

# ESTETROL – NARAVNI SELEKTIVNI MODULATOR RECEPTORJEV ZA ESTROGENE

## ESTETROL – NATURAL SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATOR

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Tamara Knific, mag. farm.

Asist. dr. Maša Sinreih, mag. farm.

Prof. dr. Tea Lanišnik Rižner

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tamara.knific@mf.uni-lj.si

## 1 ESTETROL – ESTROGEN, KI SE SINTETIZIRA LE PRI PLODU

Estetrol (E4) so pri analizi metabolitov estrogenov v urinu dojenčkov z razvojnimi nepravilnostmi odkrili Diczfalusy in sod. na inštitutu Karolinska I. 1965. Dojenčkom med 6 in 13 tednov starosti so intramuskularno injicirali <sup>14</sup>C-E2 in nato določali metabolite v urinu. Ugotovili so, da je poleg

### POVZETEK

Estetrol je naravni estrogen, ki se sintetizira le v jetrih ploda, kjer potekata 15 $\alpha$ - in/ali 16 $\alpha$ -hidroksilacija endogenega estriola in estradiola. Študije *in vitro* so pokazale, da se estetrol veže samo na receptorje za estrogene (ER), z največjo afiniteto na ER $\alpha$ . Estetrol ima veliko biološko uporabnost in dolg eliminacijski čas, zaradi česar ga je mogoče aplicirati enkrat dnevno. Rezultati raziskav pri raku dojke so pokazali, da estetrol nasprotuje učinkom estradiola, zavira rast tumorja in celo zmanjša število in obseg že nastalih tumorjev, kar kaže na primerčnost uporabe estetrola v hormonski nadomestni terapiji pri bolnicah s trenutnim ali že prebolelim rakom dojke. Številne klinične raziskave so potrdile varno uporabo estetrola v humani medicini brez pomembnih neželenih učinkov. Estetrol bi se lahko uporabljal tudi v terapiji z menopavzo povezanih simptomov, tj. vazomotoričnih simptomov, vulvovaginalne atrofije in za preprečevanje nastanka osteoporoze, možna pa bi bila tudi njegova uporaba v kombiniranih peroralnih kontraceptivih, saj ima manjši vpliv na delovanje jeter in jetrnih encimov v primerjavi z etinilestradiolom in s tem manjše tveganje za razvoj globoke venske tromboze.

### KLJUČNE BESEDE:

Ključne besede: estetrol, estrogeni, plod, kontracepcija, rak dojke

### ABSTRACT

Estetrol is a natural fetal estrogen, synthesised in fetal liver that are capable of 15 $\alpha$ - and/or 16 $\alpha$ -hydroxylation of endogenous estriol and estradiol. *In vitro* studies have shown that estetrol only binds to estrogen receptors (ER) and has the highest affinity for ER $\alpha$ . Estetrol also has high oral bioavailability with slower elimination and thus enables once-daily dosing regimen. Studies on breast cancer revealed that estetrol counteracts the effects of estradiol, prevents tumor growth, and decreases the number and size of pre-existing tumors which enables its use in hormone replacement therapy for women who have or have had breast cancer. Several additional studies verified the safe use of estetrol in humans with no reports of significant negative side effects. Estetrol has a potential for the treatment of

menopausal symptoms including vasomotor symptoms, vulvovaginal atrophy and prevention of osteoporosis. It also has potential for use in combined oral contraceptives with minimal or no effects on liver and liver enzymes, as compared to ethinylestradiol, suggesting a lower risk for development of deep vein thrombosis.

**KEY WORDS:**

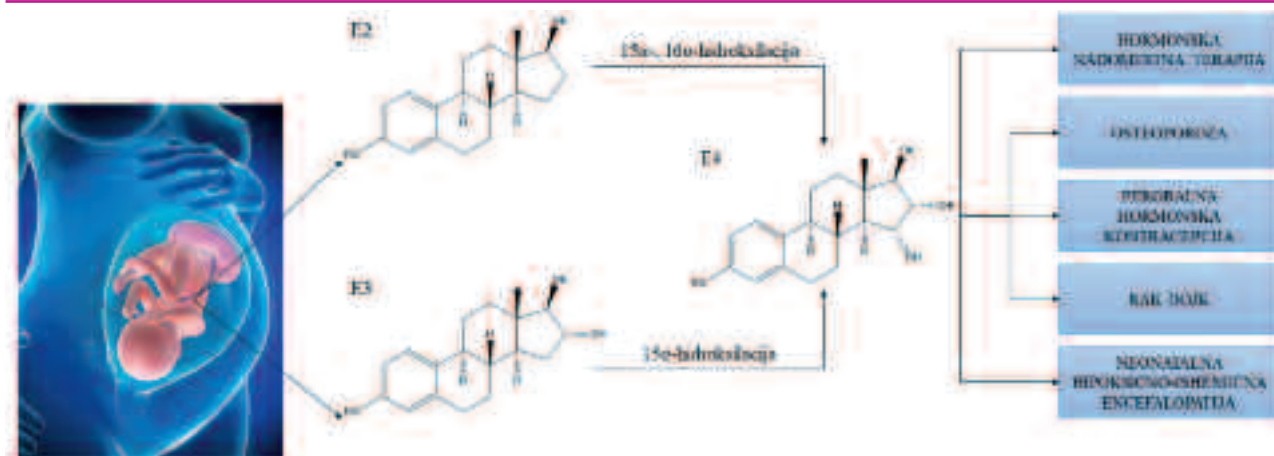
breast cancer, contraception, estetrol, estrogens, fetus

estrone (E1), estradiola (E2) in estriola (E3) prisoten vsaj še en, do tedaj nepoznan metabolit, ki ima v strukturi še eno dodatno hidroksilno skupino (1). Kmalu zatem so Gurpide in sod. preiskovali metabolizem E2 v urinu zdravih nosečnic s pomočjo intravenoznega vnosa <sup>3</sup>H-E2 in <sup>14</sup>C-E2. Potrdili so prisotnost metabolita, ki je mnogo bolj polaren kot E3 in ima enak infrardeči spekter, kot so ga objavili Diczfalusy in sod. (2). Gurpide in sod. so tudi prvi poimenovali spojino estetrol. Estetrol so nato uspešno izolirali iz 200 litrov zbrane urina nosečnic in identificirali s pomočjo plinske kromatografije (3, 4). Na osnovi fizikalnih in kemijskih lastnosti so zaključili, da je spojina 15 $\alpha$ -hidroksiestriol oz. estra-1,3,5(10)-trien-3,15 $\alpha$ -,16 $\alpha$ -,17 $\beta$ -tetrol (slika 1). Estetrol se sintetizira samo v jetrih ploda (v urinu nosečnic so ga detektirali najbolj zgodaj v devetem tednu nosečnosti), kjer potekata 15 $\alpha$ - in/ali 16 $\alpha$ -hidroksilacija E2 in E3 (slika 1) (5-

9). Plod dnevno proizvede okoli 3 mg E4, ki skozi placento prehaja do matere (10). Med nosečnostjo tako koncentracija E4 pri nosečnici stalno narašča in končno doseže koncentracijo 0,5 do 20 nM (11-13). Po porodu se v jetrih novorojenčka geni za encime 15 $\alpha$ - in 16 $\alpha$ -hidroksilacijo ne izražajo več in tako nastanek E4 iz E2 ali E3 ni več mogoč (14). Zaradi prisotnosti in povezave E4 z nosečnostjo so E4 proučevali kot potencialen bioznačevalec poteka nosečnosti. Ugotovili so, da zaradi velike intra- in intervariabilnosti v plazemskih koncentracijah pri nosečnicah E4 ni primeren bioznačevalec (3, 11, 12, 15, 16). V 80. letih prejšnjega stoletja so raziskave o E4 popolnoma opustili, saj so eksperimentalni rezultati raziskav *in vitro* ter *in vivo* pokazali, da ima E4 prešibko estrogeno delovanje (potrebna tudi do 50-krat višja koncentracija E4 oz. zgolj 5-odstotna vezava na receptorje za estrogene (9, 17)), iz česar so sklepali, da ga posledično ne bo moč uporabljati v kliniki. Zanimanje za E4 se je obudilo leta 2001 in privedlo do kliničnih raziskav za potencialno uporabo E4.

## 2 FARMAKODINAMIKA ESTETROLA

Podobno kot E2 se tudi E4 veže na jedrne receptorje za estrogene (ER), in sicer ima večjo afiniteto za vezavo na ER $\alpha$  (K<sub>i</sub> = 4,9 nM  $\pm$  0,6 nM) kot na ER $\beta$  (K<sub>i</sub> = 19,0 nM  $\pm$



**Slika 1:** Estetrol (E4) se pri človeku sintetizira izključno v jetrih ploda, kjer potekata 15 $\alpha$ - in/ali 16 $\alpha$ -hidroksilacija estradiola (E2) in estriola (E3). Na desni strani slike je navedena potencialna klinična uporabnost E4 za nadomeščanje estrogenih hormonov in za zdravljenje navedenih patologij.

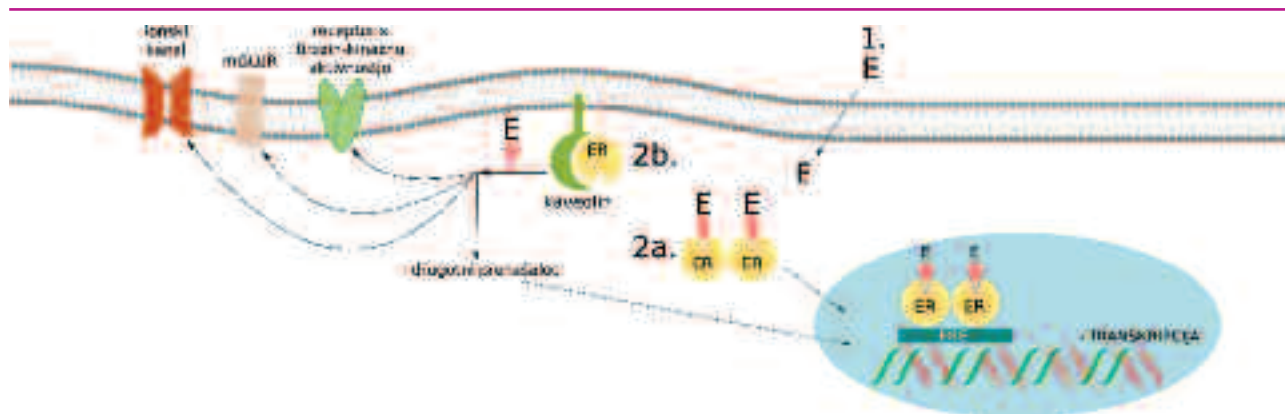
**Figure 1:** In humans, estetrol (E4) is produced only by fetal liver, with 15 $\alpha$ - and/or 16 $\alpha$ -hydroxylations of estradiol (E2) and estriol (E3). On the right side, potential clinical applications of E4 for estrogen hormone replacement and treatment of the pathologies are listed.

1,0 nM), nima značilno izražene afinitete za vezavo na druge steroidne receptorje (receptorji za glukokortikoide, progesteron, testosteron) in na 124 preizkušenih tarčnih molekul za učinkovine (9). Velika specifičnost vezave E4 na ER $\alpha$  nakazuje, da bi tveganje za pojav neželenih učinkov po sistemski aplikaciji E4 lahko bilo majhno. Poskusi na celični liniji MCF7 (modelna celična linija raka dojke z izraženimi ER) so pokazali, da je za doseg učinkov, podobnih E2, potrebna 50-krat večja koncentracija E4 (17). Pri človeku E4 učinkuje estrogeno na vagino, uterus oz. endometrij (18), možgane (zmanjša pojavnost vročinskih valov in zavira ovulacijo) (19, 20) ter povečuje mineralno kostno gostoto (21). Eden izmed napovednih dejavnikov za globoko vensko trombozo je med drugim tudi porast plazemske koncentracije vezavnega globulina za spolne hormone (SHBG, *sex hormone-binding globulin*), ki ga inducira E2, medtem ko so raziskave *in vivo* pokazale, da E4 ne inducira sinteze SHBG v hepatocitih (22). Zaradi odsotnosti vpliva E4 na SHBG ima E4 manjši prokoagulacijski učinek kot preostali estrogeni in zato dodaten potencial pri uporabi za hormonsko terapijo. Številne nadaljnje raziskave *in vitro* ter *in vivo* so pokazale, da ima E4 ob prisotnosti E2 antiestrogeno delovanje (23, 24). V nadaljnjih obsežnih raziskavah *in vivo* ter *in vitro* so Abot in sod. bolj natančno opredelili mehanizem delovanja E4 (25). Rezultati raziskave *in vivo* na mišjem modelu, v kateri so uporabili velike odmerke E4 subkutano (100-krat višji odmerek kot E2) so pokazali, da

E4 v uterusu poveča izražanje genov (niz genov za katere je znano, da jih uravnava E2), proliferacijo epitela in prepreči nastanek ateroma (25). Vsi navedeni učinki so dokazano posledica aktivacije jedrnih ER $\alpha$  (25). Ugotovili so tudi, da E4 ne spodbudi aktivacije endotelijske NO-sintaze in ne pospeši celjenja endotelija. Navedena učinka sta odvisna od membransko posredovane signalizacije steroidnih hormonov (MISS, *membrane-initiated steroid signalling*), ki je E4 ne aktivira (slika 2). Poskusi *in vitro* na celični liniji MCF7 so pokazali, da E4 nasprotuje membransko posredovanim učinkom E2 (25). Raziskava je potrdila že številne predhodne napovedi o uvrstitvi E4 med endogene selektivne modulatorje ER in tako odprla pot kliničnim raziskavam za potencialno uporabo E4.

### 3 FARMAKOKINETIKA ESTETROLA

Visser in sod. so v prvi raziskavi uporabe E4 pri ljudeh ugotovili, da pride 15 do 60 minut po zaužitju E4 do maksimalnega porasta v plazemski koncentraciji, nato se koncentracija E4 v plazmi hitro zmanjšuje, temu pa sledi drugi porast v plazemski koncentraciji E4. Tak časovni potek plazemskih koncentracij E4 po peroralni aplikaciji E4 bi



**Slika 2:** Estrogeni (E; E2 ali E4) vstopajo v celico (1.), po vezavi na receptor pa lahko posredujejo učinke z jedro (2a.) ali membransko posredovano signalizacijo (2b.; delovanje na receptorje s tirozin-kinazno aktivnostjo, metabotropne receptorje za glutamat, ionske kanale ali delovanje s posredovanjem drugotnih prenašalcev). Estetrol posreduje učinke z vezavo na jedrni ER, medtem ko E2 posreduje učinke preko obeh navedenih mehanizmov. E – estrogen; ER – receptor za estrogene; ERE – na estrogene odzivni element; mGLUR – metabotropni receptor za glutamat.

**Figure 1:** Estrogens (E; E2 or E4) enter into the cell (1.) and mediate their effects via direct nuclear- (2a.) or membrane-initiated estradiol signaling (2b.; regulation of tyrosine kinase receptors, metabotropic glutamate receptors, membrane based ion channels or second-messenger systems). Estetrol mediates its effects by binding mainly to nuclear ER while E2 elicits effects by both pathways. E – estrogen; ER – estrogen receptor; ERE – estrogen response element; mGLUR – metabotropic glutamate receptor.

lahko pripisali fenomenu enterohepatičnega kroženja, ki je sicer značilen za estrogene, vendar ne moremo izključiti, da je drugi porast plazemskih koncentracij E4 posledica njegove kumulacije in nato sproščanja iz maščobnega tkiva (14). Estetrol se za razliko od drugih steroidov ne veže na SHBG, kar poveča delež v plazmi prostega E4 (22). K povečanju v plazmi prostega E4 prispeva tudi veliko manjša vezava na albumin v primerjavi z E2 (60 %) (26). Estetrol tudi v veliki koncentraciji (10 µM) ne vpliva na aktivnost glavnih jetrnih encimov citokromov P-450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4), ki so v največji meri povezani z metabolizmom ksenobiotikov (9, 22). Metabolizem E4 poteka z glukuronidacijo in/ali sulfatacijo. Farmakokinetični profil so natančno proučili Gemzell-Danielsson in sod., ki so v raziskavo (klinična raziskava NCT00163033) vključili 49 žensk po menopavzi in potrdili aplikacije dnevnega peroralnega odmerka E4 v razponu med 2 mg in 40 mg (27). Raziskave so razkrile, da se metabolizem E4 med glodavci in človekom precej razlikuje, in sicer se pri glodavcih E4 z oksidoredukcijskimi reakcijami hitro metabolizira (biološki razpolovni čas 2 do 3 ure). Te reakcije I. faze metabolizma pa lahko privedejo do nastanka aktivnih metabolitov, kateholov in kinonov (28). Reakcijam I. faze pri človeku sledijo reakcije II. faze metabolizma, in sicer glukuronidacija na obroču D, pri čemer nastanejo neaktivni metaboliti, biološki razpolovni čas E4 pri človeku pa tako znaša 28 ur. Za razliko od drugih estrogenov se E4 ne izloča samo skozi jetra, temveč tudi skozi ledvice, kar razbremeni žolčnik in zmanjša že znane neželene učinke uporabe klasičnih sinteznih estrogenov, kot so žolčni kamni, vnetje žolčnika in maligne bolezni (29, 30). Farmakokinetične lastnosti E4 pri človeku (počasn metabolizem, dolg biološki razpolovni čas in velika biološka uporabnost) tako omogočajo enkratni peroralni odmerki E4 (9, 14, 31).

## 4 POTENCIALNA UPORABA ESTETROLA V MEDICINI

Cilji prve dvojno slepe, randomizirane, s placebom kontrolirane klinične raziskave, katere rezultate so objavili leta 2008, so bili: ovrednotenje varnosti, sposobnosti sprejemanja zdravljenja, farmakokinetike in vpliva E4 na gonadotropine. V raziskavo so vključili 32 zdravih žensk v obdobju po nastopu menopavze, ki so prejemale E4 peroralno, in sicer v enkratnem odmerku. Ženske so bile

razdeljene v štiri skupine glede na različne prejete odmerke E4: i) 0,1 mg, ii) 1 mg, iii) 10 mg in iv) 100 mg enkrat dnevno (šest žensk na skupino), ki so jih primerjali s štirimi placebo skupinami (dve ženski na skupino). Ugotovili so, da E4 v odvisnosti od odmerka zavira porast plazemske koncentracije luteinizirajočega hormona (LH), mnogo večji pa je njegov zaviralni učinek na plazemske koncentracije folikle stimulirajočega hormona (FSH). Navedeni rezultati dokazujejo delovanje E4 na osrednji živčni sistem oz. na hipofizo. V raziskavi je bila sposobnost sprejemanja zdravljenja z E4 ustrezna, prav tako tudi v skupini, ki je prejemala največji odmerek (100 mg), niso poročali o kakršnih koli neželenih učinkih (14). Med raziskavo niso poročali o nobenih varnostnih težavah, povezanih z aplikacijo različnih odmerkov E4, in s tem zaključili, da je uporaba E4 pri ljudeh ustrezna in varna. Farmakokinetični parametri, ki izvirajo iz te raziskave, so že opisani v prejšnjem poglavju. Na osnovi vseh pozitivnih predhodnih raziskav *in vitro*, *in vivo* ter prvih kliničnih raziskav, so nadaljevali z vrsto raziskav, s katerimi so želeli preveriti možnost klinične uporabe E4.

### 4.1 HORMONSKA NADOMESTNA TERAPIJA

Učinkovitost E4 pri lajšanju vročinskih valov so proučevali *in vivo* pri podganah, ki predstavljajo vzorčni model za raziskave vazomotoričnih simptomov menopavze. Spremljali so učinkovitost zaviranja porasta temperature pri ovariektomiziranih podganah po dodatku naloksona (antagonista opioidnih receptorjev, ki povzroči povišanje telesne temperature). Ugotovili so, da je učinek E4 v odmerku 3 mg/kg/dan primerljiv z 10-krat nižjim odmerkom etinilestradiola (EE), ki je služil kot pozitivna kontrola (19). Raziskava je tako potrdila učinkovitost E4 pri lajšanju vročinskih valov, ki nastopijo v peri- in pomenopavzalnem obdobju. Dodatne raziskave *in vivo* na ovariektomiziranih podganah so pokazale, da ima E4 pri peroralnem zaužitju tudi pozitivne učinke na vagino, uterus in endometrij, kar bi lahko omogočalo terapijo urogenitalne in vulvovaginalne atrofije. Zaradi učinka E4 na proliferacijo endometrija pa bi bila pri ženskah z maternico potrebna dodatna zaščita s progestini zaradi morebitne endometrijske hiperplazije in potencialnega razvoja raka endometrija (18, 21). V predklinični raziskavi so Péqueux in sod. pokazali, da E4 sicer stimulira rast hormonsko odvisnega raka dojke, vendar v koncentracijah, ki presegajo terapevtske koncentracije (> 10 nM), potrebne za zdravljenje simptomov menopavze (32). Učinke E4 na vazomotorične simptome, vagino in endometrij so



nato preiskovali Gemzell-Danielsson in sod., ki so v raziskavo (klinična raziskava NCT00163033) vključili 49 žensk v obdobju po nastopu menopavze. Zaradi potencialno negativnega učinka E4 na hiperplazijo endometrija so največje odmerke E4 (20 mg in 40 mg) prejele ženske, ki so jih predhodno zdravili s histerektomijo, preostale preiskovanke pa so prejemale 2 mg ali 10 mg E4. Primerjalna skupina je prejela 2 mg estradiolvalerata, endogenemu estrogenu najbolj podobno obliko estrogena, ki je kot estrogenska komponenta peroralnih kontraceptivov že uveljavljen v klinični praksi. Rezultati raziskave so pokazali, da je E4 varen, brez resnih neželenih učinkov, izkazuje estrogene učinke na vaginalne celice in tako potencialno omogoča terapijo vulvovaginalne atrofije. Povečanje debeline endometrija je bilo proporcionalno povečanju odmerka E4, zmanjšanje vročinskih valov pa je bilo moč zaznati v skupinah, ki so prejemale 2 mg E4, 10 mg E4 in 2 mg estradiolvalerata. Splošen zaključek raziskave tako potrjuje varno uporabo E4 za namene hormonske nadomestne terapije in izpostavlja potrebo po nadaljnjih kliničnih raziskavah na večjem številu preiskovank (33).

## 4.2 OSTEOPOROZA

Christiansen in sod. so z raziskavo *in vivo* pokazali, da ima E4 veliko biološko uporabnost, inhibira porast koncentracije osteokalcina, ki je posledica znižanja koncentracije estrogenov zaradi ovariektomije, poveča mineralno kostno gostoto ter poveča trdnost kosti, ki so oslabiljene zaradi znižanja koncentracije estrogenov kot posledice ovariektomije. Pri tej raziskavi so bili učinki E4 v odmerku 2,5 mg/kg/dan primerljivi z učinki EE 0,1 mg/kg/dan (EE je služil kot pozitivna kontrola) (21). Raziskave *in vivo* so pokazale, da ima E4 v odmerku 3 mg/kg/dan ali 10 mg/kg/dan v obdobju osmih oz. štirih tednov ugoden varnostni profil, brez neželenih učinkov ali smrtnih izidov (18-20, 23). Pri ženskah v obdobju po menopavzi so ugotovili, da E4 v odvisnosti od odmerka zmanjša koncentracijo označevalca kostne resorpcije (C-telopeptid) in označevalca kostne izgradnje (osteokalcin). Mnogo bolj izražen inhibicijski učinek kostne resorpcije tako predpostavlja povečano tvorbo kosti in možnost uporabe E4 pri preprečevanju nastanka osteoporoze (34). Podoben pozitiven učinek na kosti (klinična raziskava NTR2102) pa so kasneje pokazali tudi pri mladih adolescentnih ženskah (35). Vse navedeno je dodatno pripomoglo in odprlo pot kliničnim raziskavam uporabe E4 pri preprečevanju nastanka osteoporoze pri ženskah v peri- in pomenopavzalnem obdobju.

## 4.3 PERORALNA HORMONSKA KONTRACEPCIJA

Holinka in sod. so *in vivo* primerjali učinek inhibicije ovulacije z E4 in z EE (EE je še vedno najbolj pogosta estrogenska komponenta v kombiniranih kontraceptivih). Rezultati raziskave so pokazali, da je učinek E4 proporcionalen velikosti odmerka. Sicer je E4 18-krat manj učinkovit kot EE, vendar pri predlaganem režimu odmerjanja v enaki meri uspešno zavira ovulacijo in tako predstavlja potencialno novo estrogensko komponento v kombiniranih kontraceptivih (20). V odprti, paralelni, pilotni raziskavi (klinična raziskava NTR2102) so proučevali učinkovitost zaviranja osi hipofiza-jajčniki pri različnih odmerkih E4 v kombinaciji s progestinom drospirenonom ali levonorgestrelom v primerjavi z EE v kombinaciji z drospirenonom. V raziskavo so vključili 109 zdravih žensk, starih med 18 in 35 let, in jih razdelili v šest skupin glede na predpisan režim odmerjanja: i) 5 mg E4 in 3 mg drospirenon, ii) 10 mg E4 in 3 mg drospirenon, iii) 5 mg E4 in 150 µg levonorgestrel iv) 10 mg E4 in 150 µg levonorgestrel, v) 20 mg E4 in 150 µg levonorgestrel, vi) 20 µg EE in 3 mg drospirenon. Ženske, vključene v raziskavo, so predpisane kombinacije prejemale v času treh menstrualnih ciklov. Ključna ugotovitev navedene raziskave je bila dokazano učinkovito zaviranje ovulacije z E4 v odmerku 10 mg/dan ali več v kombinaciji s progestinom (36). Dodatno so pri isti skupini preiskovank proučevali učinek navedenih kombinacij na delovanje ledvic, metabolizem lipidov, kostne označevalce in endokrine parametre ter ugotovili, da imajo kombinacije z E4 minimalne učinke na preiskovane organe in parametre (35). V tretjem delu raziskave so proučili učinek kombinacije E4 z drospirenonom na biooznačevalce hemostaze. Dokazali so, da ima navedena kombinacija antikoagulantni učinek in s tem potencialno zmanjša tveganje za trombozo, kar pa bi bilo potrebno potrditi pri večjem številu preiskovank (37). Nadaljnje proučevanje uporabe in opredelitev natančnejšega odmerka E4 v kombiniranih peroralnih kontraceptivih predstavlja raziskava FIESTA (klinična raziskava NCT01221831), kjer so proučevali učinkovitost nadzora ovulacijskega cikla, vmesnih ali pikčastih krvavitev, sprejemljivost pri uporabnicah, zadovoljstvo, nadzor telesne mase in vsesplošno dobro počutje. V raziskavo je bilo vključenih 389 zdravih žensk, ki so jih za obdobje šestih ciklov razdelili v štiri skupine glede na predpisan režim odmerjanja: i) 15 mg E4 in 3 mg drospirenon, ii) 15 mg E4 in 150 µg levonorgestrel, iii) 20 mg E4 in 3 mg drospirenon, iv) 20 mg E4 in 150 µg levonorgestrel. Primerjalna

skupina preiskovank je prejela estradiolvalerat v kombinaciji z dienogestom (progestin, derivat nortestosterona z močnim gestagenskim učinkom). Glede na vse preiskovane parametre je bila najbolj ugodna in klinično uporabna kombinacija 15 mg E4 in 3 mg drospirenona, ki so jo nadalje proučevali v okviru klinične raziskave III. faze (38, 39).

#### 4.4 RAK DOJK

Raziskava *in vivo* delovanja E4 na modelu podgane s hormonsko odzivnim rakom dojke (kemična indukcija raka s 7,12-dimetilbenzantracenom) je bila razdeljena na dva dela. Pri preventivnem delu raziskave so proučevali učinek E4 v odmerkih 0,5 do 3,0 mg/kg, v intervencijskem delu pa učinke 1 mg/kg, 3 mg/kg in 10 mg/kg odmerka E4. Pri raziskavah sta bili kot referenčni spojini uporabljeni tamoksifen (selektivni modulator receptorjev za estrogene, ki ga uporabljamo v terapiji na ER pozitivnih rakov dojke; v odmerkih 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mg/kg), ter EE (terapevtsko uporaben agonist ER $\alpha$ , ki ima primerljive učinke s tamoksifonom; 0,025; 0,125; 0,15; 0,5 mg/kg), medtem ko so kontrolno skupino sestavljale ovariektomizirane podgane. Rezultati preventivne raziskave po osmih tednih prejemanja E4 so pokazali, da E4 v odvisnosti od odmerka zmanjša število in velikost tumorjev z učinkovitostjo, ki je primerljiva terapiji s tamoksifonom ali ovariektomijo. Pri intervencijski raziskavi na podganah, ki so že razvile tumor, pa je E4 po štirih tednih uporabe značilno zmanjšal tako število kot tudi obseg tumorjev (23, 40). Potencialno terapevtsko uporabo E4 pri hormonsko odvisnih rakah dojke so s pomočjo modelov *in vitro* potrdili tudi drugi raziskovalci (32, 41). Prva prospektivna, randomizirana, dvojno slepa s placebom kontrolirana klinična raziskava (klinična raziskava NCT00464516) je vključevala 30 bolnic z rakom dojke s prisotnimi receptorji za estrogene v obdobju pred menopavzo ali po njenem nastopu. V tej raziskavi so bolnice 14 dni pred operativnim posegom prejemale 20 mg E4. Ugotovili so, da ima E4 proapoptotične učinke na tumorsko tkivo, ne stimulira proliferacije (nespremenjeno izražanje označevalca Ki67), zmanjša se intratumorsko izražanje ER $\alpha$ , poveča se izražanje ER $\beta$ , poveča se tudi koncentracija SHBG, zaradi česar je nato prišlo do zmanjšanja koncentracije E2, zmanjša se koncentracija sistemskega IGF-1 (*insulin growth factor 1*) in FSH (42). Rezultati te raziskave so tako potrdili rezultate predhodnih raziskav *in vitro* ter *in vivo*, ki so predpostavljale protitumorno delovanje E4 na celice raka dojke.

#### 4.5 RAK PROSTATE

V okviru dvojno slepe, randomizirane s placebom kontrolirane klinične raziskave (klinična raziskava NCT02718378) so proučevali potencialno uporabo E4 v terapiji raka prostate. Vključenih je bilo 45 zdravih preiskovancev, ki so jih razdelili v tri skupine. V vsaki skupini so imeli preiskovance, ki so prejeli placebo (5 oseb), ter skupino, ki je prejela E4 (10 oseb; odmerki: 20 mg, 40 mg in 60 mg). Rezultati raziskave so pokazali, da je učinek zmanjšanja koncentracije testosterona terapevtsko nezadosten. DeBruyne in sod. so na osnovi pridobljenih kliničnih in farmakodinamičnih karakteristik predpostavili, da bi E4 v odmerku 40 mg skupaj z analogi luteinizirajoči hormon sproščajočimi hormoni (*luteinizing hormone-releasing hormone*), ki so trenutno del endokrine terapije raka prostate, sicer lahko predstavljal potencialno ugodno terapevtsko kombinacijo, vendar so potrebne nadaljnje klinične raziskave (43).

#### 4.6 NEONATALNA HIPOKSIČNO-ISHEMIČNA ENCEFALOPATIJA

Estetrol ima med estrogene največje število prostih OH-skupin, kar kaže na potencialno močan antioksidativni učinek te spojine. Foidart in sod. so tako na ravni *in vitro* ter *in vivo* preiskovali antioksidativni učinek E4 ter v povezavi s tem učinkovitost in morebitno uporabo E4 pri neonatalni hipoksično-ishemični encefalopatiji (HIE). Pokazali so, da E4 značilno zmanjša aktivnost laktat dehidrogenaze (posledica celičnih poškodb zaradi HIE; laktat dehidrogenaza predstavlja napovedni dejavnik prisotnosti bolezni) ter v osrednjem živčnem sistemu poveča proliferacijo celic. *In vivo* je E4 zmanjšal izgubo zgodnje sivine ter spodbudil nevrogenezo in angiogenezo (44). Z raziskavo so tako prvi pokazali zaščitno delovanje E4 v hipokampusu in korteksu živalskega modela HIE. V naslednji raziskavi je ista raziskovalna skupina pokazala, da pri neonatalni HIE uporaba E4 v kombinaciji z drugimi steroidi (E2, progesteron) nima nobenih koristi v primerjavi z E4 (45). Z nadaljnjimi raziskavami *in vitro* ter *in vivo* so povezali antioksidativni učinek E4 z njegovo vezavo na ER $\alpha$  in ER $\beta$ , nevrogenezo in promielinizacijo pa z vezavo E4 na ER $\beta$  (46). Piel in sod. so za morebitno zdravljenje HIE razvili nov dostavni sistem, in sicer E4, vgrajen v ciklodekstrin, ki sestavlja liposom. Rezultati *in vitro* so pokazali, da pri tem ne prihaja do hemolize, agregacije trombocitov in dostavni sistem ne vpliva na koagulacijo, kar bi omogočilo predvideno intravensko uporabo brez neželenih in toksičnih učinkov. Testi so pokazali, da



formulacija tudi uspešno prehaja krvno-možgansko pregrado in bi tako lahko dosegla tarčno mesto oz. povečala koncentracijo in s tem učinek E4 v možganih (47).

## 5 ZAKLJUČEK

Estetrol je naravni estrogen, strukturno podoben E2 in E3, vendar s številnimi različnimi, potencialno klinično zelo ugodnimi lastnostmi. V primerjavi z E2 ima E4 pri zaužitju precej večjo biološko uporabnost, njegov eliminacijski čas je mnogo daljši, kar omogoča aplikacijo E4 enkrat dnevno. Metabolizem E4 poteka z glukuronidacijo in/ali sulfatacijo, medtem ko drugih metabolitov niso detektirali. Na modelih raka dojk *in vitro* E4 nasprotuje učinkom E2, na modelu podgan pa zavira rast raka dojk, kar kaže na ugoden profil v primerjavi z drugimi estrogeni in na potencialno primer- nost uporabe E4 v hormonski nadomestni terapiji pri bol- nich s trenutnim ali že prebolelim rakom dojk. Rezultati predkliničnih raziskav kažejo na varno uporabo E4 pri ljudeh za terapijo vazomotoričnih simptomov menopavze, vulvo- vaginalne atrofije, za preprečevanje osteoporoze ter za uporabo v kombiniranih kontraceptivih. Estetrol ima mini- malne učinke na sintezo lipoproteinov, SHBG, hemostazo in s tem majhno tveganje za vensko tromboembolijo. Na- daljnje klinične raziskave so potrdile varno in terapevtsko učinkovito uporabo E4, letos pa se je zaključila tudi že III. faza klinične raziskave uporabe E4 in drospirenona v kom- biniranih peroralnih kontraceptivih.

## 6 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno de- javnost RS za finančno podporo v okviru projekta J3-8212.

## 7 LITERATURA

- Hagen AA, Barr M, Diczfalusy E. Metabolism of 17-Beta-Oestradiol-4-14-C in Early Infancy. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1965;49:207-20.
- Gurpide E, Schwers J, Welch MT, Vande Wiele RL, Lieberman S. Fetal and maternal metabolism of estradiol during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1966;26(12):1355-65.
- Heikkilä J, Luukkainen T. Urinary excretion of estriol and 15 alpha-hydroxyestriol in complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1971;110(4):509-21.
- Zucconi G, Lisboa BP, Simonitsch E, Roth L, Hagen AA, Diczfalusy E. Isolation of 15-alpha-hydroxy-oestriol from pregnancy urine and from the urine of newborn infants. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1967;56(3):413-23.
- Schwers J, Eriksson G, Diczfalusy E. 15alpha-Hydroxylation: A New Pathway of Estrogen Metabolism in the Human Fetus and Newborn. *Biochim Biophys Acta*. 1965;100:313-6.
- Hagen AA. Formation of 15-alpha-hydroxyestriol from 4-14C-17-beta-estradiol and 6,7-3H-estriol by an anencephalic. *J Clin Endocrinol Metab*. 1970;30(6):763-8.
- Schwers J, Govaerts-Videtsky M, Wiquist N, Diczfalusy E. Metabolism of oestrone sulphate by the previable human foetus. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1965;50(4):597-610.
- Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJ. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;110(1-2):138-43.
- Visser M, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:64-8.
- Fishman J, Solomon S. Metabolism production and excretion rates of 15alpha-hydroxyestriol in late pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972;35(3):339-44.
- Tulchinsky D, Frigoletto FD, Jr., Ryan KJ, Fishman J. Plasma estetrol as an index of fetal well-being. *J Clin Endocrinol Metab*. 1975;40(4):560-7.
- Kundu N, Wachs M, Iverson GB, Petersen LP. Comparison of serum unconjugated estriol and estetrol in normal and complicated pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1981;58(3):276-81.
- Fleck SC, Twaddle NC, Churchwell MI, Doerge DR, Pande P, Teeguarden JG. Comparative estrogenicity of endogenous, environmental and dietary estrogens in pregnant women I: Serum levels, variability and the basis for urinary biomonitoring of serum estrogenicity. *Food Chem Toxicol*. 2018;115:511-22.
- Visser M, Holinka CF, Coelingh Bennink HJ. First human exposure to exogenous single-dose oral estetrol in early postmenopausal women. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:31-40.
- Kundu N, Grant M. Radioimmunoassay of 15alpha-hydroxyestriol (estetrol) in pregnancy serum. *Steroids*. 1976;27(6):785-96.
- Notation AD, Tagatz GE. Unconjugated estriol and 15alpha-hydroxyestriol in complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1977;128(7):747-56.
- Jozan S, Kreitmann B, Bayard F. Different effects of oestradiol, oestriol, oestetrol and of oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1981;98(1):73-80.
- Heegaard AM, Holinka CF, Kenemans P, Coelingh Bennink HJ. Estrogenic uterovaginal effects of oral estetrol in the modified Allen-Doisy test. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:22-8.
- Holinka CF, Brincat M, Coelingh Bennink HJ. Preventive effect of oral estetrol in a menopausal hot flush model. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:15-21.
- Coelingh Bennink HJ, Skouby S, Bouchard P, Holinka CF. Ovulation inhibition by estetrol in an in vivo model. *Contraception*. 2008;77(3):186-90.
- Coelingh Bennink HJ, Heegaard AM, Visser M, Holinka CF, Christiansen C. Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:2-14.

22. Hammond GL, Hogeveen KN, Visser M, Coelingh Bennink HJ. Estetrol does not bind sex hormone binding globulin or increase its production by human HepG2 cells. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:41-6.
23. Coelingh Bennink HJT, Singer C, Simoncini T, Genazzani AR, Holinka CF, Kubista E. Estetrol, a pregnancy-specific human steroid, prevents and suppresses mammary tumor growth in a rat model. *Climacteric*. 2008;11(sup1):29.
24. Pluchino N, Santoro AN, Casarosa E, Giannini A, Genazzani A, Russo M, et al. Effect of estetrol administration on brain and serum allopregnanolone in intact and ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:285-90.
25. Abot A, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, et al. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor alpha modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1328-46.
26. Wu CH, Motohashi T, Abdel-Rahman HA, Flickinger GL, Mikhail G. Free and protein-bound plasma estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976;43(2):436-45.
27. Coelingh Bennink HJT, Verhoeven C, Zimmerman Y, Visser M, Foidart JM, Gemzell-Danielsson K. Pharmacokinetics of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Climacteric*. 2017;20(3):285-9.
28. Hevir N, Šinkovec J, Rižner TL. Disturbed expression of phase I and phase II estrogen-metabolizing enzymes in endometrial cancer: lower levels of CYP1B1 and increased expression of S-COMT. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;331(1):158-67.
29. Donovan JM. Physical and metabolic factors in gallstone pathogenesis. *Gastroenterol Clin North Am*. 1999;28(1):75-97.
30. Cirillo DJ, Wallace RB, Rodabough RJ, Greenland P, LaCroix AZ, Limacher MC, et al. Effect of estrogen therapy on gallbladder disease. *JAMA*. 2005;293(3):330-9.
31. Jirku H, Kadner S, Levitz M. Pattern of estetrol conjugation in the human. *Steroids*. 1972;19(4):519-34.
32. Gerard C, Mestdagt M, Tskitishvili E, Communal L, Gompel A, Silva E, et al. Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. *Oncotarget*. 2015;6(19):17621-36.
33. Coelingh Bennink HJ, Verhoeven C, Zimmerman Y, Visser M, Foidart JM, Gemzell-Danielsson K. Clinical effects of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Maturitas*. 2016;91:93-100.
34. Visser M, Coelingh Bennink HJ. Clinical applications for estetrol. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;114(1-2):85-9.
35. Mawet M, Maillard C, Klipping C, Zimmerman Y, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2015;20(6):463-75.
36. Duijkers IJ, Klipping C, Zimmerman Y, Appels N, Jost M, Maillard C, et al. Inhibition of ovulation by administration of estetrol in combination with drospirenone or levonorgestrel: Results of a phase II dose-finding pilot study. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2015;20(6):476-89.
37. Klufft C, Zimmerman Y, Mawet M, Klipping C, Duijkers IJ, Neuteboom J, et al. Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception*. 2017;95(2):140-7.
38. Apter D, Zimmerman Y, Beekman L, Mawet M, Maillard C, Foidart JM, et al. Bleeding pattern and cycle control with estetrol-containing combined oral contraceptives: results from a phase II, randomised, dose-finding study (FLESTA). *Contraception*. 2016;94(4):366-73.
39. Apter D, Zimmerman Y, Beekman L, Mawet M, Maillard C, Foidart JM, et al. Estetrol combined with drospirenone: an oral contraceptive with high acceptability, user satisfaction, well-being and favourable body weight control. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2017;22(4):260-7.
40. Visser M, Kloosterboer HJ, Bennink HJ. Estetrol prevents and suppresses mammary tumors induced by DMBA in a rat model. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2012;9(1):95-103.
41. Yue W, Verhoeven C, Bernink HC, Wang JP, Santen RJ. Pro-Apoptotic Effects of Estetrol on Long-Term Estrogen-Deprived Breast Cancer Cells and at Low Doses on Hormone-Sensitive Cells. *Breast Cancer (Auckl)*. 2019;13:1178223419844198.
42. Singer CF, Bennink HJ, Natter C, Steurer S, Rudas M, Moinfar F, et al. Antiestrogenic effects of the fetal estrogen estetrol in women with estrogen-receptor positive early breast cancer. *Carcinogenesis*. 2014;35(11):2447-51.
43. Coelingh Bennink HJT, Zimmerman Y, Verhoeven C, Dutman AE, Mensinga T, Klufft C, et al. A Dose-Escalating Study With the Fetal Estrogen Estetrol in Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(9):3239-49.
44. Tskitishvili E, Nisolle M, Munaut C, Pequeux C, Gerard C, Noel A, et al. Estetrol attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol*. 2014;261:298-307.
45. Tskitishvili E, Pequeux C, Munaut C, Viellevoye R, Nisolle M, Noel A, et al. Use of estetrol with other steroids for attenuation of neonatal hypoxic-ischemic brain injury: to combine or not to combine? *Oncotarget*. 2016;7(23):33722-43.
46. Tskitishvili E, Pequeux C, Munaut C, Viellevoye R, Nisolle M, Noel A, et al. Estrogen receptors and estetrol-dependent neuroprotective actions: a pilot study. *J Endocrinol*. 2017;232(1):85-95.
47. Palazzo C, Laloy J, Delvigne AS, Nys G, Fillet M, Dogne JM, et al. Development of injectable liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposome formulations encapsulating estetrol to prevent cerebral ischemia of premature babies. *Eur J Pharm Sci*. 2019;127:52-9.

