

Retinoidy ako dermatologiká s antineoplastickým účinkom v experimentálnej mamárnej karcinogéze

Kubatka, P.¹, Bojková, B.², Péč, M.¹, Kajo, K.³, Orendáš, P.², Kassayová, M.², Kapinová, A.⁴, Péč, J.⁵

¹Ústav lekárskej biológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzity Komenského v Bratislave

²Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

³Onkologický ústav sv. Alžbety a Ústav patológie SZU, Bratislava

⁴Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzity Komenského v Bratislave

⁵Klinika dermatovenerológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzity Komenského v Bratislave

Súhrn

Retinoidy predstavujú deriváty vitamínu A, pričom patria medzi farmaká, ktoré zohrávajú významnú úlohu v regulácii bunkového rastu, v diferenciácii a apoptóze, majú dokázané imunomodulačné či protizápalové účinky. Efekt retinoidov je sprostredkovaný väzbou na nukleárne receptory, ktoré patria k rodine steroido-tyreoidálnych receptorov, s následnou moduláciou génovej expresie. Účinky retinoidov sa úspešne využívajú v dermatologickej praxi, zvlášť v liečbe psoriázy alebo akné. Experimentálne štúdie priniesli dôkazy aj o protinádorovom účinku retinoidov, vrátane rakoviny prsníka. Opakované klinické štúdie potvrdili, že retinoidy potláčajú rast nielen estrogén receptor-pozitívnych, ale aj estrogén receptor-negatívnych mamárnych tumorov. V medicínskej praxi sa do popredia v poslednom období dostávajú selektívne RXR (retinoid X receptor) retinoidy so zachovaným protinádorovým účinkom a vylepšeným toxickým profilom. Komplexnosť funkcie retinoidných receptorov dáva možnosti pre vývoj ďalších selektívnych retinoidov s očakávaným terapeutickým pôsobením a minimálnymi nežiaducimi účinkami.

Kľúčové slová: retinoidy, dermatologiká, mamárna karcinogéza, chemoprevenia, retinylacetát, bexarotén

Abstract

Retinoids are derivatives of vitamin A that play a substantial role in regulating cell growth, differentiation, and apoptosis, with proven immunomodulatory or anti-inflammatory effects. The effect of retinoids is mediated by binding to nuclear receptors, belonging to the family of steroid-thyroid receptors, with subsequent modulation of gene expression. The effects of retinoids have been successfully used in dermatology practice, especially in the treatment of psoriasis and acne. Experimental studies have shown evidence of the antitumor effect of retinoids, including breast cancer. Repeated clinical studies have shown that retinoids inhibit the growth of both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative mammary tumors. Recently, selective RXR (retinoid X receptor) retinoids are available in clinical practice. Compared to older retinoids, these drugs are characterized with well-preserved antitumor activity and improved toxicity profile. The complexity of retinoid receptor function gives the possibility for the development of more selective retinoids with the expected therapeutic effect and minimal side effects.

Key words: retinoids, dermatological drugs, mammary carcinogenesis, chemoprevention, retinylacetate, bexarotene

Retinoidmi sú označované látky odvodené od vitamínu A (retinolu). Retinoidy sú nevyhnutné pre mnohé fyziologické procesy zahrnujúce úlohu v regulácii bunkového rastu, apoptózy, reprodukcie, metabolizmu, hematopoézy, vývinu kostí, tiež v celulónej diferenciácii či v embryogenéze [1]. Pri nedostatku vitamínu A dochádza k šeroslepe, poruchám spermatogenézy, kožným hyperkeratózám a dlaždicovitým metapláziam slizníc, možný je aj teratogénny efekt. U živočíchov je deficiencia vitamínu A spájaná s vyššou incidenciou rakoviny a zvýšenou citlivosťou na chemické karcinogény.

Retinoidy možno rozdeliť na prirodzené a syntetické. K prirodzene sa vyskytujúcim patrí retinal (aldehyd vitamínu A) a kyselina retinová, ktorá sa môže vyskytovať vo forme 9-cis-, 13-cis- (isotretinoín) alebo all-trans (znej môže byť syntetizovaný retinylacetát, retinylpalmitát a retinylmetyléter).

Modifikáciou cyklickej skupiny, polyénového reťazca alebo terminálnej polárnej skupiny vznikajú syntetické deriváty vitamínu A.

Retinoidy sa delia do troch generácií. Prvá generácia sú nearomatické retinoidy. Patrí k nim tretinoín (kyselina retinová) a isotretinoín (13-cis-retinová kyselina). Do druhej generácie patria monoaromatické retinoidy ako etretinát a acitretín, uplatňujúce sa v liečbe ťažkých foriem psoriázy. Novšie syntetizované retinoidy tretej generácie sú polyaromatické retinoidy, tzv. arotinoidy, ku ktorým patrí adapalén, či tazarotén.

V dermatológii sa u retinoidov využíva schopnosť ovplyvňovať epidermálny rast a diferenciáciu buniek. Pri patologickej hyperproliferácii epidermis retinoidy spôsobujú jej normalizáciu, čo sa využíva hlavne v liečbe psoriázy. Retinoidy majú výrazný účinok na aktivitu mazovej žľazy.

Nízke dávky podporujú rast a diferenciáciu sebocytov, naopak vyššie dávky vyvolávajú atrofiu mazových žliaz a znižujú sekréciu mazu u ľudí či zvierat [2]. Napriek skutočnosti, že retinoidy sa využívajú v liečbe acne vulgaris už dlhú dobu, presný mechanizmus ich pôsobenia nebol úplne objasnený.

Nežiaduce účinky retinoidov sú závislé na dávke. Obvykle doznejú po redukcii dávky alebo vysadení lieku. Spektrum nežiaducich účinkov retinoidov zahŕňa poškodenie kože a slizníc (cheilitis, xerosis, conjunctivitis, urethritis, pruritus), stenčenie vlasov až alopeciu, zvýšenie sérových hladín cholesterolu a triacylglycerolov, poškodenie tvorby kostí, či extraskelétálne kalcifikácie. V klinickej praxi sa používajú k systémovej liečbe isotretinoín a acitretín. Isotretinoín je najúčinnnejším retinoidom z pohľadu potlačenia aktivity mazových žliaz a tiež je vysoko účinný v systémovej liečbe ťažkých foriem akné [2]. Isotretinoín má priamy protizápalový účinok, inhibuje proliferáciu endotelových buniek kožných kapilár a angiogénzu, tiež bráni prestupu neutrofilov z kapilár do tkaniva. Acitretín sa využíva hlavne v liečbe psoriázy, tiež pri ichthyóze, palmoplantárnych keratózach, m.Darier, keratosis lichenoides chronica, lichen planus, či ekzému rúk. Acitretín ovplyvňuje proliferáciu, keratinizáciu a diferenciáciu epitelových buniek, bunkovú a humorálnu imunitnú odpoveď a má protizápalový účinok [2,3]. V praxi sa využívajú aj retinoidy s lokálnou aplikáciou. Tretinoín redukuje tvorbu komedónov a má komedolytický účinok, adapalén sa využíva v liečbe prevažne komedonitickej formy akné a tazarotén hlavne v liečbe psoriázy [4].

Mechanizmus účinku retinoidov

Hoci prirodzené retinoidy sú vďaka ich prijímaniu do organizmu prostredníctvom stravy označované ako vitamíny, môžu byť na základe mechanizmu svojho pôsobenia klasifikované tiež ako hormóny, ktoré sú účinkami podobné steroidným a tyroidálnym hormónom. Molekulová podstata biologických účinkov retinoidov bola dlhé roky neznáma, prelom v bádaní prinieslo až objavenie nukleárných receptorov pre retinoidy koncom 80. rokov 20. storočia [5]. V súčasnosti je už všeobecne akceptovaná skutočnosť, že prevažná väčšina účinkov retinoidov je sprostredkovaná cez ich jadrové receptory. Nukleárne retinoidné receptory predstavujú ligandom aktivované transkripčné faktory, ktoré regulujú expresiu príslušných génov. Poznáme šesť typov retinoidných receptorov, ktoré patria do dvoch rozdielnych receptorových rodín RARs (retinoic acid receptors) [5] a RXRs (retinoid X receptors) [6]. RARs sú receptory pre kyselinu trans-retinovú (RA) a 9-cis retinovú (9-cis-RA). 9-cis RA sa k receptoru viaže s väčšou afinitou ako trans forma. RXRs sú receptory pre 9-cis RA, ktorá sa môže viazať tak k RARs, ako aj k RXRs [7].

Obe receptorové rodiny pozostávajú z troch receptorových podtypov (α , β , γ), ktoré sú produktmi rôznych génov. Okrem toho jednotlivé receptorové subtypy majú veľké množstvo izoform, ktoré vznikajú alternatívnym posttranskripčným zostrihom a pôsobením rozdielnych promótorov [8]. Expresia jednotlivých subtypov a izoform retinoidných receptorov je tkanivovo a bunkovo závislý proces, napr. dominantné subtypy RAR a RXR prítomné v ľudskej koži sú RAR- γ a RXR- α [9].

Úloha retinoidov v experimentálnej karcinogéze mliečnej žľazy

Experimentálne štúdie poukázali na schopnosti retinoidov ovplyvňovať génovú expresiu priamo, aktiváciou a/alebo represiou špecifických génov a tiež nepriamo, pôsobením cez rôzne signálne dráhy. Okrem vyššie spomínaných procesov môžu retinoidy ovplyvniť karcinogézu prostredníctvom ďalších mechanizmov: stimuláciou imunitného systému, zosilnením cytotoxicity sprostredkovanej bunkami, inhibíciou expzie onkogénov, potlačením malígneho fenotypu, inhibíciou angiogénzy, moduláciou bunkovej migrácie, adhézie a invazívnosti, antioxidačným pôsobením a deaktiváciou voľných radikálov, stimuláciou EGF, TGF- β a tumor nekrotizujúceho faktora (TNF) [10], inhibíciou aktivity cyklooxygenázy-2 [11], stimuláciou tvorby konexínu 43 [12].

Prvý dôkaz o antikarcinogénom pôsobení retinoidov priniesli Moon et al. v roku 1976 [13]. Retinylacetát (RA), ktorý sa začal podávať v potrave týždeň po podaní chemokarcinogénu 7,12-dimetylbenz[a]antracénu (DMBA) samiciam potkanov, signifikantne znížil incidencia mamárnych adenokarcinómov ako aj benígnych nádorov. V štúdií McCormicka et al. [14] RA znížil incidencia DMBA-indukovaných mamárnych tumorov u samíc potkanov aj keď bol podávaný počas krátkeho časového obdobia, dva týždne pred a týždeň po aplikácii DMBA, pričom efekt bol porovnateľný s 30-týždňovým podávaním. RA bol účinný aj v prevencii N-metyl-N-nitrozoureu (NMU) indukovanej mamárnej karcinogénzy u samíc potkanov, pričom inhibícia karcinogénzy bola zosilnená pri podávaní kombinácie RA a CB-154, látky potlačujúcej uvoľňovanie prolaktínu spolu s estrogénovým antagonistom tamoxifénom [15]. RA inhiboval tiež vznik mamárnych karcinómov u potkanov indukovaných benzo[a]pyrénom [16]. Podávanie RA ako chemopreventíva je však obmedzené jeho toxicitou. Vysoké dávky RA vedú k akumulácii retinylesterov v pečeni, čo je často sprevádzané jej poškodením.

N-(4-hydroxyfenyl)retinamid (fenretinid, fenretinamid, 4-HPR), analóg kyseliny all-trans retinovej, je účinný syntetický retinoid s relatívne nízkou toxicitou. Jeho chemopreventívny efekt v mamárnej karcinogéze bol potvrdený Moonom et al. [17]. V NMU modeli rakoviny mliečnej žľazy u potkanov mal silný antiproliferatívny účinok na mamárny epitel, keď znižoval vetvenie koncových dutkov a proliferáciu koncových štruktúr žľazy. Inhibícia karcinogénzy prostredníctvom 4-HPR bola dokázaná aj u DMBA-indukovanej mamárnej tumorigénzy u samíc potkanov [16]. V ďalšej štúdií Moona et al. [18], 4-HPR redukoval vznik nových tumorov po chirurgickom odstránení primárneho NMU-indukovaného mamárneho nádoru potkanov. Na rozdiel od RA, 4-HPR inhiboval mamárnu tumorigénzu aj u myší, keď znížil tvorbu tumorov u C3H myší, ktoré nerodili, nie však u myší, ktoré viackrát prekonali tehotenstvo a ani u myší s podaným chemokarcinogénom [18]. V modeli NMU-indukovanej mamárnej tumorigénzy u potkanov, 4-HPR podávaný v potrave (2 mM/kg) selektívne potlačil vznik a progresiu hyperplastických lézií a karcinómov in situ v terminálnych koncových zakončeníach

mliečnych žliaz [19]. Zvýšenie chemopreventívneho efektu 4-HPR možno dosiahnuť súčasným podávaním s inou látkou s onkostatickým účinkom. Kombinácia 4-HPR a tamoxifénu účinnejšie inhibovala vznik NMU-indukovaných adenokarcinómov mliečnej žľazy u potkanov v porovnaní so samostatnou aplikáciou týchto látok [20]. Kombinácia 4-HPR a tamoxifénu u potkanov s chemicky indukovanou karcinogénou, ktorým boli chirurgicky odstránené prvé palpovateľné tumory, bola efektívnejšia ako podanie len jednej z týchto látok. Podobne 4-HPR podávaný ovariektomovaným potkanom lepšie potláča vznik tumorov mliečnej žľazy ako samotná ovariektómia alebo podávanie 4-HPR u intaktných potkanov [18]. Fenretinid vystupuje nielen ako chemopreventívna látka, ale aj ako terapeutikum. Vysoké dávky podávané potkanom s NMU-indukovanými mamárnymi tumormi viedli k úplnej regresii lézií v 22% prípadov a k čiastočnej regresii v 19% prípadov. Bol účinný aj v inhibícii rastu už vzniknutých DMBA-indukovaných tumorov mliečnej žľazy potkanov [18].

V kultúrach buniek MCF-7 a T47D (obe estrogén receptor-pozitívne línie), ale aj u estrogén receptor-negatívnej línie BT20, kombinácia 4-HPR s tamoxifénom alebo s interferónom β inhibovala viac ich rast ako podávanie týchto látok jednotlivo. U inej estrogén receptor-negatívnej línie MDA-MB231 bol 4-HPR neefektívny, ale v kombinácii s tamoxifénom alebo s IFN- β bol pozorovaný synergický účinok, čo naznačuje, že fenretinid môže účinkovať nezávisle od špecifických retinoidových receptorov [21].

V chemoprevencii rakoviny mliečnej žľazy sa uplatňuje aj kyselina all-trans retinová (ATRA). ATRA inhibovala NMU-indukovanú mamárnu karcinogézu u samíc potkanov [16]. U estrogén-pozitívnych MCF-7 buniek ľudského mamárneho karcinómu potláčala nielen ich rast [22] ale aj ich invazívnosť [23].

Ďalšou skupinou retinoidov účinných v supresii mamárnej tumorigenézy sú retinyl étery. Retinyl metyl éter potláča vznik tumorov mliečnej žľazy indukovaných chemokarcinogénom, je však toxický, preto pre chemoprevenciu sú vhodnejšie retinyl-2-propynyl éter a 3,4,5-trimetoxybenzyl éter (RTMBE). Obe spomenuté látky inhibujú rast NMU-indukovaných mamárných tumorov u potkanov. RTMBE je minimálne taký efektívny ako RA, výhodou je jeho veľmi nízka toxicita. Dosahuje vysoké koncentrácie v mamárnom tkanive, súčasne sa menej kumuluje v pečeni [24]. V prevencii mamárnej karcinogenézy u potkanov sa uplatnili aj iné retinoidy, napr. axerofén a temarotén, ako málo aktívne sa ukázali retinol, retinylpalmitát, kyselina 13-cis retinová, retinyl butyl éter, N-etylretinamid, N-(2-hydroxyetyl)retinamid, etretinát [25].

Retinoidy v klinickom výskume

Významnou vlastnosťou 4-HPR, najčastejšie študovaného retinoidu v chemoprevencii rakoviny prsníka, je jeho akumulácia v tkanive mliečnej žľazy a prijateľný toxický profil. National Tumour Institute v Miláne uskutočnil štúdiu (1987-1992), v ktorej testoval efekt každodenného

podávania 200 mg 4-HPR počas 5 rokov u žien s 1. štádiom rakoviny prsníka vo veku 30 – 70 rokov. V 3. fáze chemopreventívnej štúdie 4-HPR preukázal zreteľnú redukciu sekundárnych nádorov prsníka u premenopauzálnych žien s predchádzajúcou včasnou rakovinou prsníka alebo s DCIS. 4-HPR sa ukázal efektívny pri potláčaní rizika ipsilaterálneho aj kontralaterálneho nádoru prsníka. Tento výsledok bol spojený s poklesom cirkulujúcich hladín inzulín-podobného rastového faktora-1 (IGF-1) u premenopauzálnych žien. Tento parameter, ako kľúčový regulátor apoptózy a proliferácie, je spájaný s nárastom rizika rakoviny prsníka u mladších žien. U postmenopauzálnych žien 4-HPR neovplyvnil výskyt sekundárnych nádorov prsníka ani hladiny IGF-1 [26,27]. Kombinácia 4-HPR s tamoxifénom u rizikových premenopauzálnych žien sa ukázala klinicky bezpečná a dobre tolerovaná, zvlášť pri použití nízkych dávok antiestrogénu [28, 29].

Rexinoidy

Nové retinoidy – selektívne RXR retinoidy (rexinoidy) v porovnaní s retinoidmi viažucimi sa na RAR, veľmi efektívne potláčajú mamárnu karcinogézu pri minimálnej toxicite. Rexinoid bexaroten (LGD1069) potlačil v modelových štúdiách tak estrogén receptor (ER)-negatívne, ako aj ER-pozitívne mamárne tumory u samíc potkanov alebo u erbB2 transgénnych myší [30,31]. U ER-negatívnych tumorov rexinoidy potláčajú rast premalígnych mamárných buniek prostredníctvom blokády bunkového cyklu v G1 fáze, kde sa uplatňuje znížená expresia RAR-beta, cyklínu D a COX-2. Bexaroten v normálnych ľudských mamárných epiteliálnych bunkách výrazne redukoval expresiu COX-2, čiastočne aj prostredníctvom represie transkripčného faktora AP-1 [32]. Experimentálne štúdie mamárnej karcinogenézy poukazujú na aditívne účinky bexaroténu s tamoxifénom [33], melatonínom [34], resp. s paklitaxelom [35].

Bexaroten sa v klinickej praxi využíva v liečbe kožných T-bunkových lymfómov. Efektivita a bezpečnosť bexarotenu bola hodnotená aj u 148 pacientov s metastatickou rakovinou prsníka [36]. Rexinoid v tejto štúdii vykázal iba limitované účinky u ochorenia, približne 20% pacientov zaznamenalo klinický benefit. Iba u dvoch žien sa pozorovali vážnejšie nežiaduce účinky. V súčasnosti prebieha ďalšia klinická štúdia, do ktorej sú zaradené ženy s rizikom rakoviny prsníka, sú nositeľkami potvrdených mutácií BRCA1 alebo BRCA2, resp. majú vyše 10%-né riziko nositeľstva týchto mutácií.

Ďalší nový rexinoid LG100268 je tiež veľmi nádejný pre liečbu a prevenciu mamárnej karcinogenézy. Kombinovaná aplikácia LG100268 a arzoxifénu bola efektívna v experimentálnom modeli u ER-pozitívnej rakoviny prsníka *in vivo*, aj *in vitro* [37]. V mamárných nádorových bunkových líniiach táto kombinácia farmák vyvolávala apoptózu ako dôsledok zvýšenia TGF-beta pomocou arzoxifénu, resp. prostredníctvom LG100268 potláčala nukleárny faktor kB a signálnu dráhu spojenú s PI3K. LG100268 mal tumorsupresívny účinok aj v ďalších experimentálnych štúdiách modelujúcich mamárnu karcinogézu [38, 39].

Bexarotén a retinyl acetát aplikované samostatne a v kombinácii s melatonínom v chemoprevenčii v mamárnej karcinogéze u samíc potkanov

Naša pracovná skupina testovala chemopreventívny účinok rexinoidu bexaroténu, ktorý bol aplikovaný samostatne a v kombinácii s pineálnym hormónom melatonínom v NMU-modeli premenopauzálnnej rakoviny mliečnej žľazy u potkanov [34]. V ďalších dvoch experimentoch sme testovali onkostatiký účinok RA samostatne i v kombinácii s melatonínom v rovnakom modeli pri použití tak NMU, ako aj DMBA [40, 41]. V experimentoch boli použité samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (AnLab, Praha, Česká republika) vo veku 35 ± 2 dni. Bexarotén (Eisai Ltd., Londýn, UK) bol podávaný orálne, 3 razy do týždňa v priemernej dávke 27 mg/kg telesnej hmotnosti, retinylacetát (Sigma, Deisenhofen, Nemecko) bol perorálne podávaný denne v dávke 8,2 mg na zviera, obe látky počas celého pokusu. Melatonín (MEL, Biosynth, Staad, Švajčiarsko) bol podávaný denne medzi 15.00 – 8.00 hod. v dávke 20 µg/ml pitnej vody tiež počas celého experimentu. Chemoprevenčia všetkými tromi farmakami začala približne 10 dní pred podaním karcinogénu a následne trvala 15 – 20 týždňov až do konca experimentu.

Porovnaním voči kontrole, bexarotén samotný ale zvlášť v kombinácii s MEL signifikantne redukoval incidenciu (o 22%, resp. 69%) a frekvenciu tumorov na skupinu (o 69%, resp. 81%) v mamárnej karcinogéze u potkanov.

V pokuse sme pozorovali vplyvom liečby bexaroténom samotným či v kombinácii s MEL zreteľný posun od slabšie diferencovaných k dobre diferencovaným karcinómom [34]. V DMBA modeli mamárnej karcinogézy, RA aplikovaný samostatne signifikantne znížil incidenciu o 81%, frekvenciu nádorov na skupinu o 54% a signifikantne predĺžil latenciu o 38 dní voči kontrolným zvieratám. RA v kombinácii s MEL znížil signifikantne frekvenciu nádorov na skupinu o 75% voči kontrolám [41]. V NMU modeli samostatne aplikovaný RA predĺžil latenciu nádorov o 15 dní voči kontrolám, kombinovaná aplikácia s MEL však bola výrazne efektívnejšia. Signifikantne predĺžila latenciu o 28 dní a signifikantne znížila frekvenciu nádorov o 74% a incidenciu o 58% voči zvieratám v kontrolnej skupine [40].

Záver

Výsledky experimentálnych a klinických štúdií zreteľne poukazujú na tumorsupresívne účinky retinoidov v mamárnej karcinogéze. Na rozdiel od selektívnych modulátorov estrogénového receptora, retinoidy na základe mechanizmu účinku potláčajú rast aj ER-negatívnych tumorov. Vzhľadom na túto skutočnosť môže byť kombinovaná aplikácia retinoidov s inými onkostatikami pôsobiacimi látkami u rakoviny prsníka pre klinickú prax veľmi prínosná.

V modelových štúdiách bola pozorovaná vysoká efektivita selektívnych RXR-retinoidov v tumorigéze, súčasne aj nižšia toxicita v porovnaní so selektívnymi RAR-ligandami. Rexinoidy sú preto príslušom pre liečbu a chemoprevenciu rakoviny prsníka; potrebné sú však ďalšie štúdie, ktoré tento účinok potvrdia.

Literatúra

1. Fanjul A, Dawson M, Hobbs P, et al. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 1994; 372: 107-111.
2. Zouboulis CC, Korge BP, Mischke D, Orfanoc CE. Altered proliferation, synthetic activity, and differentiation of cultured human sebocytes in the absence of vitamin A and their modulation by synthetic retinoids. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 143-152.
3. Zouboulis CC, Korge BP, Akamatsu H, et al. Effects of 13-cis-retinoic acid, all-trans retinoic acid and acitretin on the proliferation, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 792-797.
4. Rulcová J. Terapeutické postupy v dermatovenerológii. *Acne vulgaris*. *Čs Derm* 2006; 81: 4-12.
5. Petkovich M, Brandt NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; 330: 444-450.
6. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990; 345: 224-229.
7. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, et al. Retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992; 68: 1-20.
8. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. The retinoid receptors. In: Sporn M, Roberts B, Goodman D. (eds), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Raven Press: New York 1994; 319-349.
9. Fisher GJ, Talwar HS, Xiao JH, et al. Immunological identification and functional quantitation of retinoic acid and retinoid X receptor protein in human skin. *J Biol Chem* 1994; 269: 20629-20635.
10. Miller WH. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 1998; 8: 1471-1482.
11. Mestra JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, et al. Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2890-2895.
12. Rogers M, Berestecky JM, Hossain MZ, et al. Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein. *Mol Carcinogenesis* 1990; 3: 335-343.
13. Moon RC, Grubbs CJ, Sporn MB. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis by retinyl acetate. *Cancer Res* 1976; 36: 2626-2630.

14. Mc Cormick DL, Burns FJ, Albert RE. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by short dietary exposure to retinyl acetate. *Cancer Res* 1980; 40: 1140-1143.
15. Welsch CW, DeHoog JV, Moon RC. Lack of an effect of dietary retinoids in chemical carcinogenesis on the mouse mammary gland: inverse relationship between mammary tumor cell anaplasia and retinoid efficacy. *Carcinogenesis* 1984; 5: 1301-1304.
16. Moon RC, Mehta RG. Chemoprevention of experimental carcinogenesis in animals. *Prev Med* 1989; 18: 576-591.
17. Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, et al. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, a new retinoid for the prevention of the breast cancer in the rat. *Cancer Res* 1979; 39: 1339-1346.
18. Moon RC, Mehta RC, Rao KVM. Retinoids and cancer in experimental animals. In: Sporn M. B., Roberts A. B., Goodman D. S., (eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Raven Press: New York 1994; 573-593.
19. Green A, Shilkaitis A, Christov K. 4-(Hydroxyphenyl)retinamide selectively inhibits the development and progression of ductal hyperplastic lesions and carcinoma in situ in mammary gland. *Carcinogenesis* 1999; 8: 1535-1540.
20. Moon RC, Kelloff GJ, Detrisac CJ, et al. Chemoprevention of MNU-Induced mammary tumors in the mature rat by 4-HPR and tamoxifen. *Anticancer Res* 1992; 12: 1147-1154.
21. Coradini D, Biffi A, Pellizzaro C, et al. Combined Effect of Tamoxifen or Interferon- α and 4-Hydroxyphenylretinamide on the Growth of Breast Cancer Cell Lines. *Tumor Biol* 1997; 18: 22-29.
22. Dawson MI, Chao W, Pine P, et al. Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor α with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF-7 mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 4446-4451.
23. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, van Roy FM, et al. Activation of the E-cadherin/catenin complex in human MCF-7 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid. *Br J Cancer* 1995; 72: 1447-1453.
24. Shealy YF, Frye JL, Hill DL, et al. Retinyl substituted benzylethers. Inhibition of mammary carcinogenesis by retinyl 3,4,5-trimethoxybenzyl ether (RTMBE). *Anti-Cancer Drug Des* 1998; 13: 159-182.
25. Moon RC, Mehta RG, Detrisac CJ. Retinoids as chemopreventive agents for breast cancer. *Cancer Det Prev* 1992; 16: 73-80.
26. Veronesi U, De Palo G, Marubini E, et al. Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91: 1847-1856.
27. Torrisi R, Decensi A, Formelli F, et al. Chemoprevention of breast cancer with fenretinide. *Drugs* 2001; 61: 909-918.
28. Decensi A, Bonnani B, Guerrieri-Gonzaga A, et al. A randomized 2x2 biomarker trial of low-dose tamoxifen and fenretinide in premenopausal women at high risk for breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 22(14S): 1001.
29. Zanardi S, Serrano D, Argusti A, et al. Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. *Endocr Rel Cancer* 2006; 13: 51-68.
30. Gottardis MM, Bischoff ED, Shirley MA, et al. Chemoprevention of mammary carcinogenesis by LGD1069 (Targretin): an RXR-selective ligand. *Cancer Res* 1996; 56: 5566-5570.
31. Wu K, Kim HT, Rodriguez JL, et al. Suppression of mammary tumorigenesis in transgenic mice by the RXR-selective retinoid, LGD1069. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2002; 11: 467-474.
32. Kong G, Kim HT, Wu K. et al. The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, down-regulates cyclooxygenase-2 expression in human breast cells through transcription factor crosstalk: implications for molecular-based chemoprevention. *Cancer Res* 2005; 65: 3462-3469.
33. Bischoff ED, Gottardis MM, Moon TE, et al. Beyond tamoxifen: The retinoid X receptor-selective ligand LGD1069 (TARGRETIN) causes complete regression of mammary carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 479-484.
34. Orendas P, Kubatka P, Kajo K, et al. Melatonin enhanced bexarotene efficacy in experimental mammary carcinogenesis. *Neoplasma* 2012; 59: 469-474.
35. Yen WC, Prudente RY, Lamph WW. Synergistic effect of a retinoid X receptor-selective ligand bexarotene (LGD1069, Targretin) and paclitaxel (Taxol) in mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88: 141-148.
36. Esteva FJ, Glaspy J, Baidas S, et al. Multicenter phase II study of oral bexarotene for patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 999-1006.
37. Rendi MH, Suh N, Lamph WW, et al. The selective oestrogen receptor modulator arzoxifene and the rexinoid LG100268 cooperate to promote transforming growth factor beta-dependent apoptosis in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 3566-3571.
38. Liby K, Rendi M, Suh N, et al. The combination of the rexinoid, LG100268, and a selective estrogen receptor modulator, either arzoxifene or acolbifene, synergizes in the prevention and treatment of mammary tumors in an estrogen receptor-negative model of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5902-5909.
39. Suh N., Lamph W. W., Glasebrook A. L., et al.: Prevention and treatment of experimental breast cancer with the combination of a new selective estrogen receptor modulator, arzoxifene, and a new rexinoid, LG 100268. *Clin. Cancer Res.*, 8, 2002, 3270-5.
40. Bojková B, Kubatka P, Móciková K, et al. Effects of retinyl acetate and melatonin on N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis. A preliminary report. *Folia Biol Praha* 2000; 46: 73-76.
41. Ahlersová E, Ahlers I, Kubatka P, et al. Melatonin and retinyl acetate as chemopreventives in DMBA-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Folia Biol Praha* 2000; 46: 69-72.