

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 2 (1998)



### Oestrogen receptors and antioestrogen treatment of hormone-dependent tumours

N. G. KOSTOMITSOPOULOS (N.Γ. ΚΩΣΤΟΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15752](https://doi.org/10.12681/jhvms.15752)

Copyright © 2018, NG KOSTOMITSOPOULOS



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

#### To cite this article:

KOSTOMITSOPOULOS (N.Γ. ΚΩΣΤΟΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΣ) N. G. (2018). Oestrogen receptors and antioestrogen treatment of hormone-dependent tumours. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 49(2), 91–98. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15752>

## Υποδοχείς οιστρογόνων και αντιοιστρογονική θεραπεία των ορμονο-εξαρτώμενων όγκων

Νικόλαος Γ. Κωστομητσόπουλος

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Οι υποδοχείς οιστρογόνων αποτελούν ορμονο-εξαρτώμενους μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση ειδικών γονιδίων μετά από σύνδεσή τους με το DNA. Η κατανόηση του ρόλου των υποδοχέων οιστρογόνων στην έκφραση της μιτογόνου δράσης των οιστρογόνων ορμονών και στην προαγωγή ορμονο-εξαρτώμενων όγκων οδήγησαν τη βιοϊατρική έρευνα σε νέους προσανατολισμούς, σχετικά με τη θεραπευτική προσέγγιση των οιστρογόνο-εξαρτώμενων όγκων, με τη χρησιμοποίηση των αντιοιστρογόνων. Κύριος μηχανισμός δράσης των αντιοιστρογόνων είναι μέσω του ανταγωνισμού της οιστραδιόλης στη σύνδεσή της με τους αντίστοιχους υποδοχείς, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Η ταμοξιφαίνη αποτελεί το πλέον γνωστό αντιοιστρογόνο που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην επικουρική ορμονική θεραπεία όλων των σταδίων καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο. Η χρησιμοποίηση των αντιοιστρογόνων στην κτηνιατρική ογκολογία είναι υπό συζήτηση.

**ABSTRACT.** Kostomitsopoulos N.G. Oestrogen receptors and antioestrogen treatment of hormone-dependent tumours. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1998, 49(2): 91-98.* The oestrogen receptor is a ligand-activated transcription factor that modulates specific gene expression by binding to short DNA sequences. The study of the role of oestrogen receptor on the expression of the mitogenic action of oestrogens and oncogenesis lead biomedical research in new approaches of the treatment of oestrogen-dependent tumors by using antioestrogens. Main mechanism of action of antioestrogens is the prevention of oestrogen action by blocking the binding of oestradiol to the oestrogen receptor. Tamoxifen, the most wellknown antioestrogen, is widely used as adjuvant therapy in all stages of human breast cancer. Recently interest is focused on the potential use of "pure" antioestrogens. The use of antioestrogens in veterinary oncology is also under discussion.

Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας "Ν.Σ. Χρηστέα", Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Laboratory of Experimental Surgery and Surgical Research "N S Christeas", School of Medicine, University of Athens

Ημερομηνία υποβολής: 23.04.97

Ημερομηνία εγκρίσεως: 21.12.97

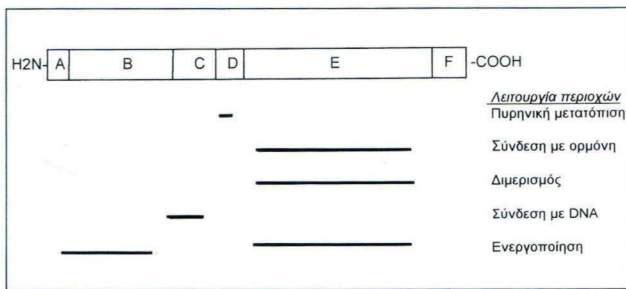
**Λέξεις ευρετηρίασης:** οιστρογονικοί υποδοχείς, αντιοιστρογόνα, ταμοξιφαίνη.

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σκέψη ότι τα οιστρογόνα σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ογκογένεση, δεν είναι πρόσφατη. Κατά το 18ο αιώνα ο John Hunter διατύπωσε την άποψη και απέδειξε ότι η αφαίρεση γονάδων από ζώα συνεπάγεται συρρίκνωση των αντίστοιχων οργάνων και αδένων του αναπαραγωγικού συστήματος. Λίγο αργότερα, στα 1898, ο Beatson<sup>1</sup>, μετά από μακροχρόνια πειράματα σε αγελάδες, παρατήρησε παλινδρόμηση του όγκου του μαστού προεπιλεγμένων γυναικών μετά από αμφοτερόπλευρη αφαίρεση των ωοθηκών. Οι Huggins και Bergenset al<sup>2</sup> εισήγαγαν τη χειρουργική επινεφριδιεκτομή ως μέθοδο ορμονικής θεραπείας του καρκίνου του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Στις ανωτέρω μεθόδους προστέθηκαν η χειρουργική υποφυσιεκτομή καθώς και οι ορμονικές παρεμβάσεις με τη χρησιμοποίηση ανδρογόνων, οιστρογόνων, προγεσταγόνων και γλυκοκορτικοειδών<sup>3</sup>. Στις μέρες μας η διαπίστωση της εξάρτησης διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως του καρκίνου του μαστού και του ενδομητρίου, από τα οιστρογόνα έχει συμβάλει καθοριστικά στην προσπάθεια τόσο για την πρόληψη, όσο και για την επικουρική θεραπεία των νεοπλασιών αυτών.

Αν και ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα οιστρογόνα συμβάλλουν στην προαγωγή της ογκογένεσης δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, είναι πλέον γνωστό, ότι η ευαισθησία των κυττάρων στη δράση των οιστρογόνων εξαρτάται από την παρουσία ή μη στο κύτταρο ειδικών πρωτεϊνών, των υποδοχέων οιστρογόνων. Η σύνδεση των οιστρογόνων με τους υποδοχείς είναι εκείνη που πυροδοτεί σειρά αντιδράσεων που ως αποτέλεσμα έχουν την έκφραση της μιτογόνου δράσης των οιστρογόνων στον πυρήνα του κυττάρου, επηρεάζοντας μάλιστα τη βιοσύνθεση και άλλων παραγόντων, όπως είναι οι στεροειδο-εξαρτώμενοι αυξητικοί παράγοντες TGF-α, TGF-β, EGF κ.λπ.

Παράλληλη με την ανακάλυψη του ρόλου που διαδραματίζουν οι υποδοχείς οιστρογόνων στην ογκογένεση ήταν και η προσπάθεια για την ανεύρεση και χρησιμοποίη-



**Εικόνα 1.** Σχηματική παράσταση των περιοχών των υποδοχέων οιστρογόνων και της κυριότερης λειτουργίας στην οποία μετέχουν

ηση των αντιοιστρογόνων, των ουσιών δηλαδή εκείνων που ανταγωνιζόμενες τη δράση των οιστρογόνων σε επίπεδο υποδοχέων θα συνέβαλλαν στην αναστολή της προαγωγής της ογκογένεσης. Η ανακάλυψη του αντιοιστρογόνου ταμοξιφαίνη από τους Harper και Walpole το 1966 άνοιξε νέο κεφάλαιο στην ορμονική θεραπευτική προσέγγιση των ορμονο-εξαρτώμενων όγκων<sup>4</sup>.

Σκοπός του άρθρου είναι η βασική περιγραφή του ρόλου που διαδραματίζουν οι υποδοχείς οιστρογόνων στην έκφραση της μιτογόνου δράσης των οιστρογόνων ορμονών, καθώς και η περιγραφή του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου ο φυσιολογικός αυτός ρόλος αναστέλλεται, υπό την επίδραση των αντιοιστρογόνων.

## 2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (nuclear hormone receptors.) Αποτελούν ορμονο-ενεργοποιούμενους μεταγραφικούς παράγοντες, που ρυθμίζουν την έκφραση ειδικών γονιδίων μετά από σύνδεσή τους με το DNA σε ειδικές θέσεις αποδέκτες (ERE, Estrogen Response Elements)<sup>5</sup>. Άλλοι υποδοχείς, μέλη της ίδιας οικογένειας, είναι οι των στεροειδών και θυρεοειδικών ορμονών, της βιταμίνης D<sub>3</sub> και του ρετινοϊκού οξέος<sup>6</sup>. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς των πεπτιδικών ορμονών, οι υποδοχείς των στεροειδών είναι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες. Για πολλά χρόνια ήταν αποδεκτό, ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων ήταν εντοπισμένοι στο κυτταρόπλασμα. Σύνδεση των υποδοχέων με την ορμόνη προκαλούσε την ενεργοποίησή τους και τη μεταφορά τους στον πυρήνα. Με την ανακάλυψη νέων ανοσοκυτοχημικών μεθόδων και τη χρησιμοποίηση αντίστοιχων μονοκλωνικών αντισωμάτων έγινε σαφές, ότι, εκτός των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών, οι υποδοχείς των στεροειδών αποτελούν πυρηνικές πρωτεΐνες, που μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα μετά τη σύνθεσή τους. Στον πυρήνα παραμένουν ανενεργοί, ώσπου να συνδεθούν με την αντίστοιχη ορμόνη, οπότε και πυροδοτείται η διαδικασία σύνδεσης του συμπλόκου με την αντίστοιχη περιοχή του DNA<sup>7</sup>. Σε πρόσφατη μελέτη των Mantel και συν<sup>8</sup> διατυπώ-

θηκε η άποψη ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία κινούμενοι από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίθετα.

Υψηλές συγκεντρώσεις υποδοχέων οιστρογόνων βρίσκονται σε κύτταρα επιλεγμένων οργάνων, όπως αυτά του αναπαραγωγικού συστήματος (μήτρα, κόλπος, ωαγωγός), στο μαστό, καθώς και σε νεοπλασματικούς ιστούς των αντίστοιχων οργάνων. Η ανίχνευση των υποδοχέων οιστρογόνων στα καρκινικά κύτταρα και η διαπίστωση της εξάρτησής τους από ενδογενείς ορμονικούς παράγοντες, αποτέλεσε τη βάση για την ορμονική θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου.

### 2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Κλωνοποίηση ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων από cDNA βιβλιοθήκες προερχόμενες από MCF-7 κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού έδειξε, ότι αποτελείται από 595 αμινοξέα μοριακού βάρους περίπου 66 Kda<sup>9</sup>. Σύγκριση της πρωτοταγούς δομής υποδοχέα οιστρογόνων ανθρώπου και όρνιθας οδήγησε στη διαπίστωση 6 διαφορετικών ομολόγων λειτουργικών περιοχών (A-F)<sup>10</sup> (εικόνα 1).

Οι περιοχές A, B, F αποτελούν τις ρυθμιστικές περιοχές του υποδοχέα (modulating regions), ενώ οι A και B είναι υπεύθυνες για το μέγεθός του. Η περιοχή C αποτελεί το τμήμα του υποδοχέα το οποίο έρχεται σε επαφή με το DNA του πυρήνα (DNA binding region), προκαλώντας την έναρξη της μεταγραφής ειδικών γονιδίων<sup>11</sup>. Το εν λόγω τμήμα (περιοχή C) είναι υδρόφιλο, πλούσιο σε κυστίνη, λυσίνη, αργινίνη και περιέχει θέσεις σύνδεσης Zn<sup>++</sup> ή άλλων δισθενών μετάλλων, τα οποία καθορίζουν την τεταρτοταγή δομή του. Η πεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται και συνενώνεται με τα Zn<sup>++</sup>, οπότε σχηματίζει δύο βρόχους, που ονομάζονται “zing fingers”<sup>12</sup>.

Η περιοχή E είναι το τμήμα του υποδοχέα που συνδέεται με το οιστρογόνο (ligand binding region). Η περιοχή αυτή σχηματίζει έναν υδρόφοβο φάκελο, η δομή του οποίου εξασφαλίζεται από τα κοινά αμινοξέα των υποδοχέων, ενώ τα διαφορετικά αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την ειδική σύνδεση της κάθε ορμόνης με τον αντίστοιχο υποδοχέα. Στην περιοχή αυτή επίσης αποδίδονται και άλλες λειτουργίες, όπως είναι ο διμερισμός του υποδοχέα, η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες του θερμικού shock (heat shock proteins), καθώς και η συμμετοχή, μαζί με την περιοχή A, στην ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας του γονιδίου (Transcriptional Activation Function TAF-2, TAF-1)<sup>13</sup>. Από τις δύο μεταγραφικές περιοχές η TAF-1 βρίσκεται στην αμινοτελική πλευρά (περιοχή A) του υποδοχέα και είναι ανεξάρτητη της παρουσίας οιστρογόνων, ενώ η TAF-2 βρίσκεται στην καρβοξυλική τελική πλευρά (περιοχή E) και ενεργοποιείται μόνο με την παρουσία οιστρογόνων: Τόσο η δομή των TAF-1 και TAF-2, όσο και ο ακριβής μεταγραφικός μηχανισμός τους δεν είναι απόλυτα γνωστές.

## 2.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων στην ελεύθερη (αδέσμευτη) μορφή τους βρίσκονται με μορφή 8S. Η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται μετά από την είσοδο των οιστρογόνων στον ενδοκυττάριο χώρο και τη σύνδεσή τους με την αντίστοιχη περιοχή E του υποδοχέα. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του υποδοχέα είναι η αύξηση της τάσης σύνδεσής του με το DNA, γεγονός που συνοδεύεται και από άλλες μεταβολές, όπως τη μετατροπή του υποδοχέα από 8S σε 4S και από το διμερισμό του μορίου<sup>13</sup>. Η προκαλούμενη μεταβολή του υποδοχέα από 8S σε 4S φαίνεται να αντιστοιχεί στην απώλεια μιας πρωτεΐνης θερμικού shock μοριακού βάρους 90 Kda, που φέρεται με τα χαρακτηριστικά hsp90<sup>14</sup>. Αν και δεν είναι γνωστό πότε ο υποδοχέας οιστρογόνων ενώνεται *in vivo* με την hsp90, η δημιουργία του συμπλόκου υποδοχέα οιστρογόνων-hsp90, σε απουσία της ορμόνης, είναι δυνατό να εξηγήσει γιατί ο ελεύθερος οιστρογονικός υποδοχέας δεν μπορεί να δεσμευτεί με το αντίστοιχο τμήμα του DNA, δεδομένου ότι η hsp90 αναστέλλει το διμερισμό του μορίου, στοιχείο απαραίτητο για τη σύνδεσή του. Άλλη ιδιότητα της hsp90 είναι η δυνατότητα κάλυψης του σημείου σύνδεσης στο DNA, έτσι ώστε να μην είναι δυνατή η αναγνώρισή του από τον υποδοχέα οιστρογόνων<sup>15</sup>. Στον πυρήνα το σύμπλοκο υποδοχέα-ορμόνης συνδέεται με την αντίστοιχη περιοχή του DNA, μέσω της περιοχής C. Η συνάφεια του συμπλόκου με τη συγκεκριμένη περιοχή ενισχύεται από το διμερισμό του μορίου και τη μετατροπή του από 4S σε 5S<sup>16</sup>. Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας του υποδοχέα γίνεται από τη στιγμή που αυτός θα ενωθεί με το αντίστοιχο τμήμα του DNA (Estrogen Receptor Element).

## 3. ΑΝΤΙΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Η διαπίστωση του ρόλου που διαδραματίζουν οι υποδοχείς οιστρογόνων στην έκφραση της μιτογόνο δράσης των οιστρογόνων και την ογκογένεση οδήγησε στην προσπάθεια για ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών, που θα είχαν την ικανότητα να δεσμεύουν τους υποδοχείς αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση των οιστρογόνων στους ιστούς. Μη στεροειδή αντιοιστρογόνα που κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πράξη ήταν η αιθαμοξιτριφετόλη (ethamoxitriphetol MER25)<sup>17</sup>, η κλομιφαίνη ή κλοραμιφαίνη (clomiphene MRL41)<sup>18</sup>, η ναφοξιδίνη (nafoxidine U-11, 100A)<sup>19</sup>, η νιτρομιφαίνη (nitromifene CI628)<sup>20</sup> και η ταμοξιφαίνη (tamoxifen ICI 46,474)<sup>4</sup>. Από αυτά η ταμοξιφαίνη θεωρείται ως ο πλέον χαρακτηριστικός εκπρόσωπος των μη στεροειδών αντιοιστρογόνων. Πρόκειται για το *trans* ισομερές παράγωγο του τριφαινυλαιθυλενίου [trans-1-(4β-dimethyl-aminoethoxyphenyl) 1,2-diphenylbut-1-ene] (εικόνα 2), που λόγω του χαμηλού ποσοστού παρενεργειών αλλά και των ευεργετικών επιπτώσεων στο καρδιαγγειακό σύστημα και στα οστά, απο-

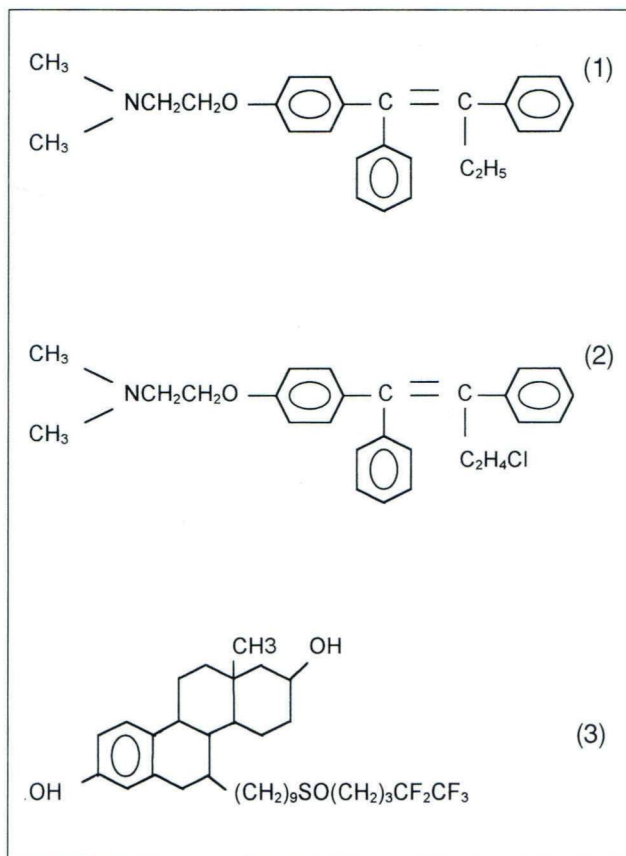
τελεί το φάρμακο εκλογής στην επικουρική θεραπεία του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες<sup>21</sup>. Πρόσφατα έχει διατυπωθεί και η άποψη για την προληπτική χορήγηση της ταμοξιφαίνης σε γυναίκες που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου για εκδήλωση καρκίνου του μαστού<sup>22</sup>.

Η βιολογική δράση της ταμοξιφαίνης οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στους ενεργούς μεταβολίτες της που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της ουσίας στο ήπαρ. Χαρακτηριστική είναι η ιδιότητα του υδροξυλιωμένου μεταβολίτη 4-υδροξυταμοξιφαίνης να εμφανίζει μεγαλύτερη τάση σύνδεσης με τους υποδοχείς οιστρογόνων από τη μητρική ουσία<sup>23</sup>. Κύριος ενεργός μεταβολίτης στον άνθρωπο είναι ο μεταβολίτης-X (N-δεσμεθυλταμοξιφαίνη), ενώ στο σκύλο ο μεταβολίτης-B (4-υδροξυταμοξιφαίνη), ο οποίος όμως μεταβολίζεται πολύ γρήγορα σε ανενεργά σύμπλοκα<sup>24</sup>.

Η χρησιμοποίηση της ταμοξιφαίνης στον καρκίνο του μαστού των ζώων συντροφιάς δεν φαίνεται να έχει ακόμα τεκμηριωθεί. Σε μελέτη των Morris και συν.<sup>25</sup> διαπιστώθηκε ότι η επικουρική μετεγχειρητική θεραπεία με ταμοξιφαίνη στη δόση του 1 mg/kg/ημέρα (adjuvant tamoxifen therapy) φαίνεται ότι έχει κάποια αποτελέσματα, πλην όμως αναφέρονται αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως διόγκωση του αιδοίου, κύστεις των ωοθηκών και τυομήτρα, λόγω της οιστρογονικής δράσης του φαρμάκου. Υπεύθυνος για την εν λόγω δράση θεωρείται ότι είναι ο μεταβολίτης E ή και η απευθείας δράση της ταμοξιφαίνης, που στα μεν κύτταρα του μαστού συμπεριφέρεται ως αντιοιστρογόνο, ενώ στα κύτταρα του ενδομητρίου εμφανίζει σαφή οιστρογονική δράση<sup>26</sup>. Οι πιο πάνω ανεπιθύμητες ενέργειες πιθανώς να είναι δυνατό να αποφευχθούν με τη μείωση της δόσης χορήγησης του αντιοιστρογόνου, καθώς και με τη μείωση της συχνότητας χορήγησης<sup>27,28</sup>.

Ανάλογο της ταμοξιφαίνης μη στεροειδές αντιοιστρογόνο είναι και η τορεμιφαίνη, που λόγω της ύπαρξης ατόμου χλωρίου στο μόριό της ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο σχηματισμού δραστικών μεταβολιτών, που ευθύνονται για το σχηματισμό συμπλόκων με το DNA των κυττάρων (εικόνα 2)<sup>29</sup>.

Δεδομένου ότι τα μη στεροειδή αντιοιστρογόνα εμφανίζουν αντιοιστρογονική, οιστρογονική ή και εν μέρει οιστρογονική δράση, ανάλογα με το είδος του ζώου στο οποίο χορηγούνται, καθώς και το όργανο στόχο, αλλά και λόγω της ανθεκτικότητας που συχνά αναπτύσσουν τα κύτταρα-στόχοι στις ουσίες αυτές<sup>30</sup>, η έρευνα συνεχίζεται προς την κατεύθυνση ανεύρεσης ουσιών που να εμφανίζουν αμιγώς αντιοιστρογονική δράση, των "καθαρών" αντιοιστρογόνων. Πρόκειται για στεροειδείς ενώσεις που εμφανίζουν 1,5-5,5 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από την ταμοξιφαίνη στο να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των θετικών για υποδοχείς οιστρογόνων κυττάρων καρκίνου του μαστού. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος των "καθαρών" αντιοιστρογόνων είναι η ουσία ICI 182,780



**Εικόνα 2.** Χημική δομή ταμοξιφαίνης(1), τορεμιφαίνης(2)και ICI 182,780(3)

(εικόνα 2), η μελέτη της οποίας βρίσκεται ήδη στο στάδιο των κλινικών δοκιμών<sup>31</sup>.

### 3.1 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Από το 1971 που η ταμοξιφαίνη αναφέρθηκε ως αντιοιστρογονικός παράγοντας έως σήμερα, πολλά σημεία της αντινεοπλασματικής δράσης των αντιοιστρογόνων έχουν παραμείνει αδιευκρίνιστα ή αμφισβητούνται. Ο μοριακός μηχανισμός δράσης των θεωρείται ότι εκδηλώνεται ως ένα σύνθετο αποτέλεσμα ανταγωνισμού της μιτογόνου δράσης της οιστραδιόλης, καθώς και ενός πλήθους άλλων δράσεων, όπως είναι η αναστολή δράσης ενζύμων και η τροποποίηση της δράσης των αυξητικών παραγόντων (εικόνα 3)<sup>32</sup>.

Η *in vitro* διαπίστωση ότι η [<sup>3</sup>H] οιστραδιόλη μπορεί και ενώνεται με ελεύθερους υποδοχείς οιστρογόνων<sup>33</sup>, τροφοδότησε ουσιαστικά τους ερευνητές με ένα μοντέλο ικανό να ερμηνεύσει το μηχανισμό δράσης των οιστρογόνων, αλλά και άλλων ορμονών, στα κύτταρα-στόχους. Οι Skidmore και Binart οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα, ότι η ταμοξιφαίνη ανταγωνίζεται τη σύνδεση της [<sup>3</sup>H] οιστραδιόλης με οιστρογονικούς υποδοχείς που εντοπίζονται στη μήτρα μυών,

επιμύων, κονίλλων, στο γεννητικό σωλήνα όρνιθας, καθώς και στο ενδομήτριο γυναίκας, εκδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο τις αντιοιστρογονικές ιδιότητες<sup>34,35</sup>. Η άποψη αυτή ενισχύθηκε και από το γεγονός, ότι αυξημένες συγκεντρώσεις οιστρογόνων είναι δυνατό να αντιστρέψουν τα προκαλούμενα από την ταμοξιφαίνη αποτελέσματα, εφόσον δεσμεύουν μεγαλύτερο ποσοστό υποδοχέων<sup>36,37</sup>.

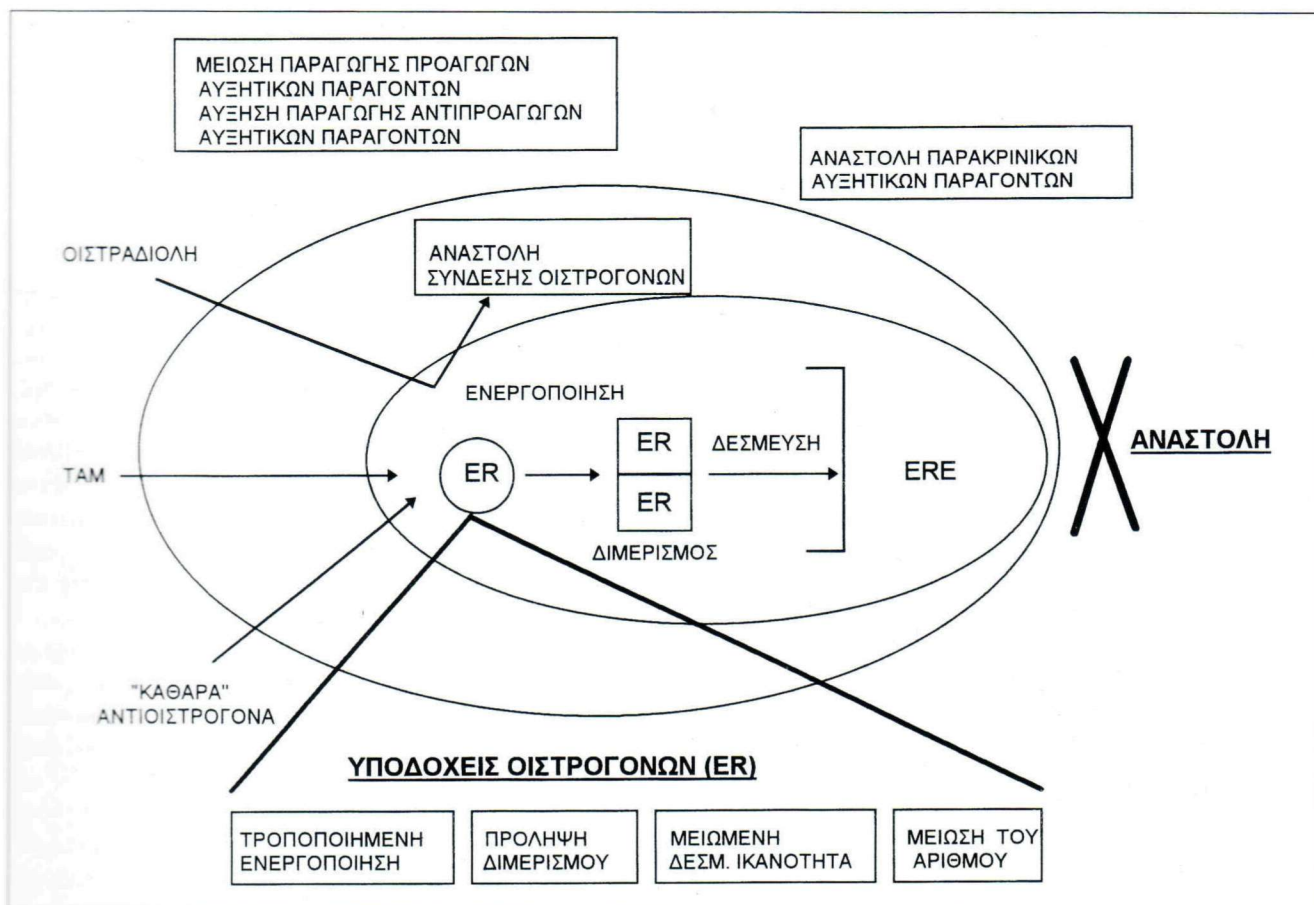
Η δημιουργία του συμπλόκου ταμοξιφαίνης-υποδοχέα προκαλεί αναστολή τόσο της γονιδιακής μεταγραφής και της σύνθεσης των οιστρογόνου-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, όσο και της δράσης διαφόρων αυξητικών παραγόντων (TGF- $\alpha$ , IGF-II, PDGF). Ταυτόχρονα προάγει τη δράση του αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta$ , με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων<sup>38</sup>.

*In vivo* παρατηρήσεις σε επίμυς, μετά από χορήγηση καρκινογόνου διμεθυλβενζανθρακενίου (DMBA) απέδειξαν, ότι η ταμοξιφαίνη δρα περισσότερο ως κυτταροστατικός παρά ως κυτταροτοξικός παράγοντας, δεδομένου ότι ουσιαστικά αναστέλλει την επέκταση των καρκινικών εστιών ή μειώνει τον αριθμό τους για χρονικό διάστημα τόσο, όσο διαρκεί η παρουσία της και η παρουσία των ενεργών μεταβολιτών της στον οργανισμό. Η διακοπή της χορήγησης της ταμοξιφαίνης και η απομάκρυνση των μεταβολιτών της οδηγεί στην επανεμφάνιση ή στην εκδήλωση νεοπλασιών<sup>39</sup>. Ανάλογη δράση του αντιοιστρογόνου διαπιστώθηκε και σε άλλο πειραματικό πρότυπο αθυμικών μυών, στους οποίους είχαν εμφυτευθεί MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου<sup>40</sup>. Η κυτταροστατική αυτή ιδιότητα της ταμοξιφαίνης απαιτεί η εφαρμοζόμενη θεραπεία να είναι μακροχρόνια (5-10 χρόνια).

Κλινικές παρατηρήσεις αλλά και εκτενείς *in vivo* και *in vitro* μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα, ότι η προκαλούμενη από την ταμοξιφαίνη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι δυνατό να επιτυγχάνεται και με άλλους μηχανισμούς ανεξάρτητους από την παρουσία υποδοχέων στα κύτταρα-στόχους, όπως μέσω των θέσεων σύνδεσης αντιοιστρογόνων<sup>41</sup>, της φαρμακολογικής δράσης της ταμοξιφαίνης σε ουσίες όπως η καλμοντουλίνη<sup>42</sup>, η ισταμίνη<sup>43</sup>, η 5-λιποξυγονάση<sup>44</sup>, η πρωτεϊνική κινάση C<sup>45</sup>, καθώς και της μεταβολής της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και της τροποποίησης της ανοσορρυθμιστικής λειτουργίας<sup>48</sup>.

#### 3.1.1 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Μελέτες των Rochefort και Clark<sup>47,48</sup> θεμελίωσαν κατ' αρχήν την άποψη, ότι τα αντιοιστρογόνα μπορούν να προκαλούν ενεργοποίηση των υποδοχέων για μεταφορά τους (translocation) στον πυρήνα, χωρίς όμως να είναι σε θέση να επιτυγχάνουν και την πλήρη βιολογική ενεργοποίησή τους, προκαλώντας έτσι τη σύνθεση μερικών αλλά όχι ό-



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση του μοριακού μηχανισμού δράσης των αντιοιστρογόνων σε κύτταρο καρκίνου του μαστού<sup>32</sup>

λων των οιστρογόνο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών. Τεκμηριώνοντας την πιο πάνω άποψη οι Rochefort και συν.<sup>24</sup>, μετά από *in vitro* μελέτες διαπίστωσαν, ότι η ενεργοποίηση από την οιστραδιόλη των υποδοχέων οιστρογόνων διαφέρει από την αντίστοιχη που προκαλείται από τα αντιοιστρογόνα ταμοξιφαίνη και υδροξυταμοξιφαίνη, σε τρία σημεία:

α) Στην περίπτωση της ενεργοποίησης του υποδοχέα από την οιστραδιόλη μειώνεται ο ρυθμός διάσπασης του συμπλόκου (k-), ενώ σε ενεργοποίηση από την ταμοξιφαίνη ή την υδροξυ-ταμοξιφαίνη δεν παρατηρείται παρόμοια μεταβολή.

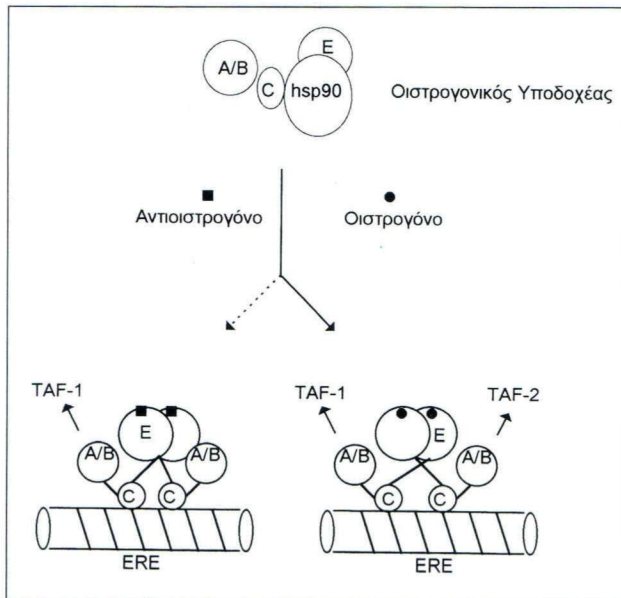
β) Στην περίπτωση ενεργοποίησης του υποδοχέα από την ταμοξιφαίνη, η *in vitro* τάση του υποδοχέα για σύνδεση με το DNA εμφανίζεται χαμηλή.

γ) Η διαπίστωση μεταβολών που επέρχονται στο σημείο σύνδεσης του υποδοχέα με την ταμοξιφαίνη και γίνονται εμφανείς με τη βοήθεια των μονοκλωνικών αντισωμάτων B36.

Οι Pavlik και συν.<sup>49,50</sup> διατύπωσαν την άποψη, ότι το σύμπλοκο υποδοχέα-αντιοιστρογόνου αντιδρά με διαφορε-

τική περιοχή χρωματίνης απ' ό,τι το σύμπλοκο υποδοχέα-οιστραδιόλης. Σε μεταγενέστερες όμως μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση ειδικών τεχνικών (red retardation and methylation interference), διατυπώθηκε, ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων διατηρούν την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν την αντίστοιχη θέση σύνδεσης στο DNA (ERE), άσχετα με το αν είναι δεσμευμένοι με οιστραδιόλη ή με ταμοξιφαίνη, ενώ σε άλλη δοκιμή (gel retardation) διαπιστώθηκε, ότι το σύμπλοκο ορμόνη-υποδοχέα-DNA μετακινείται ελαφρώς βραδύτερα στην περίπτωση παρουσίας της ταμοξιφαίνης από ό,τι όταν υπάρχει η οιστραδιόλη, γεγονός που αποδεικνύει τη μεταβολή της δομής του υποδοχέα<sup>15,51</sup>.

Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας και την ανάλυση της δομής και της ακριβούς λειτουργίας των υποδοχέων οιστρογόνων δόθηκε η δυνατότητα της λεπτομερούς μελέτης των δομικών μεταβολών που προκαλούνται στο σύμπλοκο υποδοχέα-ταμοξιφαίνης, ρίχνοντας ακόμα περισσότερο φως στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης της ταμοξιφαίνης που ως τελικό αποτέλεσμα έχει την εκδήλωση οιστρογονικών, εν μέρει οιστρογονικών, καθώς



**Εικόνα 4.** Σχηματική παράσταση του μηχανισμού σύνδεσης των οιστρογόνων και αντιοιστρογόνων με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Ως A/B, C, E χαρακτηρίζονται οι αντίστοιχες λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα, hsp90 η πρωτεΐνη θερμικού shock, ERE η περιοχή του DNA στην οποία συνδέεται ο υποδοχέας και TAF-1, TAF-2 οι αντίστοιχες περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφικής λειτουργίας<sup>13</sup>.

και αντιοιστρογονικών ιδιοτήτων. Σύμφωνα με το πρότυπο που περιγράφηκε από τον Green<sup>13</sup>, η ταμοξιφαίνη, μετά τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα, προάγει το διμερισμό του και τελικά τη σύνδεση του συμπλόκου με τις αντίστοιχες θέσεις-αποδέκτες του DNA. Μετά τη σύνδεση του διμερούς με το DNA δεν προκαλείται πλήρης ενεργοποίηση της μεταγραφής, λόγω της μη ενεργοποίησης της μεταγραφικής λειτουργίας της περιοχής E (TAF-2) (εικόνα 4). Η δυνατότητα λοιπόν της ταμοξιφαίνης να εκδηλώνει άλλοτε αντιοιστρογονική και άλλοτε οιστρογονική δράση φαίνεται να εξαρτάται από την ικανότητά της να προάγει τη σύνδεση του υποδοχέα με το DNA ενεργοποιώντας την TAF-1 περιοχή (περιοχή A/B) αλλά όχι την TAF-2 (περιοχή E). Σε κύτταρα ή ιστούς που απαιτείται η ενεργοποίηση τόσο της TAF-1 όσο και της TAF-2 περιοχής, η ταμοξιφαίνη ασκεί αντιοιστρογονική δράση, ενώ στην περίπτωση που απαιτείται η ενεργοποίηση μόνο της TAF-1 η ταμοξιφαίνη ασκεί οιστρογονική δράση<sup>52</sup>.

Μετά το τέλος της μεταγραφής το σύμπλοκο υποδοχέα-αντιοιστρογόνου παραμένει προσκολλημένο στο DNA, αποκλείοντας την περαιτέρω ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων, ενώ έμμεσα μειώνεται και ο διαθέσιμος αριθμός των υποδοχέων οιστρογόνων, με αποτέλεσμα την αναστολή της δυνατότητας δράσης των οιστρογόνων στα εν λόγω γονίδια.

Σε αντίθεση με τα μη στεροειδή αντιοιστρογόνα, τα “καθαρά” αντιοιστρογόνα προκαλούν πλήρη αναστολή της σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA, μέσω της αναστολής του διμερισμού του συμπλόκου υποδοχέα-αντιοιστρογόνου, εκδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο αποκλειστικά αντιοιστρογονική δράση<sup>53</sup>.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα τελευταία χρόνια, με την αλματώδη ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, έγινε δυνατή η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των οιστρογόνων ορμονών στα φυσιολογικά και μη κύτταρα. Απαραίτητη προϋπόθεση που καθορίζει την ευαισθησία των κυττάρων στα οιστρογόνα είναι η παρουσία ειδικών πρωτεϊνικών ενδοκυττάρων σχηματισμών, των υποδοχέων οιστρογόνων. Η δημιουργία του συμπλόκου οιστρογόνου-υποδοχέα ενεργοποιεί σειρά αντιδράσεων που ως τελικό αποτέλεσμα έχουν τη μεταφορά της ορμόνης στο DNA του κυττάρου στόχου και την έκφραση της μιτογόνου δράσης της.

Η κατανόηση της σημασίας του ρόλου των υποδοχέων οιστρογόνων ήταν εκείνη που ώθησε τους ερευνητές στην προσπάθεια για ανεύρεση ουσιών που θα είχαν την ικανότητα να δεσμεύουν τους εν λόγω υποδοχείς και να αναστείλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των οιστρογόνο-εξαρτώμενων όγκων. Αποτέλεσμα ήταν η ανακάλυψη των αντιοιστρογόνων ορμονών με κύριο εκπρόσωπο την ταμοξιφαίνη, φάρμακο που συνέβαλε καθοριστικά στη βελτίωση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής γυναικών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού. Η πρόσφατη εξάλλου ανακάλυψη των “καθαρών” αντιοιστρογόνων, ανταγωνιστών των οιστρογόνων με εξειδικευμένη δράση, έχει ανοίξει ένα ελπιδοφόρο κεφάλαιο για τη θεραπευτική ορμονική προσέγγιση των οιστρογόνο-εξαρτώμενων νεοπλασιών.

Οι ομοιότητες που παρουσιάζονται στην παθοφυσιολογία διαφόρων κακοήθων νεοπλασιών του ανθρώπου με αυτές των ζώων συνετέλεσαν πολλές φορές στην υιοθέτηση κοινών θεραπευτικών σχημάτων. Προκειμένου όμως για την περίπτωση της ταμοξιφαίνης δεν φαίνεται να έχει τεκμηριωθεί ακόμα η δυνατότητα χρησιμοποίησής της στην κτηνιατρική ογκολογία, κυρίως λόγω της οιστρογονικής δράσης του φαρμάκου σε άλλα όργανα των πασχόντων ζώων. Παρ' όλα αυτά, θεωρείται ότι περαιτέρω έρευνα του μηχανισμού δράσης των αντιοιστρογόνων και κυρίως των “καθαρών” αντιοιστρογόνων είναι δυνατό να συμβάλει στην καλύτερη αξιοποίηση των εν λόγω φαρμάκων, εμπλουτίζοντας έτσι τη θεραπευτική φαρέτρα του κτηνιάτρου.

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Beatson GT. On the treatment of inoperable cases in carcinoma of the mamma: suggestion for new method of treatment illustrative cases. *Lancet* 1896, 2:104-107

2. Huggins C, Bergenstal DM. Inhibition of human mammary metastatic cancer by adrenalectomy. *Cancer* 1952, 12:134-137
3. Henderson IC, Canellos GP. Cancer of the breast. *N Engl J Med* 1980, 302:17-30
4. Harper MJK, Walpole AL. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fert* 1967, 13:101-119
5. Seiler-Tuyns A, Walker P, Martinez E, Merillat AM, Givel F, Wahli W. Identification of estrogen-responsive DNA sequences by transient expression experiments in a human breast cancer cell line. *Nucl Acids Res* 1986, 14:8755-8770
6. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988, 240:889-895
7. Walters MR. Steroid hormone receptors and the nucleus. *Endocrine Rev* 1985, 6:512-543
8. Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Milgrom E. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996, 56:3-9
9. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P, Chambon P. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature* 1986, 320:134-139
10. Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert J-M, Chambon P. The chicken estrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 1986, 5:891-897
11. Pratt WB. Interaction of hsp90 with steroid-receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Mol Cell Endocrinol* 1990, 74:69-71
12. Γραβάνης Α. Μοριακή φαρμακολογία των οιστρογονο-εξαρτώμενων όγκων. *Ιατρική* 1995, 67:28-39
13. Green S. Modulation and oestrogen receptor activity by oestrogens and anti-oestrogens. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1990, 37:745-751
14. Catelli MG, Binart N, Jung-Testas I, Renoir J-M, Baulieu EE, Feramisco JR, Welch WJ. The common 90-kd protein component to non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J* 1985, 4:3131-3135
15. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988, 55:145-146
16. Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 1990, 60:953-962
17. Lerner LJ, Holthaus JF, Thompson CR. A non-steroidal estrogen antagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenylethanol. *Endocrinology* 1958, 63:295-318
18. Holtkamp DE, Greslin SC, Root CA, Lerner LJ. Gonadotropin inhibiting and antifecundity effects of chloramiphen. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960, 105:197-201
19. Duncan GW, Lyster SC, Clark JJ, Lednicer D. Antifertility activities of two diphenyl-dihydronaphthalene derivatives. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963, 112:439-442
20. Callantine MR, Humphrey RR, Lee SL, Windsor BL, Schottin NH, O'Brien OP. Action of an estrogen antagonist on reproductive mechanisms in the rat. *Endocrinology* 1966, 79:153-169
21. Jordan VC. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *Br J Pharmacol* 1993, 110:507-517
22. Powels TJ, Jones AL, Ashley SE, O'Brien MER, Tidy VA, Treleaven J, Cosgrove D, Nash AG, Sacks N, Baum M, McKinna JA, Davey JB. The Royal Marsden Hospital pilot tamoxifen chemoprevention trial. *Breast Cancer Res Treat* 1994, 31:73-82
23. Robertson DW, Katzenellenbogen JA, Long DJ, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen antiestrogen. A comparison of the activity, pharmacokinetics and metabolic activation of the cis- and trans- isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem* 1982, 16:1-13
24. Rochefort H, Borgna JL, Evans E. Cellular and molecular mechanism of action of antiestrogens. *J Steroid Biochem* 1983, 19:69-74
25. Morris JS, Dobson JM, Bostock DE. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 1993, 133:539-542
26. Jordan VC. Biochemical pharmacology of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1984, 36:245-275
27. Ruben J. Use of tamoxifen in control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 1993, 133:602
28. Baker RW. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 1994, 134:24
29. Hemminki K, Widlak P, Hou SM. DNA adducts caused by tamoxifen and toremifene in human microsomal system and lymphocytes in vitro. *Carcinogenesis* 1995, 16:1661-1664
30. Osborne CK. Mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer: possible role of tamoxifen metabolism. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993, 47:83-89
31. DeCupis A, Nooman D, Pirani P, Ferrera A, Clerico L, Favoni RE. Comparison between novel steroid-like and conventional nonsteroidal antioestrogens in inhibiting oestradiol- and IGF-I-induced proliferation of human breast cancer-derived cells. *Br J Pharmacol* 1995, 116:2391-2400
32. Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994, 31:41-52
33. Toft D, Shyamala G, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967, 57:1740-1743
34. Skidmore JR, Walpole AL, Woodburn J. Effect of some triphenylethylenes on estradiol binding in vitro to macromolecules from uterus and anterior pituitary. *J Endocrinol* 1972, 52:289-298
35. Binart N, Catelli MH, Greynot C, Puri V, Hehnel R, Mester J, Baulieu EE. Monohydroxy-tamoxifen: an antiestrogen with high affinity for the chick oviduct estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1979, 91:812-818
36. Croxtall JD, Emmas C, White JO, Choudhary Q, Flaver RJ. Tamoxifen inhibits growth of estrogen receptor-negative A549 cells. *Biochem Pharmacol* 1994, 47:197-202
37. Daniel CP, Gaskell SJ, Nicholson RI. The measurement of tamoxifen and metabolites in the rat and relationship to the response of DMBA-induced mammary tumours. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984, 20:137-143
38. Sunderland MC, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patient with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1991, 7:1283-1297

39. Robinson SP, Jordan VC. Reversal of antitumor effects of tamoxifen by progesterone in the 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res* 1987, 47:5386-5390
40. Jordan VC, Gottardis MM, Robinson SP, Field A. Immune deficient animals to study "hormone-dependent" breast cancer and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 1989, 34:169-176
41. Kon OL. An antiestrogen-binding protein in human tissues. *J Biol Chem* 1983, 258:3173-3177
42. Musgrove EA, Wakeling AE, Sutherland RL. Points of estrogen antagonists and a calmodulin antagonist within MCF-7 human breast cancer cell cycle. *Cancer Res* 1989, 49:2398-2404
43. Kroeger EA, Brandes LJ. Evidence that tamoxifen is an histamine antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 131:750-755
44. Tavares IA, Stamford IF, Bennet A. Tamoxifen inhibits 5-lipoxygenase in human polymorphonuclear lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 1987, 39:323-324
45. O'Brien CA, Liskamp RM, Solomon DH, Weinstein IB. Triphenylethylenes: a new class of protein kinase C inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 1986, 76:1243-1246
46. Mandeville R, Ghali SS, Chausseau JP. In vitro stimulation of human NK activity by an estrogen antagonist (tamoxifen). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984, 20:983-985
47. Rochefort H, Lignon F, Capony F. Formation of estrogen nuclear receptor in the uterus: effect of androgens, estrone and nafoxidine. *Biochem Biophys Res Commun* 1972, 47:662-670
48. Clark JH, Anderson JN, Peck EJ. Estrogen receptor-antiestrogen complex: atypical binding by uterine nuclei and effects on uterine growth. *Steroids* 1973, 22:707-718
49. Pavlik EJ, Nelson K, van Nagell JR Jr, Donaldson ES, Walden ML, Hanson MB, Gallion H, Flanigan RC, Kenady DE. Hydrodynamic characterization of estrogen receptor complexes with [<sup>3</sup>H]-4-hydroxytamoxifen: evidence in support of contrasting receptor transitions mediated by different ligands. *Biochemistry* 1985, 24:8101-8106
50. Pavlik EJ, von Nagell JR Jr, Nelson K, Gallion H, Donaldson ES, Kenady DE, Baranowska-Kortylewicz J. Antagonism to estradiol in the mouse: reduced entry of receptors complexed with 4-hydroxytamoxifen into a Mg<sup>+2</sup>-soluble chromatin fraction. *Endocrinology* 1986, 118:1924-1934
51. Metzger D, White JH, Chambon P. The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature* 1988, 334:31-36
52. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonist activity of the antiestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 1990, 9:2811-2818
53. Wakeling AE. Are breast tumours resistant to tamoxifen also resistant to pure antiestrogens? *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993, 47:107-114