

Л.В.Тарасенко, О.Г.Резніков

Патогенетична роль оваріальної ароматази стероїдів у розладах статевої циклічності

В опытах на половозрелых самках крыс с регулярными эстральными циклами изучали влияние ингибитора ароматазы стероидов – летрозолола на активность этого фермента в яичниках и состояние репродуктивной системы. Препарат вводили перорально в дозе 1 мг/кг массы тела, ежедневно на протяжении 10 сут. Под влиянием ингибитора активность ароматазы снижалась в 20,5 раза. У всех животных прерывались эстральные циклы и наступало стойкое состояние анэструса, при этом микроскопическая картина вагинальных мазков соответствовала стадии диэструса. Масса матки снижалась вдвое, яичников – увеличивалась на треть, в них визуально определялись множественные кистоподобные фолликулы. Результаты исследования свидетельствуют о ключевой роли ароматазы стероидов яичников в нарушениях половой цикличности, вызываемых летрозололом. Летрозолол может быть использован для экспериментального моделирования нарушений половой цикличности у самок крыс.

ВСТУП

Однією з найважливіших ознак нормальної діяльності репродуктивної системи самиць ссавців є циклічні морфологічні та функціональні зміни у статевих органах, зокрема яєчниках. Вони супроводжуються регулярними менструальними крововиділеннями (у людей, приматів) або характерними змінами цитологічної картини слизової оболонки вагіни (естральні цикли у гризунів). Існує прямий зв'язок між функціональними розладами яєчників і порушеннями статевої циклічності, які призводять до втрати фертильності. Досить поширена форма такої патології у жінок – синдром полікістозних яєчників (СПКЯ), для якого є характерними порушення фолікулогенезу, ановуляція, неплідність, оліго- та аменорея. Проте синтез естрогенів в організмі та їхній вміст у крові зберігаються нормальними або навіть підвищеними [2]. З іншого боку, первинна недостатність яєчників, наприклад, при синдромі резистентних яєчників або після оварієктомії, також призводить до

аменореї або порушення естральних циклів.

Експериментальні моделі ановуляції широко використовують для вивчення патогенезу та експериментальної терапії СПКЯ та інших розладів оваріально-менструального або естрального циклів. З цією метою використовують постійне освітлення, імплантацію яєчників у середовище зі зниженою температурою, андрогенізацію статевозрілих або новонароджених тварин та інші підходи [1, 3, 4]. Кожна з цих моделей має свої патогенетичні особливості і потребує всебічної характеристики. Наявність різних за етіологією та патогенезом експериментальних моделей СПКЯ виправдана тим, що цей синдром є поліетіопатогенетичним за своєю природою та варіабельним за клінічними проявами (наприклад, супроводжується ожирінням або ні). Це залежить від генетично успадкованих порушень біосинтезу стероїдів у надниркових залозах та яєчниках, синтезу інсуліноподібного фактора росту в яєчниках та інших причин. Отже, вибір адекватної експериментальної моделі СПКЯ має

© Л.В.Тарасенко, О.Г.Резніков

суттєве значення в дослідженнях з репродуктивної ендокринології.

Нещодавно було показано, що полікістоз яєчників у щурів може бути відтворено за допомогою летрозолу – селективного інгібітора ароматази стероїдів [10]. Після його введення у самиць спостерігали порушення естральних циклів, зменшення концентрацій естрадіолу та прогестерону в плазмі крові, підвищений вміст гонадотропінів, зменшення маси матки, в яєчниках – збільшення маси, субкапсулярні кісти, потовщення капсули, неповну лютеїнізацію та зменшення кількості жовтих тіл. Однак патофізіологічна характеристика наведеної моделі залишається неповною, бо автори обмежилися вивченням непрямих показників біосинтезу естрогенів і не досліджували вплив летрозолу на активність ароматази стероїдів, яка є лімітуючим ферментом синтезу естрогенів у оваріальних фолікулах.

Мета нашої роботи – отримати прямі докази гальмівного впливу летрозолу на активність ароматази стероїдів у тканині яєчників і зіставити їх з характеристикою естральних циклів у щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (м.Страсбург, 1986 р.). В дослідках використовували самиць щурів лінії Вістар масою 180–220 г. Тварин утримували в однакових умовах (температура 22–24°C, відносна вологість 50–60 %, світловий режим: темрява – 10 год, світло – 14 год) на стандартному раціоні харчування та вільному доступі до питної води.

Протягом 12 діб до початку експерименту у самиць щурів вивчали статеву циклічність за допомогою щодобового мікроскопічного дослідження вагінальних

мазків, і для подальших досліджень відбирали тварин з нормальними естральними циклами. Надалі протягом десяти діб вони отримували щоранку перорально, через металевий шлунковий зонд, суспензію таблеткової маси летрозолу (фемара “Новартіс Фарма АГ”, Швейцарія) в дозі діючої речовини 1 мг/кг (0,2 мл суспензії на 100 г маси). За даними літератури, ця доза є оптимальною для гальмування продукції естрогенів [6, 10]. Для приготування суспензії використовували гель Дорфмана: 0,5% карбоксиметилцелюлози у 0,9%-му розчині натрію хлориду з доданням 0,4 % твіну-80 (об’ємна частка) та 0,9 % бензилового спирту (об’ємна частка). Контрольні щури отримували тільки гель Дорфмана.

Від початку введення препарату проводили щодобове мікроскопічне дослідження вагінальних мазків. Наступної доби після останнього введення летрозолу тварин декапітували, видаляли яєчники та матку і зважували їх. Самиць контрольної групи забивали у стадії дієструсу, яка відповідала стану дослідних самиць (див. “Результати та їх обговорення”).

Яєчники зберігали у низькотемпературному холодильнику при –20°C до визначення ароматазної активності. При визначенні цього показника всі процедури попередньої обробки тканини (приготування 10 %-го гомогенату яєчників у тріс-НСІ буфері, рН 7,4, одержання мікросомальної фракції за допомогою центрифугування при 1000 г) проводили на льоду (2–4°C). Надосадову фракцію інкубували з 15 пмоль [1,2,6,7 -³H]-тестостерону (“Amersham”, Великобританія) при наявності НАДФН⁺ (“Reanal”, Угорщина) на водяній бані при 37°C протягом 1 год, після чого реакцію зупиняли доданням 1N розчину НСІ на льодяній бані. Продукти реакції екстрагували з інкубату сумішшю бензолу з етанолом (9 : 1). Розділення стероїдних продуктів реакції проводили за допомогою двомірної хро-

матографії в тонкому шарі силікагелю (пластини Silica gel 60 F₂₅₄ фірми “Merck”, Німеччина) у взаємно перпендикулярних напрямках в системах бензол – етилацетат (4 : 1) і бензол – ацетон – етанол (4 : 1 : 0,25). Плям, що відповідала естрадіолу, виявляли обприскуванням хроматограми сумішшю оцтової та сірчаної кислот з анісовим альдегідом (50 : 1 : 0,5) з наступним проявленням при 110°C. Плям естрадіолу вирізали, стероїд елюювали метанолом, додавали до флакону сцинтиляційну рідину та підраховували радіоактивність у β-спектрометрі (“Beckman” LS 500TA) протягом 1 хв. Ароматазну активність виражали у пікомолях естрадіолу, утвореного з тестостерону за час інкубації, в розрахунку на 1 г тканини яєчників, 1 г білка та на орган. Вміст білка у тканині яєчників визначали за методом Лоурі.

Результати статистично обробляли з використанням критерію t Стьюдента. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідних самиць уже через 3–4 доби введення летрозолу порушувались естральні цикли. До кінця першого тижня циклічність у них повністю переривалась, і у всіх самиць розвивався стан персистентного анеструсу. При цьому мікроскопічна картина вагінальних мазків відповідала стадії дієструсу. Ці спостереження узгоджуються з даними [7] про припинення естральної циклічності у щурів через 2 тиж від початку введення летрозолу.

Під впливом летрозолу у дослідних самиць спостерігалось достовірне збільшення маси яєчників (на 36,2 %) порівняно з самицями контрольної групи, котрі перебували на стадії дієструсу (табл. 1). При цьому зовні яєчники дослідних тварин сильно відрізнялися від норми: вони характеризувалися надмірним кровонаповненням, значною кількістю більших за розміром, ніж у контрольних тварин, кістоподібних фолікулів. Маса матки при цьому удвічі зменшувалася порівняно з контрольними тваринами, що є характерним для дефіциту естрогенів в організмі. Одержані нами результати підтверджують спостереження інших авторів про зниження під впливом введення летрозолу маси матки у щурів на 60 % [6] та про збільшення маси яєчників [10].

Найбільш імовірною причиною репродуктивних порушень у дослідних щурів ми вважали фармакологічну блокаду біосинтезу естрадіолу в яєчниках завдяки гальмуванню ароматазної активності. Результати вимірювання активності ферменту підтвердили це припущення (табл. 2). Введення препарату протягом 10 діб спричинило достовірне зменшення активності ферменту порівняно з нормою у 16,7 раза у перерахунку на 1 г тканини та у 20,5 раза при перерахунку на 1 г білка.

Як відомо, ароматаза є ферментним комплексом, який складається з гемопротеїну цитохрому P450 і флавопротеїну та відповідає за перетворення андрогенів на естрогени, зокрема тестостерону на естрадіол. Окрім яєчників, цей процес відбувається також у жировій тканині, в тканинах головного мозку, хоча і менш інтенсивно, ніж у яєчниках.

Таблиця 1. Маса тіла та органів репродуктивної системи самиць щурів, що отримували інгібітор ароматази летрозол (M ± m; n=7)

Схема досліджу	Маса тіла, г	Маса, мг/100 г	
		Яєчники	Матка
Контроль	206 ± 5,3	36,7 ± 4,7	186,5 ± 16,6
Летрозол	212 ± 8,8	50,0 ± 3,7	95,2 ± 4,9
	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,001

Таблиця 2. Ароматазна активність в яєчниках щурів після 10-добового перорального введення летрозолу (M ± m; n=7)

Схема досліду	Ароматазна активність, пмоль естрадіолу / год		
	на орган	на 1 г тканини	на 1 г білка
Контроль	0,910 ± 0,293	13,53 ± 3,58	654,72 ± 186,30
Летрозол	0,069 ± 0,021 P < 0,02	0,81 ± 0,23 P < 0,01	32,01 ± 8,41 P < 0,01

Предметом наукового інтересу останніми роками стала група інгібіторів ароматази третього покоління, яка включає два нестероїдні препарати – летрозол і анастрозол – та сполуку стероїдної природи екземестан [5, 8, 9]. Серед зазначених нестероїдних інгібіторів ароматази особливу увагу привертає летрозол, який за своєю інгібуючою здатністю є у 150–250 разів активнішим за аміноглютетимід (інгібітор ароматази першого покоління), у 19 разів більш активний за анастрозол і удвічі – за ворозол (інгібітор ароматази другого покоління) [11]. Дані досліджень *in vitro* показали, що летрозол, на відміну від багатьох інгібіторів ароматази, не впливає на біосинтез інших гормонів, крім естрогенів. Завдяки цьому його досить широко застосовують для лікування естрогенпозитивних форм раку молочної залози. Концентрації летрозолу, що викликають пригнічення продукції прогестерону, кортикостерону і альдостерону, щонайменше у 10000 разів більші, ніж необхідні для терапевтичного зниження вмісту естрогенів [7].

Наші результати щодо здатності летрозолу при застосуванні *in vivo* блокувати в яєчниках біосинтез естрогенів дають змогу пояснити описаний раніше факт багаторазового зменшення концентрації естрадіолу в оваріальній тканині самиць щурів під впливом цього інгібітора [12]. Результати нашого дослідження також свідчать, поперше, що летрозол при застосуванні *in vivo* здійснює безпосередній гальмівний вплив на активність ароматази стероїдів у яєчниках і саме це є безпосередньою причиною наступних розладів естральних циклів. По-

друге, він може бути рекомендований для моделювання порушень статевої циклічності у самиць щурів.

L.V. Tarasenko, A.G. Reznikov

THE ROLE OF THE OVARIAN STEROID AROMATASE IN PATHOGENESIS OF REPRODUCTIVE CYCLES DISORDERS

In the rats with regular estrous cycles effects of letrozole, a steroid aromatase inhibitor, on the enzyme activity in ovarian tissues and reproductive system condition were studied. Letrozole was administered per os daily in a dose of 1 mg/kg b.w. over 10 days. As the result of treatment, 20.5-fold decrease in aromatase activity was obtained. All animals have developed persistent anestrus with vaginal smear patterns being similar to diestrus. Uterine weights were two-fold less than that of controls, and ovarian weights increased by one third. The ovaries contained multiple cystoidal follicles. Results of the study demonstrate the key role of ovarian steroid aromatase in letrozole-induced disorders of reproductive cycles. Letrozole might be recommended for experimental modeling of reproductive cycle disorders in female rats.

Institute of Endocrinology and Metabolism named after V.P.Komisarenko, AMS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вундер П.А., Сметанина М.Д. О механизме возникновения эструса у крыс после трансплантации яичников в среду с пониженной температурой // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1983. – **95**, № 3. – С.103–105.
2. Пищулин А.А., Бутов А.В., Удовиченко О.В. Синдром овариальной гиперандрогении неопухолевого генеза (обзор литературы) // Пробл. репродукции. – 1999. – № 3. – С. 6–19.
3. Резніков О.Г., Сініцин П.В., Тарасенко Л.В., Полякова Л.І. Нейроендокринні механізми розвитку ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження у щурів // Фізіол. журн. – 1995. – **41**, № 5–6. – С. 33–37.
4. Barraclough C.A. Production of anovulatory, sterile rats by single injection of testosterone propionate //

- Endocrinology. – 1961. – **68**. – P.62–67.
5. Bhatnagar A.S. Review of the development of letrozole and its use in advanced breast cancer and in the neoadjuvant setting // Breast. – 2006. – Suppl. 1. – P. 3–13.
 6. Bhatnagar A.S., Batzl C., Hausler A., Nogues V. The role of estrogen in the feedback regulation of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1993. – **47**, № 1-6. – P.161–166.
 7. Bhatnagar A.S., Hausler A., Schieweck K. et al. Highly selective inhibition of estrogen biosynthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor // Ibid. – 1990. – **37**, № 6. – P.1021–1027.
 8. Gradishar W.J. Tamoxifen – what next? // Oncologist. – 2004. – **9**, № 4. – P. 378–384.
 9. Haynes B.P., Dowsett M., Miller W.R. et al. The pharmacology of letrozole // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2003. – **87**, № 1. – P. 35–45.
 10. Kafali H., Iriadam M., Ozardali I., Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease // Arch. Med. Res. – 2004. – **35**, № 2. – P. 103–108.
 11. Odum J., Ashby J. Detection of aromatase inhibitors in vitro using rat ovary microsomes // Toxicol. Lett. – 2002. – **129**, № 1–2. – P.119–122.
 12. Sinha S., Kaseta J., Santner S.J. et al. Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat // Breast Cancer Res. Treat. – 1998. – **48**, № 1. – P.45–51.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка
АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 01.08.2006*