POVEZANOST SKLEROSTINA I DICKKOPFA 1 TE FUNKCIONALNIH GENSKIH POLIMORFIZAMA INHIBITORA AROMATAZE S INDIVIDUALNIM RAZLIKAMA U UČESTALOSTI I TEŽINI NEŽELJENIH POPRATNIH POJAVA LIJEČENJA

Bojanić, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:113404

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Kristina Bojanić

POVEZANOST SKLEROSTINA I DICKKOPFA 1 TE FUNKCIONALNIH GENSKIH POLIMORFIZAMA INHIBITORA AROMATAZE S INDIVIDUALNIM RAZLIKAMA U UČESTALOSTI I TEŽINI NEŽELJENIH POPRATNIH POJAVA LIJEČENJA

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Kristina Bojanić

POVEZANOST SKLEROSTINA I DICKKOPFA 1 TE FUNKCIONALNIH GENSKIH POLIMORFIZAMA INHIBITORA AROMATAZE S INDIVIDUALNIM RAZLIKAMA U UČESTALOSTI I TEŽINI NEŽELJENIH POPRATNIH POJAVA LIJEČENJA

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

Doktorska je disertacija ostvarena u: Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; Klinički bolnički centar Osijek; Dom zdravlja Osijek.

Mentor doktorske disertacije: izv. prof. dr. sc. Martina Smolić, dr. med.
Komentor doktorske disertacije: prof. dr. sc. Aleksandar Včev, dr. med.
Doktorska disertacija sadrži: 94 lista, 29 tablica, 11 slika.

ZAHVALE

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Martini Smolić, dr. med., mentorici, na nesebičnoj pomoći i potpori te dragocjenim uputama i savjetima koji su bili potrebni za istraživanje i izradu doktorske disertacije.

Zahvaljujem svim članovima Zavoda za mineralni metabolizam, Laboratorija za farmakologiju te Laboratorija za medicinsku genetiku Medicinskoga fakulteta Osijek te svima koji su mi bili potpora tijekom izrade ovoga rada.

Veliko hvala suprugu Darku, sinovima Nikoli i Davidu te obitelji i prijateljima za strpljenje, razumijevanje i pomoć pri studiranju, istraživanju i izradi doktorske disertacije.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj majci koja mi je oduvijek bila najveća moralna potpora.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

1. UVOD 1

1.1. Rak dojke 1

1.1.1. Epidemiologija raka dojke 1

1.1.2. Molekularni podtipovi raka dojke 3

1.1.3. Terapija hormonski ovisnog raka dojke 5

1.2. Anastrozol 6

1.2.1. Metabolizam anastrozola 6

1.2.2. Genetičke inačice enzima i transportera faze I i faze II metabolizma anastrozola 7

1.2.3. Neželjene koštane nuspojave 9

1.3. Signalni putovi koštane pregradnje 12

1.3.1. Anabolički signalni koštani put 12

1.3.2. Inhibitori anaboličkog signalnog koštanog puta 12

2. HIPOTEZA 15

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 16

4. ISPITANICI I METODE 17

4.1. Ustroj studije 17

4.2. Ispitanici 17

4.3. Metode 19

4.3.1. Antropometrijska mjerenja 19

4.3.2. Mjerenje mineralne gustoće kostiju 19

4.3.3. Biokemijska analiza biljega koštane pregradnje 20

4.3.4. DNA izolacija 21

4.3.5. Određivanje CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama 22

4.3.6. Upitnik o prehrambenim i životnim navikama 23

4.4. Statističke metode 23

5. REZULTATI 25
5.1. Antropometrijska obilježja te prehrambene i životne navike ispitanica 25
5.2. Mineralna gustoća kostiju ispitanica 31
5.3. Razina biokemijskih markera koštane pregradnje poslijemenopauzalnih bolesnica s rakom dojke prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije i u tijeku liječenja anastrozolom 38
5.4. Povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kostiju ispitanica 38
5.5. Povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s parametrima prehrambenih i životnih navika ispitanica 39
5.6. Raspodjela frekvencije genotipova AA, AG i GG CYP3A4 polimorfizma (rs 2740574) poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke 44
5.7. Raspodjela frekvencije genotipova AA, AG i GG CYP3A5 polimorfizma (rs 776746) poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke 44
5.8. Disekvilibrij 45
5.9. Raspodjela frekvencije genotipova AA, AC i CC UGT1A4 polimorfizma (rs 6755571) poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke 45
5.10. Razlike u BMD i T vrijednosti između homozigota i heterozigota polimorfizama CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4.....46
5.11. Razlike u serumskim razinama sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota polimorfizama CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 49
6. RASPRAVA 50
6.1. Uvod u raspravu 50
6.2. Značajke IA-induciranog gubitka koštane mase u odnosu na ITM ispitanica, redovitost menstuacijskih ciklusa i nastup menopauze prije 45. godine života, životnu dob ispitanica te naviku pušenja.....51
6.3. Razlike u serumskim razinama Wnt inhibitora i njihova povezanost s BMD, prehrambenim navikama i parametrima životnog stila u ovisnosti o liječenju IA….52
6.4. Moguća ograničnenja istraživanja.....56
6.5. Procjena raspodjele ispitivanih polimorfizama i njihove povezanosti s neželjenim nuspojavama.....57

6.6. Buduća istraživanja.....60
6.7. Zaključak rasprave.....63
7. ZAKLJUČCI 64
8. SAŽETAK 66
9. SUMMARY.....68
10. LITERATURA 70
11. ŽIVOTOPIS 82

POPIS KRATICA

BMD Bone Mineral Density (mineralna gustoća kosti)

CYP3A4 Citokrom P450, izoforma 3A4

CYP3A5 Citokrom P450, izoforma 3A5

DKK1 Dickkopf1

DXA Dual X-ray Absroptiometry (dvoenergetska rendgenska apsorpciometrija)

ER estrogenski receptori

ER+ rak dojke s pozitivnim nalazom estrogenskih receptora

HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (ljudski epidermalni čimbenik rasta 2)

HR+ hormonski ovisan rak dojke

IA inhibitor aromataze

ITM indeks tjelesne mase

PCR Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimerazom)

PgR progesteronski receptori

PgR+ rak dojke s pozitivnim nalazom progesteronskih receptora

RANK/RANKL/OPG Receptor activator of NF-kß/receptor activator of NF-kß ligand/ osteoprotegerin (receptor aktivatora nuklearnog faktora-kß/ligand aktivatora receptora nuklearnog faktora-kß/osteoprotegerin)

SERM Selective Estrogen Receptor Modulator (selektivni modulator estrogenskih receptora)

SNP Single Nucleotide Polymorphism (polimorfizam pojedinog nukleotida)

SZO Svjetska zdravstvena organizacija

UGT1A4 UDP-glukuronoziltransferaza, izoforma 1A4

Wnt Wingless-type

POPIS TABLICA

1. 1.1. Dijagnostički kriteriji za osteoporozu prema SZO-u.....11
2. 5.1. Antropometrijska odrednice u odnosu na primjenu terapije.....25
3. 5.2. Razlika u trenutačnoj visini ispitanica u odnosu na mladost.....26
4. 5.3. Raspodjela ispitanica prema uhranjenosti i terapiji.....26
5. 5.4. Zanimanje ispitanica u odnosu na terapiju anastrozolom.....27
6. 5.5. Uzimanje i učestalost uzimanja vitamina D i kalcija (Ca) prema skupinama.....28
7. 5.6. Raspodjela ispitanica prema fizičkoj aktivnosti i navici vježbanja.....29
8. 5.7. Konzumacija mlijeka, mliječnih proizvoda i alkohola prema skupinama….....30
9. 5.8. Regularnost ciklusa, nastup menopauze, stanje po histerektomiji i adneksektomiji u odnosu na skupine prema terapiji.....31
10. 5.9. Raspodjela ispitanica prema nalazu DXA i terapiji anastrozolom.....32
11. 5.10. Razlike u T vrijednostima, BMD-u i Z vrijednostima između ispitanica na terapiji IA-om i bez terapije IA-om.....33
12. 5.11. Razlike u T vrijednostima, BMD-u i Z vrijednostima među ispitanicama prema uhranjenosti (ITM) 35
13. 5.12. Povezanost ITM-a, nastupa menopauze i regularnosti menstruacijskih ciklusa s nalazom T vrijednosti.....36
14. 5.13. Antropometrijske odrednice ispitanica u odnosu na primjenu terapije.....37
15. 5.14. Povezanost indeksa tjelesne mase s BMD-om.....37
16. 5.15. Vrijednosti serumskih razina sklerostina i DKK1 u odnosu na nalaz T vrijednosti.....38
17. 5.16. Povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kosti ispitanica.....39
18. 5.17. Razlike u vrijednosti sklerostina prema prehrambenim i životnim navikama ispitanica.....41
19. 5.18. Razlike u vrijednosti DKK1 prema prehrambenim i životnim navikama ispitanica.....43
20. 5.19. Frekvencije genotipova i varijantnih alela za CYP3A4*1B polimorfizam u poslijemenopauzalnih ER-pozitivnih ispitanica s rakom dojke.....44

21. 5.20. Frekvencije genotipova i varijantnih alela za CYP3A5*3 polimorfizam u poslijemenopauzalnih ER-pozitivnih ispitanica s rakom dojke.....45
22. 5.21. Raspodjela različitih genotipova CYP3A4*1B i CYP3A5*3 polimorfizama među ispitanicama.....45
23. 5.22. Frekvencija genotipova i varijantnih alela za UGT1A4*2 polimorfizam u poslijemenopauzalnih ER-pozitivnih ispitanica s rakom dojke.....46
24. 5.23. Razlike u BMD-u između homozigota i heterozigota za CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizme ispitanica tijekom liječenja IA-om.....46
25. 5.24. Razlike u T vrijednostima između homozigota i heterozigota za CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizme ispitanica tijekom liječenja IA-om.....47
26. 5.25. Razlike u BMD-u između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije....48
27. 5.26. Razlike u T vrijednostima između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije..48
28. 5.27. Vrijednosti sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica liječenih anastrozolom.....49
29. 5.28. Vrijednosti sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama u ispitanica prije početka hormonske terapije....49

POPIS SLIKA

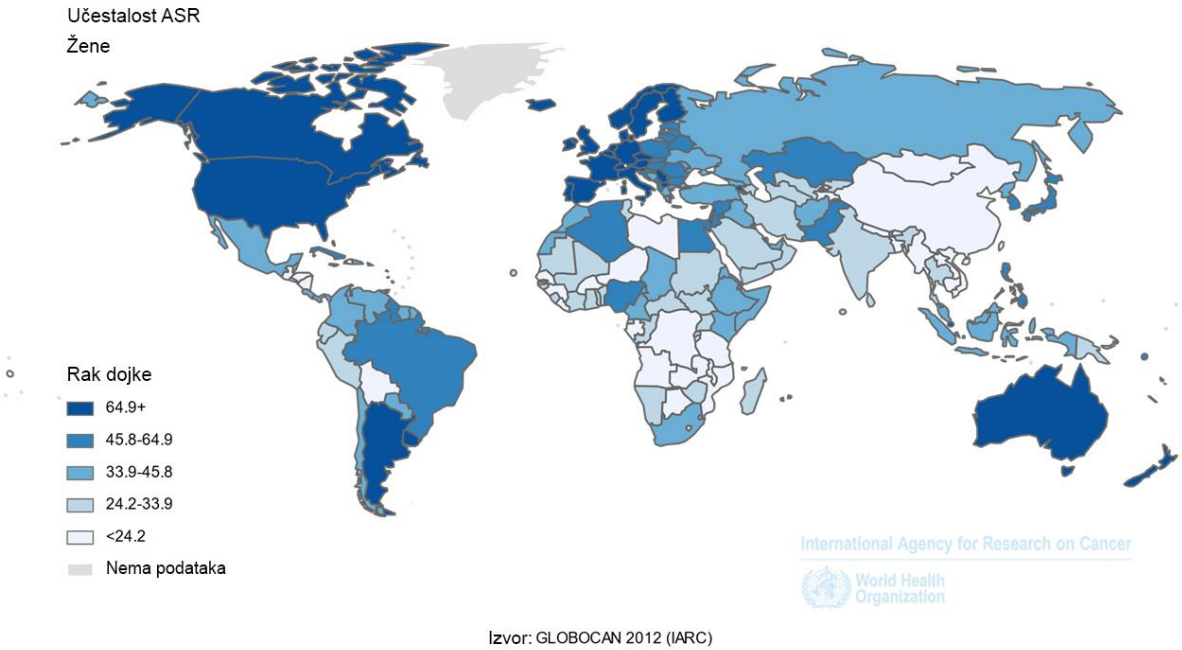
1. 1.1. Incidencija karcinoma dojke u svijetu prema GLOBOCAN-u 2012 1
2. 1.2. Trendovi incidencije i mortaliteta raka dojke u odabranim europskim zemljama prema GLOBOCAN-u 2012. 2
3. 1.3. Mortalitet karcinoma dojke u svijetu prema GLOBOCAN-u 2012…….....3
4. 1.4. Shematski prikaz molekularnih podtipova raka dojke.....4
5. 1.5. Shematski prikaz metabolizma anastrozola.....7
6. 1.6. Lokacija i učinci CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 polimorfizama.....9
7. 1.7. Shematski prikaz regulacije koštane pregradnje.....10
8. 1.8. Shematski prikaz Wnt signalnog puta.....14
9. 2.1. Shematski prikaz tijeka broja ispitanica od uključenja u istraživanje do završne točke studije.....18
10. 4.1. Klasifikacija osteoporoze prema SZO-u temeljem koncepta T vrijednosti.....20
11. 5.1. Razlike u T vrijednostima među ispitanicama prema ITM-u.....34

1. UVOD

1.1. Rak dojke

1.1.1. Epidemiologija raka dojke

Rak dojke najprevalentniji je rak u svijetu s incidencijom 1,7 milijuna u 2012. godini. Iste godine od raka dojke diljem svijeta umrlo je više od 520 000 žena (1). Prema podatcima GLOBOCAN-a svakih 18 sekundi u svijetu dijagnosticira se novi slučaj raka dojke. Globalno svaka osma žena ima rizik od obolijevanja od te bolesti tijekom života, a najviši je udio oboljevanja u dobnoj skupini između 55. i 64. godine života. U Hrvatskoj je rak dojke također vodeća maligna bolest po pojavnosti i po smrtnosti kod žena. U razvijenim zemljama incidencija je raka dojke u porastu na što velikim dijelom utječu starenje populacije, provođenje nacionalnog programa ranog otkrivanja raka dojke, rizični čimbenici vezani uz reprodukcijsko ponašanje žena (niži paritet i kasniji prvi porod), povećanje udjela žena s prekomjernom tjelesnom težinom/pretilih žena te manjak tjelesne aktivnosti (2). Stope incidencije variraju skoro četverostruko među pojedinim područjima, od 27/100 000 u središnjoj Africi i istočnoj Aziji do 96/100 000 u zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi (1) što je prikazano na Slici 1.1.

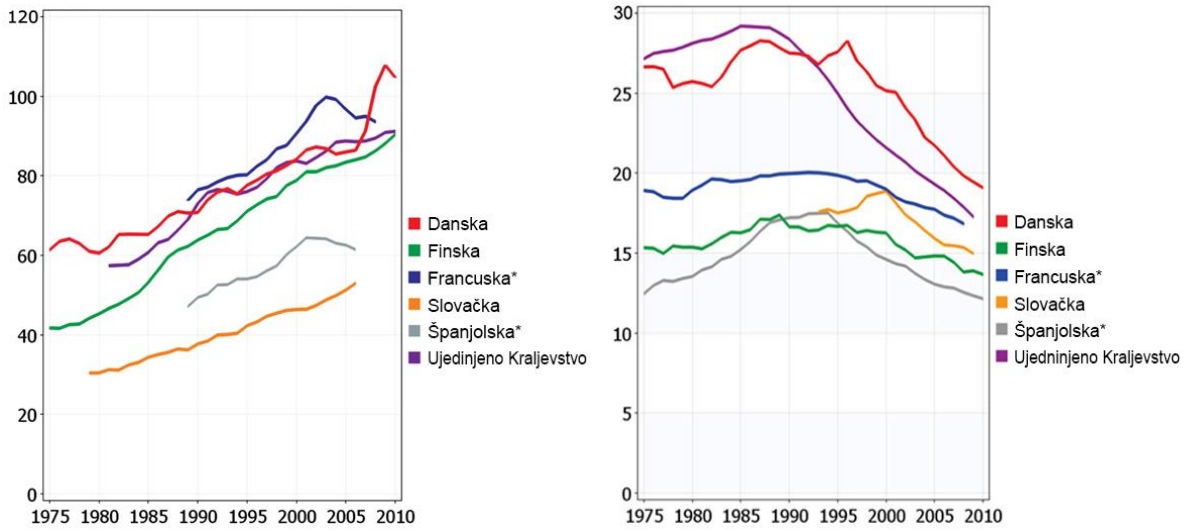


Slika 1.1. Incidencija karcinoma dojke u svijetu prema GLOBOCAN-u 2012. (1)

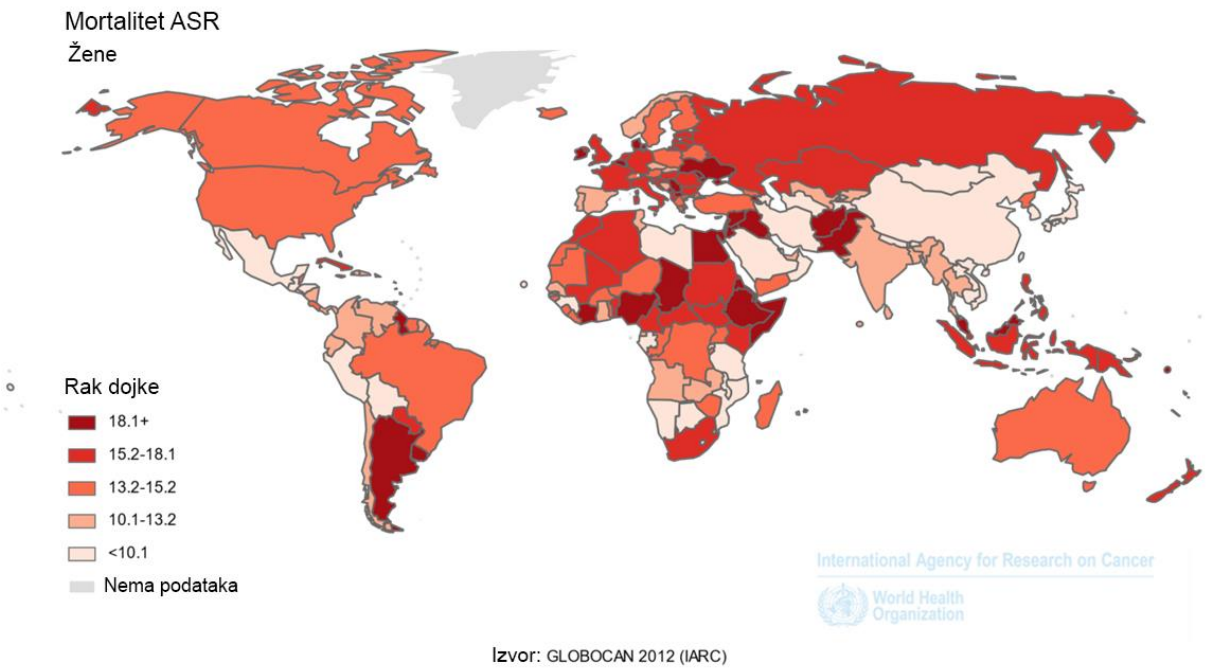
1. UVOD

Studije migranata iz zemalja s niskim rizikom u zemlje s visokim rizikom potvrđuju izjednačivanje nakon jednoga ili dvaju naraštaja što upućuje na važnost utjecaja okolinskih čimbenika (3, 4). Hrvatska prati trend razvijenih zemalja s obzirom na povećanje incidencije raka dojke, međutim za razliku od većine razvijenih zemalja koje bilježe pad mortaliteta, u Hrvatskoj je prisutan divergentni trend, odnosno smanjenje mortaliteta žena u dobi od 50 do 69 godina koje su obuhvaćene Nacionalnim programom ranog otkrivanja te porast mortaliteta od raka dojke u žena starijih od 70 godina. Prema procjenama Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD-a), Hrvatska je vodeća zemlja u Europskoj uniji po mortalitetu od raka dojke i jedna od rijetkih koja bilježi porast mortaliteta u razdoblju od 2003. do 2013. godine.

Pad smrtnosti u razvijenim zemljama prvenstveno je posljedica uvođenja i učinkovitog provođenja Programa ranog otkrivanja raka dojke, bolje edukacije žena o prevenciji i simptomima ranog raka te u učinkovitijim terapijama i načinima liječenja. Trendovi incidencije i mortaliteta raka dojke u odabranim europskim zemljama prikazani su na Slici 1.2., a mortalitet raka dojke u svijetu prikazan je na Slici 1.3.



Slika 1.2. Trendovi incidencije i mortaliteta raka dojke u odabranim europskim zemljama prema GLOBOCAN-u 2012. (1)
Lijevo: Trendovi incidencije raka dojke u odabranim europskim zemljama prema GLOBOCAN-u 2012.
Desno: Trendovi mortaliteta od raka dojke u odabranim europskim zemljama prema GLOBOCAN-u 2012.



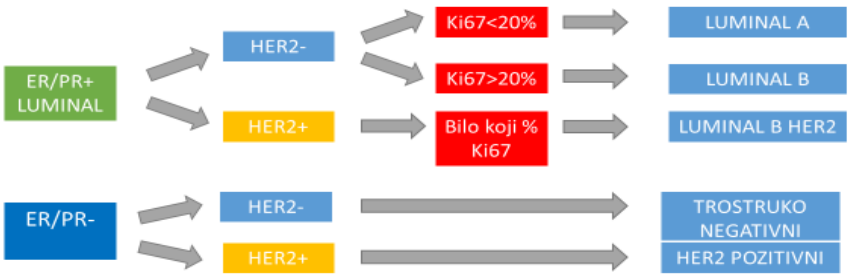
Slika 3.1. Mortalitet karcinoma dojke u svijetu prema GLOBOCAN-u 2012. (1)

1.1.2. Molekularni podtipovi raka dojke

Povijesno su se karcinomi dojke pridruživali u podskupine temeljem kliničkopatoloških odrednica kao što su stadij tumora i stupanj diferencijacije. Druge morfološke osobitosti, poput histološkog tipa, proliferacijskog statusa i vaskularne invazije, također su važan morfološki prognostički pokazatelji biologije tumora. Danas je dokazana heterogena priroda karcinoma dojke čije biološke osobitosti određuju njegovo ponašanje i odgovor na liječenje (5). Trenutačno postoji 21 histološki različit tip karcinoma dojke te četiri različita molekularna podtipa (6). Ekspresija estrogenskih (ER) i progesteronskih (PgR) receptora te ljudskog receptora za epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2), koji su 50-ih godina prošlog stoljeća identificirani kao prediktori odgovora na sistemsko liječenje, i danas su najvažniji čimbenici na čijoj se osnovi definira liječenje karcinoma dojke (7). Temeljem trenutačno prihvaćene klasifikacije (deklaracija St. Gallen, 2013.) tumori se dojke pomoću imunohistokemijskih postupaka dijele na četiri glavna molekularna/intrinzična podtipa koji imaju različitu prognozu i preživljenje: luminalni A, luminalni B, HER2 pozitivni i trostruko negativni (basal-like) (8). Većina invazivnih karcinoma dojke ima pozitivne hormonske receptore (HR+), odnosno imaju izražene ER i PgR, HER2 je negativan, sporije rastu i manje su agresivni (luminalni podtipovi). Studije koje su uspoređivale molekularne podtipove raka dojke s tradicionalnim patohistološkim obilježjima utvrdile su niži gradus i prisutnost ER-a

i/ili PgR-a kod luminalnih karcinoma. Razlikovanje između luminal A i luminal B podtipa temelji se na proliferacijskom indeksu Ki-67. Proliferacijski indeks određuje broj stanica u diobi, a prijelomna je vrijednost 20 %. U usporedbi s luminal A podtipom, luminal B tumori imaju niži izražaj ER-a, niži ili nemjerljiv izražaj PgR-a, viši histološki gradus tumora, viši izražaj gena povezanih s proliferacijom (9, 10). Mala skupina HR+ tumora ima istovremeno i amplifikaciju HER2 gena i predstavlja podtip luminal B tumora. Približno 15 % bolesnica s rakom dojke uz negativne ER i PgR ima povećan izražaj HER 2 onkoproteina što je povezano s većom agresivnošću i povećanom mogućnošću recidiva. Povećana izražajnost HER2 receptora češće je udružena s lošijom diferencijacijom tumorskih stanica i visokim stupnjem proliferacije. Trostruko negativan rak dojke fenotipski je opis tumora dojke koji nema izražaj ER, PgR ni HER2 te za razliku od opisivanih molekularnih podtipova nema etablirane ciljane terapije (11). Klinički se češće nalazi u mladih žena te je udružen s lošijom prognozom, a češće pokazuje mutaciju BRCA 1 gena. Slika 1.4. shematski prikazuje obilježja molekularnih podtipova raka dojke.

Parametri:	
ER	Receptori za estrogen
PR	Receptori za progesteron
HER2	Ljudski epidermalni čimbenik rasta 2
Ki67	Biomarker proliferacije



Slika 1.4. Shematski prikaz molekularnih podtipova raka dojke

Molekularna je klasifikacija raka dojke u neprekidnom razvoju te prema rezultatima istraživanja Curtisa i suradnika, objavljenih u časopisu Nature 2012. godine, postoji najmanje deset biološki različitih podtipova raka dojke koji imaju različito preživljenje (12).

1.1.3. Terapija hormonski ovisnog raka dojke

Terapijski je pristup karcinomu dojke višediciplinaran i obuhvaća kirurgiju, radioterapiju, kemoterapiju te hormonsku terapiju. Dvije trećine žena oboljelih od raka dojke imaju hormonski ovisan tip raka dojke i kandidati su za adjuvantnu hormonsku terapiju (13). Temeljni je učinak bilo koje hormonske terapije deprivacija tumorskih stanica od estrogena. U premenopauzi glavni su izvor estrogena jajnici, a u poslijemenopauzi to je periferna sinteza, prvenstveno u masnom tkivu. U poslijemenopauzalnih žena oboljelih od karcinoma dojke kao adjuvantna endokrina terapija primjenjuju se dvije velike skupine lijekova: selektivni modulatori ER (SERM) i treća generacija inhibitora aromataze (IA). SERM obuhvaćaju tamoksifen (TAM) i raloksifen koji imaju antagonistički učinak na ER u dojci. Treća generacija IA obuhvaća nesteroidne anastrozol i letrozol te steroidni eksemestan koji specifično blokiraju enzim aromatazu. Aromataza je mikrosomalni enzim koji pripada obitelji citokroma P450, kodiran genom citokrom P450 izoforma 19A1 (CYP19A1) na lokusu 15q21.2. Nalazi se u brojnim ljudskim tkivima (jajnicima, testisima, masnom tkivu, posteljici, mozgu, mišićima i dr.) i katalizira konverziju androstendiona i testosterona u estron i estradiol koji su glavni izvor estrogena u poslijemenopauzalnih žena (14, 15). Treća generacija IA-a suprimira 96 – 99 % aktivnosti aromataze tako da nakon tri tjedna terapije IA-om dolazi do brzoga smanjenja razine estrogena, do nemjerljivih razina (16). Brojne su kliničke studije i meta analize u posljednjih pet godina pokazale da IA imaju značajno manju stopu lokalnih i distalnih recidiva u odnosu na SERM kao inicijalna monoterapija ili nakon dvije do tri godine SERM terapije (17, 18). Posljedično tomu Američko je društvo onkologa (American Society of Clinical oncology, ASCO) u svojim smjernicama preporučilo primjenu IA-a kao inicijalnu monoterapiju ili nakon dvije do tri godine liječenja SERM-om (19). Temeljem specifičnosti i potentnosti u inhibiranju aktivnosti aromataze, IA su klasificirani u prvu, drugu i treću generaciju. Zatim se podklasificiraju u tip 1 koji ireverzibilno inhibiraju te tip 2 koji reverzibilno blokiraju aromatazu (20). Egzemestan je predstavnik tipa 1 IA, tzv. suicidalni inhibitor koji kovalentnim vezanjem ireverzibilno inhibira aromatazu i dovodi do permanentne inaktivacije koja perzistira i nakon prekida davanja lijeka, sve dok periferna tkiva ne sintetiziraju novi enzim. Anastrozol i letrozol kao nesteroidni predstavnici tipa 2 IA reverzibilno se vežu na heme grupu ciokroma P450 što rezultira u kompetitivnoj inhibiciji. Treća je generacija IA-a u usporedbi s prethodnim dvjema generacijama najpotentnija,

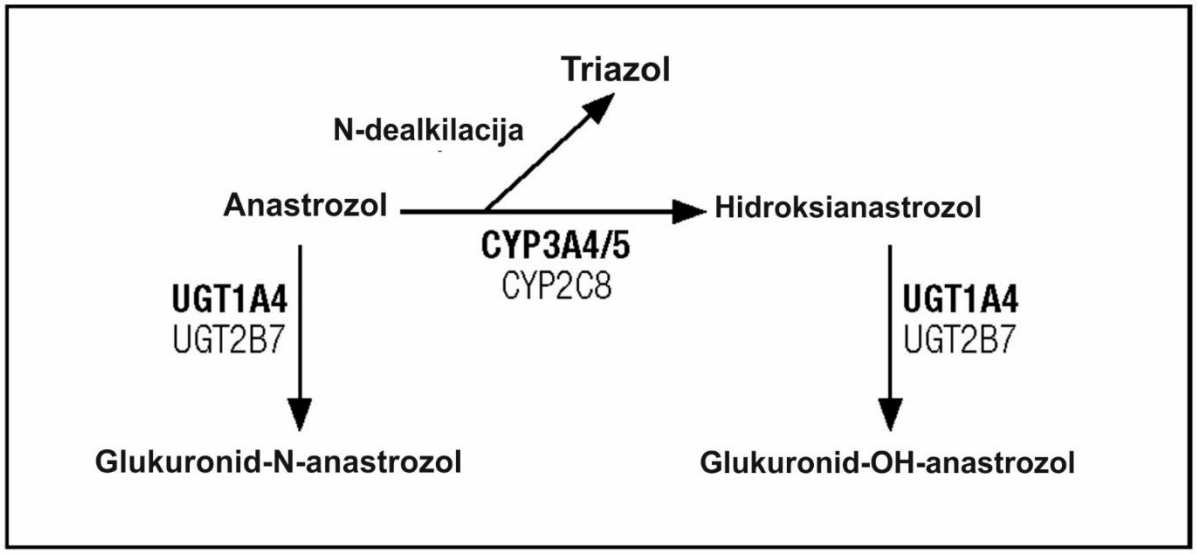
najselektivnija i najspecifičnija u inhibiranju aktivnosti aromataze, uz poboljšan profil nuspojava (20).

1.2. Anastrozol

1.2.1. Metabolizam anastrozola

Anastrozol se predominantno metabolizira u jetri uglavnom u dvama koracima: u fazi I podliježe hidroksilaciji u hidroksianastrozol te N-dealkilaciji u triazol najviše pomoću mikrosomalnog enzima citokroma P450, izoforme 3A4, te nešto manje pomoću izoformi 3A5 i 2C8 (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8), a u fazi II glukuronidacijom stvara se glukuronid-OH-anastrozol pomoću enzima UDP-glukuroniltransferaze, izoforme 1A4, UGT1A4 (21). Eksperimenti *in vitro* pokazali su da se anastrozol može izravno metabolizirati putem faze II glukuronidacije u anastrozol-N-glukuronid u mikrosomima ljudske jetre (15, 21) upućujući na to da funkcionalni polimorfizmi u genu koji kodira UGT1A4 mogu imati ulogu u metabolizmu anastrozola. Glavni su metaboliti anastrozola u plazmi i urinu: triazol, hidroksianastrozol, glukuronid hidroksianastrozola te N-glukuronid anastrozola. Triazol kao glavni metabolit u cirkulaciji nema farmakološku aktivnost, a 40 % izlučenog anastrozola nalazi se u obliku glukuronida (15).

U preporučenoj dozi od 1 mg na dan anastrozol doseže maksimalne koncentracije u plazmi za otprilike dva sata. Manje od 10 % anastrozola izlučuje se u nepromijenjenom obliku, a 60 % izlučuje se u obliku metabolita. Prosječno poluvrijeme života u plazmi iznosi oko 50 sati što upućuje na to da je primjena jedne doze dnevno dovoljna (22). Slika 1.5. shematski prikazuje opisan metabolizam anastrozola.



Slika 1.5. Shematski prikaz metabolizma anastrozola

1.2.2. Genetičke inačice enzima i transportera faze I i faze II metabolizma anastrozola

Studije su pokazale da tijekom primjene 1mg/dan anastrozola postoje velike individualne razlike i u razinama hormona (estron, estradiol, androstendion i testosteron) kao i u koncentracijama samog anastrozola i njegovih matabolita u plazmi (23, 24) što može utjecati i na samu učinkovitost terapije. Također je utvrđeno da postoji i varijabilnost u učestalosti i težini neželjenih popratnih pojava liječenja, osobito mišićno-koštanih nuspojava koje se javljaju u čak do 50 % slučajeva i glavni su uzrok prijevremenog prekida liječenja (25-28). Takav visok stupanj varijabilnosti u metabolizmu anastrozola može se pripisati individualnim razlikama u farmakokinetici i farmakodinamici, odnosno može biti posljedica genetičkih varijacija. Vjerojatno bi polimorfizmi pojedinog nukleotida (SNP) u genima koji kodiraju enzime i transportere faze I i II metabolizma anastrozola mogli imati ključnu ulogu u određivanju individualnog odgovora na anastrozol, pretpostavljajući da odobrena i primjenjivana doza anastrozola od 1 mg/dan nije optimalna za sve bolesnice (29).

Polimorfizam jednog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism, SNP) promjena je jedne baze koja se pojavljuje u frekvenciji većoj od 1 % unutar populacije. SNP-ovi se pojavljuju u kodirajućim i nekodirajućim regijama. Većina SNP-ova nalazi se u nekodirajućim regijama i nemaju izravan utjecaj na fenotip jedinke. U kodirajućim regijama pojavljuju se nesinonimni i sinonimni SNP-ovi koji su povezani s funkcijom proteina te mogu uzrokovati različite fenotipove i bolesti. Proučavanje SNP-ova koristi se za

fenotipizaciju i u farmakogenetici kako bi se otkrila povezanost SNP-ova s odgovorima organizma na lijekove.

Studije su otkrile SNP u promotorskoj regiji gena CYP3A4 (rs2740574). U usporedbi s divljim tipom CYP3A4*1A, mutirani aleli CYP3A4*1B prema pojedinim istraživanjima pokazuju dvostruko povećanje aktivnosti kodirajućeg enzima (30). Riječ je o zamjeni adenina gvaninom na kromosomu 7q22.1 . U genu CYP3A5 čest je SNP zamjena adenina gvaninom u intronu 3 (rs776746). Mutirani aleli CYP3A5*3 rezultiraju defektom prekrajanja i smanjenom aktivnosti, odnosno gubitkom aktivnosti kodirajućeg enzima što bi prema nekim studijama moglo imati ulogu ne samo u interindividualnim varijacijama, nego i u interetničkim varijacijama u metabolizmu anastrozola (30, 31).

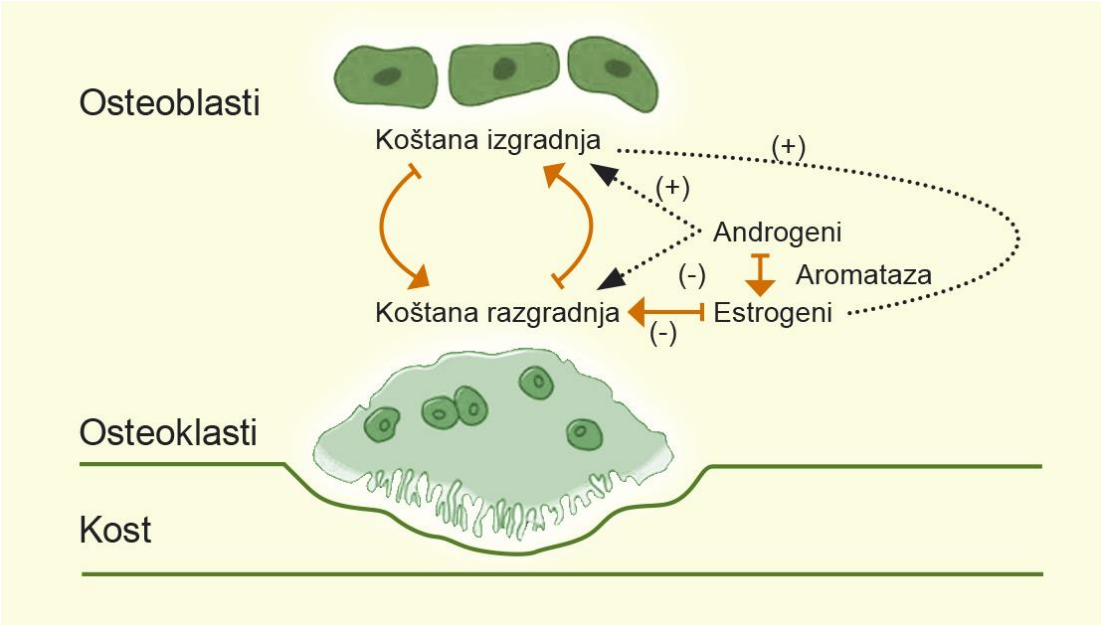
Gen za UGT 1A4 izrazito je polimorfan, smješten na lokusu 2q37.1 i kodira UDP-glukuronoziltransferazu, enzim glukuronizacijskog puta za transformaciju malih lipofilnih molekula poput steroida, bilirubina, hormona i lijekova u hidrofilne metabolite, topive u vodi. Ekspresija UGT1A4 primarno je u jetri, no i u bilijarnom sustavu, debelom crijevu i u dojci (32, 33). Glukuronidacijska aktivnost u različitim ljudskim tkivima pokazuje visok stupanj interindividualne varijabilnosti koja se ne može objasniti jedinstvenom tkivnom specifičnošću ekspresije UGT1A4 gena (34, 35). Moguće su objašnjenje te varijabilnosti SNP-ovi u promotorskoj i u kodirajućim regijama UGT1A4 gena, rezultirajući kvantitativnim ili kvalitativnim promjenama specifične enzimske aktivnosti među pojedincima. U genu za UGT1A4 identificirana je zamjena citozina s adeninom u egzonu 1 (rs6755571) koja *in vitro* pokazuje promijenjenu (smanjenu) glukuronidacijsku aktivnost (36-38). Nakon saznanja stečenih u *in vitro* uvjetima nastavljena su istraživanja o utjecaju te genetičke inačice na biotransformaciju anastrozola *in vivo*. Iako prema studijama Lazarusa i Suna te Kamdema i suradnika mutirani aleli UGT1A4*2 ne pokazuju razliku u glukuronidacijskoj aktivnosti u usporedbi s divljim tipom (15, 21), Ehmerovo istraživanje taj SNP povezuje sa smanjenom glukuronidacijskom aktivnošću prema mutagenim aminima i endogenim steroidima, mijenjajući jetreni metabolizam anastrozola i detoksikaciju (37, 39). Lokacija i funkcijski učinci opisanih SNP-ova prikazani su shematski na Slici 1.6.

POLIMORFIZAM	PROMJENA NUKLEOTIDA	RS	LOKACIJA PROTEINSKI EFEKT	FUNKCIJSKI UČINAK
CYP3A4*1B	-392A>G	rs2740574	PROMOTORSKI SNP	POVEĆANA TRANSKRIPCIJSKA AKTIVNOST, POVEĆANA EKSPRESIJA ENZIMA
CYP3A5*3	6986A>G	rs776746	DEFEKT PREKRAJANJA U INTRONU 3	SMANJENA AKTIVNOST I EKSPRESIJA ENZIMA
UGT1A4*2	70C>A	rs6755571	EGZON 1	SMANJENA GLUKOURONIDACIJSKA AKTIVNOST

Slika 1.6. Lokacija i učinci CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 polimorfizama

1.2.3. Neželjene koštane nuspojave

Budući da estrogen negativno regulira koštanu resorpciju i aktivnost osteoklasta, smanjenje njegovih serumskih razina povećat će proces razgradnje kosti. Tijekom prvih 4 – 8 godina menopauze fiziološko smanjenje ovarijske proizvodnje estrogena udruženo je s gubitkom koštane mase i do 3 % godišnje (40). Kada proizvodnju estrogena preuzme masno tkivo, gubitak se koštane mase uspori na 1 % godišnje (41). Te bazalne razine estrogena imaju ključnu ulogu u usporavanju poslijemenopauzalne osteoporoze i u regulaciji koštane pregradnje. Studije su pokazale da rezidualne razine estrogena usporavaju gubitak koštane mase i preveniraju prijelome (42), a žene s nemjerljivim razinama estrogena imaju povećanu incidenciju fraktura (43). U odnosu na zdrave poslijemenopauzalne žene, bolesnice na terapiji anastrozolom imaju nagao i ubrzan gubitak koštane mase oko 2 % godišnje (44). Više je kliničkih studija potvrdilo da IA-om induciran gubitak koštane mase (AIBL) lumbalne kralježnice i kuka premašuje postupni gubitak od 1 % godišnje i dva je do tri puta brži u odnosu na zdrave poslijemenopauzalne žene (43-46). Opisana regulacija koštane pregradnje shematski je prikazana na Slici 1.7.



Slika 1.7. Shematski prikaz regulacije koštane pregradnje

Zaključno, više je studija utvrdilo povezanost liječenja anastrozolom s povećanim rizikom za osteoporozu, odnosno prijelomima (47-49).

Osteoporoza, u doslovnom značenju „porozna kost“, najčešća je metabolička bolest kosti. Ta sistemska skeletna bolest karakterizirana je smanjenom masom koštanog tkiva i poremećenom mikroarhitekturom koštanih gredica. Posljedično je povećan rizik za nastanak prijeloma koji su glavna klinička posljedica bolesti te uzrok morbiditeta i mortaliteta, osobito u starijoj populaciji (50). Prema International Osteoporosis Foundation (IOF), riječ je o tihoj epidemiji s više od 200 milijuna oboljelih ljudi u svijetu. Predviđa se da će svaka treća žena i svaki peti muškarac pretrpjeti osteoporotičnu frakturu. Prema SZO-u osteoporoza je jedna od najčešćih „oslabljujućih“ krončnih bolesti i glavni javnozdravstveni problem u svijetu. Dijagnoza osteoporoze postavlja se denzitometrijom određivanjem mineralne gustoće kosti (BMD, engl. Bone Mineral Density). Danas je najčešće primjenjivana denzitometrijska metoda za određivanje mineralne gustoće kosti dvoenergetska rendgenska apsorpciometrija – DXA (engl. Dual X-ray Absorptiometry). Rezultati su mjerenja izraženi: kao BMD (u g/cm²) i kao T vrijednost (predstavlja odstupanje izmjerene vrijednosti BMD-a od vršne koštane mase mladih osoba izraženo u standardnim devijacijama (SD)) (51). SZO je 1993. godine definirala osteoporozu u poslijemenopauzalnih žena kao mineralnu gustoću kosti mjerenu DXA metodom u području kralježnice, vrata bedrene kosti ili podlaktice s izmjerenim vrijednostima manjima za više od 2,5 standardne devijacije (SD) od vrijednosti mlade odrasle populacije. Za manji gubitak koštane gustoće, tj. rezultatima DXA mjerenja mineralne

gustoće kosti koji odgovaraju -1 do -2,5 SD za mladu odraslu populaciju, postavlja se dijagnoza osteopenije (52). Godinu dana kasnije navedeni su kriteriji dopunjeni postojanjem "osteoporotičnog prijeloma", unatoč DXA nalazu, što znači uznapredovanu, odnosno tešku osteoporozu (Tablica 1.1).

Tablica 1.1. Dijagnostički kriteriji za osteoporozu prema SZO-u

Dijagnoza	DXA kriterij
Uredan nalaz	BMD nije niži od 1 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju.
Osteopenija	BMD je između -1 i -2,5 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju.
Osteoporoza	BMD je niži od -2,5 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju.
Teška osteoporoza	BMD je niži od -2,5 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju uz postojanje jednog ili više osteoporotičnih prijeloma.

BMD – mineralna gustoća kosti (engl. Bone mineral density)

Uz dva najčešća tipa, poslijemenopauzalnu i senilnu osteoporozu, postoji još i sekundarna osteoporoza, tj. gubitak mineralne gustoće kosti zbog neke druge poznate bolesti (npr. hiperkortizolizma, hiperparatireoidizma, hipertireoze, malnutricije, hipogonadizma, kronične bubrežne insuficijencije i dr.) ili zbog uzimanja nekih lijekova poput kortikosteroida, heparina, ciklosporina, kemoterapeutika (46). Trenutačno ne postoji lijek za izliječenje osteoporoze, nego dostupan terapijski tretman predstavlja kombinaciju lijekova uz promjene stila života u cilju usporavanja gubitka koštane mase. Uz dvije dostupne kategorije lijekova, antiresorptivne i anaboličke, istraživanja su usmjerena na nove terapijske pristupe. Jedan od njih jest inhibicija sklerostina kao inhibitora Wnt signalnog puta (53).

1.3. Signalni putovi koštane pregradnje

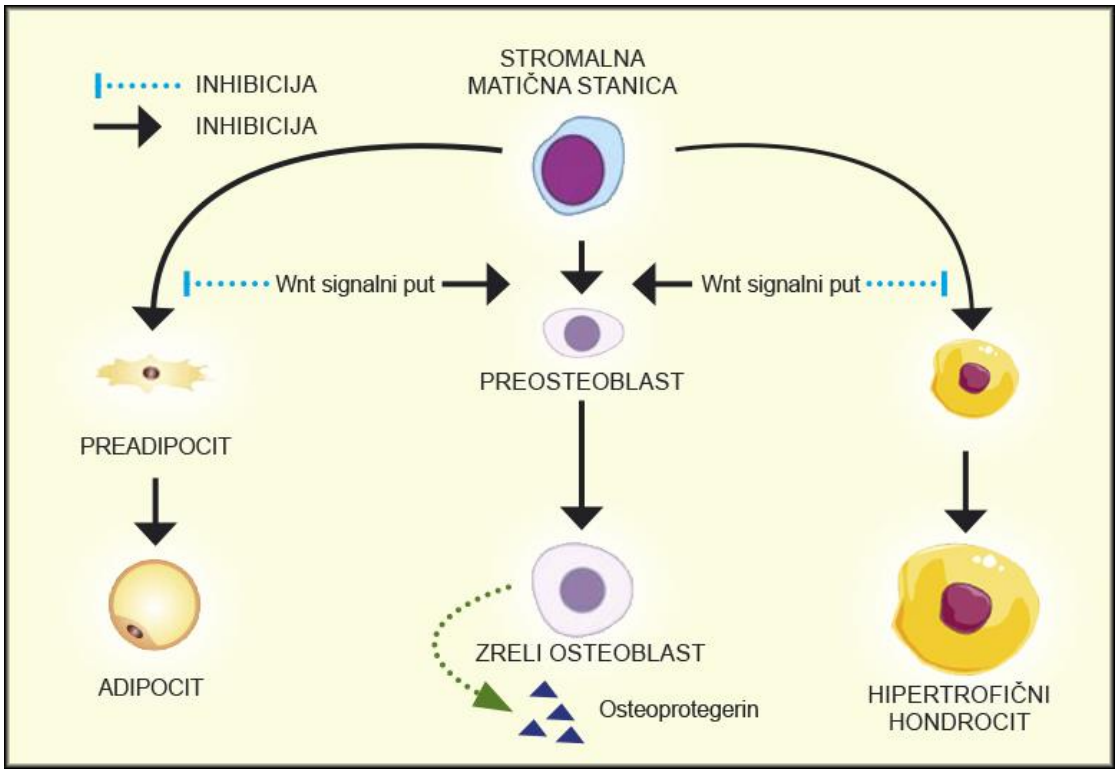
1.3.1. Anabolički signalni koštani put

Za održavanje normalne mikroskopske koštane građe, odnosno koštanoga zdravlja, nužno je da razgradnja i stvaranje kosti tijekom preoblikovanja budu pomno usklađeni. Fiziološki proces koštane pregradnje odražava ravnotežu između resorptivne aktivnosti osteoklasta i osteoblastima posredovanog stvaranja kostiju, a održava ga kompleksan sustav signalnih putova koji reguliraju funkciju osteoklasta i osteoblasta. RANK/RANKL/OPG sustav dugo se godina smatrao temeljnim signalnim putom koštane pregradnje koji regulira diferencijaciju i aktivnost osteoklasta. Ligand aktivatora receptora nuklearnog faktora-kß (RANKL) proizvode stromalne stanice koštane srži i osteoblasti. On se veže za receptor aktivatora nuklearnog faktora (RANK) na površini prekursora osteoklasta. Vezanjem RANKL-a na RANK dolazi do diferencijacije i aktivacije osteoklasta te osteoklastogeneze. Osteoprotegerin (OPG) je glikoprotein koji također proizvode osteoblasti, djeluje kao receptor mamac za RANKL i tako blokira interakciju između RANK-a i RANKL-a, odnosno sprječava osteoklastogenezu (54). U novije vrijeme sve veću važnost ima anabolički koštani put Wingless/ß-katenin (kanonski Wnt signalni put) čija aktivacija potiče diferencijaciju osteoblasta (55). Potpuna ravnoteža u procesu koštane pregradnje postoji onda kada se razgrađena kost u potpunosti nadomjesti novim koštanim tkivom.

1.3.2. Inhibitori anaboličkog signalnog koštanog puta

Wnt signalni put ključan je u određivanju diferencijacije stromalnih matičnih stanica u zrele osteoblaste, hondrocite i adipocite (56). Aktivacijom Wnt puta potiče se proliferacija i diferencijacija osteoblasta, suprimira se adipogeneza i neizravno se smanjuje osteoklastogeneza putem pojačane ekspresije OPG-a od osteoblasta (57, 58). Navedeni anabolički koštani put reguliraju dva glikoproteina, sklerostin i dickkopf1 (DKK1), djelujući kao inhibitori što je shematski prikazano na Slici 1.8. Klinička važnost sklerostina u koštanom metabolizmu inicijalno je prepoznata u bolesnika sa sklerosteozom i van Buchenovom bolešću kod kojih je mutacija SOST gena rezultirala deficijencijom sklerostina te

prekomjernom koštanom formacijom (59). Nasuprot tomu prekomjerna ekspresija SOST gena u miševa rezultirala je osteopenijom (60). Sklerostin pak izlučuju gotovo isključivo zreli osteociti (61), a DKK1 izlučuju različita tkiva, uključujući i stanice tumora (62). U posljednjih nekolika godina objavljeno je više istraživanja o promjenama serumskih razina Wnt inhibitora u poslijemenopauzalnih, a inače zdravih žena te njihovoj mogućoj ulozi u liječenju osteoporoze te drugih koštanih bolesti neutralizirajućim protutijelima (63-66). U žena oboljelih od raka dojke negativan učinak IA na zdravlje kostiju dobro je istražen i dokazan, a učinak na Wnt inhibitore proučavan je u svega nekoliko studija s nedosljednim rezultatima (67-69). Kyvernitakis je prospektivno analizirao poslijemenopauzalne žene s hormonskim ovisnim rakom dojke i nakon 12 mjeseci utvrdio porast serumskih razina sklerostina uz smanjenje razina DKK1. Glavni nedostatak studije bio je nedostatak kontrolne skupine (68). Wonjin Kim serumske je razine sklerostina u poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke usporedila s onima u premenopauzalnih žena i potvrdila porast razina sklerostina u slučaju deplecije rezidualnog estrogena, međutim nije analizirala promjene serumskih razina DKK1 (67). Te rezultate nije potvrdio Gobel koji je 2017. objavio da u bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke nakon 12 mjeseci terapije IA-om nije primijetio ni promjene razina sklerostina ni DKK1. Jedino je u bolesnica liječenih Tamoxifenom utvrdio značajno smanjenje serumskih razina DKK1, međutim bez promjena u serumskim razinama sklerostina (69). Kalam je u studiji na poslijemenopauzalnim miševima utvrdio porast serumskih razina i sklerostina i DKK1 nakon liječenja IA-om u odnosu na raloksifen, međutim isti nisu imali i podležeći hormonski ovisni rak dojke (70). U skladu s navedenim istraživanjima, sklerostin i DKK1 mogli bi postati mogući novi pokazatelji osjetljivih i kvantitativnih promjena u koštanoj pregradnji, ali i moguće mete za liječenje koštanih bolesti.



Slika 1.8. Shematski prikaz Wnt signalnog puta

2. HIPOTEZA

Sklerostin i DKK1 biljezi su osjetljivih i kvanitativnih promjena koštane pregradnje tijekom terapije IA-om.

Funkcionalni genski polimorfizmi enzima i transportera faze I i faze II metabolizma IA povezani su s nastankom individualnih razlika u učestalosti i težini neželjenih koštanih popratnih pojava liječenja ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke liječenih IA-om.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni su ciljevi ovoga istraživanja:

1. denzitometrijom odrediti gustoću koštane mase ispitanica,
2. biokemijskim analizama odrediti cirkulirajuće razine Wnt inhibitora u ispitanica s karcinomom dojke liječenih IA-om te ih usporediti s kontrolnom skupinom, odnosno s ispitanicama oboljelima od karcinoma dojke prije uvođenja terapije IA-om,
3. istražiti povezanost između serumskih pokazatelja koštane pregradnje i gustoće koštane mase ispitanica,
4. istražiti povezanost razina serumskih pokazatelja koštane pregradnje s parametrima prehrambenih i životnih navika ispitanica,
5. odrediti genetičke inačice u CYP3A4 i CYP3A5 genima i genu za UGT1A4 odgovornim za ekspresiju/funkciju enzima i transportera uključenih u metabolizam IA.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Opažajno presječno istraživanje slučaja i kontrola započeti su nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Doma zdravlja Osijek, Medicinskog fakulteta Osijek i Kliničkog bolničkog centra Osijek (ur. broj: 08-1621-1/15, 2158-61-07-15-128, R2-1099-4/2016.) u skladu s odredbama Helsinške deklaracije 1964.

4.2. Ispitanici

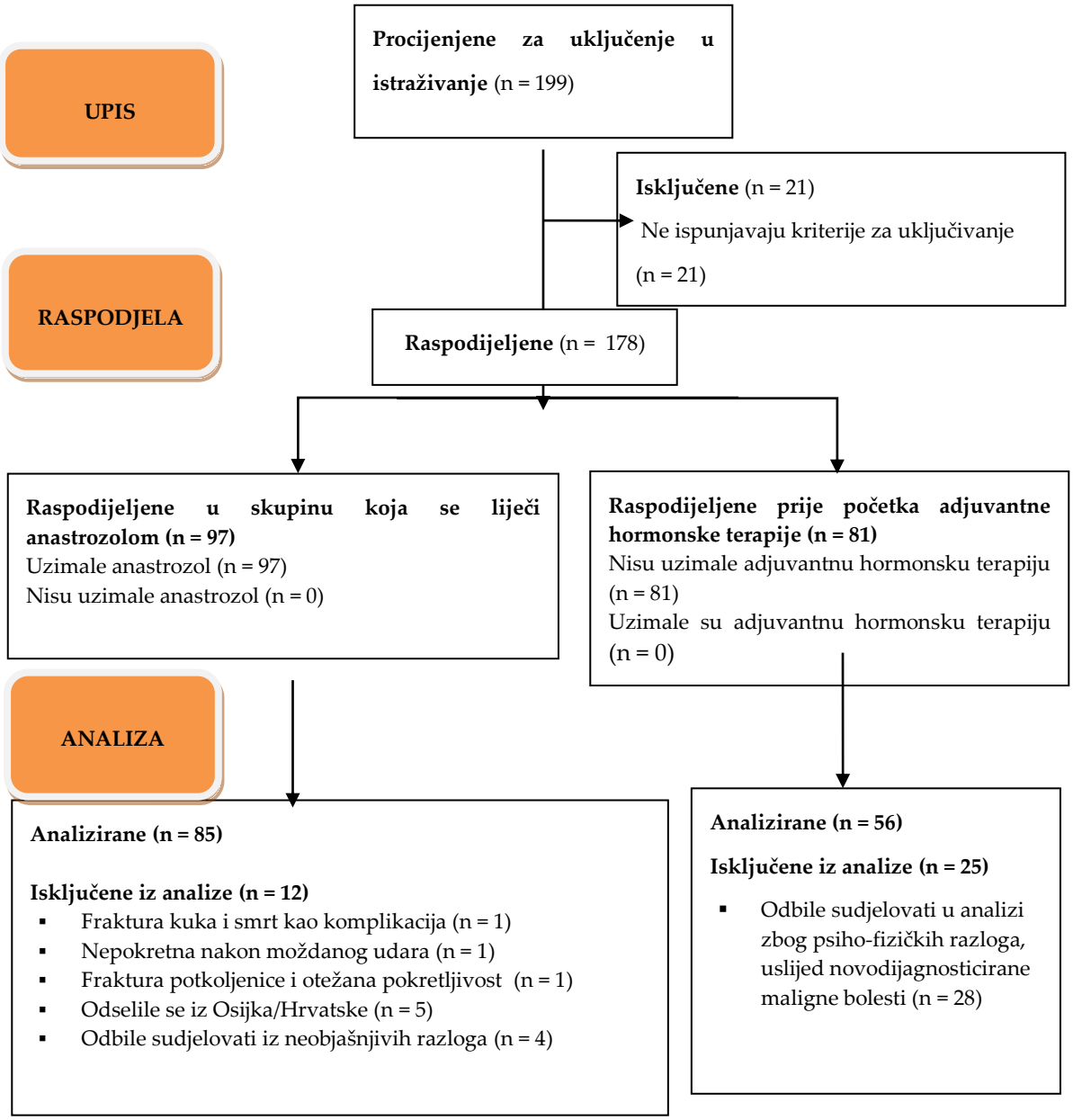
Za opažanje većih razlika uz razinu značajnosti 0,05 i snagu testa od 80 % minimalno je potrebno ukupno 85 ispitanica (G*Power ver. 3.1.2) (71). Istraživanjem je obuhvaćena ukupno 141 žena poslijemenopauzalnog statusa, oboljela od hormonski ovisnog karcinoma dojke koji je u stadiju I, II i III prema TNM klasifikaciji (72), a koja se kontrolira u ultrazvučnoj i/ili mamografskoj ambulanti za dijagnostiku dojke Doma zdravlja Osijek. Ispitanice su uključene u istraživanje nakon potpisanog informiranog pristanka. Studija se sastoji od dviju skupina ispitanica prilagođenih prema dobi, tjelesnoj visini i težini, životnim i prehrambenim navikama.

Kriteriji za uključenje ispitanica u istraživanje:
Ispitanice su poslijemenopauzalne žene s hormonski ovisnim rakom dojke na terapiji anastrozolom u dozi od 1mg/dan, najranije nakon šest mjeseci od početka terapije, a unutar pet godina koliko je prema smjernicama ACSO-a preporučeno trajanje hormonskog adjuvantnog liječenja. Uključeno je i 56 poslijemenopauzalnih ispitanica s novodijagnosticiranim, hormonski ovisnim karcinomom dojke prije uvođenja adjuvantnog hormonskog liječenja te prije kemoterapije.

Isključni kriteriji:
Uzimanje lijekova s utjecajem na koštani metabolizam unazad šest mjeseci (lijekovi za liječenje osteoporoze, kortikosteroidi u trajanju duljem od tri mjeseca), odnosno lijekova s utjecajem na enzim aromatazu (kronična primjena antiepileptičnih lijekova, antifungalnih lijekova). Također su iz istraživanja isključene bolesnice s psihijatrijski dokazanim

poremećajem u prehrani, primarnim hiperparatireoidizmom, neliječenim hipertireoidizmom, kroničnim bubrežnim, gastrointestinalnim ili jetrenim bolestima.

Kretanje broja ispitanica od probira do završne analize u studiji shematski je prikazano na slici 2.1.



Slika 2.1. Shematski prikaz tijeka broja ispitanica od uključenja u istraživanje do završne točke studije

4.3. Metode

4.3.1. Antropometrijska mjerenja

Antropometrijskim se mjerenjima odredila tjelesna visina i težina i izračunao indeks tjelesne mase (ITM, eng. body mass index, BMI) koji predstavlja omjer tjelesne težine (u kilogramima) i kvadrata tjelesne visine (u metrima). Za ITM koristila se sljedeća kategorizacija:

< 20 kg/m2 – pothranjenost;

20-25 kg/m2 – idealna tjelesna masa;

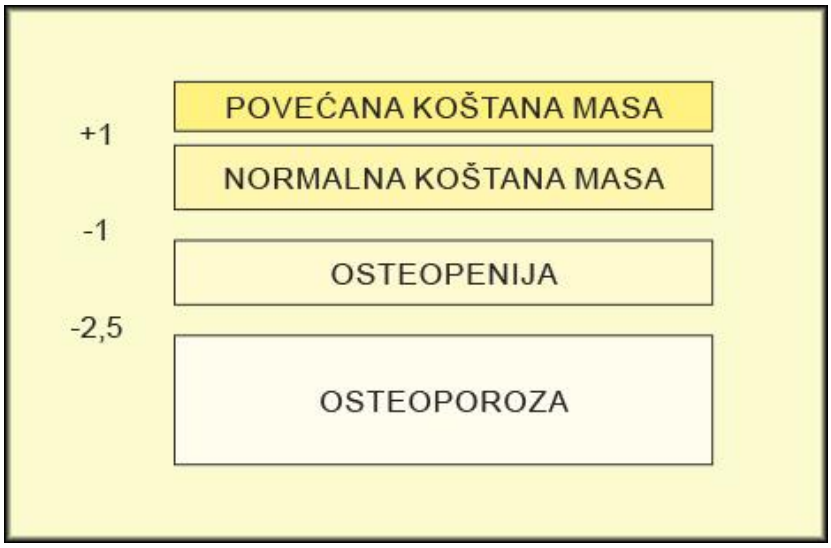
25-30 kg/m2 – pretjerana tjelesna masa;

> 30 kg/m2 – pretilost.

4.3.2. Mjerenje mineralne gustoće kostiju

Mineralna se gustoća kostiju (eng. bone mineral density, BMD) odredila denzitometrijom dvoenergetskim rendgenskim zrakama (eng. dual-energy X-ray absorptiometry, DXA) pomoću uređaja Lunar Prodigy (GE Healthcare, SAD) u Zavodu za mineralni metabolizam Medicinskog fakulteta Osijek. BMD se mjerila u području lumbalne kralježnice (L1 kralježak, L2 kralježak, L3 kralježak, L4 kralježak te zbirni rezultat od L1-L4 kralježaka) i proksimalnog dijela bedrene kosti (vrat bedrene kosti, trohanter, zbirni rezultat za proksimalni dio bedrene kosti i Wardov trokut). DXA je metoda koja se koristi X-zrakama dviju jačina u vrlo maloj dozi koje se propuštaju kroz kost. Iza kosti detektori mjere X-zrake koje su prošle kroz kost, a rezultat se obrađuje u elektroničkom računalu. Razlika energije propuštenih i apsorbiranih X zraka omogućuje izračun mineralne gustoće kosti. Rezultati su mjerenja izraženi: kao BMD (u g/cm^2) i kao T vrijednost (predstavlja odstupanje izmjerene vrijednosti BMD-a od vršne koštane mase mladih osoba izraženo u standardnim devijacijama (SD)) (51). Dijagnoza se osteoporoze, prema klasifikaciji SZO-a, temelji na konceptu T vrijednosti (52). Bolesnice su s obzirom na T vrijednost podijeljene u tri skupine:

- normalan nalaz (T vrijednost između -1 i +1),
- osteopenija (T vrijednost između -1 i -2,5) i
- osteoporoza (T vrijednost manja od – 2,5 ili Z vrijednost manja od – 1,0) (Slika 4.1).



Slika 4.1. Klasifikacija osteoporoze prema SZO-u temeljem koncepta T vrijednosti

Način izvedbe denzitometrije i standardizirana kontrola kvalitete već su opisani (73).

4.3.3. Biokemijska analiza biljega koštane pregradnje

Uzorak je krvi izuzet prilikom ultrazvučnog, odnosno mamografskog pregleda u Ambulanti za dijagnostiku dojke Doma zdravlja Osijek. Uzorkovanje se provodilo između 8 i 10 sati nakon noćnog posta. Uzorci od 4 ml centrifugiranjem su se odvojili od stanica, a zatim pohranili na -20 stupnjeva do analize. U skupini bolesnica na terapiji anastrozolom uzorak je izuzet najranije nakon šest mjeseci od početka terapije, a unutar pet godina koliko traje terapija IA-om. U skupini bolesnica s novootkrivenim rakom dojke uzorak je krvi izuzet prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije kao i prije kemoterapije.

Koncentracije sklerostina u serumu mjerile su se pomoću komercijalno dostupnog sklerostina ELISA seta prema uputama proizvođača (Biomedica, Beč, Austrija). Ukratko, 20 µl determinirano je preliminarnim testom. Pločica s 96 jažica pripremljena je prema protokolu, a serum i ostali reagensi izloženi su na sobnoj temperaturi (18 – 24°C) prije nego što su korišteni u setu. Uzorci i kontrole tretirani su antitijelom sklerostina i inkubirani preko noći na sobnoj temperaturi u mraku. Sljedeći dan jažice su ispirane i zatim inkubirane konjugatom 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Poslije pranja dodan je supstrat. Na kraju, tijekom 30 minuta dodana je stop otopina i vrijednosti su izračunate prema uputama. Apsorbancija je mjerena na 450 nm, vrijednosti su dobivene u pmol/L, a najniže je ograničenje detekcije bilo <7.5 pmol/L.

Serumske razine DKK1 mjerene su pomoću komercijalno dostupnog DKK1 ELISA seta prema uputama proizvođača (Biomedica, Beč, Austrija). Riječ je o jednodnevnom ELISA setu. Ukratko, 20 µl determinirano je preliminarnim testom. Pločica s 96 jažica pripremljena je prema uputama, serum i ostali reagensi izloženi su na sobnoj temperaturi (18 – 24°C) prije korištenja. Uzorci i kontrole u jažicama tretirani su biotiniliranim DKK1 antitijelom i inkubirani dva sata na sobnoj temperaturi u mraku. Zatim je pločica s jažicama ispirana i inkubirana konjugatom 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon pranja dodan je supstrat i inkubiran tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Na kraju je dodana stop otopina i izračunate su vrijednosti. Apsorbancija je mjerena na 450 nm, a vrijednosti su dobivene u pmol/L.

4.3.4. DNA izolacija

Svim ispitanicama izolirali smo DNA iz pune krvi koja je uzeta venepunkcijom u EDTA-epruvete (uz etilendiaminotetraoctenu kiselinu, EDTA kao antikoagulans) u količini od 2 ml te se pohranila na – 20°C. Izolacija DNA iz uzorka pune krvi provedena je u Laboratoriju za farmakologiju Medicinskog fakulteta Osijek pomoću komercijalno dostupnog seta za izolaciju DNA iz krvi i tjelesnih tekućina; QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputi proizvođača. Ukratko, pipetiralo se 20 µL proteaze (Qiagen, Hilden, Njemačka) na dno mikrocentrifugalne tubice volumena 1,5 ml u koju se dodalo 200 µL uzorka krvi ispitanice, a zatim 200 µL pufera (Qiagen, Hilden, Njemačka) te se cijela smjesa vorteksirala 15 sekundi na uređaju IKA Vortex Genius 3, a potom inkubirala na temperaturi od 56°C u Termo Block TDB-120 uređaju. Nakon toga mikrocentrifugalna se tubica centrifugirala 30 sekundi na 8000 okretaja u minuti, nakon čega se dodalo 200 µL etanola i vorteksiralo 15 sekundi. Zatim se pipetom uzelo svih 620 µL sadržaja iz mikrocentrifugalne tubice, dodalo se u spin column tubicu i stavilo u centrifugu jednu minutu na 8000 okretaja u minuti. Zatim se dodalo 500 µL AW1 pufera, a sadržaj ponovo centrifugirao jednu minutu na 8000 okretaja u minuti. Potom se dodalo 500 µL AW2 pufera, centrifugiralo na 14 000 okretaja tijekom tri minute. QIAamp mini kolone postavljene su u čistu tubicu. Na kraju postupka, u QIAamp mini kolonu dodano je 200 µL AE pufera. Uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi 15 – 25°C tijekom jedne minute, a zatim centrifugiranje na 8000 okretaja u minuti.

4.3.5. Određivanje CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama

Genotipizacija SNP u genima za CYP3A4 (rs2740574), CYP3A5 (rs776746) i UGT1A4 (rs6755571) provodila se metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR; RT-PCR) na uređaju 7500 Real time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek primjenom specifičnih TaqMan hibridizacijskih proba prema uputi proizvođača.

RT-PCR metoda kao inačica klasičnog PCR-a podrazumijeva praćenje PCR umnožavanja tijekom cijele reakcije što predstavlja veliku prednost u odnosu na tradicionalnu PCR detekciju u završnoj fazi pomoću agaroznih gelova. Veliko tehnološko unaprjeđenje kod real-time PCR metode upravo je uvođenje simultanog sustava za detekciju PCR produkta tijekom vremena (on-line PCR, kinetički PCR), a visoka osjetljivost metode postignuta je pomoću fluorescentnih proba ili početnica.

Real-time TaqMan PCR tehnologija koristi dvostruko označenu fluorescentnu probu. Naime, reporter boja koja emitira fluorescentnu svjetlost vezana je uz 5'kraj TaqMan probe, dok je prigušivač boje (eng. quencher-onaj koji gasi) vezan uz 3'kraj. U fazi hlađenja nakon denaturacije DNA, kada se za ciljni dio DNA vežu neobilježene početnice, dolazi i do vezanja TaqMan probe za specifičnu regiju DNA. Potom Taq-polimeraza dodaje nukleotide 3'-5' polimeraznom aktivnošću pri čemu istovremeno dolazi i do uklanjanja TaqMan probe s kalupa DNA zbog 5'-3'egzonukleazne aktivnosti. Tim se procesom prigušivač fluorescencije udaljava od reporter boje te ona emitira fluorescenciju jer se prigušivač više ne nalazi na odgovarajućoj udaljenosti od reportera i nema blokade emisije. Ta se metoda koristi i u analizi ekspresije gena, ali i u analizi SNP-ova. U tu svrhu obično se koriste dvije TaqMan probe od kojih je svaka komplementarna pojedinom alelu SNP i obilježena drugim fluoroforom pa emitiraju različitu fluorescenciju. Ako uređaj otkrije jednu boju, označava prisutnost jednog alela; ako otkrije drugu boju, znači da je prisutan drugi alel. Otkrivanje pak smjese tih boja označava prisutnost heterozigota (74).

4.3.6. Upitnik o prehrambenim i životnim navikama

Za istraživanje povezanosti prehrambenih i životnih navika s ispitivanom mineralnom gustoćom kostiju, odnosno serumskim razinama pokazatelja koštane pregradnje upotrijebljen je upitnik koji su ispunile sve ispitanice uključene u istraživanje. Upitnik se sastoji od pitanja

iz prethodnih tuzemnih i međunarodnih istraživanja. Prva se inačica upitnika sastojala od 30 pitanja podijeljenih u pet glavnih odjeljaka. Prvi je dio obuhvaćao antropometrijska i demografska obilježja ispitanica (šest pitanja), drugi dio osobne i obiteljske anamnestičke podatke o koštanim bolestima (osam pitanja), treći dio pet pitanja o prehrambenim navikama ispitanica, četvrti dio također pet pitanja o životnim navikama ispitanica, a peti se dio sastojao od šest pitanja kojima se procijenila izloženost estrogenima tijekom života.

Prvi su nacrt upitnika analizirala dva profesora interne medicine te profesor epidemiologije, a nakon njihovih izmjena upitnik je ispitan na 30 nasumce odabranih žena u poslijemenopauzi koje se kontroliraju u Ambulanti za bolesti dojke Doma zdravlja Osijek. Faktorskom je analizom utvrđeno da treći dio upitnika ima nešto nižu pouzdanost (Chronbach's alpha = 0.61) te su provedene izmjene tih čestica. U skladu s analizom pouzdanosti, završna inačica upitnika ima 32 čestice.

4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički su podatci opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom kod raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

Razlike kategorijskih varijabli testirane su $\chi 2$ testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom.

Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dvaju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t- testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyjevim U testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli u slučaju triju i više nezavisnih skupina (prema nalazu denzitometrije, prema indeksu tjelesne težine) testirane su analizom varijance (ANOVA, Post hoc Bonferroni), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom (Post hoc Conover). Regresijskom analizom pokušalo se utvrditi koji prediktori najviše utječu na pogoršanje denzitometrijskog nalaza. Ocjena povezanosti serumskih pokazatelja koštane pregradnje i gustoće koštane mase ispitanica kao i njihove povezanosti s parametrima životnih navika ocijenila se Pearsonovim koeficijentom korelacije (r) u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a Spearmanovim koeficijentom korelacije (Rho) u slučaju odstupanja od normalne raspodjele.

Statistička se snaga alelnog testa povezanosti polimorfizma izračunala Genetic Power kalkulatorom (http://osse.bii.a-star.edu.sg/calculation1.php), a testiranje Hardy-Weinberg

ekvilibrija genotipskih frekvencija ($\chi 2$ testom df=1) Hardy-Weinberg equilibrium kalkulatorom (http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml).

Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina je značajnosti postavljena na Alpha = 0,05. Za statističku analizu koristio se statistički program MedCalc Statistical Software ver. 17.8.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2017) i SPSS Inc. Released 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.

5. REZULTATI

5.1. Antropometrijske odrednice te prehrambene i životne navike ispitanica

Istraživanje je provedeno na 141 ženi, od kojih se 85 (60,3 %) liječi anastrozolom, a 56 (39,7 %) ne uzima hormonsku adjuvantnu terapiju. Središnja je vrijednost dobi (medijan) 64 godine (interkvartilnog raspona od 58 do 71 godinu) u rasponu od 44 do 89 godina, bez značajne razlike u dobi prema skupinama.

Medijan je visine 162 cm (interkvartilnog raspona od 158 cm do 167 cm), uz medijan tjelesne mase 72 kg (interkvartilnog raspona od 64 kg do 80 kg) bez značajnih razlika prema skupinama. Indeks je tjelesne mase (ITM) 27 kg/m^2 (interkvartilnog raspona od 24,1 do 31,1 kg/m^2) podjednako u objema skupinama. Medijan je visine u mladosti 164 cm (interkvartilnog raspona od 160 do 168 cm (Tablica 5.1.), a u objema je skupinama ispitanica došlo do značajnog smanjenja visine u odnosu na visinu u mladosti (Wilcoxon test, P < 0,001) (Tablica 5.2.).

Tablica 5.1. Antropometrijske odrednice u odnosu na primjenu terapije

	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Terapija IA-om (n = 85)	Bez terapije (n = 56)	Ukupno	
Dob ispitanika [godine]	65 (60 – 72)	62 (56 – 69)	64 (58 – 71)	0,05
Tjelesna visina [cm]	162 (158 – 165)	163 (158 – 168)	162 (158 – 167)	0,34
Tjelesna masa [kg]	70,5 (63 – 80)	72 (65 – 82)	72 (64 – 80)	0,57
Indeks tjelesne mase (ITM) [kg/m^2]	27,0 (24,0 – 1,2)	26,7 (24,5 – 30,8)	27 (24,1 – 31,1)	0,88
Visina u mladosti (cm)	164 (160-167)	165 (160 – 169)	164 (160 – 168)	0,69

*Mann-Whitneyjev U test

Tablica 5.2. Razlika u trenutačnoj visini ispitanica u odnosu na mladost

	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Sadašnja visina [cm]	Visina u mladosti [cm]	
Terapija IA-om	162 (158 – 165)	163 (158 – 168)	**< 0,001**
Bez terapije	164 (160 – 167)	165 (160 – 169)	**< 0,001**

*Wilcoxonov test

S obzirom na dobivene vrijednosti indeksa tjelesne mase, 46 (32,9 %) je ispitanica normalne tjelesne mase, 51 (36,4 %) ispitanica ima prekomjernu tjelesnu masu, dok je pretilo njih 43 (30,7 %), bez značajne razlike s obzirom na primjenu hormonske adjuvantne terapije (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Raspodjela ispitanica prema uhranjenosti i terapiji

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Normalan indeks tjelesne mase [18,5 ≤ ITM ≤ 24,9]	28 (33,3)	18 (32,1)	46 (32,9)	
Prekomjeran indeks tjelesne mase [25 ≤ ITM ≤ 29,9]	29 (34,5)	22 (39,3)	51 (36,4)	0,86
Pretili [ITM ≥ 30]	27 (32,1)	16 (28,6)	43 (30,7)	
Ukupno	84 (100)	56 (100)	140 (100)	

*χ^2 test

Prema zanimanju, najviše je domaćica, njih 33 (24,1 %), i službenica, njih 31 (22,6 %), te 17 (12,4 %) fizičkih radnica, bez značajne razlike u skupinama (Tablica 5.4.).

Tablica 5.4. Zanimanje ispitanica u odnosu na terapiju anastrozolom

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Domaćica	19 (23,2)	14 (25,5)	33 (24,1)	
Službenica	23 (28)	8 (14,5)	31 (22,6)	
Nastavnica	3 (3,7)	3 (5,5)	6 (4,4)	
Poljoprivredni djelatnik	2 (2,4)	1 (1,8)	3 (2,2)	
Ekonomist	5 (6,1)	6 (10,9)	11 (8)	
Prehrambeni tehničar	1 (1,2)	1 (1,8)	2 (1,5)	
Kuhar	4 (4,9)	2 (3,6)	6 (4,4)	
Carinik	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,7)	0,78
Fizički radnik	10 (12,2)	7 (12,7)	17 (12,4)	
Prodavačica	5 (6,1)	4 (7,3)	9 (6,6)	
Zdravstveni djelatnik	4 (4,9)	7 (12,7)	11 (8)	
Krojačica	2 (2,4)	1 (1,8)	3 (2,2)	
Građevinski i arhitektonski inženjer	1 (1,2)	1 (1,8)	2 (1,5)	
Pravnik	2 (2,4)	0	2 (1,5)	
Ukupno	82 (100)	55 (100)	137 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Vitamin D značajno više koriste ispitanice iz skupine na terapiji IA-om, njih 32 (37,8 %) (Fisherov egzaktni test, P = 0,004), do jedne ga godine uzimaju 22 (55 %) ispitanice, a dulje od četiri godine jedna ispitanica (3,1%).

Kalcij uzima 37 (27 %) ispitanica podjednako prema skupinama, do jedne godine njih 20 (54,1 %), od 1 – 2 godine njih 8 (21,6 %), četiri (10,8 %) ispitanice od 2 do 4 godine, a 5 (13,5 %) ispitanica kalcij koriste više od četiri godine (Tablica 5.5.).

5. REZULTATI

Fizičku aktivnost (hodanje, trčanje, rad u vrtu i kući) dulju od 30 minuta dnevno značajno više imaju ispitanice na terapiji IA-om, njih 73 (89 %) (Fisherov egzaktni test, P = 0,002). Pri uključivanju u istraživanje, vježba ukupno 101 (73,7 %) ispitanica, najčešće vježbaju četiri i više puta tjedno, bez značajne razlike u učestalosti vježbanja prema skupinama. U mladosti su značajno češće vježbale ispitanice koje su bez terapije (Fisherov egzaktni test, P = 0,001) (Tablica 5.6.).

Tablica 5.5. Uzimanje i učestalost uzimanja vitamina D i kalcija (Ca) prema skupinama

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Uzimaju vitamin D	32 (37,8)	8 (14,5)	40 (28,5)	**0,004**
Koliko dugo uzimaju vitamin D				
Do 1 godine	15 (46,9)	7 (87,5)	22 (55)	
1 - 2 godine	12 (37,5)	0	12 (30)	0,09
2 - 4 godine	4 (12,5)	1 (12,5)	5 (12,5)	
više od 4 godine	1 (3,1)	0	1 (2,5)	
Uzimaju kalcij	25 (30,5)	12 (21,8)	37 (27)	0,33
Koliko dugo uzimaju kalcij				
Do 1 godine	11 (44)	9 (75)	20 (54,1)	
1 - 2 godine	7 (28)	1 (8,3)	8 (21,6)	0,41
2 - 4 godine	3 (12)	1 (8,3)	4 (10,8)	
više od 4 godine	4 (16)	1 (8,3)	5 (13,5)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.6. Raspodjela ispitanica prema fizičkoj aktivnosti i navici vježbanja

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Imaju fizičku aktivnost dulju od 30 min. dnevno	73 (89)	37 (67,3)	110 (80,3)	**0,002**
Vježbaju	55 (67,1)	46 (83,6)	101 (73,7)	0,05
Koliko često vježbaju				
Jednom tjedno	14 (26,4)	7 (15,2)	21 (21,2)	
Dva puta tjedno	15 (28,3)	8 (17,4)	23 (23,2)	0,12†
Tri puta tjedno	6 (11,3)	12 (26,1)	18 (18,2)	
4 i više puta tjedno	18 (34)	19 (41,3)	37 (37,4)	
Vježbale su i u prošlosti	47 (57,3)	47 (85,5)	94 (68,6)	**0,001**

*Fisherov egzaktni test; †Hi-kvadrat test

Minimalnu količinu mliječnih proizvoda (ekvivalent je pola litre mlijeka dnevno) konzumira 90 (65,7 %) ispitanica, najčešće do 0,25 litara dnevno, njih 50 (55,6 %), a sira i jogurta do 1,5 kg tjedno konzumira 77 (89,6 %) ispitanica. Samo jedna ispitanica (1,2%) na terapiji, navodi da konzumira redovito alkohol (više od dvije čaše alkoholnog pića dnevno). Cigarete puši 30 (21,9 %) ispitanica, značajno više iz skupine ispitanica koje su na terapiji IA-om (Fisherov egzaktni test, P = 0,04) (Tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Konzumacija mlijeka, mliječnih proizvoda i alkohola prema skupinama

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Redovito konzumiraju minimalnu količinu mliječnih proizvoda	52 (63,4)	38 (69,1)	90 (65,7)	0,58
Koliko mlijeka konzumiraju dnevno				
do 0,25 litre	31 (56,4)	19 (54,3)	50 (55,6)	
0,25 do 0,5 litara	20 (36,4)	10 (28,6)	30 (33,3)	0,35†
0,5 do 1 litre	4 (7,3)	6 (17,1)	10 (11,1)	
Koliko sira i jogurta konzumiraju tjedno				
do 1,5 kg	43 (72,9)	34 (87,2)	77 (78,6)	0,13
1,5 do 5 kg	16 (27,1)	5 (12,8)	21 (21,4)	
Redovito piju alkohol (više od 2 čaše alkoholnog pića na dan)	1 (1,2)	0	1 (0,7)	> 0,99
Puše cigarete	23 (28)	7 (12,7)	30 (21,9)	**0,04**

*Fisherov egzaktni test; †Hi-kvadrat test

Dob kod prve menstruacije iznosi 13 godina (interkvartilnog raspona od 12 do 14 godina). Regularne cikluse imale su 124 (90,5 %) ispitanice, a menopauza je nastupila prije 45. godine života kod 34 (24,8 %) ispitanice. Medijan je dobi pojave menopauze na ukupnom broju ispitanica 49 godina (interkvartilnog raspona od 45 do 51 godinu).

Histerektomiju je imalo 38 (27,7 %) ispitanica, medijana dobi 47 godina (interkvartilnog raspona od 42 do 50 godina), a jajnici su odstranjeni kod 39 (28,5 %) ispitanica, u medijana dobi 48 godina (interkvartilnog raspona od 42 do 51 godinu). Nema značajnih razlika prema skupinama (Tablica 5.8.).

Tablica 5.8. Regularnost ciklusa, nastup menopauze, stanje po histerektomiji i adneksektomiji u odnosu na skupine prema terapiji

	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	P
Dob kod prve menstruacije (godine) [Medijan (interkvartilni raspon)]	13 (12 – 14)	13 (12 – 14)	13 (12 – 14)	0,74*
Regularni ciklusi [Broj (%) ispitanica]	73 (89)	51 (92,7)	124 (90,5)	0,56†
Menopauza nastupila prije 45. godine života [Broj (%) ispitanica]	23 (28)	11 (20)	34 (24,8)	0,32†
Dob kod menopauze (godine) [Medijan (interkvartilni raspon)]	49 (44 – 51)	50 (46 – 52)	49 (45 – 51)	0,32*
Stanje nakon histerektomije [Broj (%) ispitanica]	25 (30,5)	13 (23,6)	38 (27,7)	0,44†
Dob kod histerektomije (godine) [Medijan (interkvartilni raspon)]	47 (42 – 50)	47 (42 – 51)	47 (42 – 50)	0,88*
Stanje nakon adneksektomije [Broj (%) ispitanica]	28 (34,1)	11 (20)	39 (28,5)	0,08†
Dob kod odstranjenja jajnika (godine) [Medijan (interkvartilni raspon)]	46 (41 – 50)	50 (43 – 54)	48 (42 – 51)	0,21*

*Mann-Whitneyjev U test; †Fisherov egzaktni test

5.2. Mineralna gustoća kostiju ispitanica

Ispitanice su ovisno o BMD vrijednostima lumbalnog segmenta kralježnice i/ili proksimalnog dijela bedrene kosti (izraženoj preko T vrijednosti) podijeljene u tri skupine: u prvoj su skupini ispitanice čija je T vrijednost bila veća od -1 (normalan nalaz); u drugoj su skupini ispitanice koje imaju T vrijednost između -1 i -2.5 (osteopenija), a u trećoj su skupini ispitanice koje imaju T vrijednost manju od -2.5 (osteoporoza). Pri uključenju ispitanica u

istraživanje, uredan nalaz ima 27 (20 %) žena, od kojih je 14 (17 %) na terapiji anastrozolom, a 13 (23 %) prije početka terapije, bez značajne razlike između skupina. Osteopenija je prisutna u 79 (58 %) ispitanica, od kojih se 45 (56 %) liječe anastrozolom, a 34 (61 %) još nisu započele hormonsku terapiju, dok je osteoporoza prisutna u ukupno 31 (22 %) ispitanici, od kojih su 22 (27 %) na terapiji IA-om, a 9 (16 %) u kontrolnoj skupini, također bez značajnije razlike među skupinama (Tablica 5.9.).

Tablica 5.9. Raspodjela ispitanica prema nalazu DXA i terapiji anastrozolom

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Uredan nalaz	14 (17)	13 (23)	27 (20)	
Osteopenija	45 (56)	34 (61)	79 (58)	0,28
Osteoporoza	22 (27)	9 (16)	31 (22)	
Ukupno	81 (100)	56 (100)	137 (100)	

*$\chi 2$ test

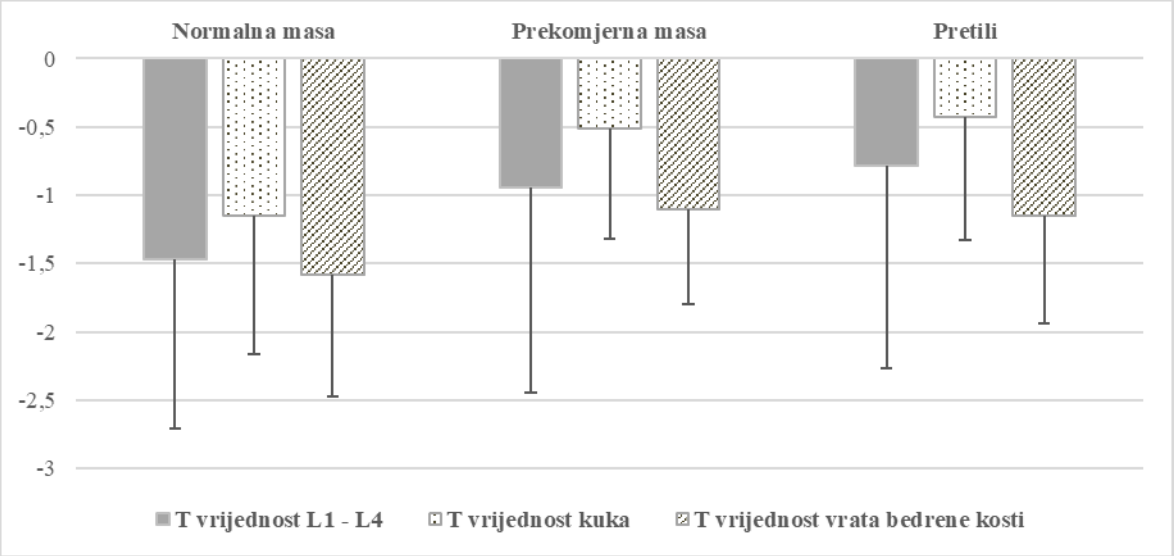
T vrijednost kuka (Studentov t-test, P = 0,01) i vrata bedrene kosti (Studentov t-test, P < 0,001) značajno je niži u skupini liječenih IA-om u odnosu na skupinu ispitanica bez terapije IA-om (-0,9 vs. -0,45 g / cm^2; -1,4 vs. -1,2 g / cm^2), dok za T vrijednost lumbalne kralježnice nije bilo značajnih razlika između dviju skupina. Također je utvrđena statistički značajna razlika u mineralnoj gustoći vrata bedrene kosti (BMD) u skupini ispitanica liječenih anastrozolom (Studentov t-test, P = 0,002) te u Z vrijednosti za cijeli kuk (Studentov t-test, P = 0,003) koji su statistički značajno niži u ispitanica liječenih anastrozolom (Tablica 5.10.).

Tablica 5.10. Razlike u T vrijednostima, BMD i Z vrijednostima između ispitanica na terapiji IA-om i bez terapije IA-om

	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		Razlika	95 % interval pouzdanosti		P*
	Terapija IA-om	Bez terapije		Od	Do	
T vrijednost L1-L4	-1,19 (1,42)	-0,94 (1,46)	-0,25	-0,74	0,25	0,44
T vrijednost kuka	-0,88 (0,88)	-0,46 (1,0)	-0,42	-0,74	-0,01	**0,01**
T vrijednost vrata bedrene kosti	-1,4 (0,81)	-1,11 (0,79)	-0,29	-0,56	-0,01	**<0,001**
BMD L1-L4	1,04 (0,17)	1,07 (0,18)	-0,03	-0,87	0,03	0,71
BMD kuka	0,91 (0,11)	0,95 (0,13)	-0,05	-0,09	-0,01	0,05
BMD vrata bedrene kosti	0,85 (0,11)	0,88 (0,11)	-0,03	-0,07	0,01	**0,002**
Z vrijednost L1-L4	0,04 (1,43)	0,14 (1,51)	-0,09	-0,61	0,41	0,05
Z vrijednost kuka	0,23 (0,96)	0,47 (1,01)	-0,24	-0,58	0,10	**0,003**
Z vrijednost vrata bedrene kosti	-0,05 (0,75)	0,08 (0,75)	-0,12	-0,39	0,14	0,20

*Studentov T-test (korekcija za dob)

Značajno su više T vrijednosti područja kuka (ANOVA, P < 0,001) i vrata bedrene kosti (ANOVA, P < 0,001) u skupini ispitanica prekomjernog indeksa tjelesne mase (ITM) i pretilih (Slika 5.1).



Slika 5.1. Razlike u T vrijednostima između ispitanica prema ITM

Također, značajno su više vrijednosti mineralne gustoće vrata bedrene kosti (ANOVA, P = 0,001) u skupini ispitanica prekomjernog indeksa tjelesne mase (ITM) i pretilih, dok se Z vrijednosti ne razlikuju značajno u odnosu na uhranjenost (Tablica 5.11.).

Tablica 5.11. Razlike u T vrijednostima, BMD i Z vrijednostima između ispitanica prema uhranjenosti (ITM)

	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			P*
	Normalna masa	Prekomjerna masa	Pretili	
T vrijednost L1-L4	-1,47 (1,24)	-0,94 (1,51)	-0,78 (1,49)	0,05
T vrijednost kuka	-1,15 (1,01)	-0,51 (0,81)	-0,43 (0,9)	< **0,001**
T vrijednost vrata bedrene kosti	-1,58 (0,89)	-1,1 (0,7)	-1,15 (0,79)	< **0,001**
BMD L1-L4	1,01 (0,15)	1,06 (0,19)	1,08 (0,18)	0,20
BMD kuka	0,87 (0,13)	0,95 (0,1)	0,96 (0,12)	0,14
BMD vrata bedrene kosti	0,83 (0,12)	0,88 (0,1)	0,88 (0,11)	**0,001**
Z vrijednost L1-L4	-0,5 (1,19)	0,24 (1,57)	0,56 (1,38)	0,28
Z vrijednost kuka	-0,22 (0,98)	0,5 (0,87)	0,73 (0,87)	0,20
Z vrijednost vrata bedrene kosti	-0,39 (0,73)	0,17 (0,69)	0,24 (0,7)	0,88

*ANOVA (korekcija za dob)

U daljnjoj su analizi podataka ispitanice podijeljene s obzirom na nalaz T vrijednosti u skupinu u kojoj sve ispitanice imaju nalaz T vrijednosti unutar fizioloških granica i/ili je riječ o osteopeniji te u drugu skupinu u kojoj su sve ispitanice s osteoporozom budući da one zahtijevaju liječenje bolesti.

Ispitanice prekomjerne mase i pretile imaju značajnije više uredan nalaz T vrijednosti, odnosno osteopeniju u odnosu na 17 (55 %) ispitanica s patološkim nalazom koje su normalne

tjelesne mase ($\chi 2$ test, P = 0,02). Menopauzu prije 45. godine imale su 34 (26 %) ispitanice, značajnije više ispitanica s patološkim nalazom ($\chi 2$ test, P = 0,009). Patološki nalaz imaju značajno više ispitanice koje nemaju regularne cikluse ($\chi 2$ test, P = 0,01) (Tablica 5.12.).

Tablica 5.12. Povezanost ITM-a, nastupa menopauze i regularnosti menstruacijskih ciklusa s nalazom T vrijednosti

	Broj (%) ispitanica			P*
	Uredan nalaz/ osteopenija	Patološki nalaz	Ukupno	
Uhranjenost				
Normalne tjelesne mase [18,5 ≤ ITM ≤ 24,9]	29 (28)	17 (55)	46 (34)	**0,02**
Prekomjerna masa [25 ≤ ITM ≤ 29,9]	43 (41)	8 (26)	51 (38)	
Pretili [ITM ≥ 30]	33 (31)	6 (19)	39 (29)	
Ukupno	105 (100)	31 (100)	136 (100)	
Menopauza prije 45. godine				
Ne	82 (80)	17 (55)	99 (74)	**0,009**
Da	20 (20)	14 (45)	34 (26)	
Ukupno	102 (100)	31 (100)	133 (100)	
Regularni ciklusi				
Ne	6 (6)	7 (23)	13 (10)	**0,01**
Da	96 (94)	24 (77)	120 (90)	
Ukupno	102 (100)	31 (100)	133 (100)	

* Hi-kvadrat test

Značajno su starije ispitanice s nalazom osteoporoze na DXA, medijana dobi 70 godina (interkvartilnog raspona od 58 do 71 godinu), u odnosu na ispitanice s urednim nalazom ili s osteopenijom (Mann-Whitneyjev U test, P = 0,002) (Tablica 5.13.).

Tablica 5.13. Antropometrijske odrednice ispitanica u odnosu na primjenu terapije

	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Uredan nalaz/ osteopenija	Patološki nalaz	Ukupno	
Dob ispitanika [godine]	63 (57 – 69)	70 (62 – 75)	64 (58 – 71)	**0,002**

*Mann-Whitneyjev U test

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenili smo da postoji značajna povezanost indeksa tjelesne mase s vrijednostima BMD-a. Najjača je pozitivna veza indeksa tjelesne mase s BMD-om kuka (Spearmanov koeficijent korelacije Rho = 0,326 P < 0,001). Dob je značajno povezana samo kod BMD vrata bedrene kosti, dok je tjelesna masa značajno povezana sa svim vrijednostima BMD-a (Tablica 5.14.).

Tablica 5.14. Povezanost indeksa tjelesne mase s BMD-om

	Spearmanov koeficijent korelacije (P vrijednost) BMD		
	L1 – L4	Kuk	Vrat bedrene kosti
Dob	-0,085 (0,34)	-0,118 (0,19)	-0,279 **(0,002)**
Tjelesna masa [kg]	0,265 **(0,002)**	0,385 **(<0,001)**	0,342 **(<0,001)**
Indeks tjelesne mase	0,186 **(0,03)**	0,326 **(< 0,001)**	0,247 **(0,004)**

5.3. Razina biokemijskih markera koštane pregradnje poslijemenopauzalnih ispitanica s rakom dojke prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije i tijekom liječenja anastrozolom

Utvrđene su statistički značajno više serumske razine sklerostina u skupini ispitanica liječenih anastrozolom u odnosu na ispitanice prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije (Mann-Whitneyjev U test, P < 0,001). Nasuprot tomu, u skupini ispitanica liječenih anastrozolom dobivene su statistički značajno niže vrijednosti DDK1 u usporedbi s ispitanicama prije početka adjuvantnog hormonskog liječenja (Mann-Whitneyjev U test, P < 0,001) (Tablica 5.15.).

Tablica 5.15.Vrijednosti serumskih razina sklerostina i DKK1 u odnosu na primjenu terapije

	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
Sklerostin	31,8 (28 - 40,2)	23,8 (15,6 - 28,8)	28,5 (22,7 - 35,8)	**< 0,001**
DKK1	24,3 (20,4 - 26,4)	26,2 (24,3 - 29,8)	25,2 (22,8 - 27,4)	**< 0,001**

*Mann-Whitneyjev U test

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenili smo da postoji značajna negativna povezanost između sklerostina i DKK1 kod analize svih ispitanica uključenih u istraživanje (Spearmanov koeficijent korelacije Rho= -0,287 P=0,001).

5.4. Povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kostiju ispitanica

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenili smo povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kostiju ispitanica liječenih anastrozolom te nije utvrđena statistički značajna veza. Međutim, u skupini ispitanica s novootkrivenim hormonski ovisnim rakom dojke prije početka liječenja anastrozolom utvrđena je pozitivna korelacija između T vrijednosti lumbalne kralježnice s DKK1 (Rho = 0,294, P = 0,03) kao i BMD-a lumbalne kralježnice s DKK1 (Rho = 0,330, P = 0,02) (Tablica 5.16.).

Tablica 5.16. Povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kosti ispitanica

		Spearmanov koeficijent korelacije (Rho) (P vrijednost)					
		Terapija IA-om		Bez terapije		Svi ispitanici	
		Sklerostin	DKK1	Sclerostin	DKK1	Sklerostin	DKK1
Dob ispitanica	Rho	0,083	0,041	0,16	0,050	0,108	-0,045
	P	0,48	0,73	0,92	0,74	0,24	0,62
T vrijednost L1-L4	Rho	-0,014	-0,072	0,182	**0,294**	0,019	0,098
	P	0,91	0,54	0,19	**0,03**	0,83	0,27
T vrijednost kuka	Rho	0,105	-0,105	0,147	0,119	0,011	0,061
	P	0,37	0,37	0,29	0,39	0,90	0,49
T vrijednost vrata bedrene kosti	Rho	0,076	-0,069	0,068	0,201	-0,019	0,103
	P	0,52	0,56	0,63	0,15	0,83	0,25
BMD L1-L4	Rho	-0,039	-0,078	0,151	**0,330**	0,002	0,100
	P	0,74	0,51	0,29	**0,02**	0,98	0,26
BMD kuka	Rho	0,094	-0,094	0,138	0,189	0,010	0,084
	P	0,42	0,42	0,33	0,18	0,91	0,35
BMD vrata bedrene kosti	Rho	0,068	-0,056	0,068	0,211	-0,010	0,101
	P	0,56	0,63	0,63	0,13	0,91	0,26
Z vrijednost L1-L4	Rho	0,025	-0,056	0,123	0,266	0,044	0,080
	P	0,84	0,63	0,39	0,06	0,63	0,37
Z vrijednost kuka	Rho	0,198	-0,092	0,182	0,169	0,091	0,062
	P	0,09	0,44	0,20	0,23	0,31	0,49
Z vrijednost vrata Bedrene kosti	Rho	0,190	-0,045	0,126	0,179	0,054	0,101
	P	0,10	0,70	0,37	0,20	0,55	0,26

5.5. Povezanost serumskih razina Wnt inhibitora s prehrambenim i životnim navikama ispitanica

Unutar skupine ispitanica liječenih anastrozolom kao i u skupini prije početka hormonske terapije nisu utvrđene statistički značajne razlike u cirkulirajućim razinama sklerostina s obzirom na ispitivane parametre prehrambenih i životnih navika. Međutim, kada usporedimo te dvije skupine ispitanica, izdvajaju se sljedeća tri parametra životnog stila: dnevna fizička

aktivnost dulja od 30 minuta (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$), redovito vježbanje (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$), redoviti ciklusi (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$) uz status ispitanica bez odstranjenih jajnika (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$). Kod navedenih ispitivanih parametara dobivene su značajno više vrijednosti sklerostina u skupini ispitanica na terapiji IA-om (Tablica 5.17.).

Tablica 5.17. Razlike u vrijednostima sklerostina prema prehrambenim i životnim navikama ispitanica

	Medijan (interkvartilni raspon) Sklerostin (pmol/L)				P†
	Terapija IA-om	P*	Bez terapije	P*	
Pušenje					
Ne	31,7 (27,6 – 40,5)	0,76	23,6 (16,1 – 29,4)	0,46	**<0,001**
Da	32,3 (28,1 – 39,3)		26,4 (13,4 – 27,1)		**<0,001**
Uzimanje vitamina D					
Ne	31,3 (27,6 – 39,0)	0,50	24,5 (16,0 – 29,2)	0,22	**<0,001**
Da	32,8 (28,3 – 41,0)		20,6 (14,4 – 24,5)		**0,001**
Uzimanje					
Ne	30,9 (27,6 – 37,9)	0,18	24,1 (14,9 – 29,2)	0,70	**<0,001**
Da	35,4 (28,3 – 46,4)		22,9 (16,7 – 27,1)		**0,002**
Fizička aktivnost dulja od 30 minuta					
Ne	37,3 (28,4 – 72,1)	0,16	27,6 (20,9 – 36,2)	0,05	0,07
Da	31,7 (27,6 – 39,7)		22,4 (14,5 – 27,5)		**<0,001**
Vježbanje					
Ne	30,1 (27,4 – 43,6)	0,75	27,6 (14,3 - 48,9)	0,54	0,18
Da	32,3 (28,1 – 39,5)		23,6 (15,6 – 28,2)		**<0,001**
Vježbanje u mladosti					
Ne	32,1 (28,1 – 45,9)	0,28	22,1 (13,4 – 36,0)	0,89	**0,03**
Da	31,7 (24,6 – 38,5)		23,8 (16,1 – 28,6)		**<0,001**
Redovita konzumacija mliječnih					
Ne	31,2 (27,8 - 43,1)	0,93	24,1 (14,6 - 32,5)	0,80	**0,008**
Da	32,3 (28 - 39,3)		23,6 (16,3 - 27,7)		**<0,001**
Nastup menopauze prije 45. godine					
Ne	31,8 (26,9 - 40)	0,35	24,1 (15,8 - 28,8)	0,66	**<0,001**
Da	31,8 (28,4 - 43,9)		21,9 (13,9 - 35,9)		**0,008**
Stanje po histerektomiji					
Ne	31,7 (27,1 - 38,9)	0,29	23,8 (16 - 28,6)	0,83	**<0,001**
Da	31,8 (28,8 - 45)		23,3 (13,6 - 36)		**0,007**
Stanje po adneksektomiji					
Ne	33,3 (28,1 - 43,3)	0,15	23,5 (15,2 - 28,4)	0,44	**<0,001**
Da	30,5 (27,8 - 34,7)		25,6 (16,2 - 39,7)		0,14
Prisutnost redovitih menstruacijskih					
Ne	29,9 (28,3 - 36,1)	0,44	37,1 (20,8 - 56,2)	0,09	0,44
Da	32,3 (27,7 - 41,6)		23,5 (15,1 - 28)		**<0,001**

*Wilcoxonov test; †Mann-Whitneyjev U test

Za razliku od sklerostina, kod DKK1 dobivene su značajno niže vrijednosti DKK1 kod ispitanica liječenih anastrozolom koje redovito vježbaju i imaju redovite cikluse. Uspoređujući skupine, značajno niže vrijednosti DKK1 imaju ispitanice liječene anastrozolom koje imaju dnevnu fizičku aktivnost dulju od 30 minuta, koje redovito vježbaju, a također su vježbale i u mladosti, redovito konzumiraju mliječne proizvode, imaju redovite menstruacijske cikluse te one ispitanice kojima nisu odstranjeni jajnici (Mann-Whitneyjev U test, $P < 0,001$) (Tablica 5.18.).

Tablica 5.18. Razlike u vrijednostima DKK1 prema prehrambenim i životnim navikama ispitanica

	Medijan (intekvartilni raspon) DKK 1 (pmol/L)				P*
	Terapija IA-om	P*	Bez terapije	P*	
Pušenje					
Ne	24,2 (20,4 – 26,8)	0,58	25,9 (23,9 – 30,3)	0,72	**<0,001**
Da	24,3 (19,3 – 25,4)		26,6 (25,3 – 29,0)		**0,007**
Uzimanje vitamina D					
Ne	24,3 (20,7 – 26,2)	0,87	26,1 (24,0 – 29,4)	0,36	**<0,001**
Da	24,3 (19,2 – 26,8)		28,2 (24,7 – 31,8)		**0,01**
Dodatak kalcija					
Ne	24,2 (20,2 – 26,3)	0,76	26,1 (24,0 – 29,5)	0,75	**<0,001**
Da	24,5 (20,4 – 26,7)		26,8 (24,6 – 31)		**0,02**
Fizička aktivnost dulja od 30 minuta					
Ne	23,2 (15,4 – 26,8)	0,82	26,7 (24,6 – 31,8)	0,52	0,05
Da	24,3 (20,4 – 26,3)		26,2 (24,1 – 29,4)		**<0,001**
Vježbanje					
Ne	25,6 (23,3 – 26,9)	0,01	25,6 (23,6 – 30,7)	0,63	0,49
Da	23,2 (17,9 – 25,6)		26,4 (24,4 – 29,8)		**<0,001**
Vježbanje u mladosti					
Ne	23,7 (20,4 – 26,0)	0,42	25,1 (23,5 – 31,1)	0,46	0,11
Da	24,3 (20,5 – 26,8)		26,5 (24,4 – 29,8)		**<0,001**
Redovita					
Ne	25,1 (22,6 - 27)	0,10	25,9 (23,2 - 30,2)	0,65	0,12
Da	23,1 (19,6 - 25,9)		26,3 (24,5 - 29,6)		**<0,001**
Nastup menopauze prije 45. godine života					
Ne	24,3 (20,4 - 26,3)	0,90	25,7 (24 - 30,1)	0,47	**<0,001**
Da	24,1 (17,9 - 26,5)		27,5 (25,7 - 29,7)		**0,01**
Stanje po histerektomiji					
Ne	24,3 (20,9 - 26,7)	0,35	26,3 (24,4 - 30,2)	0,37	**<0,001**
Da	23 (19,1 - 25,8)		25,7 (24 - 27,3)		**0,04**
Stanje po adneksektomiji					
Ne	24,3 (20,6 - 27)	0,40	26,3 (24,4 - 30)	0,34	**<0,001**
Da	24,2 (20,4 - 25,9)		25,7 (22,7 - 28,8)		0,05
Prisutnost redovitih menstruacijskih ciklusa					
Ne	25,9 (24,5 - 28,3)	0,03	25,4 (23,3 - 30,3)	0,55	0,76
Da	24,1 (20,4 - 26,1)		26,3 (24,3 - 29,8)		**<0,001**

*Wilcoxonov test; †Mann-Whitneyjev U test

5.6. Raspodjela frekvencije genotipova AA, AG i GG CYP3A4 polimorfizma (rs 2740574) poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke

Frekvencije genotipova i varijantnih alela za CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 polimorfizme u poslijemenopauzalnih ER-pozitivnih ispitanica s rakom dojke prikazane su u tablicama 5.19., 5.20. i 5.22. Frekvencije genotipova CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 u skladu su s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (P > 0,05).

Homozigoti divljeg tipa za A alel CYP3A4*1B uglavnom su prisutni i u skupini koja je na terapiji IA-om (92,7 %) kao i u skupini prije početka hormonske terapije (97,7 %), s ukupnom prevalencijom od 94,4 %. Ni u jednoj skupini nije identificiran homozigot za G alel. Šest (7,3 %) ispitanica koje se liječe anastrozolom i jedna (2,3 %) ispitanica u kontrolnoj skupini heterozigoti su za CYP3A4*1B (Tablica 5.19.).

Tablica 5.19. Frekvencije genotipova i varijantnih alela za CYP3A4*1B polimorfizam u poslijemenopauzalnih ispitanica s ER-pozitivnim rakom dojke

CYP 3A4	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA	Bez terapije	Ukupno	
AA	76 (92,7)	43 (97,7)	119 (94,4)	0,42
GA	6 (7,3)	1 (2,3)	7 (5,6)	
Ukupno	82 (100)	44 (100)	126 (100)	

*Fisherov egzaktni test

5.7. Raspodjela frekvencije genotipova AA, AG i GG CYP3A5 polimorfizma (rs 776746) poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke

Distribucija frekvencije za CYP3A5*3 pokazuje da u Hrvatskoj populaciji poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke prevladavaju homozigoti za mutirani G alel s ukupnom prevalencijom od 88,1 %, odnosno s prevalencijom od 86,6 % u skupini na terapiji IA-om te 90,9 % u kontrolnoj skupini žena.

Homozigoti za divlji A alel nisu pronađeni ni u jednoj skupini. Jedanaest (13,4 %) ispitanica koje se liječe anastrozolom i četiri (9,1 %) ispitanice u kontrolnoj skupini heterozigoti su za CYP3A5*3 (Tablica 5.20.).

Tablica 5.20. Frekvencije genotipova i varijantnih alela za CYP3A5*3 polimorfizam u poslijemenopauzalnih ispitanica s ER-pozitivnim rakom dojke

CYP 3A5	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA-om	Bez terapije	Ukupno	
GG	71 (86,6)	40 (90,9)	111 (88,1)	0,57
AG	11 (13,4)	4 (9,1)	15 (11,9)	
Ukupno	82 (100)	44 (100)	126 (100)	

*Fisherov egzaktni test

5.8. Disekvilibrij

Šest ispitanica koje su heterozigoti za CYP3A4*1B također su heterozigoti za CYP3A5*3 alel (Tablica 5.21.). Stoga, utvrđena je značajna neravnoteža veze (linkage disequilibrium) između CYP3A4*1B i CYP3A5*3 alela s 84,3 % neusklađenosti povezivanja (D '= 0,843) u skupini liječenih anastrozolom i s 95,1 % u kontrolnoj skupini (D' = 0,951).

Tablica 5.21. Raspodjela različitih genotipova CYP3A4*1B i CYP3A5*3 polimorfizama među ispitanicama

CYP3A4*1B/ CYP3A5*3	Broj (%)
AA / GG	110 (87,3)
AA / AG	9 (7,1)
GA / AG	6 (4,8)
GA / GG	1 (0,8)

5.9. Raspodjela frekvencije genotipova AA, AC i CC UGT1A4 polimorfizma (rs 6755571) poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke

Homozigoti divljeg tipa za C alel UGT1A4*2 uglavnom su prisutni i u skupini koja je na terapiji IA-om (95,2 %) te u svih ispitanica u skupini prije početka hormonske terapije (100 %), s ukupnom prevalencijom od 96,1 %. Ni u jednoj skupini nije identificiran homozigot za mutirani A alel. Tri (4,8 %) ispitanice na terapiji anastrozolom heterozigoti su za CYP1A4*2 (Tablica 5.22.).

Tablica 5.22. Frekvencija genotipova i varijantnih alela za UGT1A4*2 polimorfizam u poslijemenopauzalnih ispitanica s ER-pozitivnim rakom dojke

UGT 1A4	Broj (%) ispitanica			P*
	Terapija IA	Bez terapije	Ukupno	
CC	59 (95,2)	14 (100)	73 (96,1)	> 0,99
AC	3 (4,8)	0	3 (3,9)	
Ukupno	62 (100)	14 (100)	76 (100)	

*Fisherov egzaktni test

5.10. Razlike u BMD-u i T vrijednosti između homozigota i heterozigota polimorfizama CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4

Nema značajnih razlika u vrijednostima BMD-a kao ni u T vrijednostima između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica tijekom liječenja IA-om (Tablica 5.22., Tablica 5.23.).

Tablica 5.23. Razlike u BMD-u između homozigota i heterozigota za CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizme ispitanica tijekom liječenja IA-om

Terapija IA-om	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Homozigoti	Heterozigoti	
BMD L1-L4			
CYP 3A4 (74:5)	1,02 (0,91-1,15)	1,02 (0,99-1,07)	0,98
CYP 3A5(70:9)	1,02 (0,91 – 1,14)	1,07 (0,99 – 1,15)	0,33
UGT 1A4 (56:3)	1,03 (0,92 – 1,15)	1,13 (0,82 – 1,15)	0,95
BMD kuka			
CYP 3A4 (74:5)	0,89 (0,83,-0,97)	1,03 (0,87-1,04)	0,15
CYP 3A5 (70:9)	0,89 (0,84 – 0,98)	0,91 (0,78 – 1,0)	0,78
UGT 1A4 (56:3)	0,91 (0,84 – 1,0)	0,88 (0,75 – 1,06)	0,78
BMD vrata bedrene kosti			
CYP 3A4 (74:5)	0,84 (0,77-0,90)	0,93 (0,76-0,94)	0,62
CYP 3A5 (70:9)	0,84 (0,77 – 0,90)	0,80 (0,76 – 0,94)	0,75
UGT 1A4 (56:3)	0,85 (0,78 – 0,92)	0,81 (0,75 – 0,96)	0,70

*Mann-Whitneyjev U test

Tablica 5.24. Razlike u T vrijednostima između homozigota i heterozigota za CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizme ispitanica tijekom liječenja IA-om

Terapija IA-om	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Homozigoti	Heterozigoti	
T vrijednost L1-L4			
CYP 3A4 (74:5)	-1,3 (-2,4 - -0,3)	-1,3 (-1,6 - -1)	0,98
CYP 3A5 (69:10)	-1,4 (-2,3 - -0,3)	-1 (-2 - -0,4)	0,73
UGT 1A4 (56:3)	-1,2 (-2,4 - -0,2)	-0,4 (-3 - -0,3)	0,90
T vrijednost kuka			
CYP 3A4 (74:5)	-0,9 (-1,5 - -0,4)	0,1 (-1,2 - 0,3)	0,15
CYP 3A5 (69:10)	-0,9 (-1,4 - -0,3)	-1,2 (-1,7 - -0,1)	0,58
UGT 1A4 (56:3)	-0,8 (-1,5 - -0,2)	-1 (-2 - 0,4)	0,82
T vrijednost vrata bedrene kosti			
CYP 3A4 (74:5)	-1,5 (-2 - -1)	-0,8 (-2,1 - -0,7)	0,59
CYP 3A5 (69:10)	-1,4 (-2 - -0,9)	-1,8 (-2,1 - -0,8)	0,54
UGT 1A4 (56:3)	-1,4 (-2 - -0,9)	-1,7 (-2,1 - -0,6)	0,75

*Mann-Whitneyjev U test

Nema značajnih razlika u vrijednostima BMD-a kao i T vrijednostima između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije (Tablica 5.24., Tablica 5.25.).

Tablica 5.25. Razlike u BMD-u između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije

Bez terapije	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Homozigoti	Heterozigoti	
BMD L1-L4			
CYP 3A4 (41:1)	1,05 (0,99 – 1,17)	1,30	-
CYP 3A5 (39:3)	1,05 (0,99 – 1,17)	1,30 (0,74 – 1,39)	0,46
UGT 1A4 (13:0)	1,03 (0,77 – 1,25)	-	-
BMD kuk			
CYP 3A4 (41:1)	0,95 (0,85 – 1,02)	0,96	-
CYP 3A5 (39:3)	0,95 (0,86 – 1,01)	0,96 (0,77 – 1,25)	0,90
UGT 1A4 (13:0)	0,95 (0,87 – 1,01)	-	-
BMD vrat bedrene kosti			
CYP 3A4 (41:1)	0,87 (0,81 - 0,94)	0,87	-
CYP 3A5 (39:3)	0,87 (0,82 – 0,93)	0,87 (0,71 – 1,04)	0,86
UGT 1A4 (13:0)	0,85 (0,79 – 0,94)	-	-

*Mann-Whitneyjev U test

Tablica 5.26. Razlike u T vrijednostima između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije

Bez terapije	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Homo	Hetero	
T vrijednost L1-L4			
CYP 3A4 (43:1)	-1,1 (-1,5 – -0,1)	1,2	-
CYP 3A5 (40:4)	-1,1 (-1,3 – 0)	-0,05 (-3,1 – 1,65)	0,70
UGT 1A4 (14:0)	-1,4 (-2,3 – 0,48)	-	-
T vrijednosti kuka			
CYP 3A4 (43:1)	-0,5 (-1,3 – 0)	-0,4	-
CYP 3A5 (40:4)	-0,5 (-1,3 – 0)	-1,1 (-1,9 – 1,3)	0,49
UGT 1A4 (14:0)	-0,56 (-1,3 - -0,13)	-	-
T vrijednosti vrata bedrene			
CYP 3A4 (43:1)	-1,1 (-1,6 - -0,8)	-1,2	-
CYP 3A5 (40:4)	-1,1 (-1,5 - -0,8)	-1,5 (-2,2 - -0,3)	0,41
UGT 1A4 (14:0)	-1,3 (-1,6 - -0,8)	-	-

*Mann-Whitneyjev U test

5.11.Razlike u serumskim razinama sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota polimorfizama CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4

Nema značajnih razlika u serumskim vrijednostima sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama u skupini ispitanica koje se liječe anastrozolom kao ni u kontrolnoj skupini ispitanica (Tablica 5.26., Tablica 5.27.).

Tablica 5.27. Vrijednosti sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama ispitanica liječenih anastrozolom

Terapija IA-om	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Homozigoti	Heterozigoti	
Sklerostin			
CYP 3A4 (71:5)	31,8 (28 - 40,5)	33,3 (27 - 42,6)	0,72
CYP 3A5(67:9)	32 (28,1 - 40,5)	30,8 (22 - 39,8)	0,34
UGT 1A4 (56:3)	32,3 (28,4 - 41,6)	43,9 (40,5 - 46,3)	0,11
DKK1			
CYP 3A4 (71:5)	24,3 (20,7 - 26,5)	20,4 (19,1 - 26,2)	0,56
CYP 3A5 (67:9)	24,3 (20,7 - 26,7)	20,8 (19,1 - 25,7)	0,25
UGT 1A4 (56:3)	24,4 (20,5 - 26,5)	27,4 (24,3 - 29,2)	0,09

*Mann-Whitneyjev U test

Tablica 5.28. Vrijednosti sklerostina i DKK1 između homozigota i heterozigota CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 polimorfizama u ispitanica prije početka hormonske terapije

Bez terapije	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Homozigoti	Heterozigoti	
Sklerostin			
CYP 3A4 (43:1)	23,6 (15,1 – 28,8)	62,8	-
CYP 3A5 (40:4)	23,5 (15,1 - 27,8)	39,1 (20,5 - 58)	0,09
UGT 1A4 (14:0)	23,8 (14,3 – 32,4)	-	-
DKK1			
CYP 3A4 (43:1)	26,3 (23,9 – 30,1)	32,7	-
CYP 3A5 (40:4)	26,2 (24 - 29,5)	31,1 (24,4 - 32,5)	0,36
UGT 1A4 (14:0)	25,9 (24,3 – 31,8)	-	-

*Mann-Whitneyjev U test

6. RASPRAVA

6.1. Uvod rasprave

Rak je dojke najčešća maligna bolest žena u svijetu s čak 1 671 000 novooboljelih žena u 2012. godini prema procjeni GLOBOCANA (1). U ženskoj populaciji Hrvatske rak je dojke također vodeća maligna bolest s obzirom na incidenciju i mortalitet. Prema posljednjim službenim podatcima Registra za rak Republike Hrvatske u 2014. godini od raka dojke oboljele su 2 644 žene (gruba stopa=120,5/100.000, ASRE=89/100.000, ASR-W= 66/100.000) (75). Iako obolijevaju većinom žene u poslijemenopauzalnoj dobi, dobna raspodjela oboljelih pokazuje da je petina slučajeva raka dojke dijagnosticirana u žena mlađih od 50 godina, odnosno da broj oboljelih nije zanemariv ni kod žena generativne dobi što dodatno naglašava važnost problema u smislu obolijevanja radno aktivne populacije. Od 40 europskih zemalja, Hrvatska se sa standardiziranom stopom incidencije (ASR-W=60,9/100.000) nalazi na 24. mjestu, no na 15. mjestu po mortalitetu (ASR-W=16,7/100.000)(2) što upućuje na gorući problem pravovremenog dijagnosticiranja bolesti te odgovarajućeg liječenja. Međutim, za razliku od Hrvatske, u većini europskih zemalja mortalitet je od raka dojke u padu i to prvenstveno zahvaljujući ranijem dijagnosticiranju bolesti i sve učinkovitijim načinima liječenja. U liječenju je pristup višedisciplinaran i obuhvaća kirurgiju, radioterapiju, kemoterapiju te adjuvantnu hormonsku terapiju, i to u dvije trećine bolesnica koje imaju hormonski ovisan tip raka dojke (13). Nedvojbeno je u više kliničkih studija i metaanaliza dokazano da su IA učinkovitiji i sigurniji, uz značajno manju stopu lokalnih i distalnih recidiva u odnosu na SREM bilo kao inicijalna monoterapija, bilo nakon 2 – 3 godine terapije SREM-om (17, 18). Međutim, u odnosu na zdrave poslijemenopauzalne žene, u bolesnica liječenih IA-om dolazi do naglog i ubrzanog gubitka koštane mase od oko 2 % godišnje (44). U literaturi je opisan tzv. IA induciran gubitak koštane mase (AIBL) koji premašuje postupni gubitak koštane mase od 1 % na godinu i 2 – 3 puta je brži u odnosu na zdrave poslijemenopauzalne žene (43-46), odnosno više je studija utvrdilo povezanost između liječenja anastrozolom s povećanim rizikom za osteoporozu, tj. s prijelomima (47-49). Navedeni podatci iz literature u skladu su s rezultatima provedenog istraživanja na području Osječko-baranjske županije koje je uključilo bolesnice liječene anastrozolom te novodijagnosticirane bolesnice s hormonski ovisnim rakom dojke prije uvođenja adjuvantnog hormonskog liječenja.

6. RASPRAVA

6.2. Značajke IA-induciranog gubitka koštane mase u odnosu na ITM ispitanica, redovitost menstuacijskih ciklusa i nastup menopauze prije 45. godine života, životnu dob ispitanica te naviku pušenja

Bolesnice s hormonski ovisnim rakom dojke liječene anastrozolom imaju T vrijednosti kuka i vrata bedrene kosti značajno niže u odnosu na novodijagnosticirane bolesnice prije uvođenja hormonske terapije. Također, u istoj je skupini bolesnica utvrđena statistički značajno niža mineralna gustoća vrata bedrene kosti (BMD) kao i Z vrijednost za cijeli kuk. Navedeni su rezultati prvenstveno individualno varijabilna nuspojava djelovanja anastrozola koji inhibira 96 – 99 % aktivnosti enzima aromataze rezultirajući već unutar tri tjedna brzim smanjenjem cirkulirajućih razina estrogena što za posljedicu ima povećanje procesa koštane resorpcije (46).

I preostali u našoj studiji dobiveni rezultati vezani uz patološki nalaz DXA su u skladu sa zaključcima ranije objavljenih istraživanja. Postoji statistički značajna razlika u T vrijednostima kuka te mineralne gustoće vrata bedrene kosti ovisno o vrijednostima ITM-a. Pretile bolesnice kao i one s prekomjernom tjelesnom masom imaju veću mineralnu gustoću vrata bedrene kosti i T vrijednost kuka, dok bolesnice s normalnim ITM-om imaju manju mineralnu gustoću kosti. Tjelesna je masa bitan čimbenik koji određuje BMD i gubitak je tjelesne mase povezan sa smanjenim vrijednostima BMD-a (76-78). Izraženiji gubitak tjelesne mase povezan je s izraženijim gubitkom BMD-a u starijih osoba (79). Nedostatak je ITM-a u tome što ne uzima u obzir individualnu građu tijela i stoga je primjeren za statističku procjenu uhranjenosti stanovništva neke države, međutim neprecizan je za osobnu procjenu pretilosti. Osoba može imati vrijednosti ITM-a preko 30 kg/m², ali ne mora biti pretila. S druge strane, stariji ljudi s manjom mišićnom i koštanom masom mogu biti klinički pretili, a da vrijednost ITM-a ne upućuje na pretilost. Korelacijom vrijednosti tjelesne mase kao i ITM-a s BMD-om i T vrijednostima potvrdili smo pretpostavljenu pozitivnu korelaciju tjelesne mase s T vrijednostima i BMD-a na svim ispitivanim mjestima metodom DXA. Dobiveni rezultati potvrđuju da je pretilost zaštitni čimbenik u nastanku poslijemenopauzalne osteoporoze budući da poboljšava koštanu masu i održava višu razinu estrogena tijekom menopauze (80). Također, dobiveni rezultati podupiru činjenicu da je tijekom menopauze fiziološka redukcija u proizvodnji estrogena povezana s brzim gubitkom koštane mase tijekom prvih 4 – 8 godina trajanja menopauze te da su nakon menopauze ostatne razine estrogena važne za održavanje gustoće kosti (46). Redoviti menstruacijski ciklusi tijekom

života doprinose postizanju vršne koštane mase koja je bitan element u sprječavanju nastanka osteoporoze (81). U provedenom istraživanju patološki nalaz DXA imaju značajno više ispitanice kojima je menopauza nastupila prije 45. godine života kao i one koje tijekom života nisu imale regularne cikluse.

Porast životne dobi jedan je od najvećih rizika za nastanak osteoporoze. Niska mineralna gustoća kosti i osteoporotični prijelomi vrlo su rijetki u premenopauzalnih žena, uglavnom je tada riječ o sekundarnim uzrocima osteoporoze. SZO je izmjerila prevalenciju osteoporoze u zapadnim razvijenim zemljama prema dobnim skupinama u ženskoj populaciji, uzimajući u obzir sva područja mjerenja. Rezultati su pokazali da osteoporozu ima 14,8 % žena u dobi od 50 do 59 godina, 21,6 % žena u dobi od 60 do 69 godina, 38,5 % žena u dobi od 70 do 79 godina te čak 70 % žena u dobi od 80 i više godina (82). U našem je istraživanju utvrđena negativna korelacija između životne dobi i BMD-a, i to na svim ispitivanim mjestima metodom DXA.

Pušenje, kao rizičan čimbenik za nastanak osteoporoze na našem ispitivanom uzorku žena nije pokazao statistički značajnu korelaciju s vrijednostima BMD-a. To se može objasniti malim uzorkom žena koje puše u odnosu na sve ispitanice uključene u istraživanje. Također, u literaturi ne postoje konačne potvrde da je pušenje posljedično povezano s niskim BMD-om budući da uz studije koje ne povezuju pušenje s promjenama vrijednosti BMD-a (83) postoje i istraživanja koja su pokazala niže BMD vrijednosti lumbalne kralježnice u pušača u usporedbi s nepušačima (84).

6.3. Razlike u serumskim razinama Wnt inhibitora i njihova povezanost s BMD-om, prehrambenim navikama i parametrima životnog stila u ovisnosti o liječenju IA-om

Prema našem saznanju, u literaturi do sada nije objavljeno presječno istraživanje koje je proučavalo učinke anastrozola na cirkulirajuće razine sklerostina i DKK1 u poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke prije i tijekom adjuvantne hormonske terapije uz analizu njihove povezanosti s BMD-om te parametrima životnih i prehrambenih navika kao i distribucijom polimorfizama enzima i transportera uključenih u metabolizam anastrozola.

U našem istraživanju dobivene su značajno više cirkulirajuće razine sklerostina u skupini poslijemenopauzalnih ispitanica liječenih anastrozolom u usporedbi s ispitanicama prije uvođenja adjuvantne hormonske terapije. Dobiveni su rezultati u skladu s drugim nedavno

objavljenim studijama koje potvrđuju da je sklerostin istaknuti negativni regulator stvaranja kosti koji smanjuje diferencijaciju i aktivnost osteoblasta (55, 68). Prema tomu, sklerostin bi mogao biti mogući specifični biljeg koštanog metabolizama te moguća meta za liječenje koštanih bolesti (85). Pretpostavlja se da su u poslijemenopauzalnih žena serumske razine sklerostina regulirane estrogenima, a značajan negativan odnos između serumskih razina sklerostina i slobodnog estrogenskog indeksa utvrđen je u nedavnoj studiji Mirze i sur. (64). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su sa spomenutom studijom, a mogu se objasniti činjenicom da IA provode ablaciju ostatnog estrogena (64). Te je rezultate potvrdila Kim Wonjin sa suradnicima sugerirajući da sklerostin može biti biljeg kvantitativnih i osjetljivih promjena serumskih razina estrogena kao i pregradnje kostiju (67). U našem istraživanju BMD vrata bedrene kosti, kao i cijelog kuka, značajno je niži u skupini ispitanica liječenih anastrozolom u usporedbi sa skupinom bez terapije, podupirući hipotezu da povećanje serumskih razina sklerostina uzrokuje povećanje pregradnje kostiju te nakon toga dovodi do gubitka BMD-a (86). Dodatno, u istraživanju provedenom u Saudijskoj Arabiji, koje je obuhvatilo 1803 žene u premenopauzi i poslijemenopauzi, utvrđena je negativna korelacija serumskih razina sklerostina s BMD-om što je i u skladu s hipotezom da je sklerostin potentni inhibitor koštane formacije (87). Zanimljivo je, no trenutačno teško objašnjivo, kako su neke studije pokazale pozitivnu korelaciju između serumskih razina sklerostina i vrijednosti BMD-a (67, 68, 88-90), dok isto se nije pokazalo u našoj ispitivanoj populaciji.

U više istraživanja provedenima na zdravim poslijemenopauzalnim ženama bez prisutnosti maligne bolesti, odnosno raka dojke utvrđeno je povišenje serumskih razina DKK1 ako je istovremeno prisutna i osteoporoza, sugerirajući da je DKK1, bar djelomice, uključen u patogenezu poslijemenopauzalne osteoporoze te da može služiti kao serološki marker za procjenu koštanu mase u odraslih osoba (59, 61, 86). Butler sa suradnicima dokazao je više serumske razine DKK1 u poslijemenopauzalnih žena s osteoporozom u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih žena (87). Nasuprot tomu, u našem istraživanju utvrđene su značajno niže serumske razine DKK1 u skupini ispitanica liječenih anastrozolom. Dobiveni su podatci u skladu s rezultatima studije Kyvernitakisa i suradnika koji su istraživali učinke inhibitora aromataze na cirkulirajuće razine Wnt inhibitora u poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke, međutim bez kontrolne skupine. U toj studiji utvrđen je pad serumskih razina DKK1 nakon 24 mjeseca liječenja anastrozolom. Također je u istoj studiji dobivena negativna povezanost DKK1 s BMD-om kuka i vrata bedrene kosti (68). Navedene

rezultate nije potvrdio Gobel sa suradnicima koji je istraživao učinke adjuvantnog liječenja IA-om i tamoksifenom na vrijednosti DKK1 u premenopauzalnih i poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke. U tom istraživanju nisu pronađane značajne razlike između serumskih razina DKK1 u bilo kojem trenutku tijekom studije u skupini bolesnica liječenih anastrozolom (69). Naši se rezultati mogu objasniti činjenicom da stanice raka dojke proizvode velike količine DKK1 (91, 92) za razliku od sklerostina koji gotovo isključivo izlučuju osteociti i moguće je da se razina DKK1 razlikuje u ispitanica ovisno o statusu bolesti. U našoj skupini ispitanica liječenih anastrozolom, serumske razine DKK1 mjerene su nakon kirurškog uklanjanja raka dojke i tijekom liječenja adjuvantnom hormonskom terapijom, dok su u kontrolnoj skupini ispitanica izmjerene prije bilo kakvog liječenja. Osim toga, komercijalno dostupan ELISA set koji se koristio u istraživanju Gobela, kao i u našoj studiji, ne razlikuje netumorske i tumorske DKK1. Povišene razine DKK1 zabilježene su kod bolesnica kod kojih je rak dojke metastazirao u kosti. U istraživanju Voorzangler-Rousselot i suradnika u bolesnica s karcinomom dojke i koštanim metastazama pronađene su više serumske razine DKK1 u usporedbi sa ženama kod kojih je karcinom dojke u potpunoj remisiji, kod kojih je karcionom dojke uzrokovao metastaze na nekoštanim mjestima i u usporedbi sa zdravim ženama (91). Prema tomu, DKK1 mogući je novi biljeg proširenosti zloćudne bolesti. Dodatna istraživanja koja bi bila usredotočena na usporedbu serumskih razina sklorostina i DKK1 u žena s karcinomom i bez karcinoma dojke mogla bi biti korisna za rješavanje toga problema.

Kao jedan od sekundarnih ciljeva istraživanja analizirana je povezanost cirkulirajućih razina Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kostiju. U našoj studiji dobivena je pozitivna povezanost između serumskih razina DKK1 i BMD-a lumbalne kralježnice (rho = 0,291, p <0,03), ali samo u kontrolnoj skupini ispitanica prije uvođenja adjuvantne hormonske terapije. Kao što je ranije spomenuto, Kyvernitakis sa suradnicima utvrdio je negativnu povezanost DKK1 s mineralnom gustoćom kuka i vrata bedrene kosti u skupini poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim karcinomom dojke liječenih anastrozolom (68). Slični rezultati dobiveni su u studijama koje su proveli Butler sa suradnicima te Gatti sa suradnicima (93, 94), međutim ta povezanost nije potvrđena u našoj studiji. Stoga bi se naši rezultati mogli objasniti činjenicama da žene prije uvođenja terapije IA-om u prosjeku imaju viši BMD te također imaju i više serumske razine DKK1 u usporedbi sa skupinom ispitanica liječenih IA-om. U našem istraživanju nisu dobivene statistički značajne razlike u BMD-u lumbalne kralješnice između tih dviju skupina ispitanica. Također, nije dobivena ni korelacija sa

serumskim razinama Wnt inhibitora u skupini ispitanica liječenih anastrozolom. Potrebna su daljnja istraživanja tih odnosa u većim prospektivnim studijama.

Kad smo sve ispitanice udružili u jednu grupu te analizirali međusoban odnos Wnt inhibitora, dobivena je statistički značajna negativna korelacija između sklerostina i DKK1 (rho = -0,287; p <0,001). U literaturi postoji svega nekoliko studija koje su istraživale taj odnos, i to s oprječnim rezultatima njihova međusobna odnosa. Porast cirkulirajućih razina sklerostina uz smanjenje razina DKK1 opisan je u kontekstu antiresorptivnog liječenja u žena u poslijemenopauzi (94). Međutim, također postoje i studije koje nisu utvrdile nikakvu povezanost između serumskih razina sklerostina i DKK1 (63, 95, 96). Naprotiv, u studiji Sankaralingama i suradnika (97), koji su istraživali promjene u cirkulirajućim razinama sklerostina i DKK1 nakon visokih doza vitamina D2 (300.000 IU), pronađena je značajna pozitivna korelacija između Wnt inhibitora na početku i nakon tri mjeseca terapije visokim dozama vitamina D2. Jedno je od mogućih objašnjenja za različitost u rezultatima u posljednjoj studiji razlika u upotrijebljenim testovima koji mjere različite regije ili fragmente sklerostina i DKK1 molekule. U našem istraživanju negativna povezanost mogla bi odražavati različite biološke događaje zbog činjenice da je aktivnost sklerostina dio fiziološkog procesa pregradnje kostiju i ne izlučuju ga stanice raka za razliku od DKK1 koji proizvode stanice tumora dojke.

Kao mogući regulatori serumskih razina DKK1 izdvojili su se redovito vježbanje i redoviti menstruacijski ciklusi. Među ispitanicama liječenim anastrozolom statistički značajno niže cirkulirajuće razine DKK1 imale su bolesnice koje redovito vježbaju te su imale tijekom života redovite menstruacijske cikluse. Oba navedena parametra pridonose postizanju i održavanju vršne koštane mase. Ti rezultati odgovaraju zaključcima objavljenim u literaturi da se povišene serumske razine DKK1 mogu identificirati kao čimbenik rizika razvoja i težine osteoporoze (93). Dodatno, uspoređujući naše dvije skupine ispitanica utvrđeno je da niže serumske razine DKK1 imaju ispitanice koje redovito konzumiraju minimalnu količinu mliječnih proizvoda, koje imaju redovitu dnevnu fizičku aktivnost dulju od 30 minuta, koje su vježbale u mladosti te kojima nisu odstranjeni jajnici. Navedeni su parametri pokazali značajno niže serumske razine DKK1 u skupini liječenoj IA-om u usporedbi s grupom bez terapije što upućuje da unatoč negativnom utjecaju koji IA imaju na koštani metabolizam kod pacijentica oboljelih od raka dojke, moguće je da dominantnu ulogu mogu imati neki drugi čimbenici koji doprinose nižoj razini DKK1.

6. RASPRAVA

Među mogućim prehrambenim navikama i parametrima životnog stila, koji mogu utjecati na serumske razine sklerostina, izdvojili su se redovito vježbanje, dnevna fizička aktivnost dulja od 30 minuta kao i prisutnost redovitih menstrualnih ciklusa tijekom života koji su bili povezani sa značajno višom razinom serumskog sklerostina u skupini liječenih anastrozolom. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodno spomenutim negativno recipročnim odnosom između serumskih razina DKK1 i sklerostina u provedenom istraživanju.

Nekoliko je studija istraživalo povezanost između starenja i serumskih razina Wnt inhibitora s kontradiktornim rezultatima. Pojedini su istraživači utvrdili da ne postoji povezanost između serumskih razina DKK1 i životne dobi (65, 91, 93) te potvrdili hipotezu da je patogeneza osteoporoze odgovorna za porast serumskih razina DKK1 u zdravih poslijemenopauzalnih žena, a ne proces starenja (98). Međutim, 2014. Dovjak sa suradnicima prvi je objavio dokaze o povezanosti cirkulirajućih razina DKK1 i starenja (63). U navedenom istraživanju serumske razine sklerostina značajno su se povisile sa starijom životnom dobi samo u ispitivanih muškaraca, a ne u žena. U nekoliko ranijih istraživanja iz 2011. godine, koja su obuhvatila veći broj ispitanika, utvrđen je porast cirkulirajućih razina sklerostina sa starenjem (66, 87). Na našem uzorku ispitanica nije utvrđena povezanost između dobi i serumskih razina Wnt inhibitora. U cilju razjašnjenja navedenog problema potrebne su dodatne kliničke studije u većoj populaciji.

6.4. Moguća ograničenja istraživanja

Jedno je od ograničenja provedenog istraživanja dizajn u smislu presječne studije, odnosno nedostatak prospektivnih podataka. Bilo bi idealno obje skupine žena pratiti tijekom najmanje 12 mjeseci i ponoviti sva mjerenja u vremenskom intervalu nakon godine dana. Time bi u skupini ispitanica liječenih anastrozolom isključili mogući utjecaj vanjskih čimbenika na vrijednosti BMD-a, a u cijeloj ispitivanoj skupini dobili još objektivnije podatke skeletnog statusa. Međutim, ustroj takve studije nije opravdan i moguć budući da ozbiljnost primarne bolesti zahtijeva relativno brzo uvođenje liječenja te se kohorta bez terapije IA-om ne može prospektivno pratiti. Drugo je ograničenje relativno mali uzorak, i to prvenstveno u kontrolnoj skupini ispitanica s novodijagnosticiranim rakom dojke prije početka hormonske terapije. Osobito su bili strogi kriteriji za uključenje ispitanica u kontrolnu skupinu budući da je bilo potrebno isključiti utjecaj ne samo hormonske terapije, već i kemoterapije na mineralnu gustoću kostiju. U praksi je to značilo da su ispitanice uz sve spomenute uključne i isključne

kriterije dobrovoljno uključene u istraživanje netom nakon spoznanje da boluju od maligne smrtonosne bolesti. Stoga je iznimno važan bio psihološki pristup navedenim ispitanicama uz pronalaženje motivacije za sudjelovanje u znanstvenom istraživanju. Iz toga proizlazi glavna prepoznatljiva odrednica i originalnost našeg istraživanja u smislu postojanja usporedne kontrolne skupine koja se sastojala od novootkrivenih ispitanica oboljelih od hormonski ovisnog raka dojke, a uključenih u istraživanje u „uskome prozoru“ između postavljanja dijagnoze i započinjanja kemoterapije, odnosno hormonske terapije. Ispitanice u kontrolnoj skupini nisu se po antropometrijskim odrednicama te većini prehrambenih i životnih navika razlikovale značajno od ispitanica liječenih anastrozolom. Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje je imalo takve posebne kriterije za uključenje i isključenje. To je ujedno i ograničilo veličinu kontrolne skupine koja je obuhvaćala samo ispitanice kojima još u liječenje nije uključena ni kemoterapija ni hormonska terapija. Također bi jedan od nedostataka mogao biti i objektivnost i točnost podataka dobivenih upitnikom u vezi s načinom života i prehrambenim navikama. Postoji mogućnost da su žene koje su sudjelovale u ovoj studiji odabrale sudjelovati jer su svjesne zdravstvenih problema i bolesnije od prosjeka.

6.5. Procjena raspodjele ispitivanih polimorfizama i njihove povezanosti s neželjenim nuspojavama

Više nije stvar budućnosti, već sadašnjosti da je jedan od glavnih zadataka u liječenju karcinoma dojke individualiziran pristup uz optimizaciju hormonske terapije u svrhu postizanja učinkovitog liječenja uz istodobno smanjenje neželjenih učinaka navedenih lijekova.

Jedan od mogućih pristupa jest i određivanje farmakogenetičkog profila bolesnica kojima bi se odredili polimorfizmi pojedinog nukleotida u genima koji kodiraju enzime koji metaboliziraju lijekove (DME) budući da mogu imati ključnu ulogu u individualnom odgovoru na anastrozol. Polimorfizmi određivani u našem ispitivanju dobro su karakterizirani u različitim populacijama, međutim nema dovoljno podataka za hrvatsku populaciju, a osobito nema podataka vezano uz bolesnice oboljele od hormonski ovisnog raka dojke liječenih anastrozolom. Nadalje, prema našem saznanju, ovo je prva presječna studija koja analizira povezanost tih polimorfizama s individualnim odgovorom na hormonsku terapiju raka dojke i pojavu njezinih neželjenih sporednih učinaka.

6. RASPRAVA

Farmakogenetičke su studije pokazale da polimorfizmi DME, transportera i receptora doprinose varijabilnom odgovoru na lijek (99). CYP3A4 i CYP3A5 izoenzimi odgovorni su za metabolizam preko 50 % svih klinički upotrijebljenih lijekova, uključujući uobičajene antidepresive, antibiotike, antihipertenzive, steroide i imunosupresive (100). Stoga, polimorfizmi u obitelji CYP mogu biti važni genetički čimbenici međuindividualne i međurasne različitosti u eliminaciji lijeka putem CYP enzima, kao što je slučaj kod anastrozola. Osim toga, određivanje mutiranih alela CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 te saznanja o njihovoj alelnoj frekvenciji u hrvatskoj populaciji mogli bi u konačnici dovesti do individualizacije terapije raka dojke. Istraživanja su pokazala da se učestalost CYP3A4*1B i CYP3A5*3 polimorfizama razlikuje među različitim etničkim skupinama (100-102). Naši rezultati potvrđuju da su frekvencije mutiranih CYP alela u hrvatskih bolesnica s rakom dojke u skladu s podatcima o genotipovima bijelaca (99). Pokazali smo da je mutirani alel CYP3A4*1B rijedak u hrvatskoj populaciji, pri čemu je genotip AG bio prisutan u samo 6 % ispitanica, dok genotip GG nije bio otkriven u hrvatskoj populaciji bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke. Slično tomu, prethodne su studije otkrile CYP3A4*1B alel u oko 4 – 9 % bijelaca (101, 102) što je znatno niže nego u Afroamerikanaca kod kojih je učestalost tog alela oko 53 % (101-104). Učestalost je s druge strane veća u odnosu na tajvansku i kinesku populaciju čija je prevalencija u literaturi 0 % (105). Nasuprot tomu, utvrđeno je da polimorfizam CYP3A5*3 prevladava u hrvatskoj populaciji s incidencijom mutiranih homozigota od 88,1 %. Takva učestalost mutiranog alela u skladu je s prethodnim istraživanjima provedenim u drugim europskim populacijama. U literaturi je opisana učestalost toga alela od 94,9 % u populaciji Bosne i Hercegovine (105), zatim 94,35 % u grčkoj populaciji (100), 94 % u populaciji Velike Britanije (106), 91,7 % u nizozemskoj populaciji (107), 87,5 % u portugalskoj (101) i 82 % u francuskom stanovništvu (108). Ovim smo istraživanjem također otkrili simultano postojanje specifičnih genotipova CYP3A4*1B i CYP3A5*3 u istih ispitanica s rakom dojke. Svih sedam ispitanica s mutiranim CYP3A4*1B alelom također su imale mutirani CYP3A5*3 alel. Prema tomu, naši podatci nadopunjuju podatke iz prethodnih studija i upućuju na snažnu neravnotežu povezivanja između mutiranih CYP3A4 i CYP3A5 alela kod bijelaca (31, 109). Glukuronidacija je jedan od najvažnijih metaboličkih putova faze II. Katalizirana je s obitelji UDP-glukuronoziltransferaznih enzima (UGT). Jedna od podskupina jest UGT1A. Frekvencije alela u UGT1A4 pokazuju znatnu međuetničku varijabilnost. Naši su rezultati za UGT1A4*2 zanimljivi budući da se razlikuju od rezultata Ehmerove studije u kojoj je izvijestio o malenoj frekvenciji varijante alela

UGT1A4*2 (P24T) od 8 %. Istraživao je povezanost polimorfizma pojedinog nukleotida UGT1A s hepatocelularnim karcinomom – koju nije potvrdio, ali je pokazao smanjenu glukuronidacijsku aktivnost kod varijante UGT1A4 P24T, i to 30 % smanjenje glukuronidacijske aktivnosti za beta-naftilamin, odnosno za dihidrotestosteron 50 % smanjenje aktivnosti. Zaključio je da je visoka učestalost SNP-ova kroz ljudski lokus UGT1A genetska osnova međuindividualnih varijacija jetrenog metabolizma lijekova. UGT1A4*2 polimorfizam jetrenog enzima UGT1A4 pokazuje diferencijalnu metaboličku aktivnost prema mutagenim aminima i endogenim steroidima, mijenjajući metabolizam jetre i detoksikaciju (39). Ti su rezultati potvrđeni u Zhouovoj studiji koja je pokazala smanjenu funkciju UGT1A4*2 za glukuronidaciju lamotrigina in vitro što može dovesti do međuindividualnih varijacija metabolizma lamotrigina in vivo (38). Naši rezultati o prevalenciji UGT1A4*2 alela u hrvatskih pacijentica oboljelih od raka dojke u skladu su s podatcima objavljenim u studiji Saekija i sur. koji nisu otkrili SNP 70C>A (P24T) u japanskoj populaciji (110) kao što ni mi nismo otkrili u hrvatskoj populaciji ispitanica s rakom dojke. Takav bi rezultat mogao biti posljedica male veličine uzorka, no učinak socio-ekonomskih čimbenika ne može se isključiti. U Jean-Nicholas Royevom istraživanju, iako o CYP3A5 genetskoj inačici, naznačeno je da razlike u frekvencijama SNP-a mogu odražavati evolucijske pritiske koje generiraju okolinski čimbenici u zemljopisno različitim područjima (111). Podatci iz literature za UGT1A4 lokus složeni su i pokazuju da učestalost jednog od najčešćih mutiranih alela UGT1A4*2 u jordanskoj populaciji iznosi 6,5 % (112) što je u skladu s Ehmerovim rezultatima. Također, Reimersovo istraživanje potvrdilo je da su frekvencije mutiranog alela UGT1A4*2 u norveškoj populaciji u istom rasponu kao i u ranijim istraživanjima na bjelačkoj populaciji (113). Suprotno tomu, López je utvrdio da su frekvencije alela za UGT1A4*2 španjolskog stanovništva u Meksiku više nego kod azijata i više slične frekvencijama u bijelaca, dok su u meksičkom Mestizu bile niže nego kod bijelaca i više nego kod azijata (114) što jasno potvrđuje kompleksnost i interetničku varijabilnost lokusa UGT1A. Daljnje će studije, uključujući veći broj ispitanika, prvenstveno zdravih žena biti nužne. Pretpostavku našeg istraživanja da smanjena glukuronidacijska aktivnost kod nositelja mutiranog alela za UGT1A4*2 na ispitivanom uzorku žena oboljelih od hormonski ovisnog raka dojke nismo utvrdili budući da nije prisutna statistički značajna razlika u vrijednostima mineralne gustoće kostiju između heterozigota za mutirani alel UGT1A4*2 i homozigota za divlji alel. Kao mogući razlozi dolaze u obzir ograničena veličina uzorka te nemogućnost mjerenja koncentracija metabolita anastrozola u serumu u vrijeme izvođenja istraživanja. Upravo je

navedeni nedostatak ujedno i potencijal novoga istraživanja kojim bi se u serumu, uza sve do sada obuhvaćene parametre istraživanja, dodatno mjerile koncentracije metabolita anastrozola kao i razine estrogena, testosterona i adrostendiona pri samom uključenju u istraživanje te nakon vremenskog intervala od jednog mjeseca do šest mjeseci terapije anastrozolom. Do sada je u literaturi opisano samo jedno takvo istraživanje koje je proveo Ingle sa suradnicima. Oni su utvrdili da od 191 bolesnice s ranim rakom dojke, dvije bolesnice ekstenzivno metaboliziraju anastrozol i nisu pokazale znatna smanjenja serumskih razina estrogena. Možemo pretpostaviti da bi u takvih bolesnica mogao izostati učinak anastrozola kao hormonske terapije raka dojke. Ingleova je studija terapije anastrozolom u odobrenoj dnevnoj dozi od jednog mg otkrila značajnu varijabilnost u metabolizmu lijeka, ali i učinka lijeka. Promatrana varijabilnost sugerira da je anastrozol kao lijek prvog izbora u poslijemenopauzalnih bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke glavni kandidat za farmakogenomske studije usmjerene na otkrivanje genetske varijacije u metabolizmu lijeka. Rezultati tih budućih studija mogu omogućiti kretanje prema cilju istinski individualizirane terapije anastrozolom (23).

6.6. Buduća istraživanja

Jedna od vrlo zanimljivih mogućnosti u budućnosti, koja do sada prama našim saznanjima nije opisana u literaturi, jest korelacija metabolita anastrozola u serumu s cirkulirajućim razinama Wnt inhibitora. Nužno je identificirati osjetljive pokazatelje statusa koštanog sustava budući da se frakture javljaju i u bolesnica čiji su nalazi T vrijednosti unutar fizioloških granica.

Kao mogućnost proširenja provedenog istraživanja dolazi u obzir i uključenje zdravih žena kojima bi se analizirala distribucija CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 alela te utvrdila povezanost s pojavnošću raka dojke uspoređujući ih sa 141 ispitanicom uključenom u provedeno istraživanje.

Aktivnost CYP3A4 varira široko u ljudi, a poznato je više od 78 polimorfizama. Jedna je od hipoteza ta da pojedine varijante CYP3A4 mogu imati ulogu u karcinogenezi dojke moduliranjem razina metabolita spolnih hormona. Američka studija pokazala je da nasljeđivanje CYP3A4*1B korelira s ranom menarhom, čimbenikom rizika za karcinom dojke. Visoka aktivnost CYP3A4, ali ne CYP3A5, pokazala je nevjerojatnu povezanost s početkom puberteta (115). Međutim, australska studija nije pronašla povezanost nastanka raka

dojke s pojavnošću CYP3A4*1B (116). Alternativno, CYP3A4 može metabolički aktivirati egzogene karcinogene kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, heterociklički amini, aflatoksin i nitrozamini (117-119). Epidemiološki podatci potvrđuju postojanje razlika u frekvencijama raka dojke u različitim etničkim skupinama što je potaklo iranske istraživače da analiziraju povezanost raka dojke s frekvencijama CYP3A4*1B alela. Prema podatcima u literaturi, frekvencije mutirane varijante CYP3A4*1B među afričkim je Amerikancima 0,817, među bijelcima je 0,096, među Latinošpanjolcima koji žive u Sjevernoj Americi 0,107, među azijskim je stanovništvom 0,000 i nepoznata je u američkih domorodaca. Frekvencije pet različitih etničkih populacija za CYP3A4*1B mutirani alel slabo su korelirale s incidencijom karcinoma dojke. Iranska studija nije pokazala povezanost raka dojke s CYP3A4*1B polimorfizmom (30).

Izuzetno velik potencijal u smislu budućih istraživanja imala bi studija o primarnoj prevenciji raka dojke. Do sada je u literaturi objavljen veći broj istraživanja koja su koristila tamoxifen (TAM) u dnevnoj dozi od 20 mg u svrhu kemoprevencije, ali samo dva istraživanja koja su koristila IA kao kemopreventivna sredstva u zdravih žena s povišenim rizikom obolijevanja od raka dojke (120). Čimbenike rizika obolijevanja od raka dojke dijelimo u dvije velike skupine (121). U prvoj su skupini čimbenici na koje možemo djelovati te su generalno povezani s načinom života i izloženosti estrogenima, a uključuju fizičku neaktivnost, prekomjernu tjelesnu težinu/pretilost, povećanu konzumaciju alkohola, upotrebu hormonskog nadomjesnog liječenja (HNL) (122-125). Drugu skupinu čine nepromjenjivi čimbenici rizika kao što su rastuća životna dob/starenje, pozitivna obiteljska anamneza, prekancerozne lezije dojki te reprodukcijski čimbenici (rana menarha, kasna menopauza, prva iznesena trudnoća nakon 30. godine života, nuliparitet). TAM i raloxifen pripadaju grupi selektivnih modulatora estrogenskih receptora (SERM) koji imaju antagonistički učinak na ER u dojci. Prema smjernicama Američkog društva onkologa (ASCO), TAM je više od desetljeća, a raloksifen od nedavno preporučen za primarnu prevenciju raka dojke u žena s povećanim rizikom. U Hrvatskoj je TAM (pod nazivom Nolvadex) registriran i indiciran u svrhu liječenja i prevencije raka dojke, dok je raloxifen (pod nazivom Evista) registriran za liječenje osteoporoze. Nedvojbeno je dokazano da TAM smanjuje rizik obolijevanja od hormonski ovisnog karcinoma dojke i u premenopauzalnih i u poslijemenopauzalnih žena za otprilike jednu polovicu. Međutim TAM su u primarnoj prevenciji raka dojke bolesnici samo ograničeno prihvaćali, i to dijelom zato što je povezan s rijetkim, ali ozbiljnim toksičnim učincima (126-128). Povezan je s povišenim rizikom obolijevanja od karcinoma endometrija

te tromboembolijskim komplikacijama u smislu moždanog udara, plućne embolije, duboke venske tromboze te s razvojem katarakte.

S druge strane, IA sprječavaju više kontralateralnih karcinoma dojke i uzrokuju manje nuspojava od TAM-a u liječenju bolesnica s ranim stadijem karcinoma dojke (129).

Do sada su objavljena samo dva istraživanja koja su koristila IA za kemoprevenciju (22). Kanadska Mammary Prevention 3 Study (MAP3) studija obuhvatila je 4500 poslijemenopauzalnih žena s umjereno povišenim rizikom za rak dojke i ispitala učinkovitost i sigurnost eksemestana tijekom 35 mjeseci. MAP3 studijom utvrđeno je 65 % relativno smanjenje godišnje incidencije invazivnog raka dojke. Nije bilo značajnih razlika s obzirom na nuspojave, između ispitivane skupine na eksemestanu i kontrolne skupine na placebu u smislu fraktura kostiju, kardiovaskularnih događaja, drugih karcinoma ili smrti povezanih s liječenjem. Uočene su minimalne razlike u kvaliteti života. Istraživači su zaključili da je eksemestan značajno smanjio invazivne karcinome dojke u poslijemenopauzalnih žena s umjereno povećanim rizikom. Tijekom razdoblja praćenja od tri godine, eksemestan nije bio povezan s pojavom ozbiljnih toksičnih učinaka uz samo minimalne promjene u zdravstvenoj kvaliteti života ispitivanih žena. Europska International Breast Cancer Intervention Study II (IBIS II) studija tijekom pet godina pratila je 3864 poslijemenopauzlne žene s visokim rizikom na anastrozolu vs. placebo te utvrdila 53 %-tno relativno smanjenje godišnje incidencije invazivnog karcinoma dojke. Zanimljiv je nalaz dobiven u istraživanju – da je kemopreventivni učinak anastrozola bio najveći za karcinome dojke visokog stupnja. IBIS II studija dokazala je da anastrozol smanjuje rizik ER pozitivnog invazivnog karcinoma dojke i duktalnog karcinoma in situ (DCIS) za više od 50 %, međutim da ima mali učinak na rak dojke s negativnim ER-om. Dobiveno relativno smanjenje incidencije veće je od onih koja su u literaturi opisana za TAM ili raloksifen. Stoga je Cuzick sa suradnicima zaključio da bi anastrozol mogao biti atraktivna mogućnost u kemoprevenciji poslijemenopauzalnih žena s povećanim rizikom obolijevanja od raka dojke (120). Iako su zabilježene mnoge nuspojave kao posljedica deprivacije estrogena, iste su bile samo malo češće u skupini tretiranoj anastrozolom u odnosu na placebo grupu što može upućivati na to da većina tih simptoma zapravo nije povezana s anastrozolom. Unatoč dobivenim rezultatima, ni anastrozol ni eksemestan nisu još odobreni u primarnoj prevenciji raka dojke. Problem najbolje dostupne kemoprevencije mnogo je većih razmjera budući da žene s povećanim rizikom, ali i liječnici obiteljske medicine nisu skloni primarnoj prevenciji raka dojke. Cilj je postići šire prihvaćanje i struke i opće populacije. Kardiolozi su po tom pitanju vrlo uspješni budući da su

kardiovaskularne čimbenike rizika, poput povišenih serumskih razina kolesterola ili povišenog krvnog tlaka, proglasili bolestima za koje se generalno podrazumijeva da se liječe lijekovima. Naš je zadatak u budućnosti razvijati svijest o primarnoj prevenciji raka dojke te ju učiniti široko dostupnom i ponuđenom, možda čak dodajući preventivnu komponentu Nacionalnom programu ranog otkrivanja raka dojke.

6.7. Zaključak rasprave

Zaključno, potrebno je naglasiti da su podatci na našem uzorku žena pokazali da su serumske razine sklerostina značajno povećane u skupini poslijemenopauzalnih ispitanica s hormonski ovisnim rakom dojke, dok je razina DKK1 u serumu značajno smanjena kao rezultat liječenja IA-om. Stoga zaključujemo da serumske razine Wnt inhibitora nude nove moguće biljege za procjenu skeletnog statusa kod bolesnica liječenih anastrozolom i mogli bi biti korisni kao dodatni markeri za održavanje zdravlja kostiju te osigurati optimalnu kvalitetu života bolesnika liječenih IA-om.

Analizom polimofizama gena za CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 u našoj regiji dobivene su frekvencije alela koje odgovaraju europskoj populaciji. Naši su podatci pokazali veliku prevalenciju CYP3A5*3 alela u hrvatskoj potpopulaciji bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke što je u skladu s učestalosti tog mutiranog alela u drugim publiciranim istraživanjima. Također, pokazali smo istodobno postojanje heterozigotnog CYP3A4*1B i CYP3A5*3 u istoj skupini ispitanika. Budući da su CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 uključeni u metabolizam brojnih, često korištenih lijekova, važno je analizirati polimorfizme CYP3A4, CYP3A5 i UGT1A4 te odrediti odgovarajuće frekvencije alela u određenim etničkim skupinama. Kliničko značenje polimorfizama CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 još se uvijek istražuje, a utvrđivanje povezanosti frekvencija mutiranih alela tih polimorfizma među različitim etničkim skupinama s aktivnošću enzima koji metaboliziraju lijekove može značajno doprinijeti spoznajama o djelotvornosti lijeka i toksičnosti. U skladu s tim, rezultati našeg istraživanja mogu predstavljati osnovu za razvoj farmakogenetičkog programa u Hrvatskoj čiji bi klinički značaj bio utvrđenje učestalosti CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 alela te određivanje njihova učinka na farmakogenetskim primjenama individualiziranog pristupa liječenju bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke.

7. ZAKLJUČCI

1. T vrijednost i Z vrijednost kuka (Studentov t-test, P = 0,01) te BMD i T vrijednost vrata bedrene kosti (Studentov t-test, P < 0,001) značajno su niži u skupini ispitanica liječenih anastrozolom u odnosu na skupinu ispitanica bez terapije IA-om.
2. Značajno su više serumske razine sklerostina u skupini ispitanica liječenih anastrozolom u odnosu na ispitanice prije uvođenja hormonske adjuvantne terapije (Mann-Whitneyjev U test, P < 0,001).
3. U skupini ispitanica liječenih anastrozolom statistički su značajno niže vrijednosti DDK1 u usporedbi s ispitanicama prije hormonskog liječenja (Mann-Whitneyjev U test, P < 0,001).
4. Nije utvrđena statistički značajna veza među serumskim razinama Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kosti ispitanica liječenih anastrozolom.
5. U skupini ispitanica s novootkrivenim hormonski ovisnim rakom dojke prije početka liječenja anastrozolom utvrđena je pozitivna korelacija između T vrijednosti lumbalne kralježnice s DKK1 (Rho = 0,294, P = 0,03) kao i BMD-a lumbalne kralježnice s DKK1 (Rho = 0,330, P = 0,02).
6. Frekvencije genotipova i varijantnih alela za CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 polimorfizme u poslijemenopauzalnih ER-pozitivnih ispitanica s rakom dojke su u skladu s podatcima za Europsku populaciju.
7. Uglavnom su prisutni homozigoti divljeg tipa za A alel CYP3A4*1B polimorfizma i u skupini koja je na terapiji IA-om (92,7 %) kao i u skupini prije početka hormonske terapije (97,7 %), s ukupnom prevalencijom od 94,4 %. Ni u jednoj skupini nije identificiran homozigot za mutirani G alel.
8. Za CYP3A5*3 polimorfizam prevladavaju homozigoti za mutirani G alel s ukupnom prevalencijom od 88,1 %, odnosno s prevalencijom od 86,6 % u skupini na terapiji IA-om te 90,9 % u kontrolnoj skupini žena. Homozigoti za divlji A alel nisu pronađeni ni u jednoj skupini.
9. Utvrđena je značajna neravnoteža veze (linkage disequilibrium) između CYP3A4*1B i CYP3A5*3 alela s 84,3 % neusklađenosti povezivanja (D'= 0,843) u skupini liječenih anastrozolom, dok je u kontrolnoj skupini 95,1 % neusklađenost povezivanja (D' = 0,951).

10. Homozigoti divljeg tipa za C alel UGT1A4*2 uglavnom su prisutni i u skupini koja je na terapiji IA-om (95,2 %) te u svih ispitanica u skupini prije uvođenja adjuvantne hormonske terapije (100 %), s ukupnom prevalencijom od 96,1 %. Ni u jednoj skupini nije identificiran homozigot za mutirani A alel. Tri (4,8 %) bolesnice na terapiji anastrozolom heterozigoti su za CYP1A4*2.
11. Povezanost ispitivanih polimorfizama s nastankom nuspojava liječenja nije dokazana.

8. SAŽETAK

Cilj: Anastrozol je lijek prvog izbora u liječenju poslijemenopauzalnih žena s hormonski ovisnim rakom dojke (HR-BC). Citokrom P450 (CYP) i UDP-glukuronoziltransferaza (UGT) imaju ključnu ulogu u deaktivaciji i uklanjanju anastrozola. Negativan je učinak anastrozola na koštani metabolizam dokazan, dok se učinak na Wnt inhibitore još uvijek istražuje. Cilj je istraživanja bio odrediti cirkulirajuće razine Wnt inhibitora u bolesnica s HR-BC liječenih anastrozolom i usporediti ih s bolesnicama oboljelima od raka dojke prije uvođenja terapije. Također smo ispitali povezanost Wnt inhibitora s mineralnom gustoćom kosti (BMD) te prehrambenim i životnim navikama. Polimorfizmi jednog nukleotida (SNPs) u genima koji kodiraju CYP i UGT mogu imati ključnu ulogu u individualnim odgovorima na anastrozol. Cilj je bio utvrditi učestalost mutiranih CYP3A4*1B, CYP3A5*3 i UGT1A4*2 alela te istražiti njihovu povezanost s ishodom liječenja te pojavom nuspojava.

Bolesnici i metode: U opažajno presječno istraživanje slučaja i kontrola je uključena 141 poslijemenopauzalna ispitanica s HR-BC, od kojih je 85 liječeno s 1 mg anastrozola, dok je 56 uključeno prije adjuvantne hormonske terapije. Serumske koncentracije Wnt inhibitora mjerene su pomoću komercijalno dostupnih ELISA testova. BMD; g/cm² izmjerena je denzitometrijom dvoenergetskim rendgenskim zrakama (eng. dual-energy X-ray absorptiometry, DXA) pomoću uređaja Lunar Prodigy (GE Healthcare, SAD), a upitnik je korišten za istraživanje osobitosti životnog stila i prehrambenih navika ispitanica. Genomska je DNA izolirana iz uzoraka periferne krvni upotrebom komercijalno dostupnog kompleta (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Njemačka). PCR u realnom vremenu upotrijebljen je za otkrivanje polimorfizama, uz primjenu specifičnog testa TaqMan® SNP genotipizacije (Applied Biosystems).

Rezultati: Serumske su razine sklerostina bile znatno više u skupini ispitanica liječenih anastrozolom (31,8 pmol/l) u usporedbi sa skupinom prije uvođenja hormonske terapije (24,1 pmol/l, p <0,001). Nasuprot tomu, razina DKK1 u serumu bila je znatno niža u skupini liječenoj anastrozolom (24,3 pmol/l prema 26,02 pmol/l, p<0,001). BMD kuka i vrata bedrene kosti bio je znatno niži u skupini liječenih anastrozolom. Statistički značajna negativna korelacija između sklerostina i DKK1 (rho=-0,287, p <0,001) zabilježena je u svih ispitanika. CYP3A5*3 predominantan je alel u hrvatskoj populaciji bolesnica s HR-BC. Dokazano je i istodobno postojanje heterozigotnog CYP3A4 *1B i CYP3A5*3 haplotipa u istoj skupini ispitanica.

8. SAŽETAK

Zaključak: Povećanje serumske razine sklerostina i smanjenje razine DKK1 povezano je s liječenjem anastrozolom. Povezanost ispitivanih polimorfizama s nastankom nuspojava liječenja nije dokazana.

KLJUČNE RIJEČI: dickkopf1 protein ljudski; farmakogenomika; inhibitori aromataze; osteoporoza; SOST protein ljudski

9. SUMMARY

Association of sclerostin, dickkopf 1 and functional genetic aromatase inhibitors polymorphisms with interpatient variability in the frequency and intensity of adverse effects

Objectives: Anastrozole is the first choice treatment in postmenopausal women with hormone-dependent breast cancer (HR-BC). Cytokine P450 (CYP) and UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) have a key role in deactivating and eliminating anastrozole. The negative effect of anastrozole on bone metabolism has been demonstrated, while the effect on Wnt inhibitors is still being investigated. The aim of the study was to determine the circulating levels of Wnt inhibitors in HR-BC patients treated with anastrozole and compare them with patients with breast cancer prior to the introduction of the adjuvant hormonal therapy. We also investigated the association of Wnt inhibitors with bone mineral density (BMD) and dietary and life habits of participants. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding CYP and UGT may play a key role in individual responses to anastrozole. The aim was to determine the frequency of mutated CYP3A4*1B, CYP3A5*3 and UGT1A4*2 alleles and to investigate their correlation with the outcome of adjuvant hormonal treatment and the occurrence of side effects.

Participants and methods: Cross-sectional study included 141 postmenopausal HR-BC patients, of whom 85 were treated with 1 mg of anastrozole, and 56 were included prior to the introduction adjuvant hormonal therapy. Serum concentrations of Wnt inhibitors were measured using commercially available ELISA assays. BMD; g/cm2 was measured by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) imaging (Lunar Prodigy, GE Healthcare, SAD) and a self-reported questionnaire was used to investigate the lifestyle and eating habits of the examinees. Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using commercially available kit (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). A real-time PCR was used for the detection of polymorphisms, with the application of the specific TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems).

Results: Serum levels of sclerostin were significantly higher in the group of participants treated with anastrozole (31.8 pmol/l) compared to the w/o anastrozole therapy group (24.1 pmol/l, $p<0.001$). In contrast, the serum DKK1 level was significantly lower in the anastrozole treated group (24.3 pmol/l at 26.02 pmol/l, $p <0.001$). Total hip and femoral neck

9. SUMMARY

BMD were significantly lower in the group treated with anastrozole. Statistically significant negative correlation between sclerostin and DKK1 (rho=-0.287, p<0.001) was observed in all participants. CYP3A5*3 was found to be predominant in the Craotian population of HR-BC patients. We have demonstrated a strong linkage disequilibrium between CYP3A5*3 and CYP3A4*1B alleles in the same group of participants.

Conclusion: Increased serum levels of sclerostin and decreased levels of DKK1 are associated with the anastrozole treatment. The correlation of the investigated polymorphisms with the onset of treatment side effects has not been established.

Keywords: aromatase inhibitors; dickkopf1 protein, human; pharmacogenomics; osteoporosis; SOST protein, human

10. LITERATURA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: http://globocan.iarc.fr

2. Šekerija M, Čukelj P. Potencijalni uzroci trendova pojavnosti i smrtnosti od raka dojke u Hrvatskoj. Ivan P, editor. Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti; 2017.

3. Šamija M, Strnad M, editors. Proceedings 25.scientific meeting "Breast disease". 25 scientific meeting Breast disease; 2015.; Zagreb: Croatian academy of sciences and arts.

4. Registar za rak, Incidencija raka u Hrvatskoj. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 1994.-2014.

5. Tomić S. Era preizne dijagnostike raka dojke - sadašnjost i trendovi za budućnost. In: Prpić I, editor. XXVII Znanstveni sastanak "Bolesti dojke"; Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti; 2017.

6. Breast cancer facts and figures: American Cancer Society; 2017.

7. Lerner LJ, Jordan VC. Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. Cancer Res. 1990;50(14):4177-89.

8. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;151:1-32.

9. Jakić-Razumović J. Metode molekularne patologije u patohistološkoj dijagnostici raka dojke. In: Ivan P, editor. XXVZnanstveni sastanak "Bolesti dojke"; Zagreb: Hrvatska Akademija Znanosti i Umjetnosti; 2015. p. 33-42.

10. Levanat S. Heterogenost raka dojke i personalizirana medicina s aspekta molekularne biologije. In: Ivan P, editor. XXIVZnanstveni sastanak "Bolesti dojke"; Zagreb: Hrvatska Akademija Znanosti i Umjetnosti; 2014. p. 147-54.

11. Vrbanec D. Personalizirano sustavno liječenje bolesnica s rakom dojke. In: Ivan P, editor. XXIVZnanstveni sastanak "Bolesti dojke"; Zagreb: Hrvatska Akademija Znanosti i Umjetnosti; 2014. p. 155-62.

12. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature. 2012;486(7403):346-52.

13. Ingle JN. Pharmacogenomics of endocrine therapy in breast cancer. J Hum Genet. 2013;58(6):306-12.

14. Lake DE, Hudis C. Aromatase inhibitors in breast cancer: an update. Cancer Control. 2002;9(6):490-8.

15. Lazarus P, Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors. Drug Metab Rev. 2010;42(1):182-94.

16. Geisler J, King N, Dowsett M, Ottestad L, Lundgren S, Walton P, et al. Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer. Br J Cancer. 1996;74(8):1286-91.

17. Ingle JN. Overview of adjuvant trials of aromatase inhibitors in early breast cancer. Steroids. 2011;76(8):765-7.

18. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. J Clin Oncol. 2010;28(3):509-18.

19. Burstein HJ, Griggs JJ, Prestrud AA, Temin S. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. J Oncol Pract. 2010;6(5):243-6.

20. Altundag K, Ibrahim NK. Aromatase inhibitors in breast cancer: an overview. Oncologist. 2006;11(6):553-62.

21. Kamdem LK, Liu Y, Stearns V, Kadlubar SA, Ramirez J, Jeter S, et al. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. Br J Clin Pharmacol. 2010;70(6):854-69.

22. Barros-Oliveira MDC, Costa-Silva DR, Andrade DB, Borges US, Tavares CB, Borges RS, et al. Use of anastrozole in the chemoprevention and treatment of breast cancer: A literature review. Rev Assoc Med Bras (1992). 2017;63(4):371-8.

23. Ingle JN, Buzdar AU, Schaid DJ, Goetz MP, Batzler A, Robson ME, et al. Variation in anastrozole metabolism and pharmacodynamics in women with early breast cancer. Cancer Res. 2010;70(8):3278-86.

24. Ingle JN, Kalari KR, Buzdar AU, Robson ME, Goetz MP, Desta Z, et al. Estrogens and their precursors in postmenopausal women with early breast cancer receiving anastrozole. Steroids. 2015;99(Pt A):32-8.

25. Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, Ellis MJ, Sledge GW, Budd GT, et al. Exemestane versus anastrozole in postmenopausal women with early breast cancer: NCIC CTG MA.27--a randomized controlled phase III trial. J Clin Oncol. 2013;31(11):1398-404.

26. Partridge AH, LaFountain A, Mayer E, Taylor BS, Winer E, Asnis-Alibozek A. Adherence to initial adjuvant anastrozole therapy among women with early-stage breast cancer. J Clin Oncol. 2008;26(4):556-62.

27. Crew KD, Greenlee H, Capodice J, Raptis G, Brafman L, Fuentes D, et al. Prevalence of joint symptoms in postmenopausal women taking aromatase inhibitors for early-stage breast cancer. J Clin Oncol. 2007;25(25):3877-83.

28. Henry NL, Giles JT, Stearns V. Aromatase inhibitor-associated musculoskeletal symptoms: etiology and strategies for management. Oncology (Williston Park). 2008;22(12):1401-8.

29. Edavana VK, Dhakal IB, Williams S, Penney R, Boysen G, Yao-Borengasser A, et al. Potential role of UGT1A4 promoter SNPs in anastrozole pharmacogenomics. Drug Metab Dispos. 2013;41(4):870-7.

30. Badavi E, Safavi B, Jalali A, M ohammadzadeh Shahriary G, Mohammadi-Asl J, Babaei J. Association of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms with Iranian breast cancer patients. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2015;16:219-25.

31. Semiz S, Dujic T, Ostanek B, Prnjavorac B, Bego T, Malenica M, et al. Analysis of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms in population of Bosnia and Herzegovina. Med Glas (Zenica). 2011;8(1):84-9.

32. Chouinard S, Tessier M, Vernouillet G, Gauthier S, Labrie F, Barbier O, et al. Inactivation of the pure antiestrogen fulvestrant and other synthetic estrogen molecules by UDP-glucuronosyltransferase 1A enzymes expressed in breast tissue. Mol Pharmacol. 2006;69(3):908-20.

33. Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. Mol Pharmacol. 1997;52(2):212-20.

34. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, et al. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. J Biol Chem. 2000;275(46):36164-71.

35. Shipkova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Grone HJ, Armstrong VW, et al. Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. Br J Pharmacol. 2001;132(5):1027-34.

36. Wiener D, Fang JL, Dossett N, Lazarus P. Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone glucuronidation phenotype in human liver microsomes. Cancer Res. 2004;64(3):1190-6.

37. Benoit-Biancamano MO, Adam JP, Bernard O, Court MH, Leblanc MH, Caron P, et al. A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. Pharmacogenet Genomics. 2009;19(12):945-54.

38. Zhou J, Argikar UA, Remmel RP. Functional analysis of UGT1A4(P24T) and UGT1A4(L48V) variant enzymes. Pharmacogenomics. 2011;12(12):1671-9.

39. Ehmer U, Vogel A, Schutte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. Hepatology. 2004;39(4):970-7.

40. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev. 2002;23(3):279-302.

41. Purohit A, Reed MJ. Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. Steroids. 2002;67(12):979-83.

42. Heshmati HM, Khosla S, Robins SP, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd, Riggs BL. Role of low levels of endogenous estrogen in regulation of bone resorption in late postmenopausal women. J Bone Miner Res. 2002;17(1):172-8.

43. Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, et al. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. N Engl J Med. 1998;339(11):733-8.

44. Eastell R, Hannon RA, Cuzick J, Dowsett M, Clack G, Adams JE. Effect of an aromatase inhibitor on bmd and bone turnover markers: 2-year results of the Anastrozole, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial (18233230). J Bone Miner Res. 2006;21(8):1215-23.

45. Eastell R, Adams JE, Coleman RE, Howell A, Hannon RA, Cuzick J, et al. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the anastrozole, tamoxifen, alone or in combination trial 18233230. J Clin Oncol. 2008;26(7):1051-7.

46. Hadji P. Aromatase inhibitor-associated bone loss in breast cancer patients is distinct from postmenopausal osteoporosis. Crit Rev Oncol Hematol. 2009;69(1):73-82.

47. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. Cancer. 2003;98(9):1802-10.

48. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet. 2002;359(9324):2131-9.

49. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol. 2010;11(12):1135-41.

50. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993;94(6):646-50.

51. Njeh CF, Genant HK. Bone loss: Quantitative imaging techniques for assessing bone mass in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 22000. p. 446-50.

52. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ, 3rd, Khaltaev N. A reference standard for the description of osteoporosis. Bone. 2008;42(3):467-75.

53. Bhattacharyya S, Pal S, Chattopadhyay N. Targeted inhibition of sclerostin for post-menopausal osteoporosis therapy: A critical assessment of the mechanism of action. Eur J Pharmacol. 2018;826:39-47.

54. Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J. New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? Keio J Med. 2009;58(1):29-40.

55. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. Nat Med. 2013;19(2):179-92.

56. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell. 2005;8(5):727-38.

57. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(9):3324-9.

58. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. J Cell Sci. 2006;119(Pt 7):1283-96.

59. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. Calcif Tissue Int. 2010;87(2):99-107.

60. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. Embo j. 2003;22(23):6267-76.

61. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. FASEB J. 2005;19(13):1842-4.

62. Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA, Christoulas D, Migkou M, Iakovaki M, Gkotzamanidou M, et al. Dickkopf-1: a suitable target for the management of myeloma bone disease. Expert Opin Ther Targets. 2009;13(7):839-48.

63. Dovjak P, Dorfer S, Foger-Samwald U, Kudlacek S, Marculescu R, Pietschmann P. Serum levels of sclerostin and dickkopf-1: effects of age, gender and fracture status. Gerontology. 2014;60(6):493-501.

64. Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(4):1991-7.

65. Tian J, Xu XJ, Shen L, Yang YP, Zhu R, Shuai B, et al. Association of serum Dkk-1 levels with beta-catenin in patients with postmenopausal osteoporosis. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2015;35(2):212-8.

66. Modder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. J Bone Miner Res. 2011;26(2):373-9.

67. Kim W, Chung Y, Kim SH, Park S, Bae JH, Kim G, et al. Increased sclerostin levels after further ablation of remnant estrogen by aromatase inhibitors. Endocrinol Metab (Seoul). 2015;30(1):58-64.

68. Kyvernitakis I, Rachner TD, Urbschat A, Hars O, Hofbauer LC, Hadji P. Effect of aromatase inhibition on serum levels of sclerostin and dickkopf-1, bone turnover markers and bone mineral density in women with breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2014;140(10):1671-80.

69. Göbel A, Kuhlmann JD, Link T, Wimberger P, Browne AJ, Rauner M, et al. Adjuvant tamoxifen but not aromatase inhibitor therapy decreases serum levels of the Wnt inhibitor dickkopf-1 while not affecting sclerostin in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2017;164(3):737-43.

70. Kalam A, Talegaonkar S, Vohora D. Effects of raloxifene against letrozole-induced bone loss in chemically-induced model of menopause in mice. Mol Cell Endocrinol. 2017;440:34-43.

71. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behav Res Methods. 2007;39(2):175-91.

72. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471-4.

73. Kalder M, Hans D, Kyvernitakis I, Lamy O, Bauer M, Hadji P. Effects of Exemestane and Tamoxifen treatment on bone texture analysis assessed by TBS in comparison with bone mineral density assessed by DXA in women with breast cancer. J Clin Densitom. 2014;17(1):66-71.

74. Čačev T, Kapitanović S. SNP genotyping by TaqMan real-time PCR. In: Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, et al., editors. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. p. 389-91.

75. Incidencija raka u Hrvatskoj. Registar za rak. Bilten br.14-37 ed. Zagreb: Hrvatski Zavod za javno zdravstvo; 2014.

76. Reid IR, Ames R, Evans MC, Sharpe S, Gamble G, France JT, et al. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women--a key role for fat mass. J Clin Endocrinol Metab. 1992;75(1):45-51.

77. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. J Bone Miner Res. 1993;8(5):567-73.

78. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. J Bone Miner Res. 1999;14(9):1622-7.

79. Hannan MT, Felson DT, Dawson-Hughes B, Tucker KL, Cupples LA, Wilson PW, et al. Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. J Bone Miner Res. 2000;15(4):710-20.

80. Albala C, Yanez M, Devoto E, Sostin C, Zeballos L, Santos JL. Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. Int J Obes Relat Metab Disord. 1996;20(11):1027-32.

81. Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. Clin Orthop Relat Res. 2000(372):139-50.

82. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;843:1-129.

83. Holm K, Dan A, Wilbur J, Li S, Walker J. A longitudinal study of bone density in midlife women. Health Care Women Int. 2002;23(6-7):678-91.

84. New SA, Bolton-Smith C, Grubb DA, Reid DM. Nutritional influences on bone mineral density: a cross-sectional study in premenopausal women. Am J Clin Nutr. 1997;65(6):1831-9.

85. Baron R, Gori F. Targeting WNT signaling in the treatment of osteoporosis. Curr Opin Pharmacol. 2018;40:134-41.

86. Muschitz C, Kocijan R, Marterer C, Nia AR, Muschitz GK, Resch H, et al. Sclerostin levels and changes in bone metabolism after bariatric surgery. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(3):891-901.

87. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. J Bone Miner Res. 2011;26(12):2812-22.

88. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Bratengeier C, Woloszczuk W, Papatheodorou A, Terpos E. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide. Osteoporos Int. 2012;23(3):1171-6.

89. Garnero P, Sornay-Rendu E, Munoz F, Borel O, Chapurlat RD. Association of serum sclerostin with bone mineral density, bone turnover, steroid and parathyroid hormones, and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. Osteoporos Int. 2013;24(2):489-94.

90. Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dobnig H, Pfeifer K, et al. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(1):148-54.

91. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Journe F, Doriath V, Body JJ, Clezardin P, et al. Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. Br J Cancer. 2007;97(7):964-70.

92. Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, et al. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. Br J Cancer. 2007;96(4):646-53.

93. Butler JS, Murray DW, Hurson CJ, O'Brien J, Doran PP, O'Byrne JM. The role of Dkk1 in bone mass regulation: correlating serum Dkk1 expression with bone mineral density. J Orthop Res. 2011;29(3):414-8.

94. Gatti D, Viapiana O, Fracassi E, Idolazzi L, Dartizio C, Povino MR, et al. Sclerostin and DKK1 in postmenopausal osteoporosis treated with denosumab. J Bone Miner Res. 2012;27(11):2259-63.

95. Ustun N, Tok F, Kalyoncu U, Motor S, Yuksel R, Yagiz AE, et al. Sclerostin and Dkk-1 in patients with ankylosing spondylitis. Acta Reumatol Port. 2014;39(2):146-51.

96. Hampson G, Edwards S, Conroy S, Blake GM, Fogelman I, Frost ML. The relationship between inhibitors of the Wnt signalling pathway (Dickkopf-1(DKK1) and sclerostin), bone mineral density, vascular calcification and arterial stiffness in post-menopausal women. Bone. 2013;56(1):42-7.

97. Sankaralingam A, Roplekar R, Turner C, Dalton RN, Hampson G. Changes in Dickkopf-1 (DKK1) and Sclerostin following a Loading Dose of Vitamin D 2 (300,000 IU). J Osteoporos. 2014;2014:682763.

98. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Avramidis A, Toulis KA, Papatheodorou A, Terpos E. The effect of teriparatide on serum Dickkopf-1 levels in postmenopausal women with established osteoporosis. Clin Endocrinol (Oxf). 2010;72(6):752-7.

99. Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. Clin Cancer Res. 2008;14(24):8027-41.

100. Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. Fundam Clin Pharmacol. 2007;21(4):419-26.

101. Oliveira E, Marsh S, van Booven DJ, Amorim A, Prata MJ, McLeod HL. Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. Pharmacogenomics. 2007;8(7):703-12.

102. Miao J, Jin Y, Marunde RL, Gorski CJ, Kim S, Quinney S, et al. Association of genotypes of the CYP3A cluster with midazolam disposition in vivo. Pharmacogenomics J. 2009;9(5):319-26.

103. Hu YF, He J, Chen GL, Wang D, Liu ZQ, Zhang C, et al. CYP3A5*3 and CYP3A4*18 single nucleotide polymorphisms in a Chinese population. Clin Chim Acta. 2005;353(1-2):187-92.

104. Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. Clin Pharmacol Ther. 1999;66(3):288-94.

105. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, et al. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. Pharmacogenetics. 2002;12(2):121-32.

106. King BP, Leathart JB, Mutch E, Williams FM, Daly AK. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. Br J Clin Pharmacol. 2003;55(6):625-9.

107. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. Clin Chem. 2002;48(10):1668-71.

108. Quaranta S, Chevalier D, Allorge D, Lo-Guidice JM, Migot-Nabias F, Kenani A, et al. Ethnic differences in the distribution of CYP3A5 gene polymorphisms. Xenobiotica. 2006;36(12):1191-200.

109. Dally H, Edler L, Jager B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, et al. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. Pharmacogenetics. 2003;13(10):607-18.

110. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N, et al. Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. Drug Metab Pharmacokinet. 2005;20(2):144-51.

111. Roy JN, Lajoie J, Zijenah LS, Barama A, Poirier C, Ward BJ, et al. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. Drug Metab Dispos. 2005;33(7):884-7.

112. Hakooz N, Alzubiedi S, Yousef AM, Arafat T, Dajani R, Ababneh N, et al. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 (UGT1A4) polymorphisms in a Jordanian population. Mol Biol Rep. 2012;39(7):7763-8.

113. Reimers A, Sjursen W, Helde G, Brodtkorb E. Frequencies of UGT1A4*2 (P24T) and *3 (L48V) and their effects on serum concentrations of lamotrigine. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2016;41(2):149-55.

114. Lopez M, Dorado P, Ortega A, Penas-Lledo E, Monroy N, Silva-Zolezzi I, et al. Interethnic differences in UGT1A4 genetic polymorphisms between Mexican Mestizo and Spanish populations. Mol Biol Rep. 2013;40(4):3187-92.

115. Kadlubar FF, Berkowitz GS, Delongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, et al. The CYP3A4*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(4):327-31.

116. Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, Hopper JL, Chen X, Purdie DM, et al. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. Pharmacogenetics. 2002;12(5):355-66.

117. Windmill KF, McKinnon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. Mutat Res. 1997;376(1-2):153-60.

118. Patten CJ, Smith TJ, Friesen MJ, Tynes RE, Yang CS, Murphy SE. Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for N'-nitrosonornicotine alpha-hydroxylation by human liver microsomes. Carcinogenesis. 1997;18(8):1623-30.

119. Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. Chem Res Toxicol. 1991;4(4):391-407.

120. Cuzick J. Progress in preventive therapy for cancer: a reminiscence and personal viewpoint. Br J Cancer. 2018;118(9):1155-61.

121. Pruthi S, Heisey RE, Bevers TB. Chemoprevention for Breast Cancer. Ann Surg Oncol. 2015;22(10):3230-5.

122. Key J, Hodgson S, Omar RZ, Jensen TK, Thompson SG, Boobis AR, et al. Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. Cancer Causes Control. 2006;17(6):759-70.

123. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. Jama. 2006;296(2):193-201.

124. Lahmann PH, Friedenreich C, Schuit AJ, Salvini S, Allen NE, Key TJ, et al. Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16(1):36-42.

125. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. J Natl Cancer Inst. 2004;96(24):1856-65.

126. Armstrong K, Quistberg DA, Micco E, Domchek S, Guerra C. Prescription of tamoxifen for breast cancer prevention by primary care physicians. Arch Intern Med. 2006;166(20):2260-5.

127. Lippman SM. The dilemma and promise of cancer chemoprevention. Nat Clin Pract Oncol. 3. England2006. p. 523.

128. Ropka ME, Keim J, Philbrick JT. Patient decisions about breast cancer chemoprevention: a systematic review and meta-analysis. J Clin Oncol. 2010;28(18):3090-5.

129. Goss PE, Ingle JN, Ales-Martinez JE, Cheung AM, Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. N Engl J Med. 2011;364(25):2381-91.

11. ŽIVOTOPIS

Kristina Bojanić, dr. med., rođena je 6. svibnja 1978. godine u Kneževu.

Obrazovanje i rad u struci:

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Studij medicine u Osijeku, pohađala je od 1996. do 2002. godine te ga završila s prosječnom ocjenom položenih ispita 4,53. U Kliničkoj bolnici Osijek odradila je pripravnički staž od 2002. do 2003., zatim radila kao znanastveni novak Znanstvene jedinice KBC-a Osijek. U siječnju 2006. kao zaposlenica Doma zdravlja Osijek upućena je na specijalizaciju iz radiologije, a specijalistički staž u trajanju četiri godine obavila je u KBC-u Osijek i KBC-u Sestre Milosrdnice. Specijalistički ispit iz radiologije položila je 2010. godine. U sklopu programa specijalizacije iz radiologije završila je specijalistički poslijediplomski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Akademske godine 2013./2014. upisala je poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku te je izabrana u naslovno suradničko zvanje asistenta u Zavodu za mineralni metabolizam Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Osijek pohađala je od 2013. do 2016. godine te položila sve propisane ispite. U studenom 2015. godine započela je program uže specijalizacije koju je uspješno završila u svibnju 2018. godine polaganjem subspecijalističkog ispita iz područja ultrazvuka.

Akademski nazivi:

Akademski naziv doktora medicine stekla je 2004. godine, a od 2013. godine naslovna je asistentica u Zavodu za mineralni metabolizam Medicinskoga fakulteta Osijek.

Nagrade i priznanja:

Pristupnica je tijekom studija bila dobitnica brojnih nagrada. Akademske godine 2001./2002. dobila je Rektorovu nagradu te nagradu Lions kluba Osijek za najbolje studente Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, a 1996. godine kao najbolje rangiranom kandidatu prilikom upisa na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Studij medicine u Osijeku dodijeljena joj je šestogodišnja stipendija Ministarstva zdravstva.

11. ŽIVOTOPIS

Prikaz znanstvenog i stručnog rada:

Pristupnica Kristina Bojanić, dr. med. ima do sada objavljena četiri rada u časopisima indeksiranim u Current Contents, a jedan je rad u postupku objavljivanja. Aktivno je sudjelovala na međunarodnom kongresu u SAD-u 2015. godine kao i na Europskom kongresu radiologa (ECR) u Beču, na kojem je bila predavač (2014. – 2018.) Također je bila aktivni i pasivni sudionik niza međunarodnih i domaćih radioloških kongresa i simpozija kao što su: hrvatski radiološki kongresi, EUROSON u Ljubljani, ESSR muskuloskeletni tečaj u Dubrovniku, AVUS u Lovranu i brojni drugi.

Kroz aktivan znanstvenoistraživački rad pristupnica je i suradnica VIF-MEFOS- 2017 projekta: Osteoblastični biljezi u procjeni nuspojava inhibitora aromataze voditeljice izv. prof. dr. sc. Martine Smolić.

Članica je Hrvatskoga društva radiologa, Hrvatskoga društva za ultrazvuk u medicini i biologiji, Osteomuskularne sekcije, European Society of radiology (ESR), Radiological Society of North America (RSNA).

Uže područje istraživanja usmjereno je na dijagnostiku bolesti osteomuskularnoga sustava i bolesti dojke.