

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze - obetajoče farmakološke tarče

17 β -hydroxysteroid dehydrogenases - potential pharmacological targets

Katja Kristan, Tea Lanišnik Rižner

POVZETEK: 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD) katalizirajo oksidacijo ali redukcijo estrogenov in androgenov na mestu 17 steroidnega skeleta in s tem uravnavajo aktivnost steroidnih hormonov. Do danes je bilo pri človeku odkritih že 11 različnih tipov 17 β -HSD. Nepravilno delovanje teh encimov vodi do motenj v razvoju, do bolezni centralnega živčnega sistema, ali v razvoj številnih rakavih obolenj. Ta članek opisuje vse znane človeške 17 β -HSD, njihov pomen in vpletenost v razvoj bolezni ter predstavlja nekatere inhibitorje posameznih izooblik.

Ključne besede: 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze, androgeni, estrogeni, inhibitorji

ABSTRACT: The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) have important roles in the regulation of steroid hormone actions through their catalysis of the oxidation or reduction of estrogens and androgens at position 17. To date, 11 different human 17 β -HSDs have been described. Dysfunction of the human 17 β -HSDs results in reproduction disorders and neuronal diseases, and in the development of hormone-dependent cancers. This review summarizes current knowledge on the medical implications of the 17 β -HSDs and presents some representative inhibitors of the different 17 β -HSD isozymes.

Key words: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases, androgens, estrogens, inhibitors

1 Uvod

Moški ter ženski spolni hormoni (androgeni oz. estrogeni) so odgovorni za spolno diferenciacijo ter razvoj spolnih organov že pri zarodku, njihova koncentracija pa močno naraste v času pubertete. Androgeni so takrat odgovorni za spermatogenezo, rast in razvoj, poraščenost, spremembo glasu ter za libido moških, estrogeni pa za telesne spremembe pri ženskah, povečanje prsi, pojav menstruacije. S spolnimi hormoni je povezanih tudi 40 % vseh rakavih obolenj, gre namreč za od hormonov odvisne tipe rakov, kot so rak dojke, prostate, jajčnikov, maternice (1, 2) ter ostale od androgenov in estrogenov odvisne bolezni, kot so npr. benigna hiperplazija prostate, akne in plešavost.

1.1 Biosinteza androgenov in estrogenov v klasičnih steroidogenih tkivih

Pri moških biosinteza androgenov poteka v testisih, v Leydigovih celicah, v manjši količini pa se sintetizirajo tudi v zoni *reticularis* nadledvične žleze. Pri ženskah se androgeni sintetizirajo v veliko manjši količini, in sicer v nadledvični žlezi, v jajčnikih (*Vesicular follicles*, *Corpus luteum*) ter v placenti v času nosečnosti. Encime biosinteze aktivira luteinizirajoči hormon, koncentracija le-tega močno naraste med puberteto. Androgeni, vključno s testosteronom in 5 α -

dihidrottestosteronom (DHT), ki imata največjo afiniteto do androgenih receptorjev, se sintetizirajo preko pregnenolona (slika 1) (1).

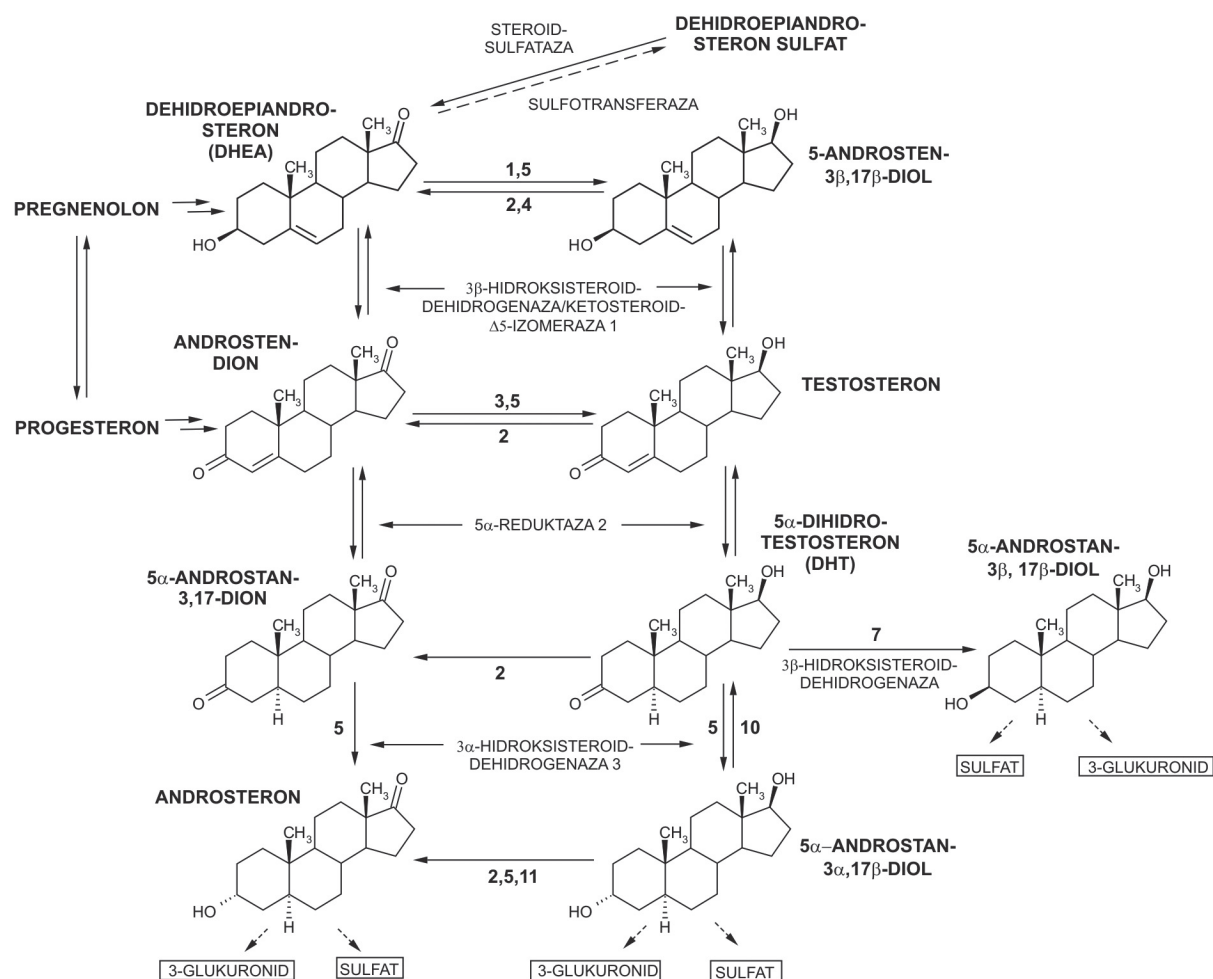
Sintezo estrogenov aktivirata luteinizirajoči ter folikel stimulirajoči hormon. Estron in aktivni ženski spolni hormon estradiol nastaneta iz androgenov po oksidativni odstranitvi C19-metilne skupine ter po sledeči aromatizaciji obroča A. Aromatizacija poteka v celicah granulozе jajčnikov, nekaj tudi v skorji nadledvične žleze (za ženske pred menopavzo manjšega pomena) ter v Sertolijevih celicah mod (slika 2) (1).

Steroidni hormoni so močno lipofilni, zato se po krvi prenašajo v obliki sulfata (dehidroepiandrosteron (DHEA), estron), ali pa se vežejo na globuline za vezavo spolnih hormonov (testosteron, estradiol) ali na albumin. V ciljnih organih se sulfatni del odstrani s steroid-sulfatazo (1, 3).

1.2 Biosinteza androgenov in estrogenov v perifernih tkivih

Leta 1988 so odkrili, da sinteza spolnih hormonov ne poteka samo v klasičnih steroidogenih tkivih, pač pa tudi lokalno v perifernih tarčnih tkivih, kjer hormoni tudi delujejo (intrakrlna sinteza) (4, 5). Tam se spolni hormoni sintetizirajo iz neaktivnih prekurzorjev, DHEA, DHEA-sulfata, androstendiona in estron-sulfata (2, 3). Koncentraciji DHEA in DHEA-sulfata v plazmi sta pri odraslih moških in ženskah 100–500-krat višji

Pregledni članki - Review Articles



Slika 1: Biosinteza androgenov. Številke predstavljajo različne tipe 17β-hidroksisteroid-dehidrogenaz (1, 2).

Figure 1: Androgen biosynthesis. Numbers indicate different types of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases (1, 2).

od koncentracije testosterona ter 1000–10000-krat višji od koncentracije estradiola. Po menopavzi, ko aktivnost jajčnikov oslabi, se skoraj 100 % estrogenov sintetizira v perifernih tkivih po t. i. intrakrini poti (5). Tako so pri ženskah z rakom dojke ugotovili 10–20-krat večjo koncentracijo aktivnega estrogena estradiola v rakavem tkivu kot v plazmi (3, 6). Drugi primer so moški z rakom na prostati. Po kirurški odstranitvi testisev so sicer res opazili 90–95 % znižanje koncentracije testosterona v krvi, vendar je koncentracija aktivnega znotrajceličnega androgena DHT v celicah prostate padla samo za 50 %, kar dokazuje, da obstaja še druga, lokalna pot biosinteze (2, 4). Biosinteza aktivnih spolnih hormonov v tumorju torej igra pomembno vlogo pri proliferaciji rakavih celic.

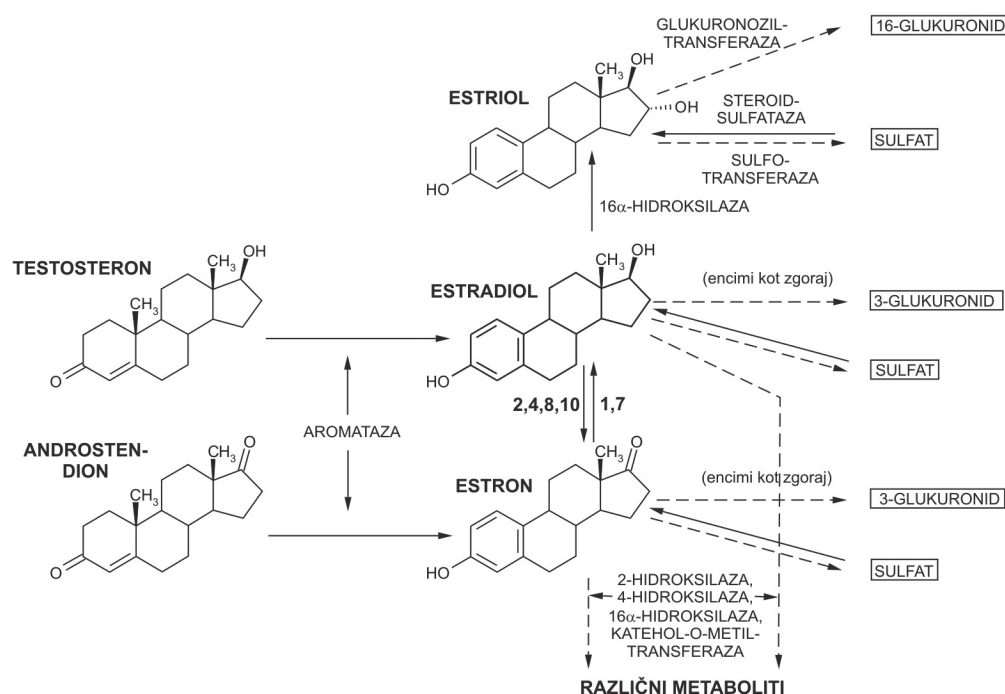
1.3 Selektivni intrakrini modulatorji

Inhibitorji encimov, ki so vključeni v biosintezo oziroma aktivacijo steroidnih hormonov, so pomembna skupina zdravilnih učinkovin za zdravljenje vseh od androgenov in estrogenov odvisnih bolezni. Med najpomembnejše encime uvrščamo aromatazo, steroid-sulfatazo ter

različne hidroksisteroid-dehidrogenaze (6). Ti encimi se izražajo tkivno specifično, tako da inhibitorji uravnavajo aktivnost številnih encimov selektivno le v določenem tkivu oz. celicah. Takšne inhibitorje imenujemo selektivni intrakrini modulatorji (SIM), govorimo o pre-receptorsem uravnavanju aktivnosti (7, 8).

SIM se že uporabljajo za zdravljenje raka na dojki. To so inhibitorji aromataze formestan, vorozol, letrozol, anastrozol in eksamestan (6). Znano je, da steroid-sulfatazo inhibirajo tibolon ter njena 3α- in 3β-hidroksi derivata. Tibolon predpisujejo za zdravljenje pomenopavzalnih težav ter za zdravljenje in preprečitev pomenopavzalne osteoporoze. V visoki koncentraciji steroid-sulfatazo inhibira tudi medrogeston, sintetični pregnanski derivat, ki se uporablja pri pomanjkanju progesterona (9). Za zdravljenje moške plešavosti (androgena alopecija), benigne hiperplazije ter raka prostate pa se uporablja finasterid, ki je inhibitor 5α-reduktaze tipa 2. Zanimiva skupina potencialnih zdravilnih učinkovin so tudi inhibitorji 17β-hidroksisteroid-dehidrogenaz, ki se v terapiji še ne uporabljajo.

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 2: Biosinteza estrogenov. Številke predstavljajo različne tipe 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz (1, 2).

Figure 2: Estrogen biosynthesis. Numbers indicate different types of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (1, 2).

2 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze in inhibitorji

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD) stereospecifično in reverzibilno pretvarjajo neaktivne 17-ketosteroide v aktivne 17 β -hidroksisteroide v prisotnosti koencima. Uvrščamo jih med NAD⁺/NADPH odvisne oksidoreduktaze (10). V steroidogenih tkivih katalizirajo zadnjo stopnjo sinteze androgenov in estrogenov, v perifernih tkivih, vključno s tarčnimi tkivi steroidnih hormonov, pa delujejo kot molekularna stikala, saj pretvarjajo učinkovite steroidne hormone (testosteron, DHT, estradiol) v neaktivne metabolite (androstendion, 5 α -androstan-3,17-dion, estron), s tem pa uravnavajo količino hormonov, ki se vežejo na jedrne receptorje (predreceptorska, intrakrinska regulacija) (8, 11). Do danes je bilo pri človeku odkritih že 11 različnih tipov 17 β -HSD, ki so oštevilčeni kronološko po času odkritja. Tipa 6 in 9 pri človeku še niso našli, znana je podganja 17 β -HSD tip 6 ter mišja 17 β -HSD tip 9 (12).

2.1 17 β -HSD tip 1

17 β -HSD tip 1 je citosolni encim, ki je bil prvič opisan in delno izoliran že leta 1958 (13). Encim je odgovoren za biosintezo estradiola v jajčnikih ter v placenti, od koder se nato izloči v kri. Tip 1 pretvarja estron v estradiol tudi v dojkah (lokalno v tarčnem tkivu), kjer estradiol deluje (11, 14, 15). Znane so tudi kristalne strukture encima s številnimi inhibitorji (16).

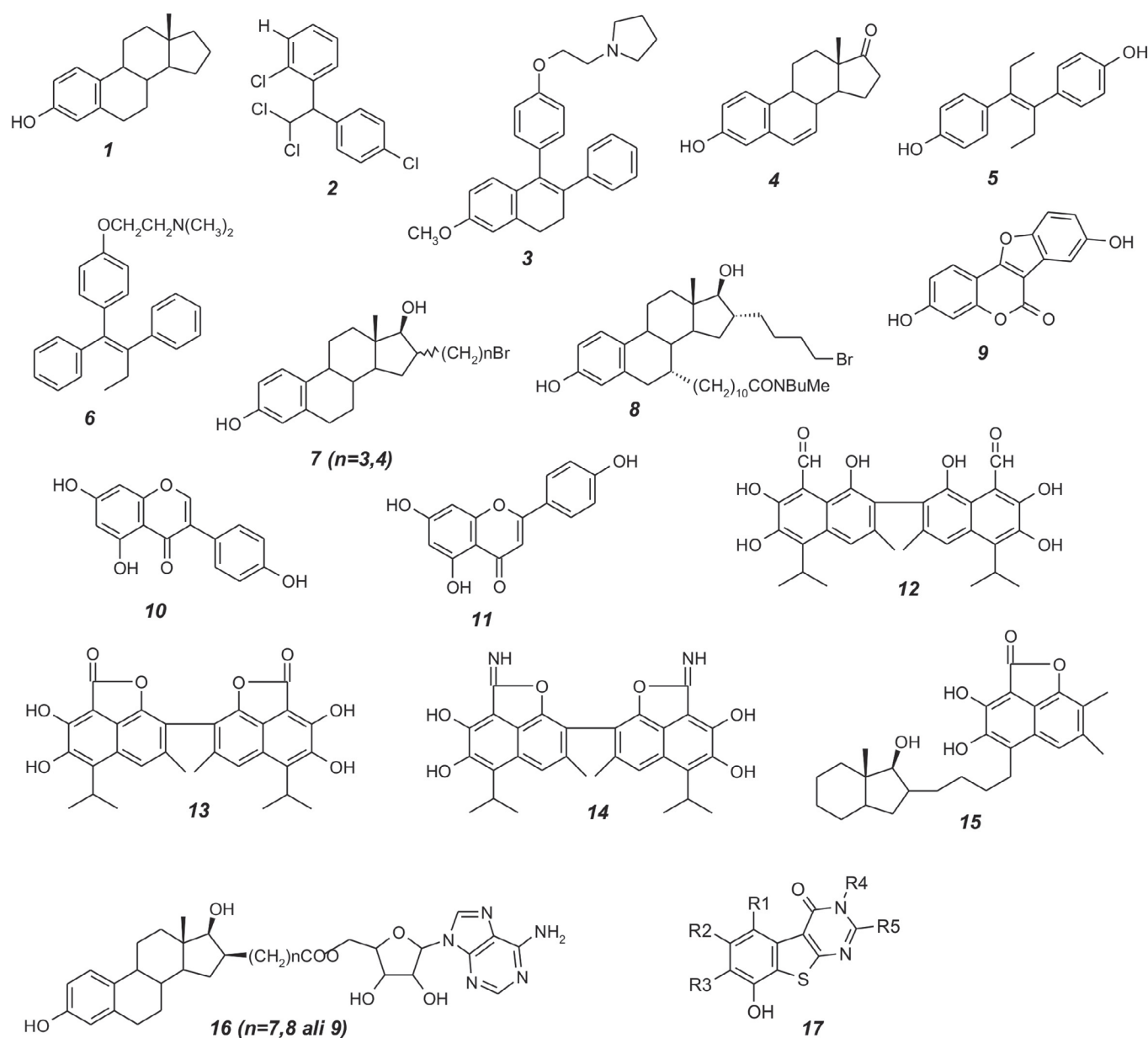
Ugotovili so, da se izražanje gena za tip 1 zelo poveča v rakavih celicah dojke, kar vodi k povečani od estrogenov odvisni proliferaciji celic (15). Zaradi navedenega je 17 β -HSD tip 1 zelo zanimiva farmakološka tarča.

Inhibitorji

Prvi znani inhibitorji so bili derivati estrona in estradiola, kasneje pa tudi spojine z nesteroidnim skeletom. Najboljši inhibitorji iz prvega obdobja so 17-dezoksi-estradiol (**1**), spojini **2** in **3** ter ekvilin (**4**) s *K_i* vrednostmi pod 1 μ M (slika 3). Kot dober inhibitor tipa 1 se je izkazal tudi nesteroidni sintezni dietilstilbestrol (**5**) (14). Kasneje so sintetizirali veliko število spojin z namenom, da bi lažje ugotovili zgradbo aktivnega mesta 17 β -HSD tipa 1. Gre za analoge naravnega substrata estrona z zelo reaktivno (npr. bromoacetoksi) skupino, ki se je kovalentno povezala z aminokislinami, odgovornimi za vezavo substrata. Kot inhibitorji so se izkazali tudi nekateri diketoni, derivati 2,3-butan-2,3-diona in 2,4-pentandiona, ter različni estronski derivati s pirazolom in izoksazolom, pripetimi na D-obroč steroidnega skeleta. Vse te sintetizirane spojine so se izkazale kot nizko selektivne, kar preprečuje njihovo uporabo v bolj kompleksnih bioloških sistemih (14).

Encim šibko inhibirajo tamoksifen (**6**) in njegova metabolita 4-hidroksi- in desmetiltamoksifen. Dobri inhibitorji 17 β -HSD tipa 1 so tudi nekateri progestini (nomegestolacetat, medrogeston, tibolon in njegovi metaboliti), ki inhibirajo še steroid sulfatazo (IC₅₀ 0,5–35 μ M ob 5 nM koncentraciji substrata) (14). Zelo dobri inhibitorji tipa 1 so derivati estradiola s stransko verigo na mestih 17 α ali 16 α z IC₅₀ vrednostmi pod 1 μ M (2–6 nM substrat). Ugotovili so, da je najprimernejša dolži-

Pregledni članki - Review Articles



Slika 3: Inhibitorji 17β -HSD tipa 1
Figure 3: Inhibitors of 17β -HSD type 1

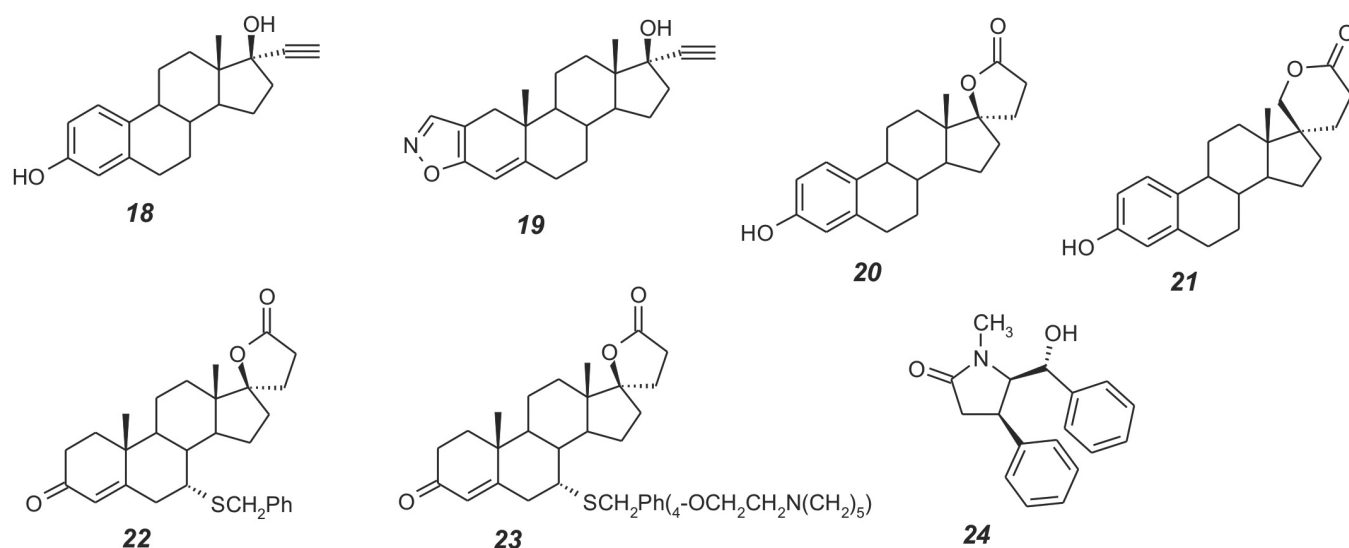
na stranske verige 3 oz. 4 ogljikove atome, za inhibicijo pa je ključen substituent na 16α položaju (**7**). Ker so spojine agonisti estrogenskih receptorjev, so uvedli dodatno verigo na mestu 7α (**8**). Te spojine estrogene aktivnosti niso imele, je pa hkrati močno padla njihova inhibitorna učinkovitost (IC_{50} 16 μ M; 3,6 nM substrat) (**14**).

Epidemiološke študije so pokazale, da lahko fitoestrogeni vplivajo na razvoj raka na dojki, zato so nadaljevali s študijami na predreceptorski ravni. Fitoestrogeni, ki jih razdelimo v flavonoide (flavoni, flavanoni in izoflavoni), kumestane in lignane, so rastlinske nesteroidne spojine

z estrogeno aktivnostjo. Kot najboljši inhibitor 17β -HSD tipa 1 se je izkazal kumestan kumestrol (**9**), dobri inhibitorji pa so tudi flavoni in izoflavoni, hidroksilirani na mestih 4', 5 in 7 obročev A in B, npr. apigenin (**10**) in genistein (**11**) (**17**). Študija inhibicije encima s fitoestrogeni je prispevala tudi k iskanju novih spojin vodnic pri nadaljnjem razvoju inhibitorjev tipa 1 (**18**).

Po odkritju, da naravna spojina gosipol (**12**), polifenolni binaftil iz bombaževih semen, inhibira vse izoencime sorodne človeške laktatdehidrogenaze, so sintetizirali več njenih analogov in jih testirali kot

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 4: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 2
Figure 4: Inhibitors of 17 β -HSD type 2

potencialne inhibitorje 17 β -HSD tipa 1. Za najboljša inhibitorja sta se izkazala gosilolakton (**13**) ter gosiloiminolakton (**14**) (K_i 2,2 in 4,3 μ M), ki se glede na rezultate sidranja vežeta v mesto za vezavo koencima (19). Sintetizirane so bile tudi spojine, ki bi se hkrati vezale v mesto za vezavo substrata in koencima, t. i. panaktivni inhibitor. Prvi takšen primer je hemigosilolakton, ki predstavlja polovico molekule gosipola, ki je preko butilnega distančnika povezana z mimetikom obročev D in C estradiola (**15**) (19). Drugi takšen primer pa so spojine **16** z različno dolgo vmesno verigo. Za optimalno se je izkazala dolžina osmih CH₂ skupin (K_i 3,0 μ M) (**14**).

Kar ponuja se vprašanje, ali je sinteza spojin, ki se vežejo v mesto za vezavo koencima, ki je podobno pri vseh encimih iste proteinske družine, smiselna oz. ali sploh lahko pričakujemo selektivne inhibitorje. Kot argument za sintezo tovrstnih spojin avtorji navajajo inhibitorje kinaz, ki se vežejo v mesto za vezavo ATP, a so selektivni za posamezne tipe in so že na tržišču. Prav tako so tudi različni analogi gosipola z različnimi substituenti na mestih 4 in 7 pokazali več kot 200-kratno selektivnost za različne tipe visoko homolognih (84–89 %) človeških laktat-dehidrogenaz (19). Zadnja skupina testiranih inhibitorjev tipa 1 so različni pirimidinonski derivati (**17**) (20).

2.2 17 β -HSD tip 2

Nasprotno od 17 β -HSD tipa 1 mikrosomalni 17 β -HSD tip 2 oksidira androgene in estrogene v njihovo neaktivno obliko. Na ta način omejuje količino aktivnih spolnih hormonov v obtoku ter ščiti tarčna tkiva. Zaradi varovalne vloge se encim nahaja v številnih tkivih; v dojkah, placenti, maternici, jetrih ter tankem črevesju, v manjši meri pa tudi v prostati, ledvicah, trebušni slinavki in debelem črevesju (21). Tipično ga najdemo v epitelijskih celicah, kot so epitelijske celice gastrointestinalnega in urinarnega trakta. Znano je, da zmanjšano izražanje gena za 17 β -HSD tip 2 vodi do raka na črevesju, prostati in dojkah (15, 22). V placenti tip 2 verjetno omejuje dostop plodovih androgenov

ov do materinih tkiv in dostop materinih estrogenov v plod ter deluje kot pregrada med plodom in materjo (15).

Zaradi varovalne lastnosti inhibitorji tega encima niso zanimivi z vidika zdravljenja rakavih obolenj. Prevelika aktivnost encima pa lahko preveč zniža koncentracijo aktivnih estrogenov, ki so naravni zaviralci resorpcije kosti, zato bi se inhibitorji tipa 2 lahko uporabljali za zdravljenje osteoporoze pri ženskah v času po menopavzi (23).

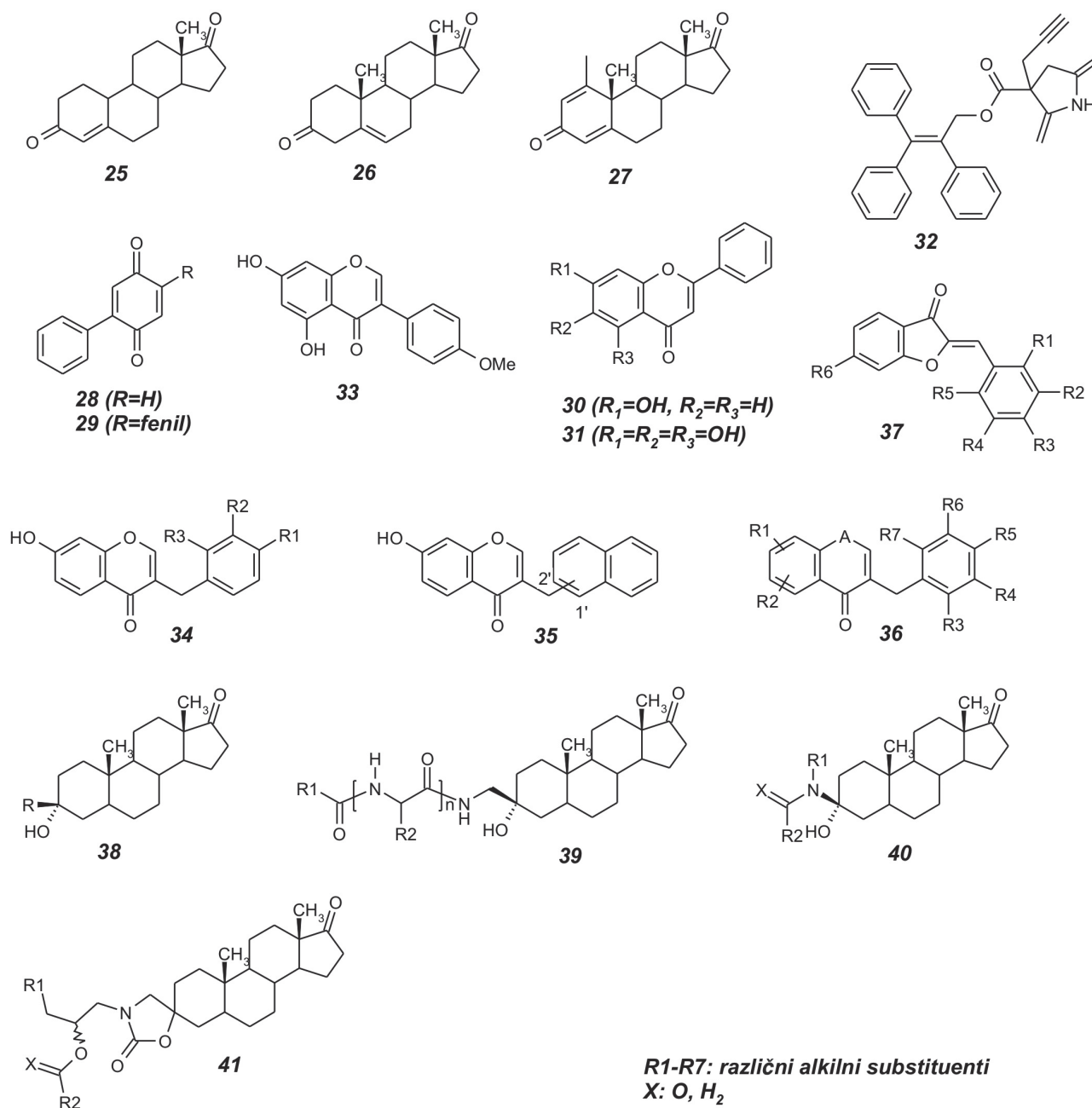
Inhibitorji

Prvi inhibitorji 17 β -HSD tipa 2 so bili objavljeni leta 1984. Najnižji K_i vrednosti sta imeli spojini 17 α -etinil-estradiol (**18**) in danazol (**19**) (K_i 0,3 in 0,6 μ M); prva spojina je hkrati agonist estrogenskega receptorja, druga pa ima androgeno aktivnost ter je šibek inhibitor steroid-sulfataze (14) (slika 4).

Testirali so tudi učinek 16 α - in 17 α -derivatov estradiola, ki so jih sintetizirali kot inhibitorje tipa 1. Ugotovili so, da le spiro- γ -laktone-estradiola (**20**) inhibira delovanje 17 β -HSD tipa 2. Ta spojina je služila kot spojina vodnica. Narejenih je bilo nekaj modifikacij, med katerimi je tudi substitucija OH-skupine, sprememba stereokemije laktone, sprememba položaja laktone, različne velikosti laktonekega obroča. Kot najboljši inhibitor se je izkazala spojina **21** (K_i 2 μ M), ki selektivno inhibira tipa 2 in 5, ne pa tipov 1, 3 in 7. Spojina ima tudi zmerno estrogeno aktivnost (14, 21).

Ker tip 2 katalizira oksidacijo estrogenov in androgenov, je bila smiselna sinteza tudi takšnih laktonev, ki imajo C19-metilno skupino. Hkrati so bile narejene tudi modifikacije A in B obroča steroidnega skeleta. Med vsemi C19 steroidnimi derivati je najboljši inhibitor spojina **22** (IC₅₀ 0,42 μ M; 3–5 nM substrat), spojina **23** (IC₅₀ 0,7 μ M; 3–5 nM substrat) pa se kot edina ni vezala na vse testirane receptorje (androgenske, estrogenske, progesteronske, glukokortikoidne). Spojina **23** tudi ni inhibitor 17 β -HSD tipov 1, 3 in 5 niti aromataze (14).

Pregledni članki - Review Articles



Slika 5: Inhibitorji 17β -HSD tipa 3
 Figure 5: Inhibitors of 17β -HSD type 3

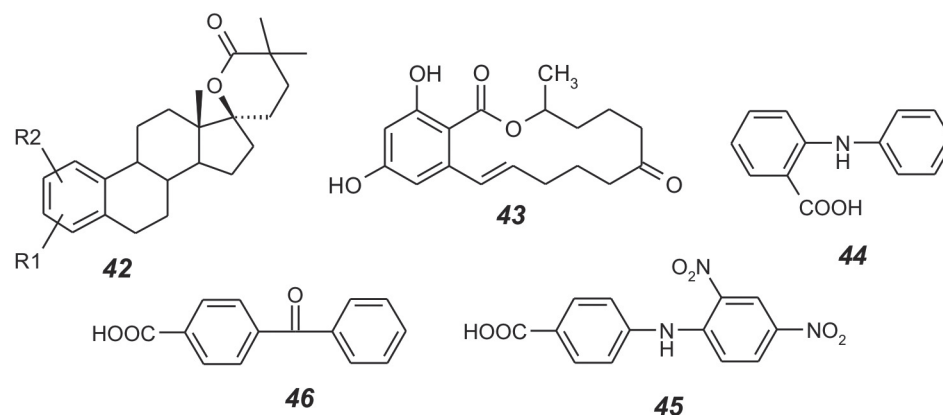
Nedavno so bili kot potencialni inhibitorji tipa 2 sintetizirani 4,5-disubstituirani cis-pirolidinoni (**24**), analogi naravne spojine klavsenamid iz drevesa *Clausena lansium* (23). Spojine so trenutno v fazi testiranja.

2.3 17β -HSD tip 3

Tip 3 je mikrosomalni encim, ki ga najdemo izključno v Leydigovih celicah testisov in je odgovoren za biosintezo testosterona. Encim zago-

tavlja 50 % aktivnih androgenov, ki delujejo v prostati in drugje po telesu (2). Ravno zaradi tega je izredno zanimiva tarča za zdravljenje vseh od androgenov odvisnih bolezni (24). Ker ga najdemo izključno v testisih, je zanimiv tudi z vidika blokade spermatogeneze, saj bi se inhibitorji lahko uporabljali kot moški kontraceptivi (14). Mutacije na genu za 17β -HSD tip 3, ki onemogočijo pravilno delovanje encima, so odgovorne za nastanek pseudohermafroditizma (25–27).

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 6: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 5
Figure 6: Inhibitors of 17 β -HSD type 5

Inhibitorji

Prve študije inhibicije so pokazale, da je za inhibicijo ključni steroidni skelet s karbonilno skupino na mestu 17 ter nearomatskim A-obročem. Izmed takrat 20 sintetiziranih spojin sta se kot najbolj aktivna izkazala 4-estren-3,17-dion (**25**) (K_i 2,4 μ M) in 5-androsten-3,17-dion (**26**) (K_i 6,8 μ M) (14) (slika 5).

Leta 1993 so Lombardo in sodelavci ugotovili, da je zelo dober inhibitor tipa 3 tudi atamestan (**27**), že prej znani ireverzibilni inhibitor aromataze (14). Kot potencialne inhibitorje so kasneje testirali nekatere zdravilne učinkovine. Pokazal se je inhibični učinek gentamicina ter S-petazina. Na padec serumske koncentracije testosterona vplivajo tudi spojine iz sladkega korena (14). Leta 2001 so Le Lain in sodelavci testirali 18 nesteroidnih spojin (p-benzokinoni, flavoni, izoflavoni, derivati trifeniletena). Najboljši inhibitorji človeškega 17 β -HSD tipa 3 so bili 2,5-difenil-p-benzokinon (**29**), fenil-p-kinon (**28**), 7-hidroksiflavin (**30**), derivat trifeniletena (**33**), baikalein (**31**) ter biokanin A (**33**). Te spojine niso učinkoviti inhibitorji (IC_{50} območje od 3 do 10 μ M, 2 μ M substrat), vendar so rezultati, še posebej pomen OH skupin različnih flavonov, pripomogli k načrtovanju novih inhibitorjev (14).

Istega leta so Smith in ostali patentirali vrsto spojin (**34**, **35**), ki so strukturno podobne biokaninu A. Najboljši inhibitorji so spojine s F, Cl ali Br na mestu R_1 (IC_{50} od 1,8 do 8,3 μ M; 2 μ M substrat). Kasneje so patentirali še več spojin s splošnima formulama **36** in **37**, ki inhibirajo 17 β -HSD in naj bi se uporabljale za preventivo in/ali zdravljenje različnih bolezni, povezanih z androgeni in estrogeni (14).

Študija različnih steroidov je vodila k temu, da so Poirier in ostali leta 1995 izbrali androsteron kot osnovni skelet za razvoj inhibitorjev tipa 3. Za dobre inhibitorje 17 β -HSD tipa 3 so se izkazali sintetizirani derivati s substituenti na mestu 3 β (**37**), najboljše skupine na tem mestu pa fenilmetil, cikloheksil, propil in sec-butil (IC_{50} 57–73 nM; 0,05–0,1 μ M substrat). Te spojine niso inhibirale tipov 1 in 5, imajo pa androgenu aktivnost.

Leta 2001 so Maltais in sodelavci skušali poiskati spojine, ki ne bi imele androgene aktivnosti. Naredili so serijo spojin z osnovnim skeletom **38**, najboljši inhibitor ($n=2$, R_x =fenilmetil, R_y =heksil) z IC_{50} 227 nM pri koncentraciji 0,1 μ M nima androgene aktivnosti.

Ista skupina je kasneje sintetizirala tudi različne derivate 3 β -amidometil-androsterona (**39**), ki so še boljši inhibitorji (IC_{50} 35–85 nM; 0,05 μ M substrat). Najboljši inhibitor ($X=O$, R_1 =oktil, R_2 =ciklopropil) ne kaže nobene androgene aktivnosti pri koncentracijah 0,1 μ M in 1 μ M (14).

Da bi pripravili bolj rigidne molekule, so naredili še vrsto derivatov spojine **41**. Najboljši inhibitor ($X=O$, R_1 =morfolino, R_2 =ciklopentiletil; IC_{50} 74 nM; 0,05 μ M substrat) ima zelo šibko androgenu aktivnost (14).

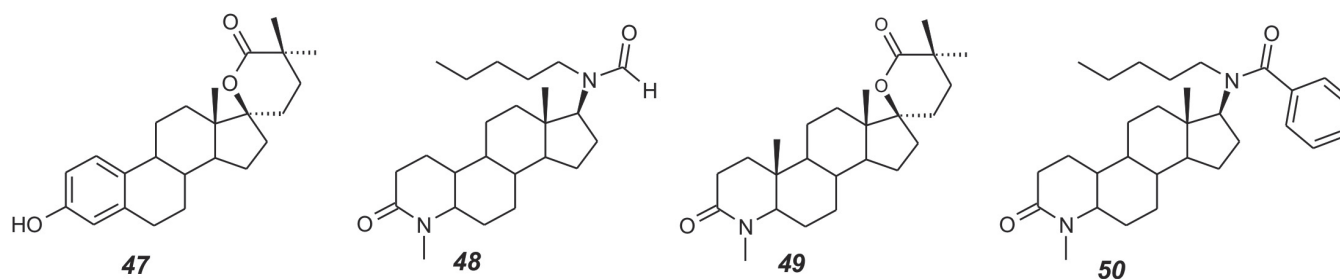
2.4 17 β -HSD tip 4

17 β -HSD tip 4 je multifunkcionalni peroksisomalni encim. N-terminalni del ima 17 β -HSD ter 3-hidroksiacyl-CoA dehidrogenazno aktivnost in katalizira oksidacije estradiola, 5-androsten-3 β ,17 β -diola ter 3-hidroksiacyl-CoA. Centralni del encima ima enoil-CoA hidratazno aktivnost, C-terminalni del proteina pa sodeluje pri prenosu 7-dehidroholesterolu in fosfatidilholina med membranami. Encim najdemo v vseh sesalskih tkivih, a je v nekaterih tkivih, kot so možgani, maternica ter pljuča, izražen samo v specifičnih celicah, kot so Purkynjeve celice ali luminalni epitelij (28). Njegova naloga je podobna nalogi 17 β -HSD tipa 2 – ščiti tkiva pred preveliko količino aktivnih spolnih hormonov (2). Znano je, da so mutacije na genu za 17 β -HSD tip 4 odgovorne za nastanek Zellwegerjevega sindroma (29). Nedavno so ugotovili, da se na 17 β -HSD tip 4 veže vitamin K in zniža koncentracijo intracelularnega estradiola. Natančni mehanizem tega delovanja še ni znan (30). Študije inhibicije na tem encimu še niso bile narejene, znana pa je kristalna struktura (16).

2.5 17 β -HSD tip 5

17 β -HSD tip 5 ali aldo-keto reduktaza 1C3 (AKR1C3) je citosolni encim in pretvarja androstendion v testosteron, DHT v 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol ter tudi estron v estradiol (31). Človeški encim deluje tudi kot 3 α -HSD, 20 α -HSD in dihidrodiol-dehidrogenaza, njegov substrat pa naj bi bil tudi prostaglandin D_2 (32). Z uporabo protiteles so ga lokalizirali v prostati, jetrih, nadledvični žlezi, testisih, endometriju, jajčnikih, mlečnih žlezah ter v ženskem maščobnem tkivu (32). Izražanje gena za ta encim je povečano pri raku prostate (15, 32) ter

Pregledni članki - Review Articles



Slika 7: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 7
Figure 7: Inhibitors of 17 β -HSD type 7

v podkožnem (subkutanem) maščobnem tkivu pri ženskah s povečanim indeksom telesne mase (33). Takšne ženske imajo posledično povečano koncentracijo androgenov v krvi, hiperandrogenemija pa je tipični znak sindroma policističnih jajčnikov (33). Znana je kristalna struktura encima (16).

Inhibitorji

Kot prvi inhibitorji tipa 5 so bili patentirani spiro-laktoni s splošno formulo **42** (slika 6). Te spojine tudi ne inhibirajo tipov 1, 2 in 3 ter 3 α -HSD tipa 1 in 3 (IC₅₀ od 2 do 54 nM, 100 nM substrat) (14). Encim inhibirajo tudi nekateri fitoestrogeni in ostale naravne substance. Najboljši inhibitorji 17 β -HSD tipa 5 so zearalenon (**43**), kumestrol (**9**), kvercetin ter biokanin A (**33**) (IC₅₀ območje od 4 do 14 μ M; 30 nM substrat) (34).

Kasneje so odkrili, da encim dobro inhibira nesteroidna protivnetna učinkovina mefenaminska kislina, zato so sintetizirali vrsto spojin na osnovi N-fenilantranilne kisline (**44**). Dva dobra inhibitorja, ki ne inhibirata AKR1C1, AKR1C2 ter ciklooksigenazi (COX) 1 in 2, sta spojini **45** in **46** s K_i vrednostmi 0,38 oziroma 1,9 μ M (31).

2.6 17 β -HSD tip 7

Tip 7 je membranski encim in reducira estron v estradiol, v manjši količini tudi inaktivira DHT v 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol. Našli so ga v maternici, testisih, placenti, mlečnih žlezah, ledvicah, priželjcu in prostati (15, 35). Natančnejši pomen tega encima še ni znan, glede na njegovo razširjenost v različnih tkivih pa verjetno deluje kot intrakrini regulator steroidnega metabolizma in povečuje koncentracijo estrogenov v okolici. Pomen estradiola za razvoj od estrogenov odvisnega raka dojke, jajčnikov ter maternice je dobro znan, zato je smiselna tudi sinteza inhibitorjev encima 17 β -HSD tip 7, ki bi v teh tkivih znižali koncentracijo estradiola.

Inhibitorji

Pri prvem rešetanju spojin sta se kot najboljša inhibitorja tipa 7 izkazala estra-1,3,5-trien-3-ol-17-spiro- δ -laktan (**47**), inhibitor 17 β -HSD tipa 5, ter 17 β -(N-pentilformamido)-4-metil-4-aza-5 α -androstan-3-on (**48**), dober inhibitor 5 α -reduktaze (slika 7). Da bi izboljšali njune inhibitorne lastnosti, so naredili različne derivate spojin (35). Spojina (**49**), ki strukturno vsebuje dela obeh prejšnjih inhibitorjev, 4-aza jedro ter 17-spiro- δ -laktan, je pokazala zelo dobre inhibitorne lastnosti, prav tako

tudi nekateri analogi spojine **48**, kot je spojina **50** z IC₅₀ vrednostmi okoli 0,05 μ M (0,15 μ M substrat) (35).

2.7 17 β -HSD tip 8

Tip 8 je mitohondrijski in prednostno oksidativni encim. Inaktivira predvsem estradiol, pa tudi testosteron in dihidrotestosteron. Ima še manjšo reduktivno sposobnost in reducira estron v estradiol, našli pa so ga v jetrih, spolnih žlezah, ledvicah in vranici. V ledvicah je veliko število različnih hidroksisteroid-dehidrogenaz, ki inaktivirajo glukokortikoide ter spolne hormone, z nizkim izražanjem gena za 17 β -HSD tip 8 pa povezujejo nastanek policističnih ledvic (36, 37).

2.8 17 β -HSD tip 10

Tudi tip 10 je mitohondrijski encim. Odgovoren je za oksidacijo estradiola, DHT ter L-3-hidroksiacyl-koencima A. Encim najdemo v številnih tkivih, vključno z možgani (38). V možganih pacientov z Alzheimerjevo boleznijo so ugotovili visoko koncentracijo 17 β -HSD tipov 10 (38). Tam encim interagira z amiloid β -peptidom, kar vodi do motenj v delovanju mitohondrijev in smrti živčnih celic (39). Encim dodatno katalizira nastanek toksičnih aldehydov v nevronih, z oksidacijo estradiola pa zmanjšuje koncentracijo zaščitnih estrogenov. Klinične študije so namreč pokazale, da nadomestna terapija z estrogeni zadrži ali prepreči nastanek Alzheimerjeve bolezni (38). Zaradi teh lastnosti je encim izredno zanimiv z vidika zdravljenja Alzheimerjeve bolezni.

Nedavno so ugotovili, da encim v možganih katalizira tudi oksidacijo naravnih pozitivnih alosteričnih modulatorjev GABA_A receptorja, kot sta alopregnanolon ter alotetrahidrodeoksikortikosteron (40). Takšni modulatorji pospešijo vezavo GABA na GABA_A receptor in imajo zaradi tega antikonvulzivni ter anksiolitični učinek.

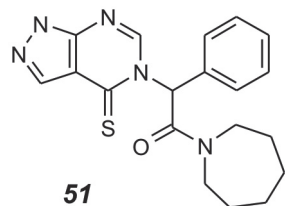
Inhibitorji

Študije različnih inhibitorjev na tem encimu še niso bile narejene, znana pa je kristalna struktura encima z vezanim inhibitorjem AG18051 (**51**) (slika 8). Ta inhibitor se veže v aktivno mesto encima ter se kovalentno poveže s koencimom NAD⁺ (39). IC₅₀ vrednost za racemno zmes tega inhibitorja je 92 nM (40 μ M substrat).

2.8 17 β -HSD tip 11, 12 in 13

Zadnji trije tipi so bili odkriti po letu 2000. Tip 11 je oksidativni encim, ki prednostno pretvarja 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol v androsteron, v

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 8: Inhibitor 17 β -HSD tipa 10

Figure 8: Inhibitor of 17 β -HSD type 10

manjši meri tudi estradiol v estron (41). Verjetno je odgovoren za intrakrino kontrolo sinteze androgenov, saj so ga našli v različnih tkivih: pljučih, trebušni slinavki, ledvicah, jetrih, srcu, nadledvični žlezi, jajčnikih, testisih, endometriju, možganih ... (12, 42). Pravilno delovanje encima naj bi bilo ključno za normalen razvoj ploda (43). Znana je kristalna struktura človeškega 17 β -HSD tipa 11 (16).

Tip 12 je bil odkrit na osnovi podobnosti aminokislinskega zaporedja z zaporedji znanih 17 β -HSD. Najdemo ga v številnih tkivih, največ pa v jetrih, mišicah in ledvicah (12). Sodeluje pri sintezi maščobnih kislin ter redukciji ketoacil-CoA (12, 44), njegove vloge pri metabolizmu steroidov pa še niso proučevali.

V tem letu so identificirali še 17 β -HSD tip 13, ki ga najdemo predvsem v ledvicah ter v očesni mrežnici. Encim oksidira estradiol, z 10-krat nižjo aktivnostjo pa tudi testosteron. Glede na to, da je mesto za vezavo substrata v encimu zelo veliko, verjetno oksidira tudi druge, večje nesteroidne substrate. Znana je kristalna struktura encima (45).

3 SKLEP

V zadnjih nekaj letih so bile odkrite številne izooblike 17 β -HSD ter njihov pomen za razvoj različnih od androgenov in estrogenov odvisnih bolezni. Inhibitorji posameznih izooblik 17 β -HSD bi se tako lahko uporabljali kot moški kontraceptivi, anksiolitiki ali antikonvulzivi, z njimi bi lahko zdravili plešavost, prekomerno poraščenost, aknavost, osteoporozo, raka na prostati, raka dojke, sindrom policističnih jajčnikov ali preprečili nastanek Alzheimerjeve bolezni. Zaradi navedenega so 17 β -HSD zelo zanimive farmakološke tarče.

4 LITERATURA

- Norman AW, Litwack G. In: Hormones. 2nd ed. New York: Academic Press, 1997; 49-86.
- Labrie F, Luu-The V, Lin SX et al. Intracrinology: role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. J Mol Endocrinol 2000; 25: 1-16.
- Suzuki T, Moriya T, Ishida T et al. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. Biomed Pharmacother 2003; 57: 460-462.
- Biswas MG, Russell DW. Expression, cloning and characterization of oxidative 17 β - and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. J Biol Chem 1997; 272: 15959-15966.
- Labrie F. Intracrinology. Mol Cell Endocrinol 1991; 78: C113-C118.
- Geisler J. Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003; 3-5: 245-253.
- Penning TM. Beyond steroid hormone receptors – aldo-keto reductases as targets for selective intracrine modulators. Pharmacology News (University of Pennsylvania school of medicine) 2001; 9: 1-6.
- Nobel S, Abrahmsen L, Oppermann U. Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. Eur J Biochem 2001; 268: 4113-4125.
- Pasqualini JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. Biochim Biophys Acta 2004; 1654: 123-143.
- Anzyme nomenclature: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb>
- Penning TM: Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. Endocrine Reviews 1997; 18: 281-305.
- Mindnich R, Moller G, Adamski J. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Mol Cell Endocrinol 2004; 218: 7-20.
- Talalay P, Williams-Ashman HG. Activation of hydrogen transfer between pyridine nucleotides by steroid hormones. Proc Natl Acad Sci US 1958; 44: 15-26.
- Poirier D. Inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. Curr Med Chem 2003; 10: 453-477.
- Vihko P, Harkonen P, Soronen P et al. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases – their role in pathophysiology. Mol Cell Endocrinol. 2004; 215: 83-88.
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)
- Makela S, Poutanen M, Lehtimäki J et al. Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. Proc Soc Exp Biol Med 1995; 208 :51-59.
- Hoffren AM, Murray CM, Hoffmann RD. Structure-based focusing using pharmacophores derived from the active site of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Curr Pharm Des 2001; 7: 547-566.
- Brown WM, Metzger LE, Barlow JP et al. 17-beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold. Chem Biol Interact 2003; 143-144: 481-491.
- Messinger J, Hirvelä L, Husen B et al. New 17beta-HSD1 inhibitors – setting up a new program line. Workshop on 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: role in human disease, Abstract book, Elmau Castle, Germany, May 8-11, 2005; 37.
- Bydal P, Auger S, Poirier D. Inhibition of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase by estradiol derivatives bearing a lactone on the D-ring: structure-activity relationships. Steroids 2004; 69: 325-342.
- Oduwole OO, Makinen MJ, Isomaa VV et al. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2: independent prognostic significance and evidence of estrogen protection in female patients with colon cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 87: 133-140.
- Cook JH, Barzaya J, Brennan C et al. 4,5-Disubstituted cis-pyrrolidinones as inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase II. Part 1: Synthetic approach. Tetrahedron Letters 2005; 46: 1525-1528.
- Edwards P. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors; thrombin receptor (PAR-1) antagonists. Drug Discovery Today 2002, 7: 785-835.
- Andersson S. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: isozymes and mutations. J Endocrinol 1995; 146: 197-200.
- Goebelsmann U, Horton R, Mestman JH et al. Male pseudohermaphroditism due to testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1972; 36: 865-878.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. Nature Genetics 1994; 7: 34-39.
- Möller G, Leenders F, van Grunsven EG et al. Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. J Steroid Biochem Mol Biol 1999; 69: 441-446.

Pregledni članki - Review Articles

29. de Launoit Y, Adamski J. Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 227-240.
30. Otsuka M, Kato N, Ichimura T et al. Vitamin K2 binds 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and modulates estrogen metabolism. *Life Sci* 2005; 76: 2473-2482.
31. Bauman DR, Rudnick SI, Szewczuk LM et al. Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 60-68.
32. Soronen P, Laiti M, Torn S et al. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 92: 281-286.
33. Quinkler M, Sinha B, Tomlinson JW et al. Androgen generation in adipose tissue in women with simple obesity—a site-specific role for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *J Endocrinol* 2004; 183: 331-342.
34. Krazeisen A, Breitling R, Möller G et al. Phytoestrogens inhibit human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 151-162.
35. Bellavance É, Luu-The V, Poirier D. First inhibitors of the steroidogenic enzyme type 7 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Letters in Drug Design & Discovery* 2004; 1: 194-197.
36. Fomitcheva J, Baker ME, Anderson E et al. Characterization of Ke6, a new 17β-hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *J Biol Chem* 1998; 273: 22664-22671.
37. Peltoketo H, Luu-The V, Simard J et al. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 1999; 23: 1-11.
38. He XZ, Merz G, Mehta P et al. Human brain short-chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single domain multifunctional enzyme. *J Biol Chem* 1999; 274: 15014-15019.
39. Kissinger CR, Rejto PA, Pelletier LA et al. Crystal structure of human ABAD/HSD10 with a bound inhibitor: implications for design of Alzheimer's disease therapeutics. *J Mol Biol* 2004; 342: 943-952.
40. He XY, Wegiel J, Yang YZ et al. Type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase catalyzing the oxidation of steroid modulators of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 111-117.
41. Adamski J, Jakob FJ. A guide to 17β-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 1-4.
42. Chai Z, Brereton P, Suzuki T et al. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology* 2003; 144: 2084-2091.
43. Brereton P, Suzuki T, Sasano H et al. Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 111-117.
44. Moon Y-A, Horton JD. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem* 2003; 278: 7335-7343.
45. Lukacik P. Structural genomics of SDR-type human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Workshop on 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: role in human disease, Abstract book, Elmau Castle, Germany, May 8-11, 2005; 13.