

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.74-008.931-07

Л.М. БЕРШТЕЙН, А.А. ЛАРИОНОВ, О.Г. КРЮКОВА, В.А. КОЧНЕВ,
В.Ф. СЕМИГЛАЗОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ АРОМАТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург

Образование женских половых гормонов — эстрогенов из андрогенных предшественников происходит под влиянием ароматазного (эстрогенсинтазного) ферментного комплекса, относимого к классу цитохромов Р-450, в специализированных стероидпродуцирующих органах (гонады, надпочечники, плацента) и в так называемых местах экстрагонадного синтеза, т.е. в периферических тканях [8, 9]. Среди последних особая и, как предполагается, равная роль в указанном отношении принадлежит жировой и мышечной ткани [5, 9]. Между тем анализу скелетной мускулатуры в этом плане по существу не уделялось должного внимания.

В одной из двух известных пока работ осуществлялась внутривенная инфузия андрогенных предшественников ^3H -7-андростендиона или ^3H -7-тестостерона вместе соответственно с ^{14}C -4-эстроном или С-4-эстрадиолом 15 здоровым мужчинам. Через определенное время брали кровь из глубоких вен плечевого пояса, дренирующих преимущественно мышцы, и из соответствующих поверхностных вен, дренирующих преимущественно жировую ткань, и рассчитывали фракционную конверсию андрогенов в эстрогены [5]. В другой работе мышечную ткань получали при аутопсии у 5 женщин и 4 мужчин, умерших от рака, инфаркта миокарда или несчастного случая. Активность ароматазы оценивали *in vitro* по превращению ^3H -1,2,6,7-андростендиона в эстрон; основной вывод исследования сводился к тому, что интенсивность ароматизации андрогенов в мышечной ткани близка таковой в жировой ткани [6].

Таким образом, очевидно, что непосредственного изучения ароматазной активности в мышечной ткани, полученной прижизненно, до сих пор не проводилось. Для понимания важности проблемы хотелось бы дополнительно отметить, что: а) после существенного снижения функциональной активности яичников в менопаузе образование эстрогенов в женском организме происходит преимущественно экстрагонадно, роль мышечной ткани в этом процессе пока не выяснена; б) повышение массы тела может происходить за счет увеличения как содержания жира в теле, так и величины тощей массы, в результате чего могут возникать различные типы макросомии [1]. Некоторые формы ожирения сопровождаются нарастанием доли тощей массы, другие — нет [4]. Тошная масса наряду с костями представлена преимущественно мышечной тканью, вклад последней в развитие гиперэстрогении, нередко сопутствующей избыточной массе тела, пока неясен. Целью настоящего исследования была попытка дать ответ на некоторые из сформулированных здесь вопросов, а также подобрать оптимальные условия для оценки ароматазной активности в мышечной ткани.

Методика. Мышечную ткань для исследования (главным образом *m.pectoralis major*, а также *m.dorsalis longus*, *m.deltoides brachii* и *m.quadriceps femoris*) получали во время оперативного вмешательства у 14 женщин (12 из которых страдали раком молочной железы и 2 — мягкоткаными новообразованиями) и 2 мужчин (опухоль мягких тканей, рак почки). Возраст обследуемых варьировал от 36 до 70 лет (женщины) и от 57 до 70 лет (мужчины). У 4 обследованных женщин сохранялся нормальный менструальный цикл и операция была произведена на 14—21-й день от начала цикла, у 2 женщин отмечалась аменорея длительностью 3—4 мес и еще 8 женщин находились в менопаузе длительностью от 3 до 17 лет. Непосредственно после получения материал переносили в лабораторию и сохраняли до момента определения ароматазной активности в жидком азоте. После размораживания ткань гомогенизировали в 12,5 мМ калийфосфатном буфере, гомогенат подвергали центрифугированию в течение 15 мин при 2000 об/мин и в полученной надосадочной жидкости исследовали активность ароматазы по высвобождению тяжелой воды ($^3\text{H}_2\text{O}$) из андрогенного предшественника ^3H -1-бета-андростендиона [2, 10]. В работе использовали ^3H -1-бета-андростендион фирмы "New England Nuclear" с удельной активностью 24,5 Ки/ммоль. Белок в образцах надосадочной жидкости, взятой для исследования, определяли по

методу Лоури. В части экспериментов *in vitro* использовали ингибиторы ароматазы аминоклутетимид ("CIBA-Geigy", 10 мкмоль) и CGS-16949A, фадрозол ("CIBA-Geigy", 1 мкмоль), которые добавляли к тестируемым образцам надосадочной жидкости гомогенатов мышечной ткани непосредственно перед началом реакции. У всех обследуемых измеряли массу и рост и по формулам, рекомендованным Barter и Forbes [4], рассчитывали величину тощей массы (в кг), долю (процент) тощей массы от массы тела и процентное содержание жира в теле. Статистическую обработку результатов осуществляли на IBM-совместимом персональном компьютере методами параметрической (с использованием критериев *t* и *P* по Стьюденту) и непараметрической (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) статистики.

Результаты и обсуждение. В итоге трех предварительных экспериментов, проводившихся с 25, 50, 100, 250 и 500 мг мышечной ткани, была продемонстрирована практически линейная зависимость активности ароматазы (по высвобождению $^3\text{H}_2\text{O}$) от массы взятого для исследования образца (рис. 1). Разброс результатов от средней ($\pm 8\%$) был минимальным при взятии навески 500 мг, однако из практических соображений более оправданным и оптимальным представляется использование 250 мг мышечной ткани, что и имело место в последующих опытах. При сравнении 1- и 2-часовой длительности инкубационного периода мы остановили свой выбор на последней преимущественно из-за большей достоверности получаемых при этом результатов. Все остальные параметры, включая количество (концентрацию) андрогенного предшественника, НАДФ-Н, глюкозо-6-фосфата и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, соответствовали использовавшимся нами ранее при оценке конверсии андростендиона в лимфоцитах крови [2].

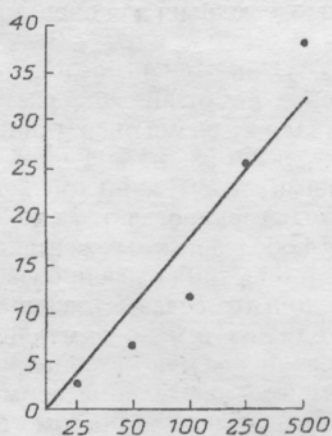


Рис. 1. Зависимость активности ароматазы, оцениваемой по высвобождению $^3\text{H}_2\text{O}$ из андрогенного предшественника, от массы взятого для исследования образца мышечной ткани.

По оси ординат — активность ароматазы (в фмоль/мг белка/ч), по оси абсцисс — навеска мышечной ткани (в мг); представлены объединенные данные 3 экспериментов.

По полученным в настоящем исследовании данным, среднее значение активности ароматазы в мышечной ткани обследованных женщин равнялось ($M \pm m$) $6,24 \pm 1,79$ фмоль/мг белка/ч, а в мышечной ткани мужчин — $3,09 \pm 0,16$ фмоль/мг белка/ч. Различий по величине этого показателя между женщинами в возрасте до 50 лет (6 человек, средний возраст $44,2 \pm 2,0$ года) и старше 50 лет (8 человек, средний возраст $59,1 \pm 2,3$ года) обнаружить не удалось (соответственно $5,53 \pm 3,19$ и $6,79 \pm 2,44$ фмоль/мг белка/ч). В то же время если у женщин с сохраненным менструальным циклом активность ароматазы в мышечной ткани равнялась $2,54 \pm 0,98$ фмоль/мг белка/ч, то в группе женщин, находящихся в менопаузе, данный показатель был на уровне $6,79 \pm 2,44$ фмоль/мг белка/ч, а в объединенной группе “менопауза + аменорея” — $7,74 \pm 2,14$ фмоль/мг белка/ч ($p < 0,05$ в сравнении с группой женщин с сохраненным менструальным циклом). При менопаузе длительностью менее 5 лет ароматазная активность мышечной ткани была равна $3,57 \pm 2,28$ фмоль/мг белка/ч, при длительности менопаузы 5—10 лет — $12,77 \pm 5,52$ фмоль/мг белка/ч, более 10 лет — $2,92 \pm 1,72$ фмоль/мг белка/ч (наглядное изображение результатов, полученных в этой части исследования, представлено на рис. 2).

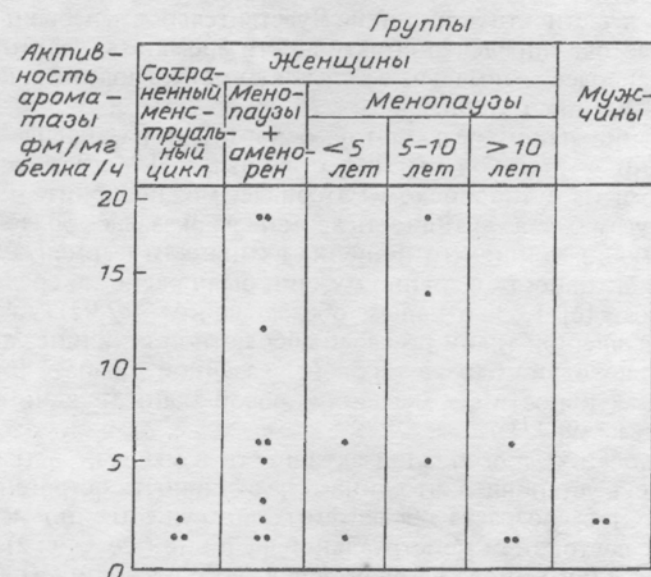


Рис. 2. Зависимость результатов исследования от менструального статуса и пола обследуемых.

По оси ординат — активность ароматазы (в фмоль/мг белка/ч), по оси абсцисс — группы обследованных лиц.

У женщин с избытком массы тела над “идеальным” значением (рост — 100) $> + 10\%$ (4 человека) активность ароматазы в мышечной ткани равнялась $12,19 \pm 4,64$ фмоль/мг белка/ч, а при избытке массы тела мень-

ше этого критерия — $4,81 \pm 1,30$ фмоль/мг белка/ч. При увеличении тощей массы в теле женщин более 45 кг исследуемый параметр был равен $6,83 \pm 3,90$ фмоль/мг белка/ч, а при величине тощей массы менее 45 кг — $5,92 \pm 2,15$ фмоль/мг белка/ч. С другой стороны, при учете доли тощей массы в теле (в процентах) или обратного ей процентного содержания жира в теле оказалось, что ароматазная активность мышечной ткани у женщин с содержанием жира в теле $> 29,7\%$ (7 человек) равна $8,09 \pm 2,79$ фмоль/мг белка/ч, а при его содержании $< 27,7\%$ (7 человек) — $4,42 \pm 1,82$ фмоль/мг белка/ч. Результаты, полученные у мужчин, в этом отношении не сравнивались из-за малого числа обследованных в группе.

При оценке эффекта ингибиторов ароматазы *in vitro* (6 экспериментов) подавление активности фермента под влиянием аминоклутетимида было зафиксировано в двух случаях, а под влиянием CGS-16949A — в одном, причем при использовании аминоклутетимида в обоих отмеченных случаях мышечная ткань бралась у больных раком молочной железы, в то время как в других опытах — у больных раком почки и мягкоткаными новообразованиями.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что мышечная ткань должна рассматриваться не просто как ткань-мишень для различных гормональных эффектов, но и как место активного метаболизма и продукции гормонов, в частности эстрогенов. Чувствительность избранного биохимического метода определения активности ароматазы достаточно высока, однако наиболее оптимальные результаты можно получить, используя не менее 250—300 мкг материала.

При сравнении наших результатов, основанных на анализе прижизненно полученных участков мышцы, с данными Н. Matsumine и соавт. [6], собранными на аутопсийском материале, можно прийти к выводу, что в том и другом случае активность ароматазы оказалась более высокой в мышечной ткани женщин (отношение активности фермента в группе женщин и его активности в группе мужчин было равно по средним значениям в работе [6] 1,83, в нашем обследовании — 2,02). Активность ароматазы в мышечной ткани по своей абсолютной величине, по нашим наблюдениям, довольно близка таковой, указанной в работе [6], но несколько ниже активности фермента в жировой ткани и ткани опухолей молочной железы [9, 11].

При исследовании ароматазной активности в мышечной ткани женщин нам удалось установить, что динамика активности эстрогенсинтазы мало зависит от возраста обследуемых, но существенно меняется в соответствии с состоянием менструальной функции (см. рис. 2). Выключение менструального цикла в целом совпадает с нарастанием ароматазной активности в скелетной мускулатуре, однако существенную роль при этом играет время, прошедшее с момента наступления менопаузы. Тот факт, что зависимость от длительности менопаузы условно представляет собой обращенную вверх параболу с максимумом, приходящимся на период 5—10 лет от начала менопаузы, безусловно, заслуживает дальнейшего анализа и, возможно, свидетельствует о том, что именно к 5-му году менопаузы, т.е. к моменту, когда функция яичников (оцениваемая по продукции классических эстрогенов) практически угасает, мышечная ткань начинает более активно участвовать в экстрагонадном синтезе эстрогенов. С другой стороны, в связи с продолжающимся старением женского

организма и мышечной ткани, в частности по прошествии 10 лет и более после наступления менопаузы, способность скелетной мускулатуры к биосинтезу эстрогенов может постепенно ослабевать.

Еще одним фактором, увязанным с изменением ароматазной активности в скелетной мускулатуре женщин, оказался избыток массы тела, преимущественно за счет ее жирового компонента. Эти сведения могут оказаться полезными не только в отношении поиска регуляторов, обеспечивающих подобное изменение активности ароматазы при повышении массы, происходящем за счет того или иного компонента состава тела, но и для понимания механизмов развития гиперэстрогении при ожирении и увеличении объема мышечной массы [1]. Продолжая накапливать материал, мы планируем непосредственно сопоставить активность ароматазы в мышечной ткани с содержанием эстрогенов в крови обследуемых лиц, а также с уровнем их физической активности и с превалирующим типом мышечных волокон во взятом материале, прежде всего потому, что типом последних в значительной степени определяется чувствительность скелетной мускулатуры к инсулину [12] и потому, что инсулин вовлечен не только в формирование различных типов макросомии [1], но и в регуляцию стероидогенеза [7].

Неспособность ингибиторов ароматазы вызвать в большинстве проведенных экспериментов подавление активности фермента связана, скорее всего, не столько с тем, что в опытах использовалась мышечная ткань не здоровых людей, а больных с различными локализациями опухолевого процесса, сколько с особенностями постановки реакции, когда препараты добавляли к надосадочной жидкости гомогената мышечной ткани в водном (аминоглутетимид) или слабоспиртовом (CGS-16949A) растворе на относительно непродолжительное время (2 ч); очевидно, более оправданным является использование тех же ингибиторов в условиях краткосрочной (24-часовой) органной культуры мышечной ткани, подобно тому как это делается в отношении других тканей [3]. Тем не менее вопрос о том, не имеется ли различий в базальной активности ароматазы и в реакции последней на ингибиторы и стимуляторы в мышечной ткани здоровых людей и онкологических больных, не является банальным и заслуживает дальнейшего изучения.

Выполнение настоящего исследования стало возможным благодаря гранту (11125a) Российского фонда фундаментальных исследований. Авторы выражают свою признательность также проф. R.Santen (Детройт, США) и проф. R.Vihko (Оулу, Финляндия) за предоставление необходимых для работы количеств андрогенного предшественника Н-1-бета-андростендиона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л.М. // Успехи соврем. биол. — 1991. — Т. 111. — С. 765-781.
2. Berstein L.M., Santner S.J., Brodie A. et al. // J. Steroid Biochem. — 1993. — Vol. 44. — P. 647-649.
3. Dowsett M., Macaulay V., Gledhill J. et al. // Ibid. — P. 605-609.
4. Forbes G.B. Human Body Composition: Growth, Aging, Nutrition and Activity. — New York; Berlin, 1987.
5. Longcope Ch., Pratt J.H., Schneider S.H., Fineberg S.E. // J. clin. Endocr. — 1978. — Vol. 46. — P. 146-150.
6. Matsumine H., Hirato K., Yanaihara T. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 63. — P. 717-720.

7. *Poretsky L., Kalin M.F.* // *Endocr. Rev.* — 1987. — Vol 8. — P. 132-141.
8. *Santen R.* // *Breast Cancer Res. Treat.* — 1986. — Vol. 7. — P. 23-36.
9. *Simpson E.R., Merill J.C., Hollub A.J. et al.* // *Endocr. Rev.* — 1989. — Vol. 10. — P. 136-148.
10. *Thompson E.A., Siiteri P.K.* // *J. biol. Chem.* — 1974. — Vol. 249. — P. 5364-5372.
11. *Tilson-Mallett N., Santner S.J., Fiel P.D., Santen R.J.* // *J. clin. Endocr.* — 1983. — Vol. 57. — P. 1125-1128.
12. *Wade A.J., Marbut M.M., Round J.M.* // *Lancet.* — 1990. — Vol. 335. — P. 805-808.

Поступила 21.09.94

INVESTIGATION OF AROMATASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCLE TISSUE

L.M.Berstein, A.A. Larionov, O.G.Krjukova, V.A. Kochev, V.F.Semiglasov

Activity of aromatase (estrogensynthetase) was investigated in muscle tissue of 14 women and 2 men. The method of hard water release from androgenic precursor ^3H -beta-androstendione was used. In men aromatase activity in muscle tissue is lower than women. For the latter group the enzyme activity is highest after 5-10 year of menopause and in the case of increased body fat content. In the future it looks interesting to correlate muscle tissue aromatase activity level with blood estrogens concentration, prevailing type of muscle fibers and physical activity rate of probands.