih proteinov, kot so na primer gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), ciklofilin in drugi. Hišni geni naj bi bili konstitutivno izraženi v vseh tkivih, raven hišnih proteinov pa je zato konstantna, saj so ti proteini potrebni za vzdrževanje osnovnih celičnih funkcij. Z upoštevanjem lise za  $\beta$ -aktin smo normirali vzorce in s tem zmanjšali vpliv razlik v nanosih vzorcev na gel in prenosa proteinov iz gela na membrano (37).

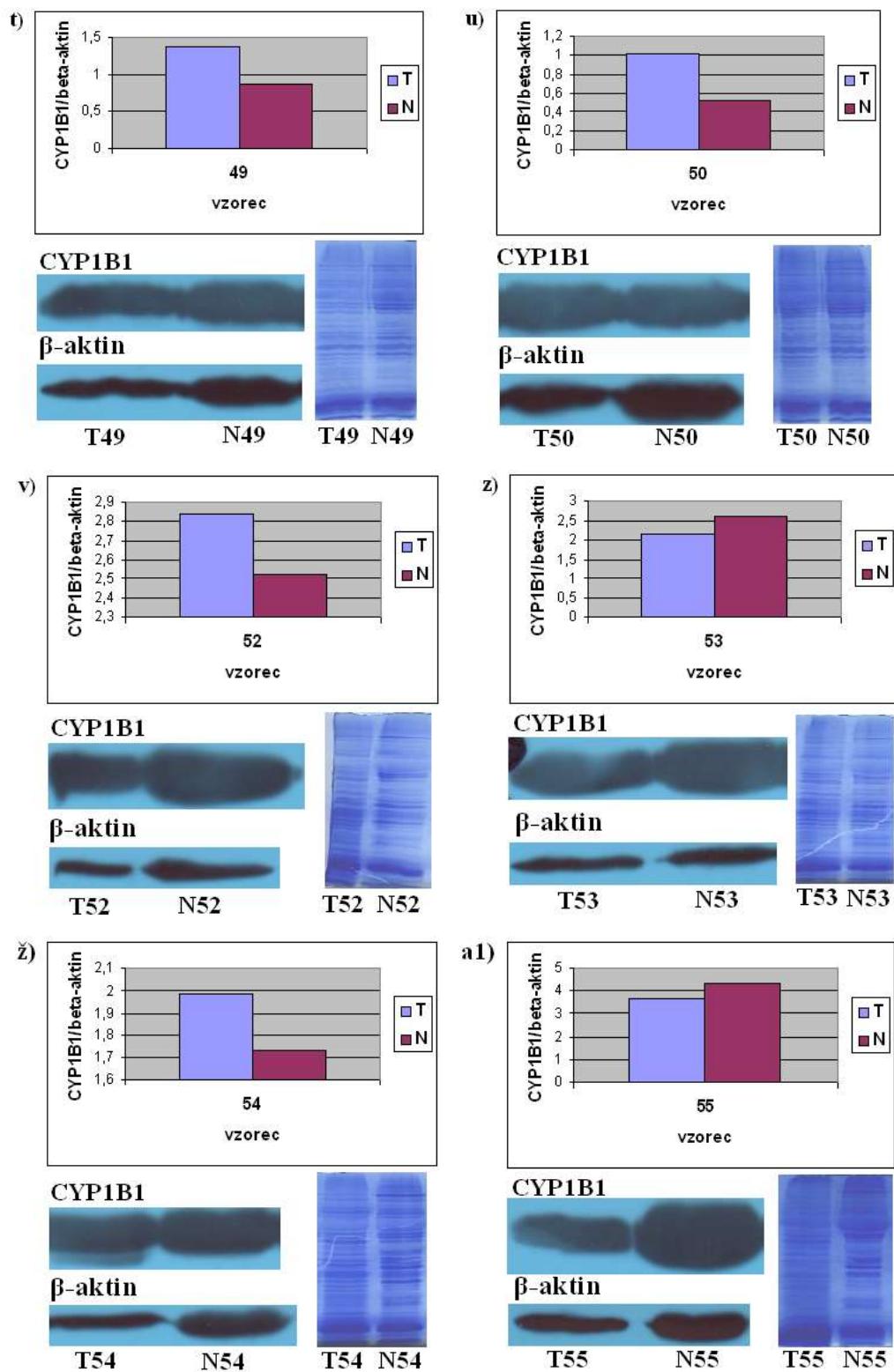
Filme smo kvantitativno ovrednotili s programom UVI-Band (UVITEC Cambridge, UK), ki je izmeril gostoto lise in numerično podal rezultat. Normirane rezultate smo podali kot razmerje CYP1B1/ $\beta$ -aktin in jih predstavili z grafi (slika 10). Izmerjene vrednosti za CYP1B1 in  $\beta$ -aktin, ter njuno razmerje se nahajajo v Prilogi 1.

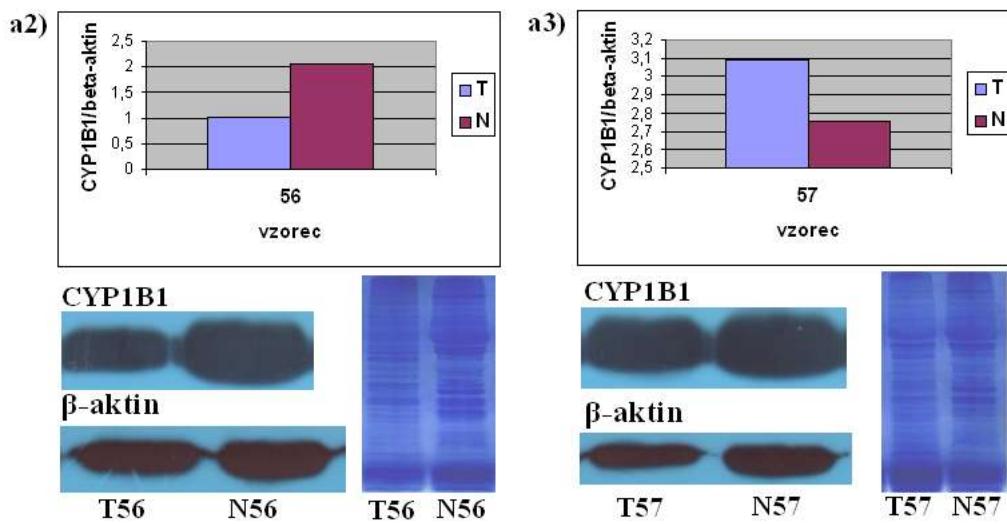










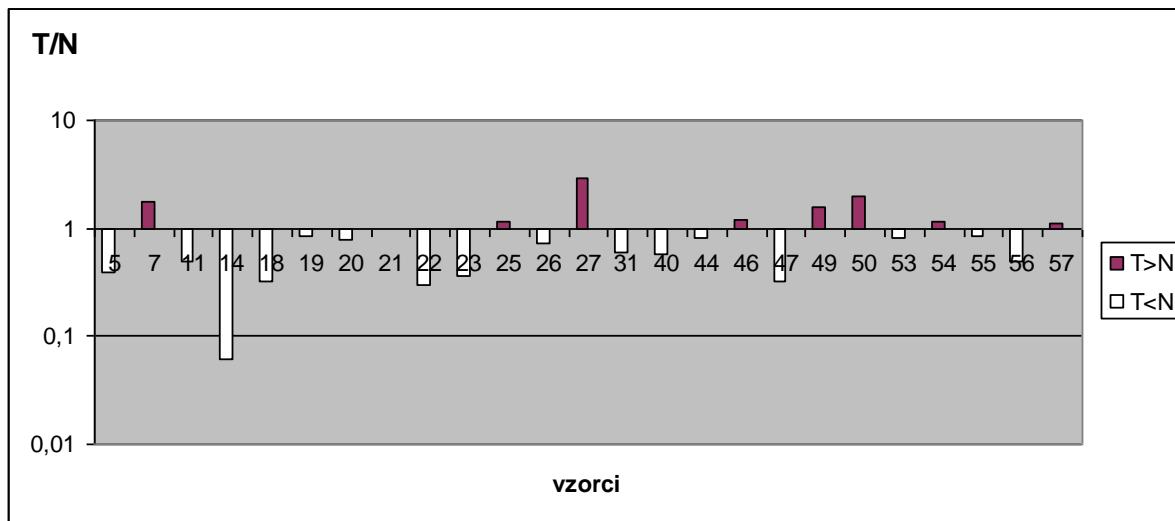


**Slika 10:** Zaznavanje proteinov CYP1B1 in  $\beta$ -aktina v 28 parih vzorcev raka endometrija (T) in okolnega kontrolnega tkiva (N). Grafi prikazujejo razmerje CYP1B1/  $\beta$ -aktin (zgoraj). Slika SDS-PAGE gela prikazuje nanose vzorcev (desno spodaj), slika filma pa zaznavanje proteinov CYP1B1 in  $\beta$ -aktina po prenosu proteinov z gela na membrano in detekciji z ojačano kemiluminiscenco (levo spodaj).

Za vsak vzorec smo njegovo razmerje CYP1B1/ $\beta$ -aktin v tumorskem tkivu delili z njegovim razmerjem CYP1B1/ $\beta$ -aktin v kontrolnem okolnem tkivu. Razmerje tumor (CYP1B1/ $\beta$ -aktin)/kontrola (CYP1B1/ $\beta$ -aktin) je predstavljeno v preglednici VI in na sliki 11.

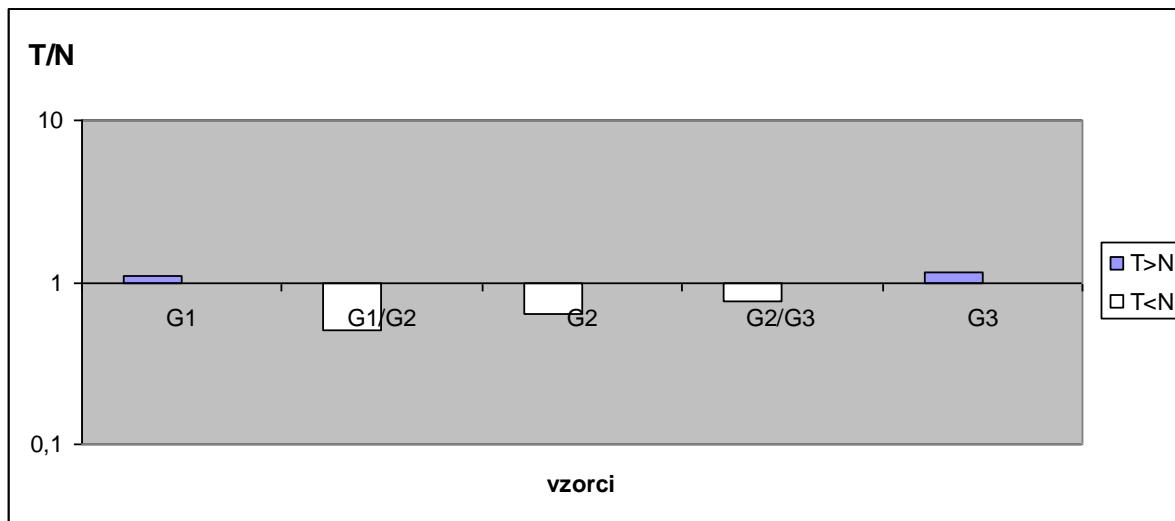
**Preglednica VI:** Razmerje CYP1B1 tumor/ kontrola za posamezen vzorec endometrija.

vzorec	T(CYP1B1/ $\beta$ -aktin)/ N(CYP1B1/ $\beta$ -aktin)	vzorec	T(CYP1B1/ $\beta$ -aktin)/ N(CYP1B1/ $\beta$ -aktin)	vzorec	T(CYP1B1/ $\beta$ -aktin)/ N(CYP1B1/ $\beta$ -aktin)
5	0,39	22	0,3	46	1,22
7	1,76	23	0,36	47	0,32
11	0,48	25	1,14	49	1,58
14	0,06	26	0,72	50	1,99
18	0,32	27	2,89	53	0,81
19	0,85	31	0,59	54	1,15
20	0,8	40	0,57	55	0,83
21	0,99	44	0,82	56	0,49
				57	1,13



**Slika 11:** Graf z logaritemsko skalo razmerja tumor (CYP1B1/β-aktin)/ kontrola (CYP1B1/β-aktin) za 25 vzorcev. T: tumor, N: kontrola.

Zaradi težav pri elektroforezi vzorcev 16, 33 in 52 nismo upoštevali. 8 od 25 vzorcev (32,0 %) je imelo razmerje tumor (CYP1B1/β-aktin)/kontrola (CYP1B1/β-aktin) večje od 1, kar pomeni večjo količino CYP1B1 v tumorskem kot v kontrolnem tkivu. 17 vzorcev (68,0 %) je imelo razmerje tumor (CYP1B1/β-aktin)/ kontrola (CYP1B1/β-aktin) manjše od 1, kar pomeni večjo količino CYP1B1 v kontrolnem kot v tumorskem tkivu. Glede na podatke o starosti bolnic in diferenciaciji tkiva, smo ugotovili, da je bila količina CYP1B1 v visoko (G1) in slabo diferenciranim tkivom (G3) večja v tumorskem kot v kontrolnem tkivu. Količina CYP1B1 v zmersno diferenciranim tkivu G2, ter v vmesnih stopnjah G1/G2 in G2/G3 je bila večja v kontrolnem kot v tumorskem tkivu (slika 12). Povprečna starost 9 bolnic z G1 je bila 65,6 let, 7 bolnic z G1/G2 51,5 let, 3 bolnic z G2 67 let, 6 bolnic z G2/G3 56,8 let, G3 pa je imela samo ena bolnica, stara 54 let. Vzorca 27 pri tem nismo upoštevali, saj za to bolnico podatki niso na voljo. Kljub zanimivim rezultatom pa, zaradi majhnega števila vzorcev, zaključkov o povezavi med prisotnostjo proteina CYP1B1 in diferenciacijo tkiva raka endometrija ne moremo postaviti.



**Slika 12:** Graf z logaritemsko skalo razmerja tumor (CYP1B1/β-aktin)/kontrola (CYP1B1/β-aktin) za 25 vzorcev glede na diferenciacijo tkiva. T: tumor, N: kontrola. G1-visoko diferencirano, G2-zmerno diferencirano, G3-slabo ali povsem nediferencirano tkivo.

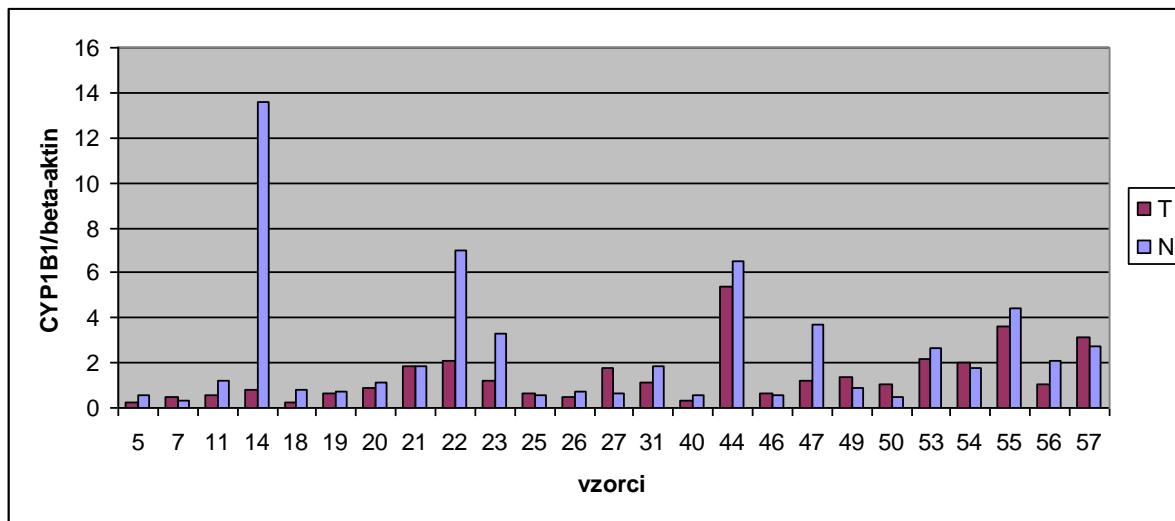
#### 4.3.1 Pogoji zaznavanja proteina CYP1B1

Elektroforezo in prenos proteinov smo izvajali na štirih gelih hkrati, da bi bili rezultati čim bolj primerljivi. Na en gel smo lahko nanesli 5 parov vzorcev. Vzorec tumorskega in kontrolnega tkiva, ki je pripadal isti osebi, smo nanesli enega poleg drugega, da smo ju kasneje lažje primerjali. Na gele smo nanesli tudi proteinski standard, ki je vseboval proteine znanih molekulskih mas. Nanašali smo tudi po en vzorec homogenata placente, ki nam je služil za kontrolo. Lisa za placento bi morala biti enaka pri vseh nanosih, saj smo nanašali enake količine. Vendar smo kljub temu dobili lise različnih intenzitet, kar kaže na neenakomeren prenos proteinov. Vzrok bi lahko bil v tem, da smo placento v večini primerov nanesli na gel na zadnje mesto in so蛋白ni potovali ob robu gela. Na vsak film smo položili 4 membrane, na katerih smo prej pri istih pogojih istočasno izvedli prenos proteinov in pri istih pogojih elektroforezo na 4 gelih. Vse filme za detekcijo CYP1B1 smo kemiluminiscentni svetlobi izpostavljali 1 minuto, za detekcijo β-aktina pa 3 minute. V primeru CYP1B1 smo filme v raztopini za razvijanje razvijali od 10-15 sekund, v primeru β-aktina pa 10-12 sekund.

Pri kvantitativnem vrednotenju filmov smo za optimalne rezultate morali spremenjati več pogojev. Pri slikanju filma s programom UVI-Image smo uravnavali ločljivost, tako da smo spremenjali odprtost zaslonke in spremenjali čas snemanja filma. V programu UVI-Band smo nameščali ozadje, tako da je bilo ozadje črno, lisa pa bela ("noise filter"). Spremenjali smo tudi prag za zaznavanje lise ("threshold"). Prag smo spremenjali, če na filmu ni bilo vidne lise, program pa je zaznal signal. V tem primeru smo dvignili prag, tako da je bil signal bližje ničli.

#### 4.3.2 Statistična obdelava rezultatov razmerja CYP1B1/β-aktin

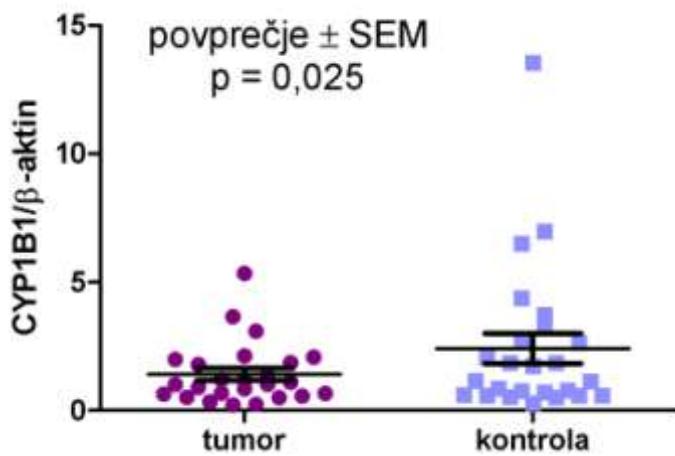
Statistično značilnost razlik med tumorskim in kontrolnim tkivom smo ocenjevali z Wilcoxonovim neparametričnim testom za pare (Wilcoxon Signed Ranks Test) s stopnjo zaupanja ( $p$ ) 0,05. Ta test smo izbrali, ker je primeren tudi za manjše število vzorcev. Uporabili smo vrednosti razmerja CYP1B1/β-aktin za 25 parov vzorcev (slika 13).



Slika 13: Stolpični grafikon razmerja CYP1B1/ β-aktin za 25 parov vzorcev. T: tumor, N: kontrola.

Postavili smo hipotezo ( $H_0$ ), da se količina CYP1B1 v tumorskem in kontrolnem tkivu statistično značilno razlikuje. Razlika je bila statistično značilna,  $p$  je bil 0,025 ( $<0,05$ ), zato smo privzeli hipotezo, da velja.

Izračunali smo povprečje vrednosti razmerij CYP1B1/ $\beta$ -aktin in standardno napako, posebej za tumorske in posebej za kontrolne vzorce. Povprečna količina CYP1B1 v kontrolem vzorcu je bila 1,7-krat večja kot v tumorskem vzorcu. Povprečje razmerij za tumorske vzorce je bilo 1,401, standardna napaka pa 0,238. Povprečje razmerij za kontrolne vzorce je bilo 2,423, standardna napaka pa 0,589 (slika 14).



**Slika 14:** Graf vrednosti razmerij CYP1B1/ $\beta$ -aktin za tumorske in kontrolne vzorce, s prikazanimi povprečnimi vrednostima in standardnimi napakama. Razlika je statistično značilna ( $p = 0,025$ ).

#### 4.4 DOLOČANJE PRISOTNOSTI CYP1B1 IN COMT NA RAVNI CELIC Z IMUNOHISTOKEMIJSKO METODO

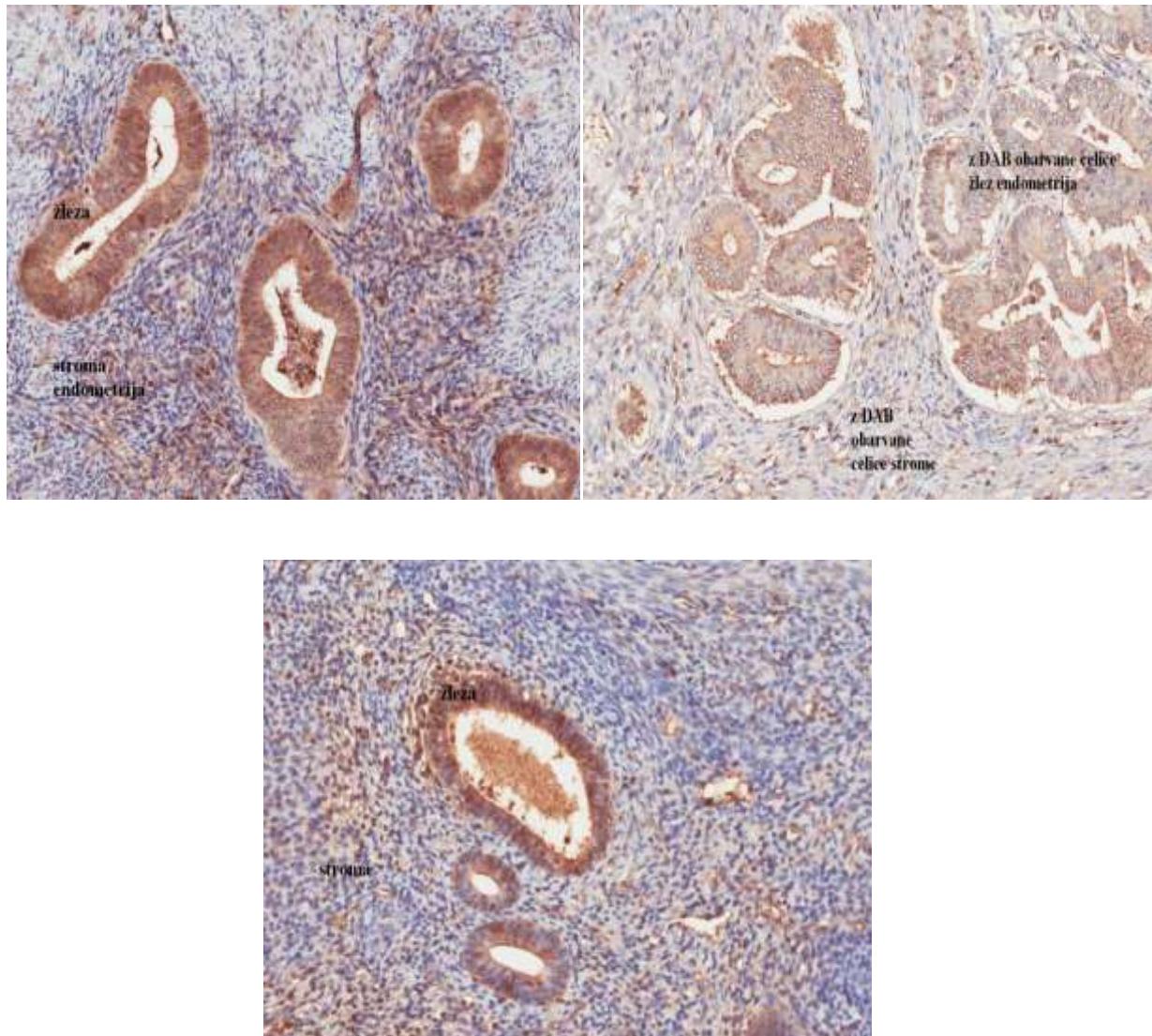
Prisotnost CYP1B1 smo preverili še na celični ravni. Z imunohistokemijskim barvanjem smo uspešno ugotavljali tudi prisotnost COMT. Sprecificnost protiteles proti COMT smo dokazali že v prvem delu raziskovalnega dela na primeru vzorcev placente in celičnih linij (slika 8), tokrat pa so se protitelesa uspešno vezala tudi na vzorce raka endometrija. Imunohistokemijsko barvanje CYP1B1 in COMT smo izvedli na 18 parafinskih rezinah tkiva. Vzorci so bili samo tumorski, bili pa so od istih oseb, kot vzorci za analizo western. Uporabljali smo ista primarna protitelesa kot za inkubiranje membrane po prenosu westernu. Naša kontrola so bili vzorci placente, na katere smo namesto primarnih protiteles nanesli le kozji serum. Če bi se kontrola obarvala, bi to pomenilo nespecifično vezavo, kar pa se ni

zgodilo. Ker vse parafinske rezine niso vsebovale netumorskega tkiva, smo obarvanje tumorskih vzorcev primerjali z vzorci endometrija žensk, ki so imele miome.

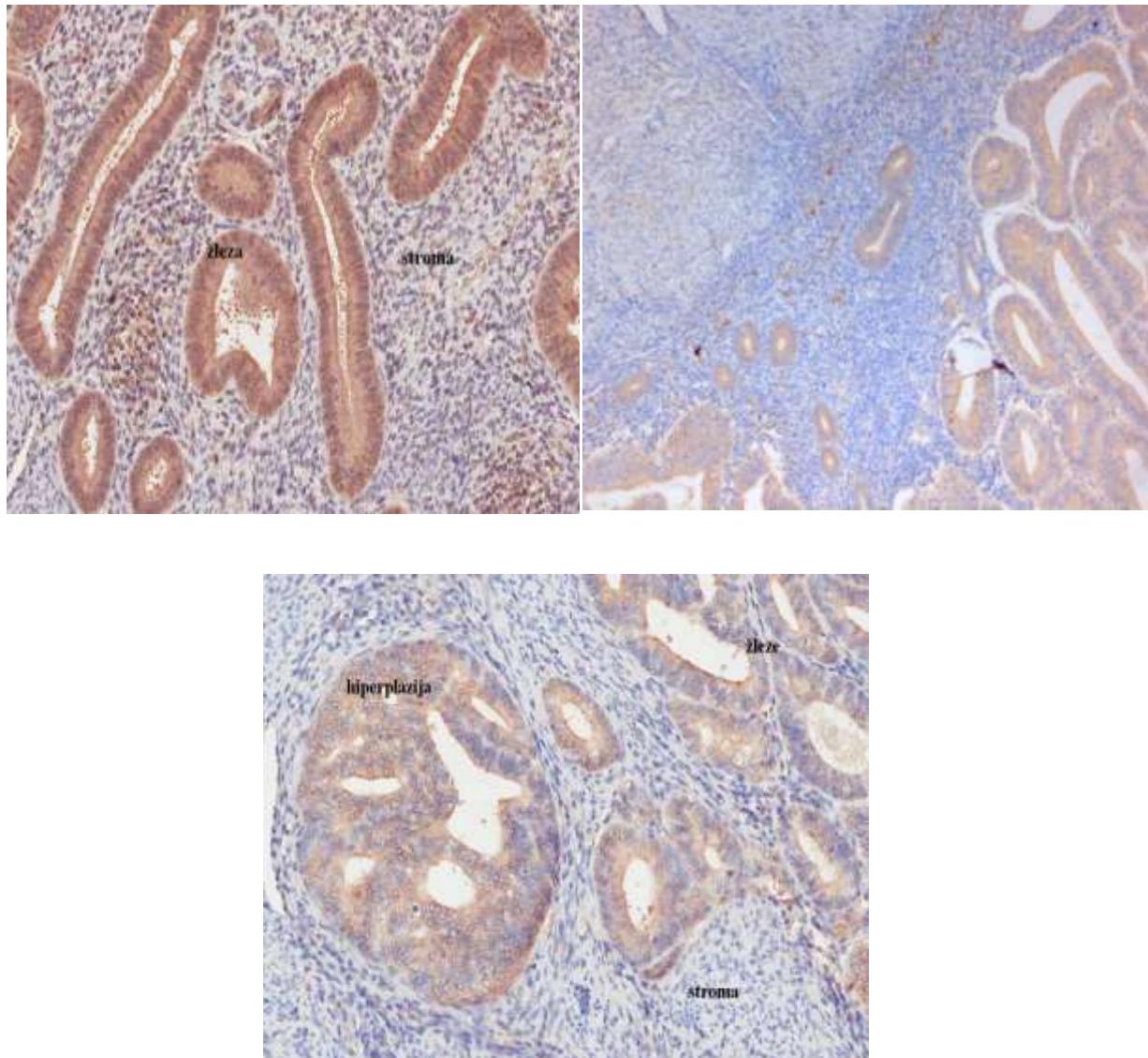
#### **4.4.1 Določanje primerne koncentracije protiteles**

Na vzorcih placente smo preizkusili različne koncentracije protiteles. Za COMT smo vzorce inkubirali v primarnih protitelesih, redčenih v kozjem serumu 1:20, 1:50, 1:100, za CYP1B1 pa v primarnih protitelesih, redčenih v kozjem serumu 1:200, 1:500, 1:1 000. Koncentracija sekundarnih protiteles je bila vedno 1:100 v T-PBS, PAP protiteles pa 1:500 v 0,05 M TRIS/HCl. Žlezne epitelijske celice so se obarvale pri koncentracijah 1:20 za COMT in 1:200 za CYP1B1.

Nekaj primerov obarvanih preparatov prikazujeta sliki 15 in 16. Z barvilm DAB so se obarvale tako žlezne epitelijske celice kot celice strome, žlezne celice bolj intenzivno. Tumorsko tkivo smo prepoznali po gosti posejanosti in razraščenosti žlez, v kontrolnem in netumorskem tkivu pa so bile žleze redko posejane in manj zadebeljene. Prisotne so bile tudi hiperplastične žleze (slika 16 spodaj), ki so predstopnja rakavih žlez.



**Slika 15:** Imunohistokemijsko barvanje CYP1B1 parafinskih rezin raka endometrija in kontrolnega endometrija. Povečava v vseh treh primerih: 200x. Vzorec 1 (zgoraj levo): kontrolno tkivo endometrija bolnice z miomi. Obarvane žleze in stroma. Žleze so redko posejane, obarvanost je močna. Vzorec 35 (zgoraj desno): rakovo tkivo endometrija, značilne gosto posejane in razraščene žleze. Šibka obarvanost žleznih in stromalnih celic. Vzorec 54 (spodaj): netumorsko tkivo, redko posejane žleze, kot v kontrolnem tkivu. Obarvanost je zmerna.



**Slika 16:** Imunohistokemijsko barvanje COMT parafinskih rezin raka endometrija in kontrolnega endometrija. Vzorec 5 (zgoraj levo): kontrolno tkivo endometrija bolnice z miomi, žleze niso razraščene in gosto posejane. Obarvanost je močna. Povečava: 200x. Vzorec 56 (zgoraj desno): rakavo tkivo endometrija, značilne gosto posejane žleze (na sliki desno), levo od njih redko posejane netumorske žleze. Obarvanost je šibka. Povečava: 18x. Vzorec 58 (spodaj): rakavo tkivo endometrija, gosto posejane žleze. Levo na sliki hiperplastična žleza, ki še ni rakavo tkivo. Obarvanost je šibka. Povečava: 100x.

#### 4.4.2 Vzorci, ocena obarvanja in statistična obdelava rezultatov

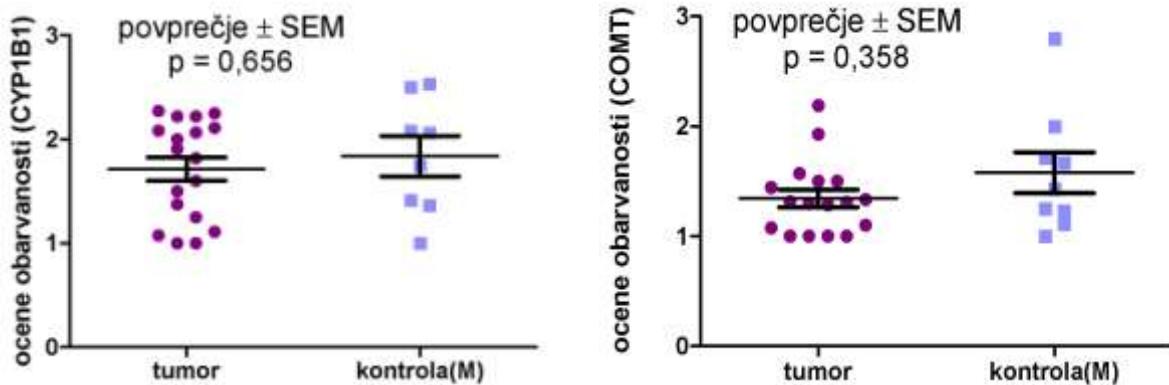
Obarvanje parafinskih rezin smo ocenjevali semikvantitativno. Obarvane preparate smo opazovali pod mikroskopom in jih fotografirali. Fotografirali smo več delov posamezne rezine tkiva in ocenjevali obarvanost žleznih epitelijskih celic in celic strome vzorcev. Povprečna vrednost teh delov je bila končna ocena obarvanosti za posamezen vzorec. Jakost obarvanja smo ocenili z ocenami 1, 2 ali 3, kjer je bila 1 šibka, 2 zmerna, 3 pa močna obarvanost. Ta način ocenjevanja je subjektiven. Ker v parafinskih rezinah niso bile vse celice tumorske, ampak so bile nekatere tudi netumorske, smo na 9 preparatih za CYP1B1 in na 4 za COMT lahko ocenili tudi obarvanost netumorskih celic. Naša kontrola so bile parafinske rezine kontrolnega endometrija bolnic z miomi; 8 rezin za CYP1B1 in 9 rezin za COMT. Povprečja ocen obarvanosti prikazuje preglednica VII. Na osnovi obarvanosti smo sklepali na količino CYP1B1 in COMT v tkivu.

**Preglednica VII:** Povprečne ocene obarvanosti žleznih epitelijskih in stromalnih celic v parafinskih rezinah vzorcev raka endometrija in kontrolnega endometrija za CYP1B1 in COMT.

CYP1B1	M	T	N
<b>žleza</b>	1,84	1,72	2,04
<b>stroma</b>	1,77	1,24	1,47
<b>COMT</b>			
<b>žleza</b>	1,58	1,34	1,28
<b>stroma</b>	1,21	1,07	1,04

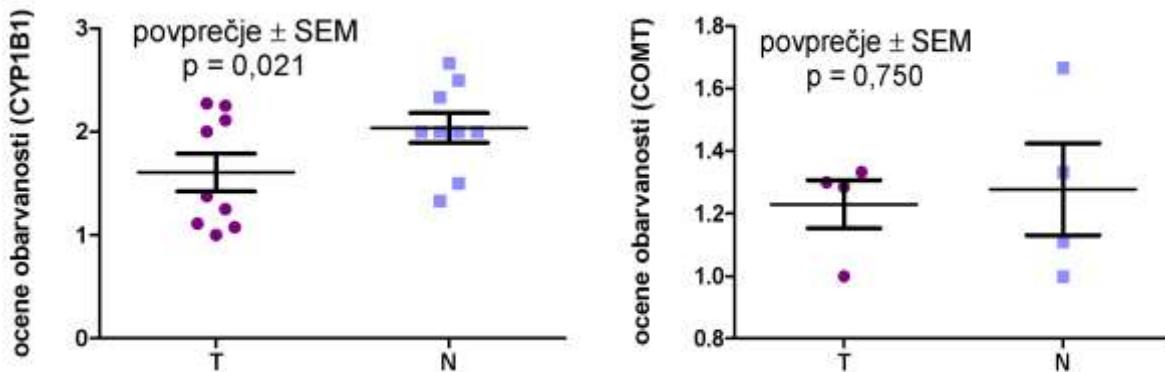
M: kontrolni endometrij bolnic z miomi. T: tumorske celice. N: netumorske celice. 1: šibka, 2: zmerna, 3: močna obarvanost.

Vrednosti za tumorske in kontrolne vzorce smo statistično obdelali z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom, ki je primeren za neparne vzorce. Statistično značilnih razlik nismo določili (slika 17).



**Slika 17:** Grafa vrednosti ocen obarvanosti za CYP1B1 in COMT v neparnih tumorskih in kontrolnih žleznih epitelijskih celicah, s prikazanimi povprečnimi vrednostmi in standardnimi napakami. Razlike niso statistično značilne ( $p>0,05$ ). M: kontrolni endometrij bolnic z miomi. SEM: standardna napaka.

Vrednosti za tumorske in netumorske vzorce smo statistično obdelali z Wilcoxonovim testom, saj smo primerjali po dva vzorca od iste bolnice (9 parov vzorcev za CYP1B1 in 4 pare vzorcev za COMT). Za CYP1B1 smo določili statistično značilno razliko ( $p<0,05$ ), za COMT pa ne (slika 18).



**Slika 18:** Grafa vrednosti ocen obarvanosti za CYP1B1 in COMT v parnih tumorskih in netumorskih žleznih epitelijskih celicah, s prikazanimi povprečnimi vrednostmi in standardnimi napakami. Razlika za CYP1B1 je statistično značilna ( $p<0,05$ ). Razlika za COMT ni statistično značilna ( $p>0,05$ ).

T: tumorske celice, N: netumorske celice. SEM: standardna napaka.

Povprečne ocene obarvanosti tkiva kažejo na naslednje:

- proteina CYP1B1 je v tumorskih žleznih epitelijskih celicah 1,28-krat več kot COMT.
- proteina CYP1B1 je v tumorskih žleznih epitelijskih celicah 1,19-krat manj kot v netumorskih celicah. 11 (61 %) tumorskih žlez je imelo obarvanost manjšo, 7 (39 %) pa večjo od povprečja obarvanosti netumorskih žlez. Primerjava 9 parov vzorcev je pokazala statistično značilno razliko ( $p = 0,021$ ). Med povprečnimi vrednostmi obarvanosti tumorskih in kontrolnih žlez je razlika zanemarljiva.
- količina proteina COMT v tumorskih in netumorskih žlezah je enaka, saj je razlika med povprečnimi vrednostmi obarvanosti tumorskih in netumorskih žlez zanemarljiva. Razlika je večja med tumorskimi in kontrolnimi žlezami: proteina COMT je v žlezah tumorskega tkiva 1,18-krat manj kot v žlezah kontrolnega tkiva. 15 tumorskih rezin tkiva je imelo obarvanost manjšo, 2 pa večjo od povprečja kontrolnega tkiva. Razlika tudi v tem primernu ni bila statistično značilna ( $p = 0,358$ ).
- oba proteina sta prisotna tudi v stromi, CYP1B1 bolj kot COMT. Ocene za stromo z žlezami niso primerljive, saj je ocena 1 za stromalne celice pomenila šibkejše obarvanje, kot ocena 1 za žleze. Možno je, da je pri CYP1B1 vzrok za močnejše obarvanje strome previsoka koncentracija primarnih protiteles (1:200).

#### 4.5 PRIMERJAVA Z OBJAVLJENIMI REZULTATI

Ker sta oba, rak dojke in endometrija, od estrogenov odvisni bolezni, bi lahko pričakovali, da bo tudi vpletenost encimov CYP1B1 in COMT pri obeh podobna. V rakavem tkivu dojke je CYP1B1 najbolj pogosto izražen encim družine CYP1 (38), količina 4-OHE2 pa je veliko višja kot količina 2-OHE2 in estrogenov (22, 23, 24, 26, 30). Pri raku endometrija so pred kratkim Lépine in sod. na ravni mRNA dokazali, da je izražanje CYP1B1 v tumorju endometrija manjše (39). Manjše izražanje gena CYP1B1 na mRNA ravni so dokazali tudi Hevir in sodelavci (neobjavljeni rezultati). Te rezultate smo na istih vzorcih potrdili na ravni proteinov. S primerjavo razmerij tumor (CYP1B1/β-aktin)/kontrola (CYP1B1/β-aktin) smo določili statistično značilno zmanjšano količino CYP1B1 v tumorskem tkivu endometrija v

primerjavi z okolnim kontrolnim tkivom endometrija. Sklepamo lahko, da CYP1B1 pri raku endometrija ni tako pomemben kot pri raku dojke, vendar pa to ne izključuje vloge CYP1B1 pri iniciaciji v predrakovem oziroma v hiperplastičnem tkivu. Okolno kontrolno tkivo je bilo v večih primerih hiperplastično, torej v predrakavi fazi.

Rezultati barvanja parafinskih rezin tkiva endometrija z imunohistokemijsko metodo potrjujejo zaključke, do katerih smo prišli v prvem delu raziskovalnega dela. Po primerjavi 9 parov tumorskega in netumorskega tkiva istih bolnic smo določili statistično značilno manjšo količino CYP1B1 v tumorskih žleznih epitelijskih celicah. Med tumorskim in kontrolnim tkivom bolnic z miomi pa je bila razlika zanemarljiva.

Primerjava prisotnosti COMT ni pokazala statistično značilnih razlik. Količina proteina COMT je bila v tumorskem tkivu 1,18-krat manjša kot v kontrolnem tkivu endometrija bolnic z miomi. Razlika med tumorskim in netumorskim tkivom, pa je bila zanemarljiva. Kljub temu bi lahko sklepali, da je rak endometrija povezan z zmanjšanim zaščitnim delovanjem COMT. To je v skladu z objavami, ki navajajo, da ima COMT zaščitno delovanje, ki ublaži genotoksičnost estrogenovih metabolitov (23) in da zmanjšano izražanje COMT poveča z E2 in CE spodbujeno nastajanje ROS, MSI in neoplastičnih transformacij (15). V nasprotju z našo študijo so Lépine in sod. na mRNA ravni dokazali večje izražanje COMT v tumorskem tkivu v primerjavi z okolnim kontrolnim tkivom (39). Hevir in sod. pa na mRNA ravni niso našli statistično značilnih razlik med tumorskim in okolnim kontrolnim tkivom endometrija (neobjavljeni rezultati). Naši rezultati na ravni proteinov na istih vzorcih bolnic z rakom endometrija to študijo potrjujejo. Rak dojke bolj povezujejo s polimorfnimi oblikami COMT, kot z njegovo količino v tkivu, saj je substitucija Val108 z Met108 povezana s slabo aktivnim encimom (20). Vendar pa v drugih študijah navajajo, da med polimorfizmom COMT in rakom dojk in endometrija ni pomembne povezave (27). Kljub temu bi bilo v nadaljnje raziskave smiselno vključiti tudi študije polimorfizmov. Pomen CYP1B1 in COMT pri razvoju raka endometrija pa bi lahko proučevali tudi z določanjem njune encimske aktivnosti v vzorcih rakavega in okolnega kontrolnega endometrija.

Naše rezultate bi morali potrditi še na večjem številu vzorcev.

## 5 SKLEP

Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. Njegov nastanek je povezan s prekomernim delovanjem estrogenov v odsotnosti progesterona in/ali progestinov. Porušeno ravnovesje med estrogeni in progesteronom ali progestini vodi do pospešenih delitev endometrijskih celic in s tem večje možnosti naključnih genetskih napak.

Predvidevali smo, da je pri raku endometrija ravnovesje encimov 1. in 2. faze metabolizma estrogenov porušeno. V našo študijo smo vključili glavna predstavnika 1. in 2. faze, CYP1B1 in COMT. Na osnovi objavljenih raziskav na raku dojke smo pričakovali, da bo tudi pri raku endometrija količina CYP1B1 zvišana. Ker ima COMT zaščitno delovanje, smo pričakovali, da bo pri raku endometrija le-to oslabljeno in bo količina COMT znižana.

Z analizo western smo v 25 parih vzorcev raka endometrija in okolnega kontrolnega endometrija določali količino CYP1B1. Uporabili smo Wilcoxonov test in ugotovili statistično značilno znižano količino CYP1B1 v tumorskem tkivu. Rezultati kažejo, da CYP1B1 pri raku endometrija nima tako pomembne vloge, kot pri raku dojke. Raziskavo bi bilo smiselno opraviti še na večjem številu vzorcev, hkrati pa bi bilo smiselno upoštevati tudi vlogo njihovih polimorfizmov in katalitično učinkovitost le-teh. Tako bi dobili popolnejši vpogled v oksidativni metabolizem estrogenov.

Količino proteinov CYP1B1 in COMT smo preverili tudi na celični ravni. Na 18 oziroma 17 parafinskih rezinah tumorskega tkiva endometrija in 9 oziroma 8 parafinskih rezinah kontrolnega tkiva endometrija bolnic z miomami smo izvedli imunohistokemijsko barvanje. Ugotovili smo, da sta proteina prisotna v žlezah in v stromi. Na podlagi obarvanosti parafinskih rezin tkiva endometrija, smo sklepali na manjšo količino proteinov CYP1B1 in COMT v tumorskem tkivu endometrija v primerjavi z netumorskim oziroma kontrolnim tkivom endometrija. Vrednosti za tumorske in netumorske vzorce smo statistično obdelali z Wilcoxonovim testom. Primerjali smo vzorce istih bolnic (9 parov vzorcev za CYP1B1 in 4 pare vzorcev za COMT). Ugotovili smo statistično značilno znižano količino CYP1B1 v

tumorskem tkivu ( $p<0,05$ ), v primeru COMT pa razlika ni bila statistično značilna. Vrednosti za tumorske in kontrolne vzorce smo statistično obdelali z Mann-Whitneyevim testom, vendar statistično značilnih razlik nismo določili. Manjša vsebnost COMT v tumorskem kot v kontrolnem tkivu kaže na to, da je rak endometrija povezan z zmanjšanim zaščitnim delovanjem proteina COMT. Tudi te rezultate bi bilo smiselno preveriti na večjem številu vzorcev.

## 6 LITERATURA

- (1) Novaković S. Karcinogeneza – nastanek rakastih celic. *Onkologija/ pregledi* 2006; 10(2): 99-102.
- (2) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Ritter J. Farmakologija. 1. hrvaška izdaja. Zagreb: Golden Marketing-Tehnička knjiga, 2006: 429-445, 729-731.
- (3) Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 427-433.
- (4) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
- (5) Rak v Sloveniji 2007. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2010.
- (6) Primic-Žakelj M, Zadnik V, Žagar T et al. Preživetje bolnikov z rakom, zbolelih v letih 1991-2005 v Sloveniji. Register raka Republike Slovenije. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2009: 172-177.
- (7) Takač I. Etiologija, epidemiologija in histopatologija raka endometrija. Medicinski razgledi 2000; 39: 191-198.
- (8) Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2007; 46(1): 26-32.
- (9) Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Morioka M, Hayashi M, Okai T. Genetics of endometrial cancers. *Obstetrics and Gynecology International* 2010: 1-8.
- (10) Uršič-Vrščaj M. Hormonsko nadomestno zdravljenje in rak. *Zdrav Vestn* 2003; 72: Supl. II: 8-15.
- (11) Lanišnik Rižner T, Šinkovec J. Vloga hidroksisteroid-dehidrogenaz pri uravnavanju aktivnosti estrogenov in progestagenov: primer raka endometrija in endometrioze. Medicinski razgledi 2004; 43: 419-428.
- (12) Karageorgi S, Hankinson SE, Kraft P, De Vivo Immaculata. Reproductive factors and postmenopausal hormone use in relation to endometrial cancer risk in the Nurses' Health Study cohort 1976-2004. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 208-216.

- (13) Štabuc B, Primic-Žakelj M, Klemenčič M, Piškur J. Rak rodil. SEMINAR In memoriam dr. Dušana Reje. Zveza slovenskih društev za boj proti raku 2008; 16.
- (14) Takač I. Diagnostični postopki pri raku endometrija. Medicinski razgledi 2001; 40: 325-333.
- (15) Salama SA, Kamel M, Awad M, Ben Nasser A-H, Al-Hendy A, Botting S, Arrastia C. Catecholestrogens induce oxidative stress and malignant transformation in human endometrial glandular cells: Protective effect of catechol-*O*-methyltransferase. Int. J. Cancer 2008; 123: 1246-1254.
- (16) Sasano H, Suzuki T, Nakata T et al. New development in introcrinology of breast carcinoma. Breast Cancer 2006; 13(2): 129-136.
- (17) Kristan K, Lanišnik Rižner T.  $17\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče. Farmacevtski vestnik 2005; 56: 259-268.
- (18) Subramanian A, Salhab M, Mokbel K. Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis. Breast Cancer Research and Treatment 2008; 111(2): 191-202.
- (19) Liehr JG. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. Human Reproduction Update 2001; 7(3): 273-281.
- (20) Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R et al. Estrogen metabolism by conjugation. Journal of the National Cancer Institute Monographs 2000; 27(6): 113-124.
- (21) Bolton JL, Thatcher GRJ. Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. Chem Res Toxicol 2008; 21(1): 93-101.
- (22) Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. Journal of the National Cancer Institute Monographs 2000; 27(3): 67-73.
- (23) Parl FF, Dawling S, Roodi N, Crooke PS. Estrogen metabolism and breast cancer a risk model. Steroid enzymes and cancer: Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009; 1155: 68-75.
- (24) Takemura H, Uchiyama H, Ohura T et al. A methoxyflavonoid, chrysoeriol, selectively inhibits the formation of a carcinogenic estrogen metabolite in MCF-7 breast cancer cells. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2010; 118: 70-76.

- (25) Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden JK, Ramanathan R, Cerny RL, Rogan EG. Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Medical Sciences* 1997; 94: 10937-10942.
- (26) Cribb AE, Knight MJ, Dryer D, Guernsey J, Hender K, Tesch M, Saleh TM. Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(3): 551-558.
- (27) Zimarina TS, Kristensen VN, Imyanitov EN, Berstein LM. Polymorphisms of CYP1B1 and COMT in breast and endometrial cancer. *Molecular Biology* 2004; 38(3): 322-328.
- (28) Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research* 1997; 57: 3026-3031.
- (29) Bernstein L, Zimarina T, Imyanitov E, Kovalevskij A, Maximov S, Pujol P, Thijssen. Hormonal imbalance in two types of endometrial cancer and genetic polymorphism of steroidogenic enzymes. *Maturitas* 2006; 54: 352-355.
- (30) Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Bernstein L. Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2000; 27(5): 95-112.
- (31) Männistö PT, Kaakkola S. Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological reviews* 1999; 51(4): 594-622.
- (32) SDS Page Gel Electrophoresis. School of chemistry and biochemistry Georgia Institute of technology.  
[http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse\\_Information/4581/techniques/gel\\_elect/pag\\_e\\_protein.html](http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/pag_e_protein.html)
- (33) Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell. Instruction manual, Bio-Rad.  
<http://www.uoguelph.ca/plant/research/homepages/raizada/Equipment/RaizadaWeb%20Equipment%20PDFs/10B.%20minitransblot%20manual.pdf>

- (34) RapidStep™ ECL Reagent. Calbiochem®. Merck.  
[http://www.merck-chemicals.si/life-science-research/rapidstep-ecl-reagent/EMD\\_BIO-345818/p\\_uuid;sid=9QA\\_A7qRXwo2A\\_FLPaEtVBJRJgO6HHKFMi8BJBVQ0DDS8qqN9tnCO5OW1PQmR8mrUu4BJBVQJgO6HGmScB8e96PV](http://www.merck-chemicals.si/life-science-research/rapidstep-ecl-reagent/EMD_BIO-345818/p_uuid;sid=9QA_A7qRXwo2A_FLPaEtVBJRJgO6HHKFMi8BJBVQ0DDS8qqN9tnCO5OW1PQmR8mrUu4BJBVQJgO6HGmScB8e96PV)
- (35) Maxey K, Johnson MD and J. Detecting and measuring cyclooxygenases. Cayman Chemicals. Currents 2001:10.  
<http://www.caymanchem.com/app/template/currents,010.vm/a/z>
- (36) SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit. Merck.  
[http://www.merck-chemicals.si/life-science-research/signal-boost/c\\_NcKb.s1Of.kAAAEeGvVczIMP?PortalCatalogID=merck4biosciences&CountryName=Slovenia](http://www.merck-chemicals.si/life-science-research/signal-boost/c_NcKb.s1Of.kAAAEeGvVczIMP?PortalCatalogID=merck4biosciences&CountryName=Slovenia)
- (37) Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. Proteomics 2005; 5: 266-571.
- (38) McKay JA, Melvin WT, Ah-See AK et al. Expression of cytochrome P 450 CYP1B1 in breast cancer. FEBS Letters 1995; 374: 270-272.
- (39) Lépine J, Audet-Walsh E, Grégoire J et al. Circulating estrogens in endometrial cancer cases and their relationship with tissular expression of key estrogen biosynthesis and metabolic pathways. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95(6): 0000-0000.

## 7 PRILOGE

### 7.1 PRILOGA 1: Rezultati zaznavanja proteinov CYP1B1 in $\beta$ -aktina.

**Preglednica VIII:** Rezultati kvantitativnega vrednotenja filmov s programom UVI-Band. Vrednosti odzivov za proteine CYP1B1 in  $\beta$ -aktin 28 vzorcev, izračun njunih razmerij, ter podatki o bolnicah.

vzorec	signal Cyp1b1	signal $\beta$ -aktin	CYP1B1/ $\beta$ aktin	starost	diagnoza
T5	22629	101999	0,221855116	39	G2/G3
N5	63691	110431	0,576749282	39	G2/G3
T7	46616	89704	0,519664675	50	G1
N7	25310	85497	0,296033779	50	G1
T11	46258	81825	0,565328445	60	G1
N11	131993	112918	1,168927895	60	G1
T14	68802	82077	0,838261632	73	G2
N14	149566	11034	13,55501178	73	G2
T16	44046	71679	0,614489599	69	G1/G2
N16	49428	163615	0,302099441	69	G1/G2
T18	23479	93923	0,249981368	79	G1
N18	82897	104919	0,790104747	79	G1
T19	68911	106246	0,648598535	74	G1/G2
N19	96806	127219	0,760939797	74	G1/G2
T20	73066	80324	0,909640954	76	G2/G3
N20	118667	104057	1,140403817	76	G2/G3
T21	95020	50986	1,863648845	53	G2
N21	112637	60187	1,871450645	53	G2
T22	116085	55834	2,079109503	36	G1/G2
N22	139624	19995	6,982945736	36	G1/G2
T23	110941	92562	1,198558804	45	G1/G2
N23	136132	41318	3,294738371	45	G1/G2
T25	57229	84108	0,68042279	54	G3
N25	58322	97616	0,597463531	54	G3
T26	46935	91685	0,511915799	72	G1/G2
N26	74278	104533	0,710569868	72	G1/G2
T27	113347	63289	1,790943134	62	ni na voljo
N27	66068	106731	0,619014157	62	ni na voljo

T31	54173	49175	1,101637011	69	G2/G3
N31	41396	22180	1,866366096	69	G2/G3
T33	73788	185	398,8540541	77	G3
N33	64870	12822	5,059273124	77	G3
T40	30258	88500	0,341898305	71	G1
N40	55611	93324	0,595891732	71	G1
T44	90229	16870	5,348488441	73	G1
N44	100430	15409	6,517619573	73	G1
T46	25634	38329	0,668788646	50	G2/G3
N46	51598	94139	0,548104399	50	G2/G3
T47	45723	37875	1,207207921	27	G1/G2
N47	78037	20930	3,728475872	27	G1/G2
T49	62081	45272	1,371289097	70	G1
N49	48777	56021	0,870691348	70	G1
T50	55647	54402	1,022885188	73	G1
N50	50387	98293	0,512620431	73	G1
T52	37780	13322	2,835910524	75	G2/G3
N52	73688	29182	2,525118224	75	G2/G3
T53	47342	22197	2,13281074	50	G2/G3
N53	71328	27161	2,626118331	50	G2/G3
T54	54804	27552	1,989111498	71	G1
N54	71487	41253	1,732892153	71	G1
T55	49235	13486	3,650823076	75	G2
N55	108344	24698	4,386751964	75	G2
T56	45634	44971	1,014742834	55	G1/G2
N56	78139	37735	2,070730091	55	G1/G2
T57	62501	20189	3,09579474	43	G1
N57	77187	28043	2,752451592	43	G1

T: tumorsko tkivo, N: okolno kontrolno tkivo.

## 7.2 PRILOGA 2: Rezultati zaznavanja proteinov CYP1B1 in COMT na celični ravni (imunohistokemijska metoda).

**Preglednica IX:** Ovrednotenje obarvanosti žleznih epitelijskih in stromalnih celic v parafinskih rezinah vzorcev raka endometrija in kontrolnega endometrija za CYP1B1 in COMT za posamezen vzorec.

COMT							CYP1B1					
M		T		N			M		T		N	
M1	1,71	T35	1,00	N42	1,67	žleza	M1	2,07	T35	2,00	N35	2,00
	1,00		1,00		1,00	stroma		1,81		1,38		1,60
M2	1,25	T38	1,00	N46	1,33	žleza	M2	1,42	T38	2,08	N40	1,50
	1,25		1,00		1,17	stroma		1,92		1,25		1,50
M3	1,23	T39	1,00	N49	1,00	žleza	M3	1,75	T39	2,07	N42	2,00
	1,15		1,00		1,00	stroma		2,63		1,27		2,00
M5	2,00	T40	1,10	N54	1,11	žleza	M5	2,50	T40	1,25	N44	2,67
	1,17		1,00		1,00	stroma		2,25		1,00		1,67
M6	1,43	T42	1,29			žleza	M6	2,08	T42	1,08	N46	1,33
	1,43		1,00			stroma		1,42		1,23		1,33
M9	1,11	T44	1,08			žleza	M9	1,36	T44	2,27	N50	2,50
	1,11		1,00			stroma		1,27		1,64		1,50
M10	1,00	T46	1,33			žleza	M10	1,00	T46	1,00	N54	2,00
	1,00		1,00			stroma		1,00		1,00		1,00
M11	2,80	T47	1,57			žleza	M25	2,53	T47	2,22	N56	2,33
	1,80		1,21			stroma		1,87		1,56		1,67
M25	1,67	T49	1,30			žleza	T49			1,91	N57	2,00
	1,00		1,00			stroma				1,18		1,00
		T51	1,50			žleza			T50	2,25		
			1,00			stroma				1,42		
		T52	2,19			žleza			T51	1,60		
			1,56			stroma				1,00		
		T53	1,50			žleza			T52	1,82		
			1,00			stroma				1,00		
		T54	1,00			žleza			T53	2,22		
			1,00			stroma				1,44		
		T55	1,44			žleza			T54	2,11		
			1,00			stroma				1,44		
		T56	1,31			žleza			T55	1,00		
			1,15			stroma				1,00		
		T57	1,31			žleza			T56	1,11		
			1,00			stroma				1,00		
		T58	1,93			žleza			T57	1,38		
			1,21			stroma				1,25		

						<b>žleza</b>			T58	1,50		
						<b>stroma</b>				1,25		

M: kontrolni endometrij bolnic z miomi. T: tumorske rezine tkiv. N: netumorsko tkivo. 1: šibka, 2: zmerna, 3: močna obarvanost.