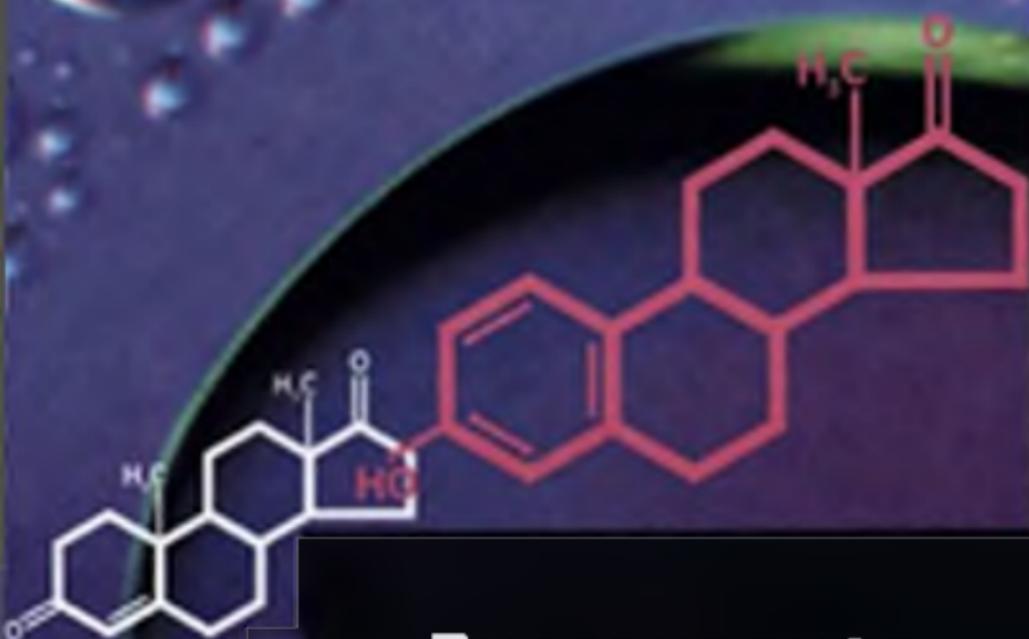


Л. М. Берштейн



# Внегонадная продукция эстрогенов

*(Говорь в физиологии и патологии)*

# **Внегонадная продукция эстрогенов**

## ГЛАВА 1

### Общие вопросы эстрогенообразования. Биохимия ароматазного комплекса; видовые особенности ароматизации

Функционирование репродуктивной системы и у мужчин, и (в особенности) у женщин осуществляется благодаря завораживающему своей сложностью и в то же время четкостью комплексу гормональных взаимодействий. Говоря о принципах работы этой системы, в целях краткости изложения мы, естественно, коснемся лишь базисных оперативных понятий, наиболее тесно связанных с проблемой эстрогенообразования.

У женщин репродуктивного возраста наблюдается определенная цикличность в продукции ряда гормонов, коррелирующая с отдельными фазами менструального цикла. Каждый цикл начинается со стимуляции в яичниках группы примордиальных фолликулов, из которых по мере прогрессирования первой фазы цикла формируется один доминантный фолликул. Увеличивающиеся в результате стимуляции фолликулы продуцируют все большее количество эстрадиола, который в концентрации ниже 200—300 пг/мл оказывает ингибирующее действие на секрецию лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов. При этом недоминантные фолликулы подвергаются атрезии, а в эндометрии выявляются признаки усиления пролиферации. Созревание доминантного фолликула приводит к концентрации эстрадиола в крови, превышающей 200—300 пг/мл, и — как следствие — к предовуляторному выбросу гонадотропин-рилизинг фактора и ЛГ. Овуляция следует после этого в среднем через 20 ч, а фолликул превращается в желтое тело, в котором под влиянием ЛГ секретируются прогестерон и эстрадиол, поддерживающие лютеиновую фазу цикла. Если не наступает беременность, желтое тело в течение следующих 11—15 дней регрессирует. Параллельно снижается секреция прогестерона и эстрадиола, ослабевает кровоснабжение эндометрия и начинается менструация (Spratt, Loughlin, 1990).

Хотя мнение о том, в каких клетках яичника преимущественно происходит продукция эстрогенов, с течением времени менялось, сейчас превалирует точка зрения, которую легче понять, если обратиться к рис. 1. Зрелые фолликулы окружены базальной мембраной, внутри которой располагаются гранулезные клетки, непосредственно контактирующие с яйцеклеткой. Снаружи базаль-

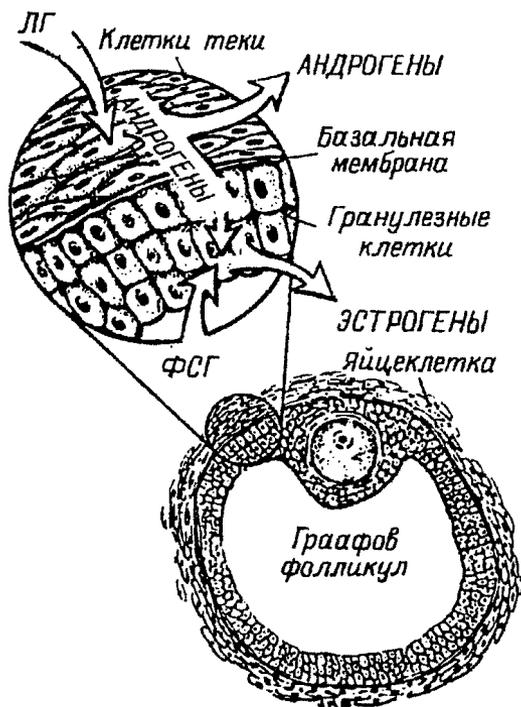


Рис. 1. Созревающий фолликул и синтез эстрогенов в его клетках (по: Spratt, Loughlin, 1990).

ной мембраны локализируются клетки теки. В последних под влиянием ЛГ синтезируются главным образом андрогены (андростендион и тестостерон), которые диффундируют в капиллярную сеть и включаются в общую циркуляцию или через базальную мембрану попадают в клетки гранулезы. В них андрогены под влиянием ФСГ превращаются в эстрогены. Гранулезные клетки являются у женщин и основным местом продукции ингибина и активина — белков, регулирующих продукцию гонадотропинов. Ингибин (гетеродимерный гликопротеидный гормон) секретируется также желтым телом и тканью плаценты. Он оказывает тормозящее действие на секрецию ФСГ гипофизом и обладает рядом паракринных эффектов непосредственно в самих яичниках, влияя, в том числе, на выбор доминантного фолликула (Spratt, Loughlin, 1990; Gosden, Faddy, 1994; Бабичев, 1995). По некоторым данным, клетки теки (особенно ее внутреннего слоя — theca interna) тоже обладают эстрогенсинтезирующей способностью, а в период менопаузы (см. гл. 5) в этом процессе могут принимать участие стромальные клетки яичников (Inkster, Brodie, 1991).

У мужчин нет свойственной женщинам цикличности в продукции гормонов репродуктивной системы. В тестикулах обычно выделяют тубулярный и интерстициальный компартменты, занимающие соответственно 90 и 10 % объема органа. В клетках Лейди-

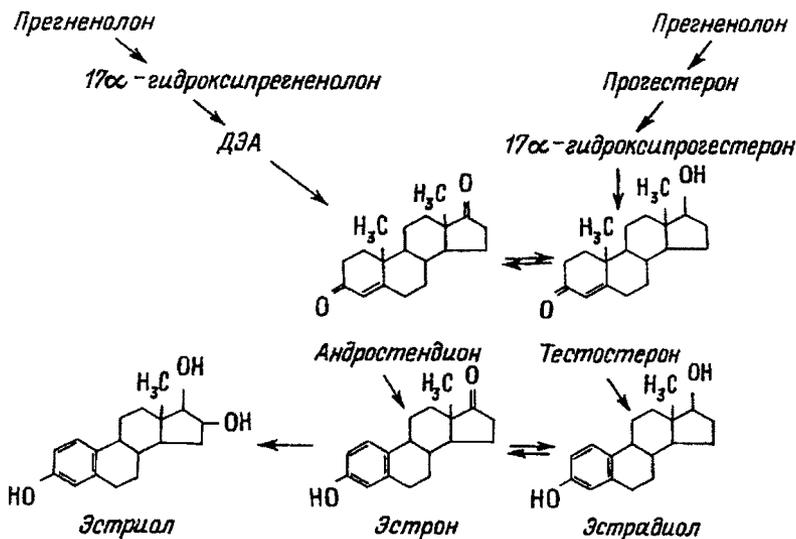


Рис. 2. Основные пути превращения андрогенов в эстрогены.

га, образующих интерстициальный компартмент, продуцируется тестостерон — локальный предшественник дигидротестостерона и эстрадиола, а в клетках Сертоли (выстраивающих наряду с зародышевыми клетками тубулярный отдел тестикул) секретруется ингибин. Клетки Лейдига регулируются преимущественно ЛГ, а клетки Сертоли — ФСГ. Эстрадиол и тестостерон способны независимо друг от друга контролировать продукцию гонадотропин-рилизинг фактора и ЛГ, а ингибин (как и у женщин) подавляет секрецию ФСГ (Nankin et al., 1990).

Таковы общие сведения о репродуктивной системе и гонадной продукции эстрогенов, дополненные информацией о структуре некоторых упоминавшихся стероидов и об основных превращениях их молекул, которые приводят к образованию эстрадиола и эстрона (рис. 2). Исходным и не представленным на рисунке элементом в цепи этих реакций является молекула холестерина, которая через прегненолон, прогестерон и 17-гидроксипрогестерон превращается в андростендион. В коре надпочечников из прегненолона преимущественно образуется 17-гидроксипрегненолон, который через дегидроэпиандростерон также превращается в андростендион. Последний способен превращаться в тестостерон, что (как это будет видно несколько ниже и на примере взаимопревращений эстрона и эстрадиола) делает приведенную схему в определенном смысле условной, хотя и не влияет на вывод о том, что тестостерон является основным предшественником эстрадиола, а андростендион — соответственно эстрона.

Яичники, тестикулы и, по мнению некоторых исследователей, надпочечники являются теми классическими стероидогенными тканями, в которых происходит образование эстрогенов; во время

беременности к ним присоединяется плацента. По существу, из перечисленных органов лишь яичники и тестикулы относятся к гонадам (см. также гл. 4). Тем не менее исторически сложилось так, что продукция эстрогенов всеми четырьмя этими образованиями получила название гонадной, или гландулярной (последним термином подчеркивается скорее эндокринная и компактная в анатомическом смысле природа процесса, чем что-либо иное, поскольку плацента лишь условно может быть названа железой). С конца 50-х гг. стали накапливаться сведения о том, что введение в организм экзогенных андрогенных предшественников сопровождается их ароматизацией (конверсией в эстрогены) в периферических тканях. Этот процесс может быть оценен на основании сведений о количестве радиоактивной метки ( $^3\text{H}$ -эстрон и  $^{14}\text{C}$ -андростендион), введенной внутривенно, и по соотношению  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  во фракции эстрона, выделенного с мочой в течение 3—5 последующих дней (гл. 3). Позднее было доказано, что некоторые из периферических тканей человека действительно обладают необходимой энзиматической (ароматазной) системой для экстрагонадного, или экстрагандулярного, образования эстрогенов, в том числе из эндогенных предшественников (Siiteri, MacDonald, 1973), и предложено в целях лучшего понимания закономерностей локального (тканевого) биосинтеза стероидов и оценки возможностей воздействия на этот процесс обращать больше внимания на интракринологию (Labrie, 1994) в дополнение к эндокринологии.

Таким образом, при совокупной оценке гонадного и экстрагонадного эстрогенообразования следует ориентироваться на различные критерии, среди которых важную роль играют как минимум три следующих показателя: а) содержание эстрогенов в биологических жидкостях, в первую очередь в крови; б) уровень конверсии андрогенов в эстрогены *in vivo*; в) активность ароматазы (эстрогенсинтетазы) в конкретных тканях. Среди этих параметров наименее доступно определение ароматизации *in vivo*, поскольку это сопряжено с введением радиоактивной метки в организм и соответственно требует специальных способов содержания обследуемых. Количество эстрогенов в крови формально представляет собой величину, характеризующую уровень секреции данных гормонов в гонадах и на периферии. Однако наблюдение за женщинами, которые подверглись овариэктомии, и ряд других клинических ситуаций показывают, что если пользоваться этим параметром, то вклад в него периферических тканей невелик. На самом же деле, процесс локального экстрагонадного эстрогенообразования может быть весьма интенсивен, что подтверждается высокой тканевой концентрацией эстрогенов, например, в нормальной молочной железе и ее новообразованиях (гл. 4). Следовательно, не исключено, что периферические ткани секретируют эстрогены в кровь не обязательно в соответствии с активностью экстрагонадного биосинтеза этих гормонов. Кроме того, следует иметь в виду, что ведущая фракция эстрогена, синтезируемого

конкретной тканью, в значительной степени зависит от типа последней (Simpson et al., 1994) и это может сказываться на фракционном составе эстрогенов в крови (гл. 3, 5).

Образовавшиеся из андрогенных предшественников эстрогены (эстрон — из андростендиона и эстрадиол — из тестостерона) могут подвергаться дальнейшим превращениям. В первую очередь следует указать на уже отмечавшуюся способность эстрона и эстрадиола к взаимным превращениям. Эти реакции катализируются  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназой, представленной различными изоформами, которые характеризуются субстратной и тканевой специфичностью и связанной с ними направленностью процесса (от эстрона к эстрадиолу или от эстрадиола к эстрону); ген  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы локализуется на 17-й хромосоме (Isomaa et al., 1993). И эстрадиол, и особенно эстрон способны циркулировать в крови в виде сульфатов (по некоторым данным, эстрон-сульфат является тем эстрогеном, который присутствует в крови менопаузальных женщин в наибольшей концентрации). Образованию сульфатов способствует фермент эстрогенсульфотрансфераза (эстроновый или эстрадиоловый вариант), а обратной реакции — высвобождению свободных эстрона или эстрадиола из их сульфатов — фермент эстрогенсульфатаза (Pasqualini et al., 1995). Наконец, необходимо упомянуть и различные эстрогенгидроксилазы, и в частности те из них, которые способствуют образованию 2- или 4-гидроксиэстрона/гидроксиэстрадиола, т. е. так называемых катехолэстрогенов (Liehr, Ricci, 1996; Коваленко и др., 1997).

Таким образом, очевидно, что, хотя ароматазная реакция, т. е. образование эстрогенов из андрогенов, является наиболее важной и этому вопросу в настоящей работе будет уделено основное внимание, не следует недооценивать другие реакции, в которых участвуют и преобразуются в разнообразные метаболиты (нередко уже с иными свойствами) классические эстрогены (в первую очередь эстрадиол и эстрон).

Энзимология биосинтеза эстрогенов представляется в настоящее время достаточно хорошо изученной. Конверсия андрогенных предшественников в эстрогены катализируется одним из членов суперсемейства цитохромов  $P_{450}$ . Данное суперсемейство микросомальных ферментов объединяет в своем составе не менее 220 членов и включает в себя свыше 30 отдельных семей (классов), различающихся по способности участвовать в метаболизме, активации или синтезе полиароматических углеводов, жирных и желчных кислот, стероидов и т. д. (Juchau, 1990; Nelson et al., 1993). XIX класс суперсемейства состоит из одного члена, которым и является ароматаза, обозначаемая как  $P_{450\text{аром}}$ , а кодирующий ее ген — как *CYP19*. Ароматаза представляет собой гемсодержащий белок, связывающий стероидный субстрат (андроген) и способствующий серии последовательных реакций, в результате которых образуется характерное для эстрогенов фенольное кольцо А.  $P_{450\text{аром}}$  является основным компонентом так называемого

ароматазного комплекса, в состав которого входит и НАДФН-цитохром  $P_{450}$  редуктаза. Этот флавопротеин, содержащийся в эндоплазматическом ретикулуме большинства клеток организма, выполняет как компонент ароматазного комплекса неспецифическую, но важную роль: переносит восстанавливающие эквиваленты от НАДФН к  $P_{450\text{аром}}$  (подобно тому, как он это делает в отношении любого цитохрома  $P_{450}$ , с которым ему приходится вступать в контакт) (Simpson et al., 1994).

Исследование структуры ароматазы, ее активных центров и связи структуры с функциональной активностью привлекает к себе внимание по разным соображениям, и в том числе потому, что способствует пониманию механизма ароматазной реакции и позволяет искать новые ингибиторы ароматазы, активно вмешивающиеся в эстрогенообразование (гл. 9). В процессе ароматазной реакции, по общему мнению, на каждый моль метаболизируемого  $C_{19}$  стероида (андрогена) расходуется 3 моля кислорода и 3 моля НАДФН. Конечными продуктами реакции являются эстроген и вода. Ключевым моментом первых двух этапов реакции служит окисление угловой метильной группы при 19-м атоме углерода. Эти два последовательных окисления мало чем отличаются от других окислительных реакций, катализируемых цитохромами  $P_{450}$ . Третий этап, как полагают, носит характер перекисного окисления с использованием интермедиата, образовавшегося в результате первой окислительной реакции — связывания кислорода с восстановленным железом гема (Akhtar et al., 1993). Современный взгляд на эту цепь реакций базируется на представлении о трехмерной структуре ароматазы по аналогии со структурой некоторых полученных в кристаллическом виде бактериальных цитохромов  $P_{450}$ . В основе модели — наличие в структуре фермента высококонсервативной области, содержащей несколько спиралей, плоскостей и гем-связывающего участка. Предложенная модель разъясняет, как происходит распознавание субстрата (андрогенного предшественника), каким образом он связывается с активным центром (участком) молекулы, как осуществляется упоминавшаяся выше серия последовательных окислительных реакций. Предполагается, что локализующийся в положении 310 треонин является тем «пусковым устройством», которое определяет смену реакций окислительного гидроксирования на реакцию перекисного окисления. Последняя сопровождается высвобождением водорода в положении  $1\beta$  (что способствует образованию двойной связи между 1-м и 10-м атомами углерода) и энолизацией (превращением в гидроксил) кетогруппы в 3-м положении кольца А, что и завершает его ароматизацию (Simpson et al., 1994; Graham-Lengence et al., 1995).

Выше отмечалось, что конечным продуктом реакции ароматизации является образование эстрогена и воды. Стохиометрия этой реакции такова, что на 1 моль эстрогена образуется 1 моль воды. Установление данной закономерности привело к предложению судить об эстрогенообразовании (активности ароматазы) *in vitro*

по количеству высвобождающейся тяжелой воды ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ) из меченого по тритию в 1-м положении андрогенного предшественника (Thompson, Siiteri, 1974). Позднее, однако, на примере печени, предстательной железы, эндометрия (Siiteri, 1982; Brodie et al., 1989; Prefontaine et al., 1990), а по нашим данным, и на примере свежевыделенных лимфоцитов крови здоровых людей (Берштейн и др., 1993б, 1994а) выяснилось, что продукция эстрогенов при конверсии андрогенов (в частности, андростендиона), которая оценивается по образованию тяжелой воды, отмечается не всегда. Подобная реакция была обозначена нами как псевдоароматазная (Берштейн и др., 1993б). Хотя продукты этой реакции еще окончательно не изучены, сама по себе конверсия андростендиона в упомянутых тканях и клетках с образованием иных (помимо эстрогенов) биологически активных стероидов — факт вполне реальный (см. гл. 4). В то же время исследование механизма реакции псевдоароматизации косвенным образом способно дать дополнительную информацию как о механизме самой ароматизации, так и о причинах отсутствия последней в той или иной ткани. Одно из важных наблюдений в этом отношении состоит в том, что, хотя первые две окислительные реакции обычно происходят «вокруг»  $\text{C}_{19}$  (см. выше), водород при  $1\beta$  также может подвергаться воздействию кислорода (Korzekwa et al., 1993). С другой стороны, по нашим данным, при использовании андростендиона, меченого тритием не только в 1-м, но также и во 2, 6 и 7-м положениях, образование тяжелой воды в лимфоцитах существенно возросло (Берштейн и др., 1993б). Аналогичные результаты были получены и при исследовании псевдоароматазной реакции в других тканях. Это позволяет предположить, что данная реакция может затрагивать группировки не только при 1-м углеродном атоме кольца А (Brodie et al., 1989; Prefontaine et al., 1990). Было показано также (Brodie et al., 1989), что в ткани предстательной железы высвобождение тяжелой воды из меченого тритием андрогена, которое не сопровождается образованием эстрогенов (псевдоароматизация), происходит в несколько этапов, причем  $5\alpha$ -редуктазная реакция предшествует гидроксилированию. Существенно, кроме того, что отсутствие в некоторых тканях или клетках способности к ароматизации (т. е. к конверсии андрогенов в эстрогены) не препятствует в них взаимопревращениям отдельных эстрогенных фракций с использованием  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназ (гл. 4). Наконец, последнее, что заслуживает здесь упоминания, это то, что ароматаза плаценты обладает способностью катализировать образование катехолэстрогенов, т. е. одновременно является и 2-гидроксилазой (Osawa et al., 1995). Пока неясно, присущи ли такие свойства ароматазе других, в том числе неопластических, тканей, что могло бы быть использовано при анализе особенностей некоторых этапов гормонального канцерогенеза (гл. 7).

Регуляция ароматазного комплекса, стимуляторы и ингибиторы активности ароматазы исходно наиболее подробно изучались на примере ароматазы яичников и плаценты; позднее исследова-

Таблица 1

Влияние инсулина и инсулиноподобного фактора роста-I (ИПФР-I)  
на активность ароматазы в клетках яичника

Вид	Инсулин	ИПФР-I
Человек	Не влияет (Dorrington et al., 1987) или стимулирует (Garzo, Dorrington, 1984)	Не влияет (Dorrington et al., 1987)
Корова	Не влияет (Dorrington et al., 1987)	Не влияет (Dorrington et al., 1987)
Свинья	Не влияет (May, Schomberg, 1981) или снижает (Veldhuis et al., 1983)	Нет данных
Крыса	Не влияет (Dorrington et al., 1987)	Не влияет (Dorrington et al., 1987; He et al., 1994)

ния такого рода стали проводиться и на других объектах. Основным стимулятором активности ароматазы в гранулезных клетках яичника является, как отмечалось выше, ФСГ, действие которого опосредуется циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ). В преовуляторном фолликуле ФСГ взаимодействует в этом процессе с ЛГ и с локально продуцируемым активином. Ингибин, как показано на обезьянах, скорее, модифицирует активность ароматазы в яичниках опосредованно, изменяя продукцию андрогенных предшественников эстрогенов — андростендиона и тестостерона (Hillier, Miro, 1993). Гипофизарный пролактин подавляет базальную продукцию эстрадиола и активность ароматазы в гранулезных клетках преовуляторного фолликула и желтом теле крыс и ослабляет стимулирующий эффект ФСГ, инсулина и форсколина (негормонального индуктора аденилатциклазы) (Krasnow et al., 1990). Участие аденилатциклазного комплекса и G-белков аденилатциклазы в модификации активности ароматазы в том же тканевом объекте доказывается и экспериментами, в которых исследовалось влияние холерного и коклюшного токсинов на стероидогенез, стимулированный комбинацией гонадотропинов и инсулиноподобного фактора роста-I (ИПФР-I) (He et al., 1994). Сам ИПФР-I, равно как и инсулин, по большей части самостоятельно не повышает активность ароматазы в гранулезных клетках; отдельные примеры стимулирующего эффекта инсулина, скорее, связаны с суперфизиологической концентрацией гормона или с определенным состоянием органа, например с лютеинизацией гранулезы (Krasnow et al., 1990; табл. 1). Чаще и инсулин и ИПФР-I выступают в роли потенциаторов эффекта ФСГ. Аналогичным действием, как выяснилось, обладают и сами эстрогены, которые усиливают влияние ФСГ на активность ароматазы в гранулезных клетках яичника крыс (Adashi, Hsueh, 1982).

В отличие от ароматазы яичника активность соответствующего фермента в синцитиотрофобласте плаценты не стимулируется, а

подавляется эстрогенами (Shimizu et al., 1993), а также инсулином и ИПФР-I и II (Nestler, 1990). Противоположно и влияние на активность ароматазы в этих органах интерлейкина-1 (ИЛ-1) (в плаценте наблюдается стимуляция, а в яичниках — подавление эстрогенообразования) (Nestler, 1993a). Объяснения подобных различий могут быть неоднозначны, однако не исключено, что одно из них, и возможно самое важное, связано с тканеспецифическими особенностями промоторов, регулирующих экспрессию гена ароматазы (гл. 2). Ароматаза клеток Лейдига ближе в этом смысле к ароматазе гранулезных клеток яичника, чем к ферменту плаценты, так как она стимулируется гонадотропинами (прежде всего хорионическим), и этот эффект усиливается инсулином и ИПФР-I (Rigaudiere et al., 1989). Гуморальные регуляторные сигналы, оказывающие влияние на активность ароматазы в экстрагонадных тканях (в частности, в жировой и в трансформированных клетках молочной железы) будут рассмотрены в других разделах (см. гл. 2, 4). Предварительно необходимо подчеркнуть, что действие локальных регуляторных факторов на эстрогенообразование в периферических тканях представляется более значительным, чем влияние системных сигналов, и что для модификации экстрагонадной продукции эстрогенов существенное значение имеет вовлечение в этот процесс семейства переносчиков сигналов и активаторов транскрипции (STAT-family), ассоциированных с особым классом тирозиновых киназ (Jak-киназы, — Zhao et al., 1995; гл. 2). В целом же проблема избирательности в активации или ингибировании одного и того же фермента (ароматазы) аналогичными сигналами в различных тканях отчасти сродни ситуации, которая связана с анализом роли G-белков в определении специфичности клеточного ответа (Толкачёва и др., 1996), и, подобно этой ситуации (Перцева, 1989), может иметь и эволюционные корни.

Исследование ароматазы (эстрогенсинтетазы) в филогенетическом ряду выявляет весьма интересную картину, которая отчасти позволяет объяснить, с чем было связано возникновение экстрагонадного эстрогенообразования и почему не достаточно биосинтеза этих гормонов только в гонадах. Известные данные в то же время не дают возможности легко ответить на вопрос, какой из топографических вариантов образования эстрогенов является более древним, поскольку практически у всех исследованных видов позвоночных активность ароматазы обнаружена как в гонадах, так и в ткани головного мозга, а беспозвоночным продукция эстрогенов не свойственна (Callard et al., 1984; Simpson et al., 1994). Различия между отдельными видами позвоночных начинают проявляться, как только анализ эстрогенообразования уходит за пределы истинных гонад и головного мозга. Так, в плаценте помимо человека и обезьяны ароматаза обнаружена лишь у коров, свиней и лошадей, но не у кроликов, мышей и крыс, а в таком важном источнике экстрагонадной продукции эстрогенов, как жировая ткань, найдена лишь у обезьян и людей (табл. 2). Оплодотворенные яйцеклетки перед инактивацией (так называемые преимплантационные blasto-

Таблица 2

Видовые особенности обнаружения ароматазы в некоторых органах и тканях  
(по: Callard et al., 1984; Simpson et al., 1994; Choi et al., 1996)

Вид	Орган или ткань			
	Гонады	Головной мозг	Плацента	Жировая ткань
Млекопитающие				
человек	+	+	+	+
обезьяна	+	+	+	+
корова	+	+	+	
лошадь	+	+	+	
свинья	+	+	+	
кролик	+	+		
крыса	+	+		
мышь	+	+		
Птицы	+	+		
Рептилии	+	+		
Амфибии	+	+		
Костистые рыбы	+	+		
Бесчелюстные	+	+		
Protochordatae	+	+		

Примечание. Объяснения см. в тексте.

цисты) способны к эстрогенообразованию у крольчих, свиней, лошадей, ослиц, верблюдиц и человека, но не у самок хомяка и крыс (Choi et al., 1996). Плацента человека отличается весьма высокой активностью ароматазы и соответственно эстрогенообразующей способностью. В первые 9—10 недель беременности, однако, основным источником эстрогенов являются яичники матери, а затем эта функция преимущественно переходит к плаценте. У животных с относительно короткой беременностью (мыши, крысы) гестация поддерживается только за счет стероидогенеза в яичниках и процедуры «передачи эстрогенообразования в плаценту» не происходит (Harada, Yamada, 1992). Тем не менее сомнительно, чтобы лишь фактор времени играл решающую роль в выявившихся видовых различиях. Помимо того, что ароматаза не обнаруживается в плаценте у некоторых видов животных, имеющих этот орган, даже у тех видов, у которых она выявляется (например, у человека и коровы), ее базальная активность и особенности регуляции существенно различаются (Hinshelwood et al., 1995).

Особое внимание, однако, привлекает своеобразная «усеченность», обнаруживаемая в тканевом распределении ароматазы при переходе от высших млекопитающих к грызунам, которые в этом отношении не отличаются от низших позвоночных, сохраняя способность к эстрогенообразованию главным образом в гонадах и головном мозгу (табл. 2). Отсутствие ароматазы в жировой ткани как у грызунов, так и у коров, лошадей и свиней, возможно,

объясняется соотношением у них стромальных элементов и истинных адипоцитов в этой ткани (гл. 4) и, не исключено, имеет косвенную связь с особенностями развития у отдельных видов основных неинфекционных заболеваний, сопутствующих старению, в том числе некоторых злокачественных новообразований (см. ниже). Филогенетические отличия ароматазы выявляются на различных уровнях: в нуклеотидном составе 5'-концов экзона I клонов комплементарной ДНК Р<sub>450аром</sub> и в длине ее 3'-нетранслируемой области (Choi et al., 1996; гл. 2), в трехмерной пространственной структуре каталитического участка (Swinney et al., 1993), в базальной активности фермента из гомологичных тканей (Hinshelwood et al., 1995), в его функциональном предназначении (Yoshida et al., 1996), в характере используемых в качестве субстрата андрогенных предшественников и получаемых в результате реакции продуктов (так, ароматаза лошадей способна превращать в эстрогены 19-норандростендион и 19-нортестостерон и помимо эстрона и эстрадиола при этом образуются соответствующие 2-гидроксипроизводные, т. е. катехолэстрогены, — Almadhidi et al., 1996) и т. д. Отличия между отдельными видами проявляются и в том, обнаруживается ли способность к образованию эстрогенов в ткани матки во время беременности и на какой ее стадии (Choi et al., 1996; гл. 4, 6), что, естественно, может иметь отношение к развитию эмбриона и к функционированию фетоплацентарного комплекса.

Выше уже упоминались межтканевые различия в регуляции ароматазы, основанные, в том числе, на особенностях чувствительности промоторов гена этого фермента к различным активаторам (см. также гл. 2). Известны и видовые отличия аналогичного характера, часть из которых связана с различиями в контроле эстрогенообразования форсколином (Hinshelwood et al., 1995) и другими стимуляторами аденилатциклазы. Система аденилатциклаза—G-белки—циклический АМФ (цАМФ) представляется значительно более древней, чем система биосинтеза эстрогенов в гонадах и экстрагонадных тканях, поскольку первая активно функционирует и у беспозвоночных (Перцева, 1989). Тем не менее имеющее, очевидно, и эволюционную основу приобретение цАМФ-зависимости процессом образования эстрогенов в одних тканях и отсутствие этой особенности — в других представляется весьма важным и с практической точки зрения, в частности, когда речь идет о механизмах возникновения некоторых эстроген-зависимых заболеваний и о подходах к их лечению (Берштейн и др., 1993а; гл. 6, 9). На примере ароматазы и регуляции эстрогенообразования не всегда удается проследить описываемую биогенетическим законом связь фило- и онтогенеза (когда онтогенез рассматривается как быстрое и короткое повторение филогенеза, см.: Перцева, 1989), хотя изменения активности ароматазы с возрастом в исследованных до настоящего времени тканях достаточно закономерны (гл. 5).

Еще один важный аспект проблемы, который здесь невозможно не затронуть, состоит в сопоставлении видовых особенностей тканевого распределения способности к биосинтезу эстрогенов с

некоторыми данными по сравнительной онкологии. За исключением крыс отдельных линий (например, Han/Wistar), у этих грызунов весьма редко развивается рак эндометрия, а аденокарциномы молочной железы у них, как правило, возникают не чаще, чем в 1—3 % всех наблюдений (Анисимов, 1976; Pathology of tumours., 1990). Спонтанный рак эндометрия также весьма редок у собак и практически не выявляется у кошек, лошадей и коров, хотя аденокарцинома молочной железы у кошек и собак (в противоположность лошадям и коровам) представляет собой одно из ведущих по частоте злокачественных новообразований. У лошадей в отличие от коров, которым свойственны новообразования гемопoэтической системы, нередко гранулезоклеточные опухоли яичников, достигающие пика частоты в 5—6-летнем возрасте, т. е. задолго до наступления старости. Среди перечисленных видов животных опухоли почек и гипофиза (которые так же, как и опухоли молочной железы и эндометрия, могут быть отнесены к эстроген-зависимым) наиболее часто спонтанно развиваются у собак и крыс (The occurrence of tumors., 1980). Если же в основном ориентироваться на новообразования эндометрия, то с учетом представленных сведений нельзя исключить, что *расширение в эволюции зоны экстрагонадного образования эстрогенов* следует рассматривать как одну из причин изменения спектра злокачественных опухолей у человека и других высших приматов (см. также гл. 4, 7).

В течение определенного времени считалось, что трудности в обнаружении случаев с недостаточностью ароматазы связаны с тем, что такие состояния могут быть несовместимы с жизнью, в частности из-за незаменимости эстрогенов в период имплантации оплодотворенной яйцеклетки (Simpson et al., 1994). Действительно, до конца 80-х гг. не были описаны клинические наблюдения, которые с достоверностью демонстрировали бы отсутствие ароматазы и соответственно эстрогенообразования в организме. Равным образом на тот период не было зарегистрировано состояний с конституитивной избыточной активностью ароматазы. С начала 90-х гг. стали появляться отдельные сведения по этому вопросу. Так, был описан случай женского псевдогермафродитизма у японской девочки (Shozu et al., 1991) и случай первичной аменореи, инфантилизма и кистозного перерождения яичников у 18-летней американской девушки (Ito et al., 1993) в сочетании и в том и в другом случае с мутациями в гем-связывающей области гена ароматазы. В то же время недавно отмечено усиление экстрагландулярной ароматизации у 9-летнего мальчика с семейной формой гинекомастии; как оказалось, это состояние наследовалось по аутосомному доминантному типу и было связано с гиперэкспрессией ранее не идентифицированного и измененного варианта экзона I гена ароматазы (Stratakis et al., 1996; гл. 2). Свидетельствуя о совместимости таких отклонений с жизнью, подобные наблюдения в то же время дополнительно указывают на роль особенностей гена ароматазы в регуляции биосинтеза эстрогенов, анализу чего и посвящена следующая глава книги.

## ГЛАВА 2

### Молекулярно-генетические аспекты продукции эстрогенов. Ген ароматазы

Около 10—15 лет тому назад такой области знания практически еще не существовало. Ее развитию способствовало несколько событий: получение высокоочищенной ароматазы из плаценты человека, секвенирование этого белка, клонирование кДНК, кодирующей ароматазу, и трансфекция полученным материалом клеточных линий, конститутивно не способных к стероидогенезу, и т. д. (см.: Corbin et al., 1988; Harada, 1988). Между тем до этих несомненных успехов, которые послужили началом еще более важных достижений, существовали различные точки зрения на то, каким образом обеспечивается процесс эстрогенообразования. Так, в связи с тем что в различных тканях могут преимущественно образовываться разные эстрогены (эстрадиол — в яичниках, эстриол — в плаценте и эстрон — в жировой ткани), предполагалось, что ароматаза может существовать в двух-трех формах (изоформах) с различной субстратной специфичностью (Osawa, Higashiyama, 1988). Было, кроме того, высказано мнение о наличии двух генов ароматазы в геноме человека по аналогии с генами еще одного фермента из группы цитохромов  $P_{450}$  — стероид-21-монооксигеназы (Chen et al., 1988). Поскольку гомология  $P_{450\text{аром}}$  с другими представителями суперсемейства цитохромов  $P_{450}$  по целому ряду параметров не превышает 20—30 % и в связи с тем что гены, кодирующие образование членов этого семейства, представлены на разных хромосомах, предполагалось, что идентификация того хромосомного локуса, где располагается ген ароматазы, может дать непредвиденные результаты (Chung et al., 1987).

Эксперимент и время все расставили по своим местам. Было доказано (и так считалось до совсем недавнего времени, — см. ниже), что существует лишь один ген, кодирующий ароматазу. Последняя, в свою очередь, представлена лишь одним полипептидом и у человека не имеет каких-либо изоформ (Mendelson et al., 1990). Ген ароматазы человека локализуется на длинном плече 15-й хромосомы (Chen et al., 1988; рис. 3). Эта хромосома является местом расположения и генов некоторых других цитохромов  $P_{450}$  (например, цитохрома, индуцируемого диоксинами (см. гл. 8), или цитохрома, отщепляющего боковую цепь холестерина); в то же время гены ряда иных стероидогенных цитохромов  $P_{450}$  распо-

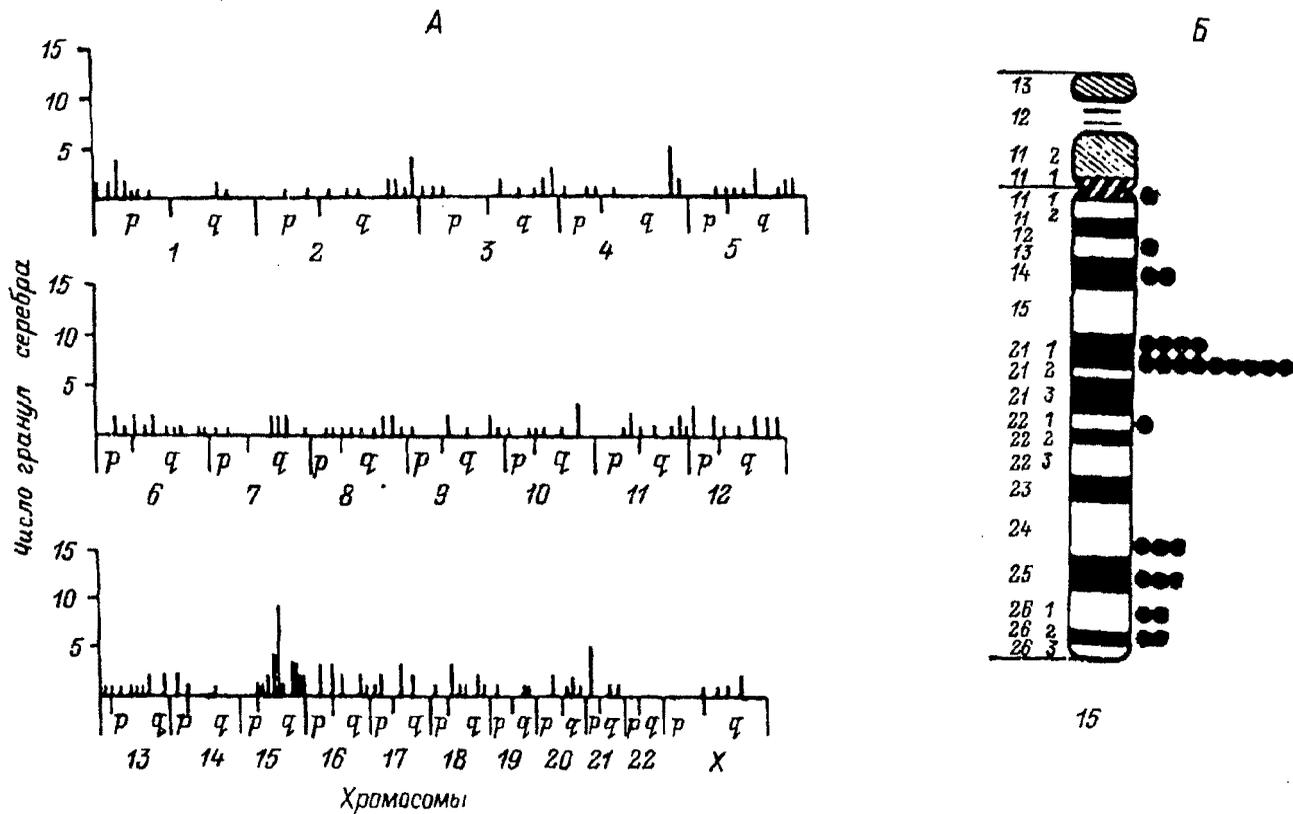


Рис. 3. Выявление гена ароматазы гибридизацией *in situ* в хромосомах человека (по: Chen et al., 1988).

А — все хромосомы, Б — хромосома 15 (накопление гранул в зоне 21.1 длинного плеча).

GCCCCCTCTGAGGTCAAGGAACACAACATCGCTTTTGGAAATGCTGAACCCGATACATTATAACATCACCAGCATCGTGCTGAAAGCCATGCCCTGCTGCCACCATGCCAGT 110  
MetValLeuGluMetLeuAsnProIleHisTyrAsnIleThrSerIleValProGluAlaMetProAlaAlaThrMetProVal  
 CCTGCTCCTCACTGGCCTTTTTCTCTTGGTGTGCAATTATGAGGGCACATCCTCAATACCAGGTCCTGGCTACTGCATGGGAATTGGACCCCTCATCTCCCACGGCAGAT 220  
LeuLeuLeuThrGlyLeuPheLeuLeuValTrpAsnTyrGluGlyThrSerSerIleProGlyProGlyTyrCysMetGlyIleGlyProLeuIleSerHisGlyArgP  
 TCCTGTGGATGGGGATCGGCAGTGCCTGCAACTACTACAACCCGGTGTATGGAGAATTCATCGGACTCTGGATCTCTGGAGAGGAAACACTCATTATCAGCAAGTCCTCA 330  
heLeuTrpMetGlyIleGlySerAlaCysAsnTyrTyrAsnArgValTyrGlyGluPheMetArgValTrpIleSerGlyGluGluThrLeuIleIleSerLysSerSer  
 AGTATGTTCCACATAATGAAGCACAATCATTACAGCTCTCGATTGGCAGCAAACCTGGGCTGCAGTGCATCGGTATGCATGACAAAGGCATCATATTTAACAAACATCC 440  
SerMetPheHisIleMetLysHisAsnHisTyrSerSerArgPheGlySerLysLeuGlyLeuGlnCysIleGlyMetHisGluLysGlyIleIlePheAsnAsnAsnP  
 AGAGCTCTGGAAAACAACCTCGACCCTCTTTATGAAAGCTCTGTGAGGCCCGGCCTGTTCGTATGGTCACAGTCTGTGCTGAATCCCTCAAACACATCTGGACAGGT 550  
oGluLeuTrpLysThrThrArgProPhePheMetLysAlaLeuSerGlyProGlyLeuValArgMetValThrValCysAlaGluSerLeuLysThrHisLeuAspArgL  
 TGCAGGAGGTGACCAATGAATCGGGCTATGTGCACGCTGTGACCCCTTCTGCGTCTGTCATGCTGGACACCTCTAACACGCTCTTCTTGAGGATCCCTTTGGACGAAGT 660  
euGluGluValThrAsnGluSerGlyTyrValAspValLeuThrLeuLeuArgArgValMetLeuAspThrSerAsnThrLeuPheLeuArgIleProLeuAspGluSer  
 CCTATCGTGGTTAAAATCCAAGGTTATTTTGCATGCATGCAAGCTCTCCTCATCAAACCAGACATCTTCTTTAAGATTTCTTGGCTATACAAAAAGTATGAGAAGTCTGT 770  
AlalleValValLysIleGlnGlyTyrPheAspAlaTrpGlnAlaLeuLeuIleLysProAspIlePhePheLysIleSerTrpLeuTyrLysLysTyrGluLysSerVa  
 CAAGGATTTGAAGATGCCATAGAAGTCTTGATAGCAGAAAAAGATGCAGGATTTCCACAGAGAGAACTGGAAGAATGATGCACTTTGCCACTGAGTTGATTTAG 880  
lLysAspLeuLysAspAlaIleGluValLeuIleAlaGluLysArgCysArgIleSerThrGluGluLysLeuGluGluCysMetAspPheAlaThrGluLeuIleLeuA  
 CAGACAAACGTTGCTGACSTGACAAGAGAGAATGTGAACCACTGCATATTGCAAACTCTGATCGCAGCTCCTGACACCATCTCTCTCTTTGTTCTTCTCATGCTATTTCTC 990  
laGluLysArgGlyAspLeuThrArgGluAsnValAsnGlnCysIleLeuGluMetLeuIleAlaAlaProAspThrMetSerValSerLeuPhePheMetLeuPheLeu

Рис. 4. Последовательность нуклеотидов в кДНК, кодирующей ароматазу человека (по: Corbin et al., 1988).

Представлена также аминокислотная последовательность в молекуле фермента. Начало рамки считывания отмечено стрелкой и квадратом, а ее окончание — только квадратом. Второй из заключенных в рамку участков указывает на расположение гем-связывающей области, а в 3'-нетранслируемом регионе линией подчеркнуто место сайта полиаденилирования.

ATTGCAAGCACCTAATGTTGAAGAGCCAATAATAAAGGAAATCCAGACTGTTATTGGTGAGAGAGACATAAAGATTGATGATATACAAAAATTAAGAAGTATGGAAAA	1100
IleAlaLysHisProAsnValGluGluAlaIleIleLysGluIleGlnThrValIleGlyGluArgAspIleLysIleAspAspIleGlnLysLeuLysValMetGluAs	8
CTTCATTTATGAGAGGAAAGCGGTACCAGCCTGTCGTGGACTTGGTCATGGCAAAGCCTTAGAAGATGATGTAATCGATGGCTACCCAGTGAAAAAGGGGACAAACHTTA	1210
nPheIleTyrGluSerMetArgTyrGlnProValValAspLeuValMetArgLysAlaLeuGluAspAspValIleAspGlyTyrProValLysLysGlyThrAsnIleI	
TCCTGAATATTGGAAGGATGCACAGACTCGAGTTTTTCCCAAACCCAAATGAATTTACTCTTGAALATTTTGCAAAGAAATGTTCCCTTATAGGTACTTTCAGCCATTGGC	1320
leLeuAsnIleGlyArgMetHisArgLeuGluPhePheProLysProAsnGluPheThrLeuGluAsnPheAlaLysAsnValProTyrArgTyrPheGlnProPheGly	
<u>TTTGGCCCCCGTGGCTGTGCAGUAAAGTACATCCCATGGTGATGATGAAGCCATCCTCGTTACACTTCTGAGACGATTCCACGTGAAGACATTUCAAGGACAGTGTGT</u>	1430
<u>PheGlyProArgGlyCysAlaGlyLysTyrIleAlaMetValMetMetLysAlaIleLeuValThrLeuLeuArgArgPheHisValLysTheLeuGlnGlyGlnCysVa</u>	
TGAGAGCATACAGAAGATACAGCACTTGTCTTCCACCCAGATGAGACTAAAAACATGCTGGAAATGATCTTTACCCCAAGAAACTCAGACAGGTGCTGGAAACATGAC	1540
IleGluSerIleGlnLysIleHisAspLeuSerLeuHisProAspGluThrLysAsnMetLeuGluMetIlePheThrProArgAsnSerAspArgCysLeuGluHisEnd	
GAAGGCTGGTCAGTACCCACTCTGGAGCATTITCTCATCACTAGTTCACATACAAATCATCCATCCTTGGCAATAGTGTATCCTCACAGTGAACACTCAGTGGCCCATG	1650
GAATTTTATAGGCATACCTCCTATGGTTGTCAACCAGCTAGGTGCTATTGGTCATCTGCTCCTGTTCACACCAGAGAACCAGGCTACAAGAGAAAAAGCAGAGGCCAAGA	1760
GTTTGAGGGCAGAAATAGTCGGTGAAGAAACCGTATCCATAAAGACCCGATTCCACCAAATGTGCTTTGAGAAGGATAGGCCCTTCATTAACAAATGTATGTCTCGTTCC	1870
CCAGTAGAGCTCTACTGCCCAACCAAGGGGATTTTTATGTCGGGGCAGAAACCTCAAGTTGATTAGAAGACCAGGCCAATGTCAGGGTACCTGGGGCCAAACCCAC	1980
CTGCTAGTGTGAATTAAGTACTTTAATTTGTTTTCTGTGGAGGTGGAAGAACAACTTATAGTCTTTGGAGAAATGCTTAGAAATTCAGCATTGACCCCTGCTGTG	2090
AATTAAGCCCAATTAATTCCTGTTTGTCTACATATGATCTGCTGTGGCAAAAGTTAATCAGAGGAAATTTCTTTCCCACTCTGTCGATTTATGCCCTCAGCCACTTGCCT	2200
GTCGTACAATTCATTGTGTTACCTGTAGATTCAGGTAATACAAACCATATATATCATCAAGTAATACAAACTAATTTAGTAATAGCCTGGGTTAAGTATTTAAGGGCC	2310
CTGTCTGCTGCAATGAGAAAAAAATTCACATGATGCACCTCAAAATCAAAATAAAATCCTTTTGGCATGTTCCCATTTTGTCTTAGCTCAATTAGTGTGGCTAACCAAG	2420
AGATAACTGTAAATGTACATTTGATTTGCTCTTACTACAGCTACAGTGATTTGGGGCAGGAAAGTCCCAACCCAAATGGGCTCAAACCTTCAAGGGGTACTCTCTCATCC	2530
CCTTATCCTTCTCCCTCGACATTTTCTCCCTCTTCTTCCCATGACCCCAAGGCCAAGGGCAACAGATCAGTAAAGAACGTGGTCSAGAGTAGAACCCCTGAAGTATTTT	2640
TAATCCTACCTCAAAATTTAACAGTTACCTGAGAGATTTAACATTATCTAGTTTATTGAATCATTGTATGTGGTCATGGATAAATGCACACTGG 2736	

Рис. 4 (продолжение).

лагаются на других хромосомах (Chen et al., 1988). До сих пор нет единодушия по поводу хромосомной локализации ароматазы у мышей: по одним данным, ген фермента связан с хромосомой 9, а по другим — он расположен на хромосоме 2 (Youngblood et al., 1989; Spearow et al., 1996). Самым главным событием, однако, существенно продвинувшим молекулярно-генетические исследования эстрогенообразования, явилось доказательство тканевой специфичности регуляции этого процесса, поддерживаемой за счет существования множественных промоторов транскрипции гена ароматазы и их селективного использования в отдельных тканях (см. Simpson et al., 1994; Берштейн, 1997б).

Следует кратко напомнить, что обычно в генах выделяют два основных функциональных участка: транскрипционный и промоторный. Транскрипционный участок включает в себя экзоны (кодирующую область) и интроны (впоследствии выщепляемые регионы). Транскрипция с конечным образованием предшественника мРНК начинается с так называемого сайта инициации на 5'-конце транскрипционного участка и завершается на 3'-конце гена. Посттранскрипционное превращение (процессинг) образовавшегося предшественника мРНК приводит к удалению из него интронов и к объединению экзонов, вслед за чем начинается трансляция. Промоторный участок состоит из ряда последовательностей, значительная часть которых (собственно промоторы) вовлечена в регуляцию транскрипции. В промоторной области располагаются и так называемые энхансеры, принимающие участие в определении скорости инициации транскрипции. Полагают, что промоторы могут занимать различное положение по отношению к регулируемому ими гену. Последовательности же, отвечающие за узнавание специфических для данного гена регуляторных сигналов, расположены вблизи его 5'-конца (Георгиев, 1989).

Исследование кДНК, кодирующей  $P_{450аром}$  человека, показало, что ее длина равняется 2736 парам оснований (Corbin et al., 1988; рис. 4). Транслируемая область кодирует белок из 503 аминокислотных остатков. N-концевой участок молекулы, особенно на протяжении от 10-го до 20-го аминокислотного остатка, очевидно, имеет существенное значение для конформационной целостности фермента, поскольку, если отщепление первых 10 аминокислот не оказывает влияния на активность ароматазы, отщепление 20 аминокислот уже приводит к потере более чем 95 % ее активности (Simpson et al., 1994). Вблизи С-конца молекулы располагается гем-связывающий участок (содержащий важный и сохраняющийся в филогенетическом ряду остаток цистеина, рис. 4), а примерно через 1000 п. н. от него в 3'-нетранслируемой области выявляется сигнальная последовательность полиаденилирования. Дополнительный сайт полиаденилирования был обнаружен еще ниже, т. е. ближе к 3'-концу (Means et al., 1989). Наличием двух участков полиаденилирования объясняют существование двух основных типов мРНК  $P_{450аром}$  человека размером соответственно 2.9 и 3.4 т. п. н. (Mendelson et al., 1990). Более важным, однако, оказался

Таблица 3

Кодирующие экзоны гена ароматазы и некоторые их свойства  
(по: Means et al., 1989)

Экзон	Номера входящих в экзон аминокислот	Функционально важные кодируемые участки
II	1—48	Старт трансляции; membrane-spanning область
III	49—99	
IV	100—150	
V	151—209	
VI	210—248	
VII	249—286	
VIII	287—340	
IX	341—421	Область I спирали; связывание субстрата
X	422—503	
		Гем-связывающая область; 3'-нетранслируемая область; сайты полиаденилирования

тот факт, что мРНК ароматазы, выделенные из различных эстроген-продуцирующих тканей, содержали одну и ту же кодирующую область, но различные 5'-нетранслируемые участки. Такое своеобразие, как выяснилось, связано с необычной для генов цитохромов P<sub>450</sub>, но присущей генам некоторых иных полипептидов и белков (ИПФР-I, ИПФР-II, пролактин и т. д., — Simpson et al., 1994) структурой гена ароматазы человека (CYP19).

Восприятию дальнейшего изложения будет способствовать ознакомление с рис. 5, 6 и табл. 3. Общая длина гена P<sub>450аром</sub> человека

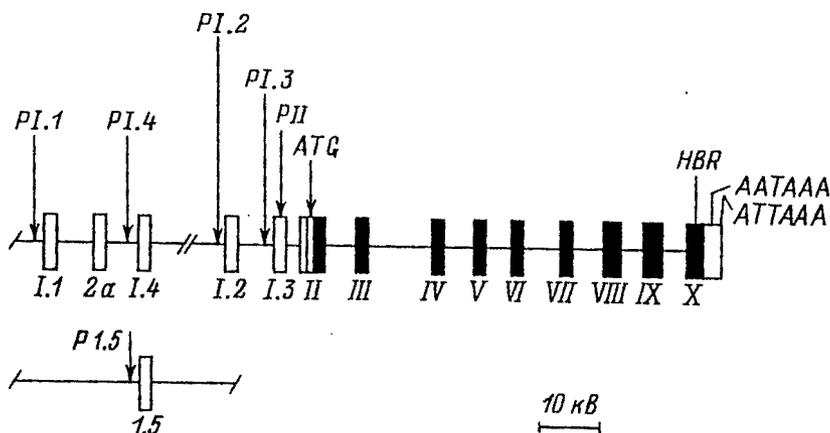


Рис. 5. Схематическое изображение гена ароматазы (CYP19) человека (по: Toda et al., 1994).

AATAAA и ATTAAG — два альтернативных сайта полиаденилирования, ATG — точка инициации трансляции, HBR — область связывания гема, P — промотор, кв — килобаза. Римскими цифрами обозначены экзоны.

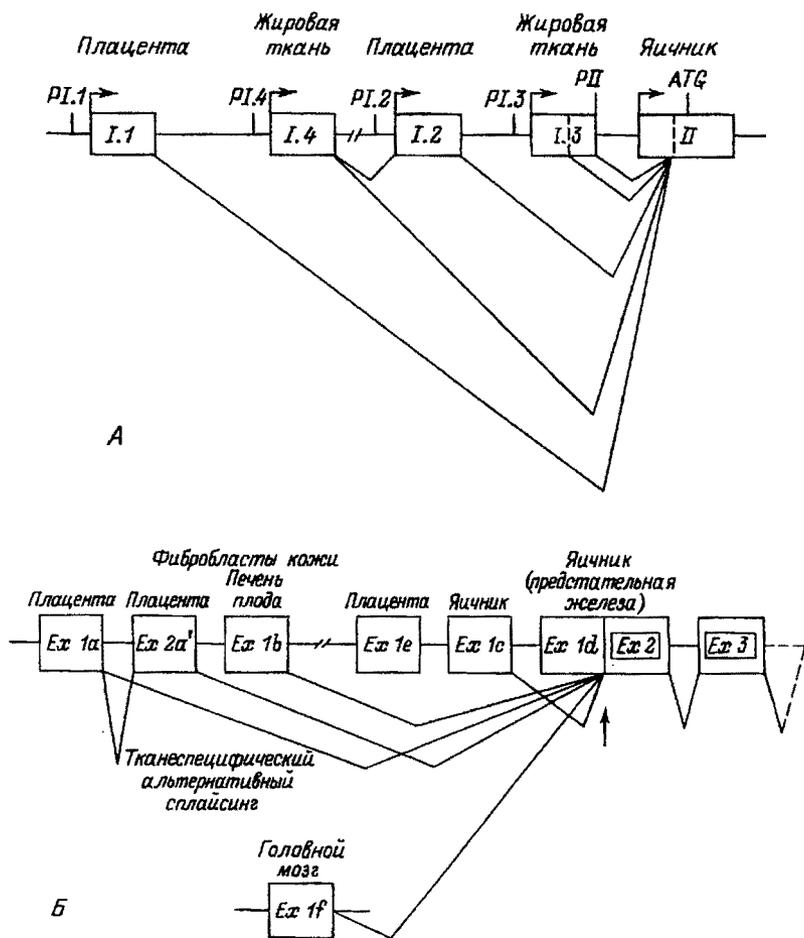


Рис. 6. Структура гена ароматазы человека выше места старта трансляции и принцип альтернативного использования множественных форм экзона I.

А — схема по: Simpson et al., 1994; Б — схема Harada et al., 1995.

приближается, по разным данным, к 75—80 т. п. н. Ген содержит 10 экзонов (I—X), причем только 9 из них (II—X) являются кодирующими. В этом отношении имеется несомненное сходство с генами других цитохромов  $P_{450}$ , число кодирующих экзонов в которых обычно колеблется от 8 до 10 (Toda et al., 1994). Сходство с большинством генов цитохромов  $P_{450}$  проявляется и в том, что гем-связывающий участок кодируется последним экзоном (табл. 3).

Этим сходство исчерпывается, и другие свойства  $P_{450аром}$  лишь подчеркивают его уникальность (Simpson et al., 1994; Choi et al., 1996). Место старта трансляции расположено, как отмечалось, не в первом, а во втором экзоне. Существенно, что в роли некодирующего экзона I могут выступать несколько последовательно рас-

положенных участков 5'-фланкирующей области гена. Протяженность кодирующей области (включая II—X экзоны и интроны) достигает 35 т. п. н., а протяженность участка от точки старта трансляции и до того места, где локализуется самый дистальный 5'-некодирующий экзон, равняется примерно 40—45 т. п. н. (эта величина не уточнена, в частности, из-за того, что расстояние между экзонами I.4 и I.2 пока точно не определено). По терминологии, используемой разными авторами, дистальный экзон обозначается как экзон I.1 или Ia, а в соответствии с тканью, в которой он преимущественно используется, — как плацентарный экзон ароматазы (Simpson et al., 1994; Harada et al., 1995; рис. 5, 6).

К необходимости тщательного исследования структурной и функциональной организации экзона I привело несколько обстоятельств. Прежде всего, оказалось, что транскрипты  $P_{450\text{аром}}$ , выделенные из различных эстроген-продуцирующих тканей человека, имеют отличающиеся друг от друга 5'-концевые последовательности (Means et al., 1989; Harada et al., 1993). Помимо этого, хотя последовательности, лежащие приблизительно на 140 п. н. выше точки инициации трансляции, как оказалось, имеют сходство с универсальными промоторными элементами эукариотических генов (ТАТА и СААТ), соответствующие эксперименты не выявили промоторной активности этого участка (Means et al., 1989). Между тем следовало, как и ранее, каким-то образом объяснить тканевую специфичность в регуляции гена ароматазы и процесса эстрогенообразования в целом.

Решение вопроса было достигнуто, как только были представлены доказательства того, что в эти процессы вовлечен механизм альтернативного сплайсинга нескольких нетранслируемых тканеспецифических экзонов I, который сохраняет в неприкосновенности кодирующую область гена ароматазы и аминокислотную последовательность молекулы фермента (Simpson et al., 1994). В частности, выше места старта трансляции в экзоне II и в то же время в тесно прилегающей к нему области был найден участок (рис. 5, 6), обозначаемый как 3'-акцептор сплайсинга (Toda et al., 1996), в котором происходит сшивка отдельных вариантов экзона I с экзонами II. Сплайсинг обеспечивается существованием тканеспецифических промоторов, расположенных перед каждым вариантом экзона I и экзонами II (рис. 5). Промотор, лежащий выше экзона II, обеспечивает экспрессию  $P_{450\text{аром}}$  в яичнике человека (он был обозначен как овариальный). Его предлагается также расценивать как примордиальный (первичный, наиболее древний) промотор экспрессии гена *CYP19*, тем более что аналогичным образом регулируется образование транскриптов  $P_{450\text{аром}}$  в яичниках крысы и курицы (Simpson et al., 1994). При этом следует подчеркнуть и более общую закономерность, сводящуюся к тому, что межвидовая гомология экзона II и участков генов ароматазы, расположенных ниже него, как правило, более высока, чем гомология экзонов I. Это указывает на роль альтернативного сплайсин-

га множественных форм экзона I в обеспечении не только тканевой, но отчасти и видовой специфичности в регуляции биосинтеза эстрогенов.

Для более четкого понимания того, каким образом осуществляется тканеспецифическая регуляция экспрессии гена ароматазы у человека, следует на нескольких примерах кратко проанализировать особенности отдельных экзонов I и их промоторов. При секвенировании вставок кДНК  $P_{450\text{аром}}$ , изолированных из клонотеки кДНК плаценты, оказалось, что эти вставки характеризуются двумя различными 5'-окончаниями и соответствуют двум нетранслируемым экзонам, которые были обозначены как I.1 и I.2 или как 1a и 1e (рис. 6). Почти все *CYP19* транскрипты плаценты представлены, как отмечалось, последовательностями, содержащими экзон I.1; напротив, экзон I.2 является частью лишь минорной фракции транскриптов гена плацентарной ароматазы. Они различаются и своим расположением: в то время как экзон I.1 находится от места старта трансляции на расстоянии порядка 35 т. п. н., экзон I.2 расположен значительно ближе к первому кодирующему экзону (Simpson et al., 1994). Кроме того, еще один экзон, расположенный между экзонами I.1 и II и обозначаемый как 2a (или 2a') (рис. 5, 6), может, как полагают, иметь отношение (правда, в незначительной степени) к экспрессии гена ароматазы в плаценте (Harada et al., 1995; Toda et al., 1996).

Хотя было высказано предположение (Harada et al., 1993), что в течение менструального цикла в ткани яичников может происходить переключение (switching) промоторов ароматазы, последующие наблюдения показали, что транскрипты  $P_{450\text{аром}}$  в ткани желтого тела, фолликулов и культивируемых гранулезных клеток яичников человека практически идентичны и содержат последовательности экзона II (Simpson et al., 1994). По мнению некоторых авторов (Harada et al., 1995), в регуляции экспрессии гена ароматазы в ткани яичника, однако, используются два промотора (рис. 6, B); причины выявившихся различий, возможно, носят методический характер.

Весьма специфичными оказались сведения, характеризующие образования транскриптов гена *CYP19* в жировой ткани. Как уже отмечалось в гл. 1, этот процесс присущ только человеку и обезьянам, поскольку у лошадей, коров, свиней, равно как и у более низших животных, включая грызунов, ароматаза в жировой ткани обнаружена не была (Simpson et al., 1994). Секвенирование 5'-концевых последовательностей кДНК, выделенной из жира молочной железы и бедер, а также из культивируемых стромальных клеток жировой ткани, выявило существование по крайней мере трех вариантов последовательностей, обозначаемых соответственно I.4, I.3 и «усеченный I.3» (Simpson et al., 1994; Zhao et al., 1995). Так как более подробно эстрогенообразование и его регуляция в жировой ткани будут обсуждаться в гл. 4, подчеркнем только, что выбор отдельных последовательностей и формирование соответствующих экзонов зависят при этом от области расположе-

ния исследуемой ткани (в жире из молочных желез превалирует I.4, а в жире из бедер — I.3 и «усеченный I.3»), условий содержания клеток и факторов, на них воздействующих. В частности, в нестимулированных стромальных клетках жировой ткани, растущих в присутствии сыворотки или без нее, 5'-окончания представлены вариантом I.3, в клетках, культивируемых с дексаметазоном, — преимущественно I.4 последовательностями, а в клетках, культивируемых с дибутирил-цАМФ, — последовательностями типа II (обычно присущими ткани яичника) в сочетании с вариантом I.3 (Mahendroo et al., 1993). Экзоны I.3 и I.4 локализуются в гене ароматазы соответственно между экзонами II и I.2 и между экзонами I.2 и I.1 (рис. 5, 6, А), причем экзон I.4 помимо жировой ткани используется еще и в некоторых эмбриональных тканях (печень, кишечник), а также в фибробластах кожи (Toda et al., 1994, 1996). Еще один нетранслируемый экзон (I.5), точная локализация которого не установлена, как полагают, используется в паре с соответствующим промотором при экспрессии ароматазы в ткани головного мозга (Simpson et al., 1994; рис. 5). Наконец, недавно обнаруженный экзон I.6 действует как промотор в клетках ТНР-1 (см. раздел 4.6), клетках хориокарциномы JEG-3 и остеобластоподобных клетках, полученных от плодов человека, и, как полагают, заслуживает особого внимания в тех ситуациях, где усилена экспрессия экзона I.3 (в частности, в трансформированной ткани молочной железы), поскольку коамплифицируется в полимеразной цепной реакции вместе с последним (Shozu et al., 1998).

Таким образом, не исключено, что в процессе эволюции (см. также гл. 1) произошел отбор генов, их отдельных участков и механизмов, контролирующих на молекулярно-генетическом уровне процесс биосинтеза эстрогенов в гонадных и экстрагонадных тканях, в основе которого, как ныне предполагается и о чем уже говорилось, лежат использование альтернативных промоторов и альтернативный тканеспецифический сплайсинг (Simpson et al., 1994). Об эволюционной природе вышеупомянутого процесса свидетельствуют и недавно представленные предположения о том, что, очевидно, имевшая место много миллионов лет тому назад дупликация гена-предшественника привела в конечном итоге к возникновению не одного, как считалось до самого последнего времени, а двух, а может быть, и большего числа генов ароматазы у свиней и костистых рыб, которые кодируют различные изоформы  $P_{450аром}$  соответственно в плаценте и яичниках и в головном мозгу и яичниках (Tchoudakova, Callard, 1998). Клеточные механизмы, участвующие в регуляции экспрессии гена  $P_{450аром}$ , стали изучаться относительно недавно, и одним из стимулов к этому анализу послужила необходимость оценить, каким образом вовлекаются в модификацию экспрессии данного гена ее наиболее известные стимуляторы, в частности глюкокортикоиды и цАМФ. Оказалось, в частности, что во всех клетках, в которых глюкокортикоиды (например, дексаметазон) стимулируют экспрессию гена ароматазы (стромальные клетки жировой ткани, фибробласты

кожи, гепатоциты эмбриональной печени и т. д.), транскрипты Р<sub>450аром</sub> содержат экзон I.4. Медиаторами стимулирующего эффекта глюкокортикоидов в присутствии сыворотки (или факторов, способных заменить последнюю в этом качестве, прежде всего некоторых лимфокинов — интерлейкина-6, интерлейкина-11 и других; см. также гл. 4) являются одна из тирозиновых киназ, так называемая Jak-киназа, и уже упоминавшийся активатор транскрипции семейства STAT, фосфорилируемый этой киназой. Упомянутый активатор транскрипции связывается с участком промотора I.4 гена ароматазы — своеобразным элементом, чувствительным к глюкокортикоидам и в то же время к активации лимфокинами, из-за чего он получил название GAS (участок, активируемый  $\gamma$ -интерфероном). Направленный мутагенез или делеция участка, занимаемого GAS, приводят к полной утрате способности к экспрессии гена ароматазы. Это позволило прийти к выводу о том, что вовлечение сигнального механизма Jak/STAT является важным клеточным процессом, регулирующим эстрогенообразование в экстрагонадных тканях, и в частности у пожилых людей (Zhao et al., 1995; гл. 5).

Несколько выше говорилось о том, что при культивировании стромальных клеток жировой ткани с дибутирил-цАМФ экспрессия гена ароматазы активируется при участии не только промотора I.3, но и промотора II, более характерного для ткани яичника. Стимулирующий эффект дибутирил-цАМФ при этом более выражен в отсутствие в среде сыворотки и потенцируется при внесении в культуру форболового эфира, в частности форбол-диацетата (Mendelson et al., 1986; гл. 4). В монослойной культуре гранулезных клеток яичника человека цАМФ опосредует стимулирующее влияние на активность ароматазы ФСТ, причем, как в случае стромальных жировых клеток, так и клеток яичника, добавление в среду эпидермального фактора роста существенно ослабляет эффект цАМФ (Mendelson et al., 1990). Все эти процессы, как оказалось, действительно происходят при воздействии на промотор II гена ароматазы. Это позволяет прийти к заключению о том, что регуляция экспрессии данного гена носит не только тканеспецифический, но и отчасти «регуляторспецифический» характер, поскольку в тех тканях, где ароматаза активируется глюкокортикоидами, преимущественно стимулируется промотор I.4, а в клетках, в которых активность ароматазы повышается под влиянием цАМФ, — промотор II (Simpson et al., 1994). В тех же случаях, когда ароматазу и ее мРНК (как в наших экспериментах со стромальными клетками из ткани молочной железы, — Santner et al., 1995) стимулируют и глюкокортикоиды и цАМФ, очевидно, следует ожидать участия в процессе и того и другого промотора.

Считается, что для генов эукариотов, регулируемых цАМФ, характерен ряд общих свойств: 1) как правило, они экспрессируются в тканях, чувствительных к гормонам; 2) скорость их транскрипции под влиянием цАМФ меняется достаточно быстро; 3) мРНК, образующаяся при транскрипции таких генов, имеет

относительно короткий период полураспада, что приводит к быстрому изменению скорости синтеза кодируемых генами белков (Берштейн и др., 1993а). В промоторной области ряда цАМФ-зависимых генов были обнаружены так называемые CRE (cAMP regulatory elements) — участки, регулируемые цАМФ и обладающие свойствами энхансеров; их структура описывается как TGACGTCA (Ferreri, et al., 1994). Иная картина обнаружена в гене ароматазы. Несмотря на то что он стимулируется цАМФ, истинного CRE в его структуре не найдено, а выявлен CRE-подобный элемент (CLS), отличающийся от CRE добавочным цитозином (TGCACGTCA). Наличие CLS оказалось обязательным условием для индукции экспрессии ароматазы, опосредованной промотором II. Последнее доказывалось экспериментами с использованием конструктов, имеющих делеции с 5'-конца промотора II (Michael, Simpson, 1996). Помимо этого, в опытах с химерными конструктами участков гена ароматазы, лежащими в различных отделах его промоторной области, было продемонстрировано существование иных важных регуляторов транскрипции данного гена.

Так, во фрагментах ДНК, изолированных из 3'-конца первого интрона гена *CYP19*, т. е. несколько выше промотора II, был обнаружен ингибиторный регуляторный элемент с функцией сайленсера. Это его свойство проявилось в том, что он тормозил действие вирусного промотора (SV-40), находясь от него на расстоянии нескольких т. п. н. (Wang, Chen, 1992). При работе с ДНК из клеток хориокарциномы линии BeWo, используя химерные конструкты 5'-фланкирующих последовательностей, присоединенные к гену бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы, удалось обнаружить факторы транскрипции со стимулирующей и ингибирующей активностью. Эти регуляторные элементы, как оказалось, могут быть вовлечены в базальную и индуцированную форболовыми эфирами экспрессию  $P_{450\text{аром}}$ . Некоторые из идентифицированных регуляторов связывались с ядерным фактором NF-IL6, который обеспечивает экспрессию интерлейкина-6 (см. гл. 4) и является членом семейства так называемых ССАТ-энхансерных связывающих белков (Toda et al., 1996). Не исключено, что столь сложная и пока до конца далеко не изученная система (рис. 7) принимает участие в обеспечении тканевой специфичности в регуляции ароматазы.

Молекулярно-генетические факторы, как уже отмечалось, играют определенную роль и в поддержании тех особенностей регуляции гена ароматазы, которые были отобраны в процессе эволюции и закрепились у отдельных видов. В частности, не найдено гомологии в характере 5'-нетранслируемых экзонов  $P_{450\text{аром}}$  в blastоцистах свиней, коров, грызунов и человека, несмотря на то что в белковой молекуле ароматазы во всех этих случаях содержится по 503 аминокислотных остатка (Choi et al., 1996). Ароматаза плаценты человека гликозилирована лишь в одном положении (Asn<sup>12</sup>), однако эта модификация отсутствует в аналогичной позиции в ароматазе свиней (Shimozawa et al., 1993). Как уже отмеча-

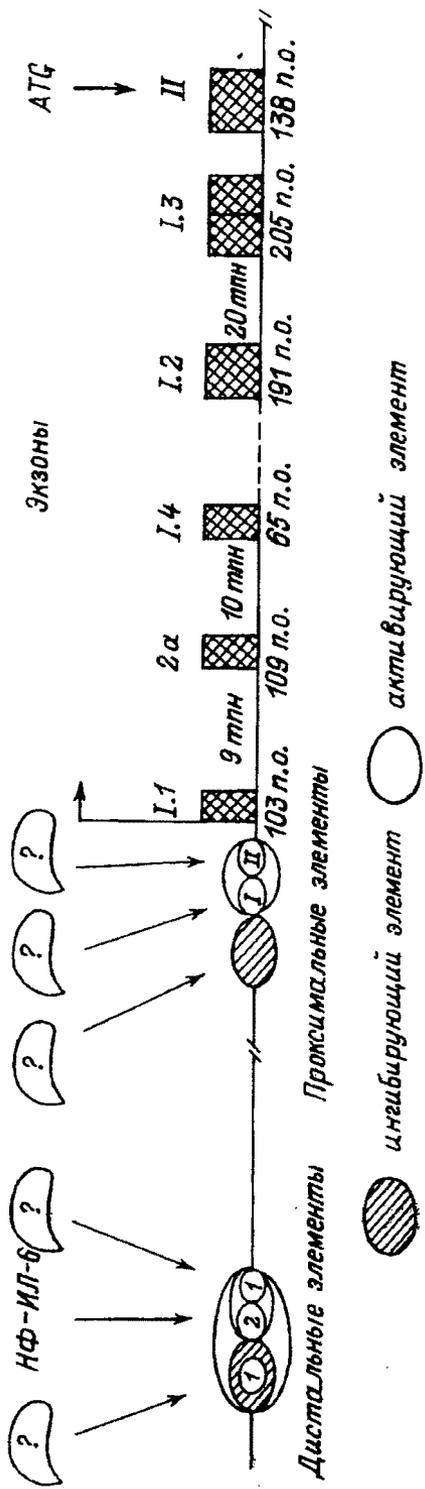


Рис. 7. Регуляторы транскрипции, идентифицированные в 5'-фланкирующей области экзона I.1 гена  $P_{450аром}$  (по: Toda et al., 1996). лось в гл. 1, описаны и мутации гена ароматазы, приводящие к недостаточности этого фермента и определенным фенотипическим проявлениям (Bulun, 1996). В дополнение к уже приводившимся ранее сведениям заслуживает внимания и тот факт, что смена 1123-й пары оснований (С-Т) в IX экзоне гена  $CYP19$  помимо снижения уровня эстрогенов в крови вызывала появление признаков остеопении и усиление роста в длину у пробанда и ее брата, оказавшихся гомозиготами по этой мутации (Oin et al., 1996). Сразу несколько точечных мутаций в кодирующей области  $P_{450аром}$  на границе между экзонном VI и интроном VI привели к недостаточности плацентарной ароматазы, сниженной экскреции эстрогенов и усиленной вирилизации плода и матери (Nagada, 1993). Существуют примеры и обратного характера, когда мутации в гене  $CYP19$  сочетаются с повышением активности ароматазы и избыточной продукцией эстрогенов. В данном случае речь идет об уже упоминавшейся наследуемой передаче aberrантной транскрипции  $P_{450аром}$ , проявляющейся гинекомастией и другими признаками феминизации (Stratakis et al., 1996, 1998), а также о так называемом синдроме Seabright-Bantam у карликовых петухов, имеющих оперение, как у кур, и признаки экстрагонадной продукции эстрогенов в различных тканях, чего у нормальных леггорнов выявить не удается (McPhaul et al., 1993). В самое последнее

время впервые выявлен редкий вариант гена *CYP19*, характеризующийся полиморфизмом ТТГА повторов и способствующий, как полагают (Kristensen et al., 1998), повышению риска развития рака молочной железы.

Завершая этот раздел, следует отметить, что анализ молекулярно-генетических особенностей эстрогенообразования имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Это видно как из вышеизложенного, так и из некоторых других глав книги (гл. 4, 9), в частности из раздела, в котором будут обсуждаться данные об изменениях альтернативного сплайсинга множественных форм экзона I  $P_{450\alpha}$  в опухолевой ткани.

## ГЛАВА 3

### Экстрагонадная конверсия андрогенов *in vivo*: суммарный показатель периферической ароматизации

Через несколько лет после выделения эстрогенов в кристаллическом виде было отмечено (Zondek, 1934), что содержание этих гормонов в моче жеребцов весьма высоко. Это позволило автору упомянутой работы предположить, что в мужском организме может происходить конверсия (превращение, преобразование) андрогенов в эстрогены. Последующие разнообразные наблюдения подтвердили эту догадку: при обследовании мужчин и овариэктомированных женщин, лечившихся тестостероном, или мужчин, которым вводился меченый тестостерон, во всех случаях отмечалось повышение выделения эстрогенов с мочой (Ahmad, Morse, 1965). Поскольку и в плаценте продукция эстрогенов также зависит от внеплацентарных андрогенных предшественников, поставляемых матерью и плодом (гл. 4), в 60—70-е гг. отчетливо сформировалось направление по изучению этого нового механизма образования эстрогенных гормонов. Решающий вклад в развитие проблемы, особенно в период ее становления, внесли три группы исследователей: эдинбургская (Baird et al., 1969), калифорнийская (Longcope et al., 1969) и тexasская (Siiteri, MacDonald, 1973). Параллельно возникла и терминология для описания самого процесса, которая, однако, до сих пор не стала единообразной. На первом этапе предлагалось использовать понятие «экстрагандулярное образование эстрогенов» (Siiteri, MacDonald, 1973) с целью разграничения процессов продукции эстрогенов в истинных железах внутренней секреции и вне их, но в последнее время этот термин используется реже остальных. Практически взаимозаменяемы и встречаются одинаково часто выражения «экстрагонадная конверсия» и «периферическая ароматизация» андрогенов в эстрогены, причем существительные и прилагательные в этих выражениях иногда переставляют местами (например, «периферическая конверсия»). Более важным оказалось то, что для изучения обсуждаемого процесса *in vivo* была разработана соответствующая методология, позволившая исследовать динамику стероидов, прежде всего андрогенов и эстрогенов, и уровень их продукции в организме. Основные сведения по этому вопросу представлены в исчерпывающем обзоре, который до сих пор не устарел (см.: Siiteri, MacDonald, 1973).

Поскольку речь идет об экстрагонадной продукции эстрогенов, считается необходимым для количественной ее оценки определить два параметра: 1) уровень конверсии циркулирующего в плазме андрогенного предшественника в эстроген и 2) плазменный уровень (скорость) продукции упомянутого предшественника. Перемножение этих двух значений дает искомую величину. Важным моментом является ориентировка на определенный андрогенный предшественник, исходя из имеющейся информации. У здоровых женщин концентрация тестостерона в крови относительно невысока, а его превращение в эстрадиол происходит на довольно низком уровне (0.15—0.20 %). То же самое можно в принципе сказать и о других андрогенах, за исключением андростендиона, который не только продуцируется в женском организме в довольно значительных количествах, но и способен к эффективной конверсии в эстрон (1—1.5 % и выше). Таким образом, у женщин проблема изучения периферической ароматизации *in vivo* сводится в первую очередь к оценке вклада андростендиона плазмы в образование эстрона (MacDonald et al., 1967; Siiteri, MacDonald, 1973). У мужчин идентификация основного андрогенного предшественника экстрагонадных эстрогенов более сложна. Доказано, что тестостерон крови у них в этом отношении существенно более значим, чем у женщин; кроме того, взаимопревращения циркулирующих тестостерона и андростендиона, с одной стороны, и циркулирующих эстрона и эстрадиола — с другой, у мужчин также протекают более активно (MacDonald et al., 1967).

Как у женщин, так и у мужчин после конверсии андростендиона в эстрон последний может: а) без всяких изменений появиться в циркуляции; б) превратиться в свою условную депо-форму (в частности, эстрон-сульфат), из которой он со временем может высвободиться; в) метаболизировать практически немедленно в эстрадиол. В последних двух случаях количество эстрона, попавшего в циркуляцию, будет меньше, чем количество этого гормона, на самом деле образовавшегося в периферических тканях из андростендиона. Для того чтобы оценить уровень конверсии циркулирующего андростендиона в эстрон, используется следующий принцип. Меченный по тритию эстрон (6.7-<sup>3</sup>H-E<sub>1</sub>, 10 мкКи) и меченный по углероду андростендион (4-<sup>14</sup>C-A, 25 мкКи) вводят обследуемому внутривенно в 50 мл физиологического раствора, затем в течение 3—7 дней (включая день введения) тщательно собирают мочу и определяют (после экстракции, колоночной и тонкослойной хроматографии, ацетилирования и перекристаллизации) отношение <sup>3</sup>H : <sup>14</sup>C во фракции эстрогенных метаболитов мочи. Долю андростендиона, превратившегося в эстрон, или так называемую константу конверсии — КК (transfer constant), рассчитывают по формуле:

$$KK_{KM}^{AE1} = P\text{-}^3\text{H-E}_1 / P\text{-}^{14}\text{C-A} : ^3\text{H} / ^{14}\text{C E}_1 \text{ мочи},$$

где P-<sup>3</sup>H-E<sub>1</sub> и P-<sup>14</sup>C-A — количество метки, введенной внутривенно в виде радиоактивных эстрона и андростендиона, А — андростен-

дион,  $E_1$  — эстрон, КМ — кровь—моча (Siiteri, MacDonald, 1973; Edman, MacDonald, 1978). В последние годы используется и другой вариант этого метода: по  $^{14}\text{C}$  метится эстрон, по тритию — андростендион, разделение продуктов реакции производится с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, а процент ароматизации (ПА) *in vivo* оценивается по формуле:

$$\text{ПА} = \frac{[{}^3\text{H}]\text{Емочи} / [{}^{14}\text{C}]\text{Емочи}}{[{}^3\text{H}]\text{Аинъец.} / [{}^{14}\text{C}]\text{Е}_{1\text{инъец.}}} \cdot 100,$$

где в знаменатель подставляются сведения о количестве меченых эстрона и андростендиона, введенных пробанду, а в числитель — данные о соотношении меченных по  ${}^3\text{H}$  и  ${}^{14}\text{C}$  эстрогенов мочи (фракции эстрона и эстриола, поскольку фракция эстрадиола в этих условиях слишком мала, чтобы ее следовало учитывать) (Geisler et al., 1996).

Если дополнительно хотят оценить, какая доля продуцируемого в организме эстрона образуется в результате конверсии из андростендиона, рассчитывают предварительно три параметра: уровень плазменной продукции андростендиона (ППА), уровень продукции эстрона из андростендиона и суммарный уровень продукции эстрона. ППА является производным от умножения концентрации эндогенного андростендиона в крови (мкг/л) на величину его метаболического клиренса (МК), причем

$$\text{МК (л/24ч)} = \frac{\text{P-}^{14}\text{C-A} \times 1440 \text{ мин/мин инфузии}}{^{14}\text{C-A (распадов/мин)}/\text{л плазмы}}.$$

Уровень продукции эстрона из андростендиона вычисляется на основании умножения ППА на процент ароматизации (см. выше). Суммарный уровень продукции эстрона оценивается методом изотопного разведения — по отношению количества введенной в организм радиоактивной метки ( ${}^3\text{H-E}_1$ ) к удельной радиоактивности эстрона мочи, умноженной на число дней сбора мочи (Siiteri, MacDonald, 1973). Логично полагать, что если величина, характеризующая уровень продукции эстрона из андростендиона, равна или близка величине суммарной продукции эстрона, то другие возможные источники образования эстрона (его секрция гонадами, образование из эстрадиола и т. д.) вряд ли в этом случае принимают какое-либо участие в процессе (Longcope et al., 1969). Такая ситуация, как оказалось, свойственна женщинам, находящимся в менопаузе. Поэтому был сделан вывод о том, что весь или почти весь эстрон образуется в их организме в результате его экстрагонадной продукции (Siiteri, MacDonald, 1973), хотя и имеются определенные возражения против подобного утверждения (см., напр.: Judd et al., 1982).

Ранее высказывались и высказываются до сих пор различные точки зрения в отношении источников продукции эстрогенов в менопаузе (см. также гл. 5). Не отрицая полностью непосредствен-

ного участия яичников (особенно в первые годы после начала менопаузы) и в меньшей степени коры надпочечников в этом процессе, большая часть исследователей полагает, что следует отдавать предпочтение мнению, в соответствии с которым эстрогены образуются из андрогенных предшественников, присутствующих в общей циркуляции (MacDonald et al., 1967, 1978; Grodin et al., 1973; Lonning et al., 1990). Основным из этих предшественников, как отмечалось выше, является андростендион. Уровень его плазменной продукции в менопаузе составляет примерно 1.7—1.8 мг/сут, а местом продукции служит преимущественно кора надпочечников, хотя он вырабатывается также и стромальными клетками яичника (Nagamani et al., 1992). По представленным данным, средний уровень конверсии (процент ароматизации) андростендиона в эстрон у менопаузальных женщин равняется 2.3—2.7 %, а доля эстрона, образующегося из андростендиона плазмы, в суммарной продукции эстрона приближается к 90—97 % (Siiteri, MacDonald, 1973; Geisler et al., 1996). Эстрадиол же в менопаузе возникает преимущественно из преобразованного эстрона (Judd et al., 1982). У мужчин уровень плазменной продукции андростендиона выше (2.5 мг/сут), интенсивность ароматизации *in vivo* ниже (1.7 %), чем у женщин, находящихся в менопаузе (Siiteri, MacDonald, 1973), однако здесь могут иметь некоторое значение не только различия по полу, но и возраст обследуемых (см. далее и гл. 5). Кроме того, соотношение между вкладом тестикул и периферических тканей в продукцию эстрона и особенно эстрадиола пока не совсем ясно (Brodie, Inkster, 1993). У пременопаузальных здоровых женщин величина, характеризующая уровень плазменной продукции андростендиона, в 1.5—2 раза превосходит соответствующее значение у менопаузальных женщин и равняется приблизительно 3 мг/сут. Расчеты показывают, что 1/3 общего пула андростендиона в этот период жизни секретируется яичниками, а 2/3 — надпочечниками (Tagatz, Gurrpide, 1973). Интенсивность периферической ароматизации андростендиона в эстрон у женщин репродуктивного возраста находится на уровне 1.3—1.8 % (Siiteri, MacDonald, 1973; Edman, MacDonald, 1978), т. е., несмотря на то что секреция андростендиона выше, чем в менопаузе, его конверсия в эстрон при сохраненном менструальном цикле примерно в 1.7 раза ниже. В разные фазы цикла доля эстрона, продуцируемого из андростендиона, по отношению к суммарной продукции эстрона может довольно существенно различаться: по пока немногочисленным данным, она наиболее низка в период, близкий к овуляции, а наиболее высока в поздней лютеиновой фазе (рис. 8). У молодых женщин (средний возраст 26 лет) с овуляторным или ановуляторным циклами не удалось установить различий в проценте ароматизации андростендиона в эстрон *in vivo* (соответственно  $1.50 \pm 0.20$  и  $1.80 \pm 0.15$  %;  $p > 0.05$ ). В то же время с увеличением массы тела этих женщин отмечалось повышение интенсивности периферической ароматизации андрогенного предшественника; коэффициенты корреляции между этими

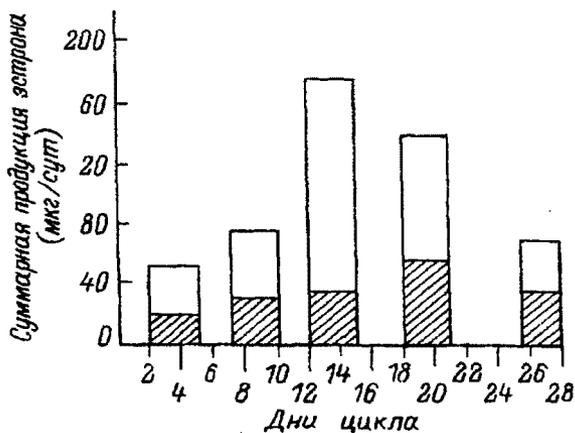


Рис. 8. Суммарная продукция эстронов и доля в ней эстронов (заштрихованная часть столбиков), образовавшегося из андростендиона плазмы на разных стадиях менструального цикла (по: Siiteri, MacDonald, 1973).

параметрами (масса тела и интенсивность ароматизации) в группах с овуляторным и ановуляторным циклами были высокосigni-фичны и равнялись соответственно  $+0.814$  и  $+0.821$  (Edman, MacDonald, 1978; рис. 9, А). Аналогичная зависимость от массы тела, но при более высоких абсолютных значениях процента ароматизации (этот вопрос будет обсуждаться в гл. 5), была выявлена и у менопаузальных женщин; при этом степень корреляции между массой тела и уровнем конверсии андростендиона плазмы была несколько ниже ( $+0.66$ ), чем при сохраненном менструальном цикле (MacDonald et al., 1978; рис. 9, Б). Существенное увеличение массы тела у мужчин также сочетается с усилением ароматизации андростендиона и тестостерона *in vivo* (Schneider et al., 1979).

Тем не менее зависимость интенсивности периферической ароматизации от массы тела устанавливается не всегда (когда, например, обследуется группа лиц, масса тела которых колеблется в пределах нормальных значений, — Jacobs et al., 1992), а по ряду данных, она выражена в меньшей степени, чем связь с возрастом (Longcore, Baker, 1993; гл. 5). Причины возможного влияния избыточной массы на величину ароматизации будут рассмотрены ниже, в частности в гл. 4. Наряду с массой тела исследовались и другие факторы, которые могли бы оказать влияние на интенсивность ароматизации в периферических тканях и в то же время помочь понять, каким образом регулируется этот процесс. Было показано, в частности, что у двух молодых женщин, подвергшихся овариэктомии, процент ароматизации был равен 1.1 и 1.3 %, т. е. находился на уровне, свойственном женщинам с сохраненным циклом (MacDonald et al., 1967). Следует, однако, отметить, что эти наблюдения весьма немногочисленны и что они проводились в срок свыше 1 года после операции, вследствие чего могло

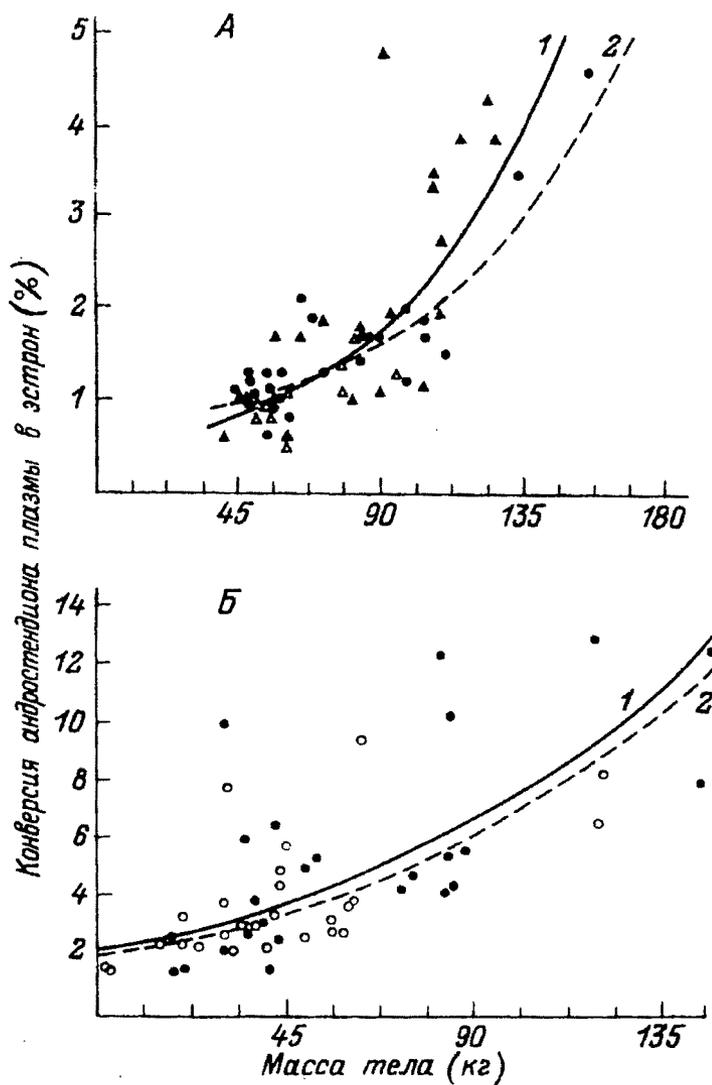


Рис. 9. Конверсия андростендиона плазмы в эстрон и масса тела (по: Edman, MacDonald, 1978; MacDonald et al., 1978).

А — женщины с ановуляторным (1) и овуляторным (2) циклами; Б — женщины в менопаузе: рак тела матки (1) и здоровые (2).

быть пропущено индуцированное повышением секреции гонадотропинов усиление периферической ароматизации в более ранние сроки, если бы оно имело место.

Оснований так думать тем не менее не много. Действительно, введение обезьянам ФСГ (по 500 ед. в течение 5 дней), хорионического гонадотропина (по 1000 ед. в течение 5 дней), а также комбинации этих гонадотропинов не оказывало достоверного влияния на конверсию андростендиона в эстрон *in vivo* (Longcore,

1982). О том же свидетельствуют и данные по оценке воздействия гонадотропных гормонов на активность ароматазы в некоторых экстрагонадных тканях *in vitro* (гл. 4), хотя, как будет видно из дальнейшего изложения, результаты исследований, проводившихся *in vitro* и *in vivo*, применительно к реакции превращения андрогенов в эстрогены совпадают не всегда. Помимо гонадотропинов делались попытки оценить влияние и некоторых других гормонов, вводимых извне, на интенсивность периферической ароматизации. У обезьян 8-недельное введение тироксина (50 мкг/сут), 4-дневное введение АКТГ (120 ед./сут) и 8-дневное введение эстрадиола не сопровождалось изменением процента конверсии (Longcope, 1982, 1987). Ни введение кортизола (4 дня) или дексаметазона (8 дней) обезьянам, ни 4-дневный прием дексаметазона (2 мг/сут) здоровыми женщинами в возрасте 46—53 лет также не вызывали каких-либо изменений этого параметра (Reed et al., 1986; Longcope, 1987). Хотя отчасти все эти данные (за исключением экспериментов с тироксином) могут быть объяснены непродолжительным введением препаратов, не исключено, что экстрагонадное эстрогенообразование менее чувствительно к системным регуляторам, чем продукция эстрогенов в гонадах или активность самой ароматазы в периферических тканях *in vitro* (поскольку, например, добавление глюкокортикоидов к срезам жировой ткани или к культуре ее стромальных клеток очень быстро вызывает в этих объектах экспрессию ароматазы, — гл. 1, 4), а возможно, и нуждается в ином наборе регуляторов. Как бы то ни было, такие наблюдения дополнительно (см. также гл. 1) подтверждают необходимость дифференцированного отношения к данным о содержании эстрогенов в общей циркуляции, их тканевой концентрации и проценте ароматизации из-за возможных различий в особенностях регуляции связанных с величиной этих параметров процессов.

По имеющимся ограниченными сведениям, у молодых женщин (25—37 лет), подвергнутых адrenaлэктомии за 5 лет до обследования и получавших заместительную кортикостероидную (гидрокортизон) терапию, процент периферической ароматизации *in vivo* (в среднем 1.4 %) не отличался от его значений, присущих здоровым женщинам репродуктивного возраста (MacDonald et al., 1967). В целом это представляется несколько странным, поскольку, как говорилось выше, уровень плазменной продукции андростендиона и его концентрация в крови оказывают несомненное влияние на интенсивность экстрагонадной ароматизации и в норме в надпочечниках в этот период жизни продуцируется до 60—70 % всего пула данного предшественника эстрогенов. Следовательно, остается допустить, что основным источником андростендиона, используемого на образование экстрагонадных эстрогенов, у молодых женщин после адrenaлэктомии является андростендион, который секретируется яичниками и образуется наряду с некоторыми другими андрогенами (хотя и в относительно небольших количествах) в процессе метаболических превращений в

периферических тканях; в последнем случае определенную роль играют «взаимопереходы» андростендиона, тестостерона и дегидроэпиандростерона (ДЭА), а также ДЭА-сульфата (Labrie, 1994).

Вопрос о закономерностях периферической ароматизации андрогенов в эстрогены *in vivo* при различных заболеваниях, в том числе при некоторых злокачественных новообразованиях, будет рассмотрен преимущественно в гл. 6 и затронут в некоторых других главах. Пока неясно, имеются ли какие-либо этнические различия в интенсивности экстрагонадного эстрогенообразования, хотя отдельные качественные и выраженные количественные особенности метаболизма эстрогенов у азиатских женщин в сравнении с европейскими и североамериканскими хорошо известны (Adlercreutz et al., 1994a, 1994b). В то же время на основании определения суммарной величины периферической ароматизации *in vivo*, рассчитываемой по данным превращения меченых экзогенных андрогенных предшественников в эстрогены (см. выше), трудно судить о вкладе в этот процесс отдельных тканевых источников экстрагонадного эстрогенообразования. Более четкое представление об их роли может дать анализ активности ароматазы и особенностей ее регуляции непосредственно в этих тканях, а также в некоторых злокачественных опухолях, чему и посвящена следующая глава.

## ГЛАВА 4

# Основные тканевые источники экстрагонадного синтеза эстрогенов; возможное функциональное предназначение, роль в патологии

### 4.1. ПЛАЦЕНТА

Суммируя прежде всего то, что говорилось в отношении плаценты ранее, следует еще раз подчеркнуть, что причисление этого органа к внегонадным (экстрагландулярным) продуцентам эстрогенов оправдано и терминологически, и анатомически, и, помимо того, различиями в особенностях биосинтеза эстрогенов в плаценте и гонадах, о чем речь пойдет ниже. Не у всех животных, имеющих плаценту, последняя способна синтезировать эстрогены (табл. 2). Как уже отмечалось, в одном из объяснений данного феномена отсутствие такой способности связывается с длительностью беременности: при ее небольшой длительности плацента не успевает «перехватить» функцию эстрогенообразования у яичников (Harada, Yamada, 1992; Simpson et al., 1994). Выше говорилось также об уникальном свойстве ароматазы плаценты быть одновременно 2- и 6 $\alpha$ -гидроксилазой и катализировать образование соответствующих дериватов эстрогенов (Osawa et al., 1995; гл. 1). Немало места было уделено, кроме того, особенностям функционирования гена ароматазы в плаценте, преимущественному использованию при этом тканеспецифического промотора I.1 и в меньшей степени промотора I.2 и различиям, которые обнаружены в регуляции гена ароматазы в плаценте у отдельных видов животных (гл. 2).

Сама плацента как орган образуется в результате участия в этом процессе матери и плода, хотя некоторые исследователи приписывают преимущественную роль в ее развитии капиллярной сети фетальных тканей. Последняя, как известно, не имеет прямых контактов с материнской системой кровоснабжения. Масса плаценты к 10-й неделе беременности у человека достигает в среднем 20 г, к 20-й — 170 г, к 30-й — 430 г и к 40-й неделе — 650 г. Скорость прибавления массы плаценты после 32—34-й недели беременности снижается, но ее абсолютная масса может увеличиваться (в случае переношенной беременности) вплоть до 44-й недели (Nyttén, Leitch, 1971). Увеличение плаценты иногда носит компенсаторный характер с целью воспрепятствовать задержке эмбрионального развития (Barker, 1996), однако нередко масса эмбриона (плода) и масса плаценты позитивно коррелируют между собой. По некоторым данным, гены отца играют доминиру-

ющую роль в развитии плаценты, а гены матери — в развитии плода, что тем не менее не объясняет, почему плацента увеличивается в размерах быстрее, чем плод, в раннем периоде беременности и значительно медленнее — на ее завершающем этапе (Naeve, Tafari, 1983). Большую часть своего существования плацента представляет собой не так называемый «послед», а активно функционирующую ткань, которая выполняет особо важную роль в стероидогенезе, и ее масса при этом имеет немалое значение. Стероидогенная функция плаценты тесно связана с другими функциями фетоплацентарного комплекса, но именно на примере образования в плаценте стероидов, и в первую очередь эстрогенов, становится понятным единство отдельных компонентов данного комплекса в обеспечении столь сложного процесса.

Действительно, в результате исследований, проводившихся на протяжении последних четырех десятилетий, стало ясно, что плацента человека (как и плацента различных видов обезьян) в отличие от гонад не может конвертировать ацетат в эстрогены *de novo*. Ткань плаценты не обладает самостоятельной эстрогенпродуцирующей системой, поскольку в ней, в частности, не обнаружена 17- $\alpha$ -гидроксилаза/17,20-лиаза, превращающая прегненолон в дегидроэпиандростерон, один из важных андрогенных предшественников, который способен к конверсии в андростендион (Albrecht, Pere, 1990). Логично было предположить, что, для того чтобы плацента могла синтезировать эстрогены, андрогенные предшественники должны поступать в нее извне. В начале 60-х гг. была доказана ведущая роль в этом отношении надпочечников плода (Siiteri, MacDonald, 1963). Выяснилось, что в образование эстрона и эстрадиола в плаценте последние вносят примерно одинаковый вклад с надпочечниками матери, однако не менее 90 % 16 $\alpha$ -гидроксидегидроэпиандростерона, необходимого для синтеза эстриола — основного плацентарного эстрогена у человека, образуется в надпочечниках плода (рис. 10). При этом помимо ароматазы в процессе используется еще несколько ферментов: 16 $\alpha$ -гидроксилаза, преобразующая дегидроэпиандростерон-сульфат (ДЭАС) в 16 $\alpha$ -гидроксиДЭАС, сульфатаза, превращающая ДЭАС в дегидроэпиандростерон (ДЭА) и 16 $\alpha$ -гидроксиДЭАС в 16 $\alpha$ -гидроксиандростендион, 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа, катализирующая образование андростендиона из ДЭА, и 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа (см. гл. 1), способствующая взаимопревращениям эстрона и эстрадиола. Сама ароматаза, как уже неоднократно отмечалось, обеспечивает конверсию андростендиона в эстрон, тестостерона в эстрадиол, 16 $\alpha$ -гидроксиандростендиона в эстриол и локализуется, по данным иммуноцитохимического анализа, исключительно в эндоплазматическом ретикулуме синцитиотрофобласта (Fournet-Dulguerov et al., 1987).

Плацента становится основным источником образования эстрогенов у человека начиная с 9-й недели, у макак-резусов с 24-го, у бабуинов с 40-го дня беременности, т. е. во всех этих случаях примерно после того, как проходит 1/4—1/6 общей продолжи-

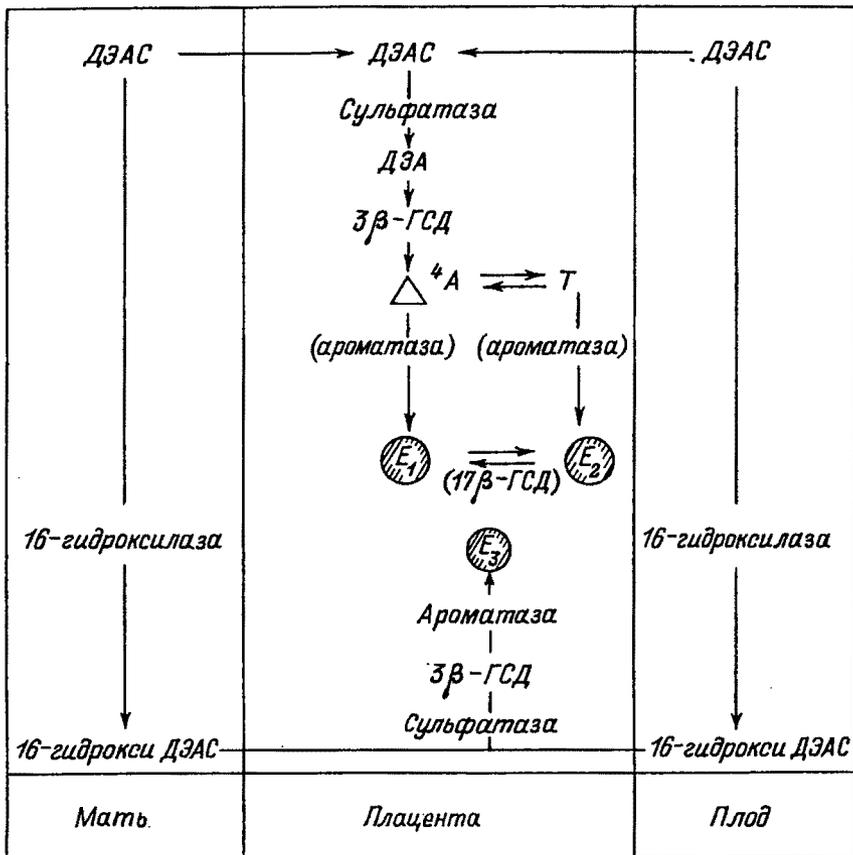


Рис. 10. Биосинтез эстрогенов в фетоплацентарном комплексе человека (по: Albrecht, Pere, 1990).

А — андростендион, ГСД — гидроксистероиддегидрогеназы, ДЭА — дегидроэпиандростерон, ДЭАС — дегидроэпиандростеронсульфат, E<sub>1</sub> — эстрон, E<sub>2</sub> — эстрадиол, E<sub>3</sub> — эстриол, Т — тестостерон.

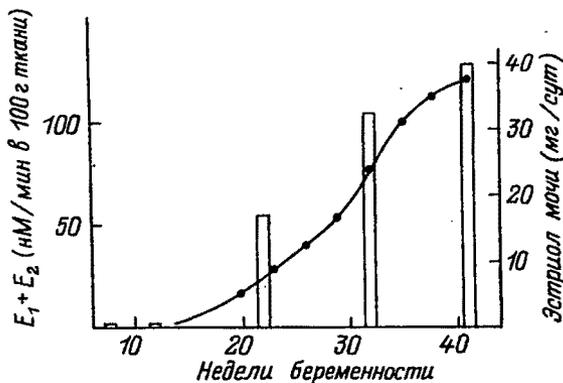


Рис. 11. Сравнение активности ароматазы в плаценте (столбики) и уровня секретиции эстриола с мочой (штрихпунктирная линия) на разных сроках беременности (по: Bedin et al., 1980).

E<sub>1</sub> — эстрон, E<sub>2</sub> — эстрадиол.

Таблица 4

Выведение эстрогенов с мочой и их концентрация в крови на заключительной стадии беременности (по: Levitz, Young, 1977)

Вид	Концентрация эстрогенов в					
	крови (нг/мл)			моче (мг/сут)		
	Е <sub>1</sub>	Е <sub>2</sub>	Е <sub>3</sub>	Е <sub>1</sub>	Е <sub>2</sub>	Е <sub>3</sub>
Человек	6	17	8	2	1	30—40
Шимпанзе	2—3	5—8	4—10	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Бабуин		4—7	Нет данных	То же	То же	То же
Макака	0.4	0.7	То же	»	»	»

Примечание. Е<sub>1</sub> — эстрон, Е<sub>2</sub> — эстрадиол, Е<sub>3</sub> — эстриол.

тельности беременности. До этого момента эстрогены продуцируются преимущественно гонадами. У крыс, мышей и кроликов гонады выполняют такую функцию (см. гл. 1) на протяжении всей беременности, а их плацента является лишь поставщиком С<sub>19</sub>-андрогенных предшественников для гонадного биосинтеза эстрогенов (Albrecht, Pere, 1990), что свидетельствует о существенных различиях в обеспечении данного процесса у отдельных видов. Различия наблюдаются, как выясняется, и в отношении того, какая фракция эстрогенов преимущественно синтезируется плацентой. Хотя общее мнение, казалось бы, сводится к тому, что такой фракцией является эстриол (Othman, Oakey, 1996), это справедливо лишь для человека и человекообразных обезьян: горилл, орангутанов, шимпанзе. В то же время у обезьян Старого Света — макак и бабуинов — этим эстрогеном является эстрадиол и соответственно превалирует его образование в плаценте из тестостерона (Albrecht, Pere, 1990). К моменту родов в крови у женщин наиболее высоко содержание неконъюгированного эстрадиола, у шимпанзе — эстриола и эстрадиола, у макак, как и у человека, — тоже эстрадиола, но при значительно более низких его концентрациях. С мочой у женщин на протяжении всей беременности больше всего выводится эстриола, причем перед родами его секреция в 15—30 раз превосходит экскрецию эстрадиола и эстрона (табл. 4) и эта величина коррелирует с активностью ароматазы в плацентарной ткани (рис. 11).

Поскольку столь значительная экскреция матерью эстриола является отображением интенсивности стероидогенеза и соответственно функционального состояния плаценты и фетоплацентарного комплекса, оправданно считается, что нормальное содержание эстриола в моче характеризует отсутствие каких-либо отклонений и в состоянии плода. Напротив, при развитии пузырного заноса, подавлении активности фетальной коры надпочечников

экзогенными глюкокортикоидами, анэнцефалии плода и в еще большей степени — при его гибели выявляется существенное снижение продукции эстриола плацентой, что в большей части этих примеров связано с уменьшением количества поставляемых в плаценту из надпочечников плода андрогенных предшественников эстрогенов. Эстрогены, в свою очередь, способны усиливать образование прогестерона в плаценте (влияя на захват последней липопротеидов низкой плотности — своеобразных переносчиков холестерина — и на активность фермента, катализирующего отщепление боковой цепи холестерина и образование прегненолона) и тем самым косвенно поддерживают течение беременности (Hyttén, Leitch, 1971; Albrecht, Pepe, 1990). Таким образом, при неблагополучии плода создается истинно порочный круг, так как не только уменьшается по описанному механизму продукция эстрогенов плацентой, но и не поддерживается на должном уровне индукция секреции основного гормонального хранителя беременности — прогестерона.

Помимо вышеперечисленных особую клиническую ситуацию, приводящую к сниженной продукции эстрогенов плацентой, представляют собой токсикозы беременности. Они проявляются симптоматикой преэклампсии (тошнота, рвота, гипертония, отеки, протеинурия) или даже эклампсии (судороги, иногда развитие комы). В последнее время гипозэстрогения, свойственная токсикозам беременности, стала рассматриваться в неожиданном ракурсе — как фактор, понижающий риск развития рака молочной железы у плода в будущей взрослой жизни. При этом считается, что эстрогены относятся к числу тех факторов, которые уже пренатально (т. е. *in utero*) могут оказывать влияние на дифференцировку и пролиферацию эпителия молочных желез, а возможно, могут вызывать в нем и иные изменения (Ekbom et al., 1997). В такой трактовке ослабление способности ткани плаценты к биосинтезу эстрогенов предстает уже не только как элемент патологических изменений, проявляющихся в достаточно короткие сроки, но и как звено в цепи событий, ведущих к весьма отдаленным неблагоприятным последствиям.

Наряду с этим выявлены состояния, когда фетоплацентарный комплекс производит большее, чем обычно, количество эстрогенов, и соответственно их концентрация в крови и выведение с мочой повышаются. К числу таких состояний, в частности, относится беременность двухяйцевыми близнецами (*dizygotic twins*), когда имеются две плаценты, а не одна. Гиперэстрогения свойственна и ситуациям, когда выявляются крайняя степень незрелости плода или желтуха новорожденных (Gerhard et al., 1986; Ekbom et al., 1997). Усиленная экскреция эстриола отмечается при увеличении массы плода (Hyttén, Leitch, 1971; Gerhard et al., 1986). Как рождение крупных плодов (особенно с массой 4 кг и более), так и вынашивание двухяйцевых близнецов сопровождаются увеличением риска развития в будущем некоторых злокачественных новообразований у матери и/или потомства (Берштейн, 1973;

Hsieh et al., 1992; Michels et al., 1996). Однако пока неясно, справедливо ли объяснять эти наблюдения преимущественно влиянием избытка эстрогенов (Michels et al., 1996), или тому следует давать и другие объяснения, например принимать во внимание роль гиперинсулинемии, ассоциированной с увеличением массы новорожденных (Берштейн, 1988). По некоторым данным, образование эстрогенов в плаценте усилено, с одной стороны, при первой беременности, а с другой — при большем возрасте матери (см. Ekblom et al., 1997). Хотя эти наблюдения, казалось бы, в определенном смысле исключают друг друга, под такую рубрику попадают, например, так называемые поздние первородящие. В эксперименте также выяснилось, что масса плаценты у 9—12-месячных беременных крыс более высокая, чем у 3—5-месячных (Rahima, Bruce, 1987), что косвенно подтверждает только что сделанное заключение. На массу плаценты и содержание эстрогенов в крови могут оказывать влияние и некоторые внешние факторы, в частности употребление кофе, алкоголя, курение, однако речь об этом пойдет в соответствующем разделе книги (гл. 8).

Наконец, наряду с такими параметрами, как масса плаценты, интенсивность утеротропного кровообращения, доставка в плаценту андрогенных предшественников из надпочечников плода матери и некоторыми другими (Albrecht, Pepe, 1990), модифицирующее влияние на биосинтез эстрогенов в плаценте оказывают и особенности аутокринно—паракринной регуляции этого процесса факторами, образующимися локально. О некоторых из них (ИЛ-1, ИПФР-I, цАМФ, сами эстрогены и т. д.) уже говорилось в гл. 1, где, в частности, отмечались различия в чувствительности ароматазы к этим регуляторам в ткани плаценты и яичников. Здесь же хотелось бы подчеркнуть, что в малигнизированном трофобласте, например в клеточных линиях хориокарциномы человека Jar, BeWo и JEG-3, дибутирил-цАМФ, теофиллин и холерный токсин стимулировали активность ароматазы в значительно большей степени, чем в монослойной культуре или в эксплантатах нормальной плаценты (Lobo et al., 1985; Albrecht, Pepe, 1990), т. е., сверх ожиданий, последняя в данном отношении оказывается более автономной, чем ткань опухолей синцитиотрофобласта (см. в связи с этим также разделы 4.7 и 4.8). Что же касается эстрогенов, то они принимают участие в регуляции активности ароматазы и в ряде других тканей, в том числе в ткани головного мозга, которая наряду с гонадами является уникальным образованием в том смысле, что ее способность к эстрогенообразованию выявлена у всех без исключения обследованных видов позвоночных (Simpson et al., 1994).

#### 4.2. ЦЕНТРАЛЬНАЯ НЕРВНАЯ СИСТЕМА

Помимо уже отмеченной универсальной способности к продукции эстрогенов в головном мозгу у всех видов позвоночных (см. гл. 1) эстрогенообразование в центральной нервной системе харак-

теризуется рядом иных особенностей, заслуживающих внимания. Непосредственно активность ароматазы в ткани головного мозга была выявлена впервые в начале 70-х гг. (Naftolin et al., 1975). Однако еще до этого накапливались факты, из которых следовало, что хотя мужской половой гормон (тестостерон) весьма важен для маскулинизации и дифференцировки ряда функций центральной нервной системы, он, не исключено, является в этом процессе прогормоном, а решающую роль в данных событиях следует отводить эстрогенам (Levin, Mullens, 1964; Weisz et al., 1982).

Необходимо отметить, что критические периоды, когда проявляется так называемое организующее действие половых гормонов на половую дифференцировку, у крыс и человека разнесены во времени: у крыс этот этап начинается пренатально, а завершается к 7-му дню после рождения, а у человека он занимает 4—7-й месяцы внутриутробной жизни (Dorner, 1977; Бабичев, 1995). Более того, и основные эксперименты, в которых оценивалось значение реакции ароматизации андрогенов в эстрогены в ткани головного мозга, были проведены, по понятным причинам, преимущественно на грызунах, что заставило ряд исследователей сомневаться в том, в какой степени эти данные и их трактовка могут быть перенесены на высших млекопитающих. Помимо этого, у приматов в отличие от грызунов половое поведение может определяться половыми гормонами не только в момент половой дифференцировки центральной нервной системы, но и в период полового созревания (Бабичев, 1995; Freeman, Rissman, 1996). Тем не менее концепция, рассматривающая трансформацию андрогенов в эстрогены как необходимое условие становления мужского полового поведения, является в настоящее время доминирующей (Honda et al., 1994) и находит значительное число подтверждений. К доказательствам такого рода можно отнести, в частности, способность эстрогенов изменять в раннем онтогенезе половую дифференцировку мозга у самок, обнаружение корреляции между стерилизационным эффектом андрогенов в течение упоминавшегося критического периода половой дифференцировки и интенсивностью превращения их в эстрогены, предупреждение андрогениндуцированной маскулинизации и дефеминизации функций головного мозга при введении ингибиторов ароматазы и ряд других (Резников, 1982; Weisz et al., 1982; Бабичев, 1995).

Для доказательства важной роли эстрогенов существенно также, что ядерные рецепторы этих гормонов локализируются в головном мозгу, главным образом в гипоталамусе и миндалевидном теле, т. е. именно там, где преимущественно выявляется активность ароматазы. Значительная активность этого фермента обнаружена, кроме того, в лимбической области и супраоптическом ядре, а в гипофизе и коре она крайне низка (Naftolin et al., 1975; Sanghera et al., 1991). Высказывается мнение, что ароматаза, локализуемая в лимбической области, в отличие от ароматазы гипоталамуса не чувствительна к влиянию половых гормонов (Naftolin, 1994). Представлены свидетельства присутствия арома-

тазы и в ткани эпифиза. У самцов (в частности, у крыс и кроликов) ароматазная активность в различных зонах головного мозга выше, чем у самок (Schade, Schubert, 1979; Roselli et al., 1984). В то же время введение эстрадиола увеличивает активность фермента в центральной нервной системе кроликов в равной степени и у самцов и у самок, тогда как тестостерон избирательно стимулирует ароматазу в гипоталамусе самок, а прогестерон снижает ее активность в той же ткани у самцов (Reddy et al., 1973). Видовые отличия, однако, важны, очевидно, не в меньшей степени, чем половые, поскольку, например, культивирование ткани переднего мозга черепах с прогестероном приводило не к снижению, а к повышению активности эстрогенсинтазы (Callard et al., 1980), а орхэктомия крыс и кроликов вызывала у них противоположные по направленности изменения (соответственно угнетение и стимуляцию) активности фермента в ткани гипоталамо-преоптической зоны (Roselli et al., 1984).

Определенные видовые отличия наблюдаются и в особенностях экспрессии гена ароматазы в центральной нервной системе, вследствие чего, по одним данным, в ткани головного мозга (как и в фибробластах кожи) в процесс вовлекаются промотор и экзон I.4 (Simpson et al., 1994), а по другим — используются специфический и необычный промотор I.5 и соответствующий экзон (Honda et al., 1994; рис. 6). Экспрессия гена ароматазы достаточно подробно картирована применительно к различным отделам мозга у птиц, в частности зябликов и перепелов; при этом установлены изменения, ассоциированные с пением и окраской перьев, т. е., по существу, с половым поведением. Тем не менее регуляция и гена ароматазы, и каталитической активности фермента в центральной нервной системе до сих пор достаточно подробно не изучалась (Lephart, 1996), хотя имеются предположения о связи процесса ароматизации в ткани головного мозга (помимо его чувствительности к такому регулятору, как цАМФ, — Callard et al., 1980), с одной стороны, с особенностями нейральной трансмиссии (Abe-Dohmae et al., 1996), а с другой — с метаболизмом биогенных аминов и катехолаэстрогенов (Резников, 1990; Balthazart, 1997). В частности, роль биогенных аминов помимо отдельных экспериментов в условиях тканевого культивирования косвенно доказывалась и опытами, в которых световой стресс во время беременности у крыс приводил к нарушению половой дифференцировки и снижению активности ароматазы (табл. 5) в гипоталамусе и миндалевидном теле плодов (Weisz et al., 1982).

Целый ряд вопросов, к сожалению, из-за метаболических или иных причин пока остался за «кадром» и не привлек к себе серьезного внимания исследователей. В частности, это касается возможной роли процесса локальной ароматизации, который происходит в ткани центральной нервной системы, в старении регуляторных центров репродуктивной системы (поскольку известно, что даже однократное введение эстрогенов может приводить к избирательному повреждению определенных нейронов головного

Таблица 5

Активность ароматазы (пМ/г белка) в гипоталамусе плодов крыс, матери которых не подвергались или подвергались стрессу (Weisz et al., 1982)

Группа крыс	Активность ароматазы в различные сроки внутриутробной жизни (дни)				
	17-й	18-й	19-й	20-й	21-й
Контроль	178±43	155±28	212±48	130±13	126±20
Стресс	124±17	129±16	115±14	78±3	114±17

мозга и с возрастом этот процесс усиливается, — Desjardins et al., 1993; см. также гл. 5), в обеспечении процесса памяти (Robinson et al., 1994), предупреждении или, напротив, создании условий для возникновения болезни Альцгеймера (Tang et al., 1996) и т. д. Не имеется, насколько нам известно, и данных об активности ароматазы в ткани различного гистогенеза опухолей головного мозга. Тем не менее, учитывая в первую очередь особенности органной представленности ароматазы у различных видов, не приходится сомневаться в том, что экстрагонадное эстрогенообразование в ткани головного мозга имеет значение не только для полового дифференцировки последнего и формирования полового поведения, но и для осуществления значительного числа других функций центральной нервной системы (Negri Cesi et al., 1996).

#### 4.3. ЖИРОВАЯ ТКАНЬ И ОЖИРЕНИЕ

Жировая ткань испытывает в функциональном смысле определенное «сродство» к стероидным гормонам. Это проявляется, например, в том, что не только глюкокортикоиды, но и половые стероиды оказывают влияние на липолиз и/или липогенез и способны воздействовать на репликацию преадипоцитов и последующее превращение их в истинные жировые клетки; таким свойством обладает, в частности, эстрадиол (Roncari et al., 1977). Одной из важнейших особенностей является, однако, способность самой жировой ткани к накоплению, метаболизму и синтезу стероидов. По содержанию стероидов жир тела эквивалентен, по некоторым расчетам, 40—400 л крови (Deslypere et al., 1985), и понятно, что при увеличении объема жировой массы в ней может возрастать и суммарная концентрация стероидов.

Как следствие, в течение многих лет исследователи обращали внимание на то, каков характер связи между массой тела обследуемых лиц и содержанием эстрогенов в их крови. Помимо чисто академического интереса к данной проблеме имеется и целый ряд прикладных аспектов с экстраполяцией, в том числе, на частоту некоторых злокачественных новообразований и других заболеваний у людей, страдающих ожирением (см. ниже и гл. 6). Оказалось, что, несмотря на кажущуюся внешнюю простоту, взаимоот-

ношения между эстрогенемией и массой тела достаточно сложны и неоднозначны. Причин тому можно назвать довольно много, но мы остановимся лишь на некоторых из них, являющихся, с нашей точки зрения, ведущими. Прежде всего, при одном и том же содержании жира в теле его доля по отношению к общей массе тела может варьировать. Поэтому следует учитывать не только величину жировой массы, но и состав тела, на основании которого (в случае избыточной массы) производится и выделение типов макросомии (Берштейн, 1991). При этом необходимо принимать во внимание, что мышечная и костная ткани, являющиеся основными компонентами так называемой тощей (безжировой) массы, также (как это будет видно из последующих разделов) способны к выработке эстрогенов. Однако у всех трех перечисленных компонентов состава тела (жир, мышцы, кости) могут отмечаться различия в градиенте концентраций эстрогенов в системе ткань — кровь.

Состав тела или, точнее, соотношение в нем жира и тощей массы существенным образом влияет на чувствительность периферических тканей к инсулину и на развитие инсулинорезистентности. В основе возрастной гиперинсулинемии и инсулинорезистентности, предрасполагающих, как ныне считается, к формированию основных неинфекционных заболеваний человека — в первую очередь атеросклероза, гипертонической болезни, ряда злокачественных опухолей и т. д. (Дильман, 1987; Reaven, 1988), лежит комплекс взаимосвязанных процессов, среди которых важная роль принадлежит абсолютному или относительному увеличению содержания жира в теле по мере старения. Напротив, физическая активность приводит к уменьшению доли жира и к нарастанию тощей массы, что сочетается с повышением чувствительности к инсулину и со снижением концентрации последнего в крови (Yki-Jarvinen, Koivisto, 1983). Инсулин является одним из факторов, опосредующих влияние изменений массы или состава тела на продукцию и/или метаболизм эстрогенов. При гиперинсулинемии и инсулинорезистентности, сопутствующих ожирению, отмечаются снижение уровня половых гормонов связывающего глобулина (отражающее подавление его биосинтеза в печени) и, как следствие, повышение концентрации в крови свободного эстрадиола (Nestler, 1993b). В то же время влияние инсулина на стероидный гомеостат, в том числе при ожирении, не ограничивается только эстрогенами, но распространяется, кроме того, на андрогены и их рецепцию (Dunaif et al., 1989), что вносит коррективы во взаимосвязи между массой тела, инсулинемией и эстрогенемией. Кстати, пока не имеется сведений о влиянии инсулина на рецепцию эстрогенов в жировой ткани, хотя сами эстрогенные рецепторы в этой ткани обнаружены, что дополнительно свидетельствует о возможности упоминавшегося выше прямого влияния эстрогенов на жировые депо (Mizutani et al., 1994).

Воздействие избыточной массы на продукцию и метаболизм эстрогенов, безусловно, реализуется не только при участии инсу-

лина. Помимо описанного в гл. 3 усиления конверсии андрогенного предшественника андростендиона в эстрон *in vivo* ряду авторов удалось показать, что у людей с избыточной массой тела происходит повышение уровня продукции ряда эстрогенных фракций, ослабление образования 2-гидроксипроизводных эстрона и эстрадиола (без параллельного изменения интенсивности образования 16 $\alpha$ -гидроксильированных эстрогенов) и повышение захвата тканями организма введенного извне меченного тритием эстрадиола, что в совокупности трактуется как ситуация, способствующая пролонгации эстрогенного действия (Schneider et al., 1983). В полученных при этом результатах выявились, однако, заметные половые различия, а также ряд других особенностей, обусловленных или возрастом обследуемых лиц или состоянием менструальной функции. Так, по некоторым данным, повышение уровня эстрогенов в крови обнаружилось у страдающих ожирением мужчин, но не у женщин с избыточной массой тела и сохраненным менструальным циклом (Schneider et al., 1979; Zumoff et al., 1981a). Задержка в организме экзогенной эстрадиол-тритиевой метки была, однако, больше выражена у тучных женщин, чем у мужчин (Zumoff et al., 1981b). Поэтому не исключено, что упомянутые половые различия во влиянии избыточной массы на пул эстрогенов не однонаправленны и могут проявляться по-разному при оценке отдельных реакций, характеризующих продукцию, обмен и тканевое накопление эстрогенов.

На протяжении последних 10—15 лет достаточно часто отмечается, что в то время как у постменопаузальных женщин с избыточной массой тела опасность развития рака молочной железы повышена, у женщин с сохраненным циклом этот фактор не только не способствует возникновению заболевания, но даже несколько уменьшает вероятность его развития. Такой своеобразной закономерности давались и даются различные объяснения, сводку которых, равно как и собственное толкование проблемы, можно найти в нашей работе (Берштейн и др., 1994б). Самое непосредственное отношение к обсуждаемым вопросам имеет еще одно наблюдение, в соответствии с которым увеличение индекса массы тела у пременопаузальных женщин сочетается со снижением, а у постменопаузальных женщин — с повышением концентрации общего эстрадиола в крови (Potischman et al., 1996a, табл. 6). Уровень эстрона в крови женщин с сохраненным менструальным циклом при этом существенно не изменялся, а у женщин, находящихся в менопаузе, достоверно возрастал, так же как и концентрация общего и свободного эстрадиола по мере увеличения индекса массы. Это позволило ряду авторов независимо друг от друга сделать заключение, что количество эстрона, продуцируемого в жировой ткани из андростендиона и составляющего в менопаузе большую часть эстрона, который образуется в этот период в организме (гл. 3), не только коррелирует с массой тела, но и обеспечивает известную позитивную связь последней с плотностью костной ткани (Suzuki et al., 1995); о том, как сама плотность костной ткани может быть связана

Таблица 6

Зависимость уровня некоторых гормонов в крови от индекса массы тела (ИМТ) у здоровых женщин (Rotischman et al., 1996a)

Гормоны	ИМТ (кг/м <sup>2</sup> ) у женщин			
	с сохраненным менструальным циклом		в менопаузе	
	ИМТ < 23.2 (n=30)	ИМТ от 23.2 до 27.1 (n=27)	ИМТ > 27.1 (n=31)	ИМТ < 23.2 (n=69) ИМТ от 23.2 до 27.1 (n=75)
Е <sub>2</sub> (пг/мл)	123 (92—162)	109 (81—145)	96 (73—126)	6.1 (5.4—6.9)
Е <sub>1</sub> (пг/мл)	78 (65—93)	79 (65—95)	74 (62—88)	28.4 (26—31)
Свободный Е <sub>2</sub> (пг/мл)	1.7 (1.3—2.2)	1.5 (1.1—2.0)	1.5 (1.2—1.9)	0.09 (0.08—0.10)
ПГСГ (нМ/л)	62 (53—72)	53 (45—63)	34 (29—40)	41 (36—47)
Андростендион (нг %)	101 (89—113)	103 (91—117)	87 (77—98)	62 (55—69)
				ИМТ > 27.1 (n=66)
				10.5 (9.2—11.9)
				40.1 (36—44)
				0.16 (0.14—0.19)
				31 (27—35)
				63 (56—71)

Примечания. ПГСГ — половые гормоны связывающий глобулин, Е<sub>1</sub> — эстрон, Е<sub>2</sub> — эстрадиол; в скобках — пределы колебаний отдельных показателей; n — число наблюдений.

со способностью костей к локальной продукции эстрогенов, речь пойдет в разделе 4.5.

Менопауза характеризуется и такой особенностью, как возрастание отношения окружность талии/окружность бедер, т. е. постепенным увеличением жиротложения в верхней части туловища (Kisselbah, Krakower, 1994). Подобный тип ожирения принято называть андройдным (верхним, центральным) в противоположность гиноидному (нижнему, периферическому) с локализацией жира преимущественно ниже талии. Андройдному типу свойственны более выраженная гиперинсулинемия и более заметное снижение концентрации половые гормоны связывающего глобулина (Bjorntorp, 1988), что, казалось бы, должно приводить к повышению уровня свободного, а возможно, и общего эстрадиола в крови. На самом деле, при верхнем типе ожирения выявляется повышение концентрации андрогенов (в первую очередь тестостерона), нарастание же уровня эстрогенов не выражено (Evans et al., 1983; Kaye et al., 1991), и оно в большей степени сочетается с увеличением индекса массы тела, чем с возрастанием величины соотноше-

ния талия/бедра (Bjorntorp, 1988). Более того, в соответствии с результатами проведенных исследований активность ароматазы в подкожной жировой ткани, полученной из области живота, более низка (не менее чем в 4 раза), чем в жировой ткани, располагающейся в области бедер и ягодиц (Killinger et al., 1987), а периферическая ароматизация андростендиона в эстрон *in vivo* у женщин с «верхним» типом ожирения равняется 1.67 %, в то время как в группе с «нижним» типом 2.54 % (Kirschner, Samojlik, 1991). Являясь одним из примеров важности так называемой топоэндокринологии (Берштейн, 1993), эти данные, кроме того, свидетельствуют о существенном значении особенностей эстрогенообразования и регуляции этого процесса непосредственно в жировой ткани.

Первые позитивные (т. е. указывающие на присутствие ароматазы в жировой ткани) работы, в которых удалось преодолеть определенные методические трудности, появились в начале—середине 70-х гг. (Schindler et al., 1972; Nimrod, Ryan, 1975). Однако примерно в то же время были опубликованы исследования, в результате которых ароматаза в подкожном жире обнаружена не была (Bleau et al., 1974), или ее активность там была весьма низка (Frost et al., 1980). Сразу же было обращено внимание на различия в активности фермента в жировых депо различной локализации. В частности, было показано, что в аксиллярном (подмышечном) жире способность к биосинтезу эстрогенов в 5—10 раз выше, чем в жировой ткани молочной железы и абдоминальной стенки (Nimrod, Ryan, 1975). В этом отношении свойства аксиллярного жира оказались практически идентичными таковым жира ягодично-бедренной области, что, как отмечалось, было выяснено значительно позднее (Killinger et al., 1987). Дальнейшее продвижение в изучении вопроса произошло после того, как удалось показать различия в активности ароматазы между стромальными клетками жировой ткани (фибробластоподобными элементами, имеющими мезенхимальное происхождение) и адипоцитами. На основании полученных в тот период данных было сделано заключение, что эта активность на 87 % обеспечивается стромальными/васкулярными клетками и лишь на 13 % — собственно адипоцитами, причем активность фермента в срезах жировой ткани практически равна сумме активностей ароматазы в стромальных и жировых клетках (Askerman et al., 1981; рис.12). Вывод о преимущественной локализации ароматазы в стромальных клетках оказался важным, в частности в том смысле, что при ожирении может отмечаться нарастание как числа (и размеров) адипоцитов, так и числа стромальных клеток (Hirsch, Leibel, 1991), и поэтому степень увеличения содержания эстрогенов в крови при ожирении может зависеть от соотношения числа стромальных клеток и адипоцитов в жировой ткани.

Кроме того, при похудании не отмечается уменьшения числа стромальных клеток, и, возможно, поэтому при снижении массы тела не удалось обнаружить уменьшения процента периферичес-

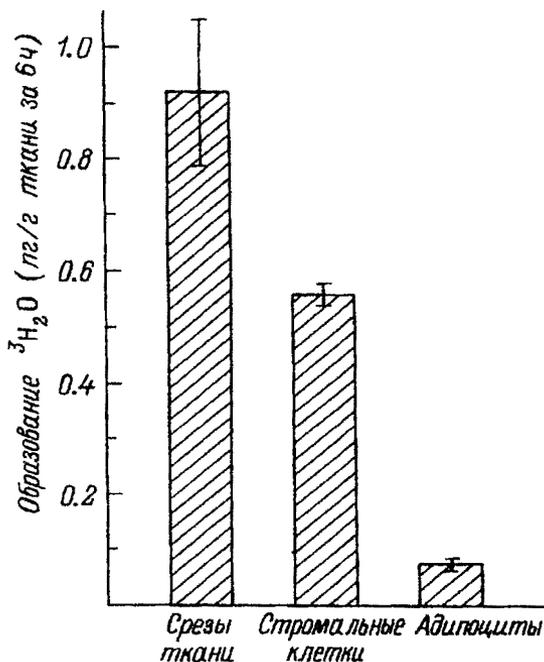


Рис. 12. Распределение активности ароматазы в клетках подкожной жировой ткани человека (по: Ackerman et al., 1981).

По вертикали — активность фермента, оцененная по количеству высвободившейся «тяжелой воды».

кой ароматизации андростендиона в эстрон *in vivo* (Siiteri et al., 1976; гл. 9).

Хотя интактные адипоциты обладают низкой активностью ароматазы, их мембранная (грубая микросомальная) фракция, выделенная в результате дифференциального центрифугирования при 100 000 g, характеризуется активностью этого фермента, сравнимой с активностью аналогичной мембранной фракции из стромальных клеток. Эти данные нашли отражение в предположении, что при работе с интактными адипоцитами происходит быстрая секвестрация андрогенного предшественника в липидной массе клеток, из-за чего он не подвергается достаточной ароматизации (Mendelson, Simpson, 1987). Тем не менее до сих пор не произошло «полного уравнивания в правах» стромальных клеток и адипоцитов и даже в работах последнего времени стромальным клеткам отдается предпочтение как основному источнику эстрогенсинтетазной активности в жировой ткани (Simpson et al., 1996).

Помимо сравнения в вышеупомянутом смысле адипоцитов и стромальных клеток, а также (о чем уже говорилось) жировых клеток из различных участков тела проводились исследования, в которых сопоставляли активность ароматазы в жире, характеризующемся различной глубиной залегания, — в частности в жировой ткани из подкожно-жирового слоя и из большого сальника.

Полученные результаты оказались неоднозначными: по одним данным, эта активность была выше в жире, расположенном более глубоко (Ackerman et al., 1981), по другим — в подкожном жире (Vujalska et al., 1996); еще в одной работе практически никаких различий найдено не было (Deslypere et al., 1985). Несмотря на эти противоречия, совокупность известных сведений позволяет прийти к выводу о том, что особенности топографического распределения ароматазной активности в отдельных жировых депо, во-первых, есть с большой вероятностью результат эволюционного отбора, в том числе по линии функциональной нагрузки (гл. 1); во-вторых, эти особенности тесно связаны не столько с содержанием эстрогенов в циркуляторном русле, сколько с их локальной концентрацией; в-третьих, сама локальная концентрация эстрогенов в существенной степени зависит от чувствительности ароматазы жировой ткани к тем регуляторным сигналам, которые оказывают влияние на ее активность.

Подробное исследование регуляторов этой активности осуществлялось с начала—середины 80-х гг., причем основным объектом для изучения явилась монослойная культура стромальных клеток, выделенных из жировой ткани (Mendelson, Simpson, 1987). Прежде всего было установлено, что Km для андростендиона как субстрата ароматазы в этой культуре равняется 30—50 нм, т. е. находится на том же уровне, что и в свежевыделенных клетках жировой ткани. Эффективным стимулятором активности фермента проявили себя глюкокортикоиды, в частности дексаметазон, который в концентрации  $10^{-9}$  М при инкубации в течение 24 ч увеличивал активность ароматазы в 20—30 раз. Специфической особенностью стимулирующего эффекта глюкокортикоидов оказалась необходимость присутствия в среде эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), и сразу же возник вопрос о том, за счет каких содержащихся в ЭТС факторов обеспечивается данный эффект (см. далее). В отличие от глюкокортикоидов дибутирил-цАМФ не нуждается в ЭТС для стимуляции активности ароматазы в жировой ткани; более того, добавление ЭТС замедляло и ослабляло действие этого циклического нуклеотида (Mendelson, Simpson, 1987). Форболовые эфиры (в частности, ТФА) тоже не нуждаются в ЭТС, и их собственное влияние на активность ароматазы в жировой ткани весьма умеренно (не превышает в оптимальной концентрации 2—3-кратного увеличения по отношению к базальной активности). В то же время при сочетании форболового эфира с дибутирил-цАМФ стимуляция возрастает весьма существенно (на 2 порядка! — рис. 13), что свидетельствует о координации в данном случае сигналов, реализуемых через систему протеинкиназ А и С (Simpson et al., 1989; Берштейн и др., 1993а). 8-Br-дериват цАМФ, холерный токсин, АКТГ и агонист  $\beta$ -адренорецепции изопротеренол также повышают активность ароматазы, но в значительно меньшей степени, чем дибутирил-цАМФ (Evans et al., 1987).

Такие факторы, как инсулин, ИПФР-I, гормон роста, пролактин, ФСГ, трийодтиронин, тироксин, прогестерон, не оказывают

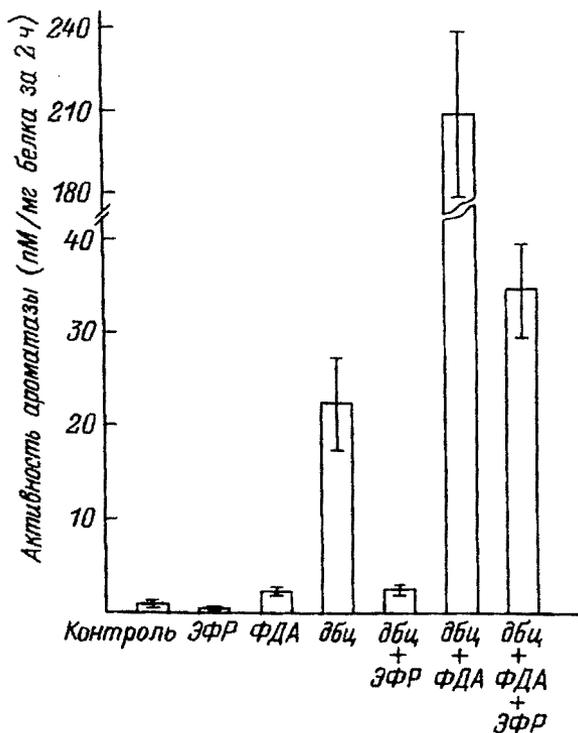


Рис. 13. Влияние различных факторов на активность ароматазы (по вертикали) в культуре стромальных клеток жировой ткани (по: Evans et al., 1987).

Концентрации тестируемых веществ: дибутирил-цАМФ — 1 мМ, ФДА (форболдиэтилацетат) — 100 нМ, ЭФР (эпидермальный фактор роста) — 20 нг/мл.

самостоятельного влияния на активность ароматазы. В то же время имеются сведения, что ИПФР-I, пролактин, а по некоторым данным и инсулин, потенцируют эффект дексаметазона, а прогестерон и медроксипрогестерон-ацетат — эффект дибутирил-цАМФ (Folkerd, James, 1984; Mendelson, Simpson, 1987; Lueprasitsakul, Longcope, 1990). Эпидермальный фактор роста (рис. 13), фактор роста фибробластов и тромбоцитарный фактор роста подавляют стимулирующее влияние на активность ароматазы дибутирил-цАМФ и его комбинации с форболовым эфиром; их действие в этой ситуации эквивалентно эффекту ЭТС (см. выше) и частично, как полагают, объясняет последний (Mendelson, Simpson, 1987). Первоначально аналогичные сведения были получены в отношении трансформирующих факторов роста ( $\beta$  и  $\alpha$ ) и цитокинов — фактора некроза опухолей и интерлейкина-1 $\beta$ , которые при добавлении в концентрации 0.1—1.0 нг/мл к культуре стромальных клеток жировой ткани ограничивали степень повышения активности ароматазы под влиянием дибутирил-цАМФ в сочетании с форболовым эфиром (Simpson et al., 1989). Позднее выяснилось, что в большей концентрации (до 5 нг/мл) фактор некроза опухолей- $\alpha$  не

Таблица 7

Особенности распределения 5'-концевых последовательностей гена P<sub>450аром</sub> в исследованных объектах (Simpson et al., 1994)

Объект исследования	5'-концевые последовательности (используемые экзоны, число случаев)			
	I.3	I.4	I.4/I.2	I.3 (усеченный)
Жировая ткань:				
молочной железы	0	<u>15</u>	0	0
бедер	<u>16</u>	0	0	10
Культура стромальных клеток жировой ткани:				
контроль	3	2	0	1
+дексаметазон с ЭТС	4	<u>7</u>	2	2
+дibuтирил-цАМФ и форболо- вый эфир	9	0	0	1

Примечание. Подчеркнуты наиболее часто встречающиеся последовательности.

ингибирует, а стимулирует экспрессию гена ароматазы в стромальных клетках жировой ткани путем использования специфического для так называемого белка-1 участка связывания, локализующегося выше промотора I.4 (Zhao et al., 1996).

Прежде чем несколько более подробно обсудить особенности экспрессии и регуляции гена ароматазы в жировой ткани, необходимо отметить, что изменение каталитической активности этого фермента в данном случае происходит строго параллельно степени индукции (изменению уровня транскрипции) мРНК, кодирующей цитохром P<sub>450аром</sub>. При использовании Northern-блота в контрольных (нестимулированных) стромальных клетках гибридизуемая РНК не выявлялась. Однако при добавлении в культуру дибuтирил-цАМФ или его комбинации с форболовым эфиром уже через 24 ч мРНК обнаруживалась достаточно четко и притом в значительных количествах; добавление эпидермального фактора роста (см. выше) и циклогексимида (для оценки необходимости образования нового белка!) соответственно ослабляло или полностью нивелировало эффект вышеупомянутых стимуляторов (Simpson et al., 1989). При анализе экспрессии гена CYP19 в жировой ткани человека (см. также гл. 3) были не только установлены регуляторные домены, ответственные за этот процесс, но и показана их зависимость от гуморального окружения культивируемых клеток. В частности, было продемонстрировано преимущественное использование экзона I.4 в жировой ткани молочной железы и в стромальных клетках, которые содержались в присутствии дексаметазона и ЭТС, и экзона I.3 в жире бедренной области и в клетках, культивируемых в присутствии комбинации дибuтирил-

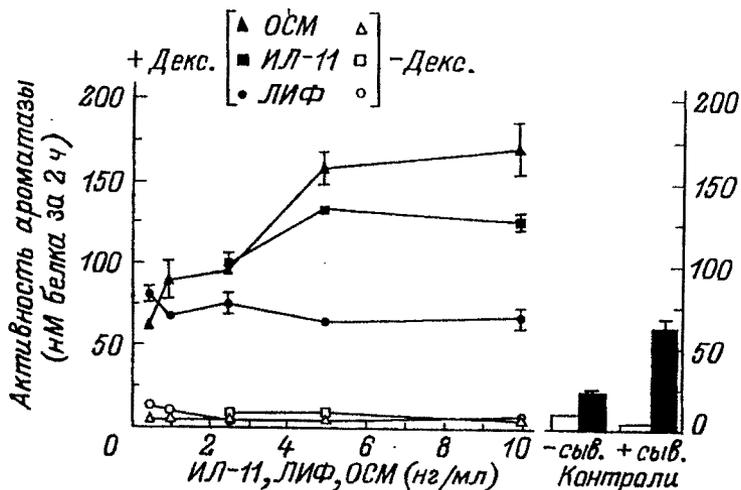


Рис. 14. Участие лимфокинов в опосредовании влияния дексаметазона на активность ароматазы в жировой ткани (по: Zhao et al., 1995).

Декс. — дексаметазон. Остальные сокращения см. в тексте.

цАМФ и форболового эфира (табл. 7; гл. 2; см. также: Agarwal et al., 1997).

Дальнейшие исследования показали, что эта регуляторная селективность еще более сложна и включает в свой механизм несколько дополнительных посредников (Zhao et al., 1995; Simpson et al., 1996). В частности, изучение глюкокортикоидной стимуляции активности ароматазы, реализуемой, как отмечалось, при участии экзона I.4 и соответствующего промотора, показало, что ЭТС в этих условиях может быть успешно заменена факторами из семейства лимфокинов, а именно интерлейкином-11 (ИЛ-11), онкостатином-М (ОСМ) и фактором, ингибирующим лейкемию (ЛИФ). Наиболее мощным потенцирующим действием обладает ОСМ (рис.14). ИЛ-6 в отличие от ИЛ-11 самостоятельным эффектом в данной системе не обладает (см. для сравнения также разделы 4.6 и 4.7), однако стимулирует активность ароматазы в присутствии своего собственного солубилизованного рецептора (Simpson et al., 1996). Влияние лимфокинов опосредуется в данном случае (о чем говорилось ранее) преимущественно тирозиновой киназой Jak-1 и фактором транскрипции STAT-3. Последний взаимодействует с так называемой GAS (последовательностью, активируемой интерфероном- $\gamma$ ), расположенной рядом с элементом, который реагирует на глюкокортикоиды (GRE), и с уже упоминавшимся связывающим участком для белка-1 (Sp1). GAS, GRE и Sp1 локализируются несколько выше промотора I.4 и обеспечивают поддержание сигнала от глюкокортикоидов к ароматазе жировой ткани (Zhao et al., 1995). При этом предлагается такой (скорее всего, предварительный) вариант «разделения функций»: глюкокортикоиды осуществляют тонический контроль экспрессии гена

ароматазы в жировых депо (хотя, как известно, *in vivo* их стимулирующего влияния на активность фермента выявить не удалось, см. гл. 3), а региональные (см. выше) и возрастные (гл. 5) вариации экспрессии находятся под контролем лимфокинов (Simpson et al., 1996).

Имеются определенные противоречия между способностью ИЛ-11 препятствовать дифференцировке преадипоцитов в адипоциты (Simpson et al., 1996) и значительным возрастанием экспрессии мРНК P<sub>450аром</sub> при превращении фибробластоподобных клеток-предшественников в истинные адипоциты (Yamada, Harada, 1990). Возможно, упомянутый эффект ИЛ-11 никак не связан с его свойством усиливать воздействие глюкокортикоидов на активность ароматазы. Пока неясно, связаны ли как-либо с регуляцией эстрогенообразования в жировой ткани некоторые ее специфические белки, — например адипсин и особенно продукт так называемого гена ожирения лептин, концентрация которого в крови возрастает при ожирении и более высока у пременопаузальных женщин, чем у женщин в менопаузе и у мужчин (Rosenbaum et al., 1996), и который обладает определенным влиянием на репродуктивную систему, способствуя, в частности, увеличению массы матки и яичников у мышей линии ob/ob (Barash et al., 1996). Из пока мало изученных стимуляторов активности ароматазы обращает на себя внимание тромбоцитарный фактор роста: его комбинированное действие с глюкокортикоидами усиливается пуриновыми нуклеотидами, он способен индуцировать пролиферацию стромальных клеток жировой ткани и к нему чувствительны лишь стромальные клетки из жира молочной железы, но не из других депо (Schmidt et al., 1996).

Жир из ткани молочной железы отличается еще рядом особенностей, которые заслуживают обсуждения. В частности, четыре разные группы исследователей изучали эстрогенообразование в отдельных квадрантах молочной железы у больных раком или доброкачественными локализованными заболеваниями органа. В хронологически первой из этих работ было показано, что активность ароматазы, определявшаяся по высвобождению тяжелой воды, наиболее высока в тех квадрантах, в которых расположено само новообразование, а поскольку опухоли чаще локализовались в верхненаружном квадранте, то и средняя активность фермента в нем ( $17.4 \pm 2.2$  фМ эстрогена/мг белка в час) была выше, чем, например, в нижневнутреннем ( $11.5 \pm 2.0$  фМ/мг белка в час) (O'Neill et al., 1988).

Та же группа авторов в своей предыдущей работе показала, что в жировой ткани, лежащей вблизи злокачественных опухолей молочной железы, активность ароматазы ( $27.0 \pm 2.8$  фМ/мг белка в час) достоверно выше, чем в жире, окружающем образования доброкачественной природы ( $12.3 \pm 1.7$  фМ/мг белка в час,  $p < 0.0001$ ); при этом никакой зависимости от менструального статуса больных, их массы, роста и некоторых других факторов, характеризующих личный и семейный анамнез, установить не удалось

(O'Neill, Miller, 1987). На основании полученных данных был сделан вывод о том, что опухоль посредством секретируемых ею факторов стимулирует активность эстрогенсинтазы в локализуемом рядом жире или же усиление эстрогенообразования в определенном участке жировой ткани способствует ускоренному росту опухолевых клеток (O'Neill et al., 1988).

В дальнейшем выявилась определенная противоречивость полученных данных, которая вряд ли связана лишь с различиями в методических подходах и пока полностью не поддается трактовке. Так, при использовании метода определения активности ароматазы, основанного на так называемом прямом изолировании продуктов реакции (direct product isolation), т. е. эстрогенов, различий в ферментативной активности в жире квадрантов, содержащих опухоль и не содержащих ее, установить не удалось (Thijssen et al., 1991). Такие же результаты были получены другой группой, использовавшей метод оценки по высвобождению тяжелой воды (Aitken et al., 1996). В то же время на основании использования полуколичественной полимеразной цепной реакции удалось подтвердить данные лаборатории, возглавляемой Миллером (O'Neill et al., 1988), и показать, что: 1) уровень транскриптов P<sub>450аром</sub> наиболее высок в жировой ткани того квадранта, который содержит в себе опухоль молочной железы; 2) чем выше число стромальных клеток в квадранте, тем больше там уровень экспрессии мРНК ароматазы; 3) в жировой ткани молочной железы здоровых женщин уровень транскриптов наиболее высок во внешнеаружных квадрантах, и там же наиболее высоко соотношение стромальных (фибробластных) клеток и адипоцитов (Price et al., 1992; Bulun et al., 1993b; Bulun, Simpson, 1994). Последний вывод, как оказалось, справедлив лишь для отдельных квадрантов молочной железы, но не объясняет различий в экспрессии гена ароматазы между жировыми депо живота и ягодично-бедренной области; там эти отличия основаны на тканевой специфике в использовании множественных вариантов экзона I (гл. 2). В итоге сформировалась основная гипотеза (Bulun et al., 1993b; Simpson et al., 1996; рис. 15), в соответствии с которой ростовые факторы из опухолевых клеток оказывают паракринное влияние на расположенные рядом стромальные клетки жировой ткани, вызывая десмопластическую реакцию и соответственно размножение последних. В свою очередь, увеличение доли стромальных клеток сочетается с возрастанием общего пула образуемых в них эстрогенов, которые стимулируют дальнейший рост опухолевых клеток. При всей привлекательности этой точки зрения она не полностью учитывает роль эпителиальных злокачественных клеток и других клеточных типов в опухолевой ткани, о чем дополнительно речь пойдет в разделах 4.6 и 4.7.

Существенно, что в стромальных клетках жировой ткани молочной железы помимо эстрогенов могут образовываться в избыточном количестве и андрогены, в частности 5 $\alpha$ -андростандион, андростерон и дигидротестостерон. Эти андрогенные дериваты



Рис. 15. Схема положительной обратной связи при регуляции эстрогенообразования в системе «опухоль молочной железы—стромальные клетки жировой ткани» (по: Bulun et al., 1993b).

ФР — фактор роста, Э — эстроген(ы).

способны угнетать активность ароматазы (Perel et al., 1986), что, естественно, может модифицировать как общее содержание эстрогенов в опухоли, так и собственно оценку роли стромальных клеток в эстрогенообразовании (Бершгейн и др., 1995б). По другим сведениям, активность ароматазы в жировой ткани молочной железы негативно коррелирует с содержанием в этой ткани прогестерона (Newton et al., 1986), а по данным, полученным при нашем участии, в культуре стромальных клеток, выделенных из жировой ткани молочной железы, каталитическая активность и экспрессия мРНК ароматазы нечувствительны к форболовому эфиру и цАМФ, но в существенной степени стимулируются дексаметазоном (Santner et al., 1995). Последнее наблюдение косвенно соответствует заключению об использовании чувствительного к глюкокортикоидам (см. выше) экзона I.4 в процессе экспрессии гена ароматазы в жировой ткани молочной железы (Bulun, Simpson, 1994a); в то же время имеется сообщение о сдвиге (switching) от экзона I.4 к эксонам I.3 и II в 3 из 5 исследованных образцов жира, взятого из молочной железы больных со злокачественной опухолью этого органа (Harada et al., 1993).

Влияние опухолевой ткани на особенности эстрогенообразования в жировой ткани дополнительно проявилось и при обследо-

нии больных раком эндометрия. Так, в двух из трех известных нам работ в параметрическом и абдоминальном жире этих больных отмечалось 2—5-кратное повышение активности ароматазы по сравнению с активностью этого фермента в аналогичных участках жировой ткани здоровых женщин (Schindler et al., 1972; Forney et al., 1981). Корреляция интенсивности реакции ароматизации *in vitro* с массой тела была при этом у больных раком тела также выше, чем в контрольной группе (Forney et al., 1981), что, очевидно, свидетельствует о реальном влиянии факторов, секретлируемых опухолью, на паракринную регуляцию процесса экстрагонадного биосинтеза эстрогенов (см. также разделы 4.6—4.8).

#### 4.4. МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ

Мышцы представляют собой наиболее динамичный во многих отношениях элемент тощей массы, т. е. одного из двух (наряду с жировой тканью) важных компонентов состава тела. Для многих физиологических и патологических состояний характерно изменение объема мышечной массы, варьирующее от ее гипертрофии до так называемого саркопении, т. е. мышечного истощения. Количественные и качественные характеристики мышечной ткани зависят от пола обследуемых, периода онтогенеза, уровня физической активности и целого ряда других факторов, включая гормональные. Наряду с некоторыми истинными гормонами, о чем речь пойдет ниже, в регуляции объема и функций мышечной ткани участвуют цитокины и ростовые факторы (Belizario et al., 1991; McPheron et al., 1997), причем такие (ИЛ-1 $\beta$ , фактор некроза опухолей- $\alpha$ , трансформирующий ростовой фактор- $\beta$ ), которые известны и как регуляторы активности ароматазы (эстрогенсинтазы). Хотя медленная прогрессирующая потеря тощей и соответственно мышечной массы признается одной из особенностей процесса старения, лонгитудинальные наблюдения свидетельствуют о том, что в части — примерно в четверти — случаев (в первую очередь в зависимости от образа жизни) данный процесс реализуется очень медленно, вследствие чего объем мышечной ткани остается при этом практически константным (Forbes, 1987). Возрастное, а чаще и не возрастное прибавление массы тела нередко связано с увеличением содержания в теле не только жировой, но и тощей массы (Forbes, 1987; Берштейн, 1991), однако плотность мускулатуры при этом может быть ниже соответствующей нормы (Kelley et al., 1991). Все эти наблюдения, безусловно, следует принимать во внимание, переходя к обсуждению вопроса о роли мышечной ткани в продукции эстрогенов.

В соответствии с данными биохимических и иммуногистохимических методов тестирования выделяют различные типы мышечных волокон, в частности медленные и быстрые. В свою очередь, быстрые волокна, называемые иначе волокнами II типа, подразделяются на низкогликолитические (IIA) и высокогликоли-

тические (ИБ). Последние характеризуются уменьшением числа содержащихся в них капилляров и сниженной чувствительностью к инсулину (инсулинорезистентностью) и типичны для людей с уже упоминавшимся «верхним», или андронидным, ожирением (Krotkiewski, Bjorntorp, 1986). Этому типу ожирения свойственна гиперандрогенизация, в частности увеличение содержания тестостерона в крови (Evans et al., 1983). Последний способствует гипертрофии мышечных волокон и перераспределению их качественного набора в пользу варианта ИБ (Seidell, Cigolini, 1990). Влияние тестостерона на мышечную ткань реализуется при участии андрогенных рецепторов. В мышце есть, однако, и рецепторы эстрогенов, посредством которых эстрогены, в частности, предотвращают физиологическое повреждение мышечной ткани, связанное с повышением в ней активности креатинкиназы в процессе тренировки или повышенной двигательной активности (Яковлев, 1990; Koot et al., 1991). Хотя предыдущее изложение как бы подводит к тому, что увеличение объема мышечной массы есть не в последнюю очередь результат андрогенного воздействия, имеются сведения и о том, что у мужчин с избыточной массой тела, связанной преимущественно с увеличением объема мускулатуры, повышено содержание в крови эстрогенов (Segal et al., 1987). На этом основании может быть сделано предварительное заключение о том, что мышечная ткань является не только объектом влияния половых стероидных гормонов, но и источником образования эстрогенов в результате конверсии в них андрогенных предшественников.

Следует отметить, что анализу скелетной мускулатуры в этом отношении уделялось значительно меньше внимания, чем изучению продукции эстрогенов, например, в жировой ткани. В экспериментальных исследованиях было показано, что ароматаза присутствует в гладкомышечных клетках артериальной стенки у крыс (Bayard et al., 1995b) и в кардиомиоцитах новорожденных особей этого вида (Grohe et al., 1998), а в тканях плода человека ее активность в мышечной ткани оказалась существенно ниже, чем в печени и головном мозгу, но выше, чем в ткани селезенки, легких, желудка и надпочечников (Doody, Carr, 1989). Известно очень небольшое число таких работ, проведенных на взрослых людях. В одной из них (Longcope et al., 1978) здоровым мужчинам осуществляли внутривенную инфузию андрогенных предшественников  $^3\text{H}$ -7-андростендиона или  $^3\text{H}$ -7-тестостерона вместе соответственно с  $^{14}\text{C}$ -4-эстроном или  $^{14}\text{C}$ -4-эстрадиолом. 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. При таком подходе конверсия андростендиона в эстрон оказалась в мышцах равна  $0.013 \pm 0.004$ , а в жировой ткани  $0.014 \pm 0.002$ ; конверсия тестостерона в эстрадиол была существенно ниже — соответственно  $0.0007 \pm 0.0001$  и  $0.0012 \pm 0.0002$ . С уче-

том доли мышечной и жировой ткани в теле авторы предположили, что в мускулатуре может образовываться до 25—30, а в жире — до 10—15 % всех экстрагонадных эстрогенов. В другой работе (Matsumine et al., 1986) 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  $^3\text{H}$ -1,2,6,7-андростендиона в эстрон. В материале, полученном от женщин, активность фермента варьировала от 8.8 до 39.8 пг/г сырой массы (в среднем  $14.4 \pm 4.2$ ). Основным выводом исследования сводился к тому, что интенсивность ароматизации андрогенов в мышечной ткани близка таковой в жировой ткани.

Мышечная ткань является, как отмечалось выше, одним из основных компонентов состава тела, ее объем подвергается заметной динамике в онтогенезе, и в менопаузе образование эстрогенов в женском организме происходит преимущественно экстрагонадно (гл. 3, 5). Исходя из этого, мы изучали активность ароматазы по высвобождению тяжелой воды из андрогенного предшественника  $^3\text{H}$ -1 $\beta$ -андростендиона в мышечной ткани больных раком молочной железы и (в качестве группы сравнения) больных, подвергавшихся оперативному вмешательству по поводу травмы (Берштейн и др., 1996). По данным нашего сотрудника А. А. Ларионова (1997), активность фермента в исследованном материале варьировала от 0 до 13 фм/мг белка в час и равнялась в среднем  $2.0 \pm 0.6$  фм/мг белка в час, т. е. была ниже, чем активность ароматазы в жировой ткани и в ткани опухолей молочных желез (см. также раздел 4.7). Достоверных отличий между больными раком молочной железы и группой травматологических больных по активности ароматазы в мышечной ткани обнаружено не было. В то же время в объединенной группе обследованных лиц были отмечены достоверное усиление эстрогенообразования в мышцах в возрасте старше 50 лет и в менопаузе, что представляется весьма существенным (см. гл. 5), и соответственно негативная ассоциация активности ароматазы в мышечной ткани с уровнем эстрадиола в крови, который с возрастом снижается. Значимой корреляции с ростом и массой тела не выявлено (Ларионов, 1997), хотя, по нашим предварительным наблюдениям, при увеличении избытка массы (в первую очередь за счет жира) отмечалась тенденция к нарастанию активности ароматазы в мышечной ткани (Берштейн и др., 1996).

Таким образом, способность к эстрогенообразованию, по-видимому, является конститутивной особенностью мышечной ткани взрослых людей. Несмотря на то что интенсивность данного процесса в мышцах, скорее всего, уступает таковой в жировой ткани, при условном пересчете на общий объем мышечной ткани значимость мышц в экстрагонадной продукции эстрогенов, в том числе в возрасте 50 лет и старше, никоим образом не следует сбрасывать со счетов. Тем не менее в данной области сохраняется немало пробелов. Не известно, в частности, какова чувствительность аро-

матазы мышц к ее ингибиторам, какими факторами регулируется активность ароматазы в мышечной ткани (глюкокортикоиды? цАМФ?) и соответственно какой из вариантов экзона I гена ароматазы (см. гл. 2) преимущественно экспрессируется в этой ткани. Другой из компонентов тощей массы тела — костная ткань — изучен в указанном отношении несколько лучше, хотя исследование и этого тканевого источника внегонадного эстрогенообразования также, как будет видно из последующего изложения, еще далеко от своего завершения.

#### 4.5. КОСТНАЯ ТКАНЬ

В отличие от жировой и мышечной ткани дать количественную оценку величины костной ткани и той доли, которую она занимает в массе тела, значительно сложнее. Это в принципе затрудняет и интегральный анализ роли костей в экстрагонадном эстрогенообразовании. Скелет можно описывать с помощью трех основных факторов: общей характеристики его размера, ширины костей конечностей и их длины. Толщина костей складывается из двух независимых элементов: ширины костномозговой полости и толщины кортикального (компактного) слоя, причем если толщина последнего в определенной степени зависит от развития скелетной мускулатуры, то ширина костномозговой полости — признак весьма индивидуальный и автономный. Весьма индивидуально и соотношение компактного и губчатого вещества костной ткани, причем это соотношение определяется и топографией (локализацией) кости, и соответственно падающей на нее функциональной нагрузкой (Тэннер, 1979). Костной ткани свойственна высокая степень минерализации межклеточного вещества, содержащего до 70 % неорганических соединений, главным образом фосфата кальция. Матрикс костной ткани (или его органическое вещество) образовано в основном белками и липидами. Несмотря на высокую степень минерализации, костной ткани присущ достаточно высокий уровень обновления и приспособления к изменяющимся условиям существования: сдвигам в процессе онтогенеза, ослаблению или усилению двигательной (мышечной) активности, особенностям питания, воздействию гормональных и иных эндогенных и экзогенных факторов.

В контексте настоящего изложения в качестве предварительной информации особую важность представляют сведения об изменениях костей в результате взаимодействия с эстрогенами или в условиях эстрогенного дефицита, а также о том, как и каким образом эстрогены действуют на костную ткань. Естественно, что многие аспекты метаболизма костной ткани, роста и функции скелета могут осуществляться и в отсутствие половых гормонов (эстрогенов и андрогенов). Тем не менее половые стероиды оказывают выраженное влияние на физиологию костей: участвуют в становлении полового диморфизма скелета, в поддержании го-

меостаза минерального обмена в процессе репродукции, в обеспечении баланса костной ткани у взрослых людей и т. д. При этом эстрогенам отводится центральная роль в предупреждении развития постменопаузального остеопороза (Turner et al., 1994; Markus et al., 1996), чем в значительной степени определяется внимание к их экстрагонадной продукции, в том числе в самих костях.

Несколько ключевых понятий облегчат знакомство как с регулирующей эстрогенами структуры, функции и других свойств костной ткани, так и с проблемой остеопороза. Основные типы клеток в скелете представлены остеобластами и остеокластами, соответственно воссоздающими и разрушающими костный матрикс, а также остеоцитами, составляющими его более стабильную основу. Изменения скелета, приводящие к постменопаузальному остеопорозу, — нередко процесс длительный и не всегда легко регистрируемый. Кость обычно перестраивается в отдельных участках, обозначаемых как «единицы ремоделирования» (Parfitt, 1979). В каждом цикле ремоделирования в таких единицах участвуют и остеокласты и остеобласты. Первые создают лакуны в губчатой или резорбционные туннели в компактной структурах кости, а вторые заполняют в результате своего размножения возникшее пространство. Основная задача эстрогенов, как полагают, сводится к сохранению баланса ремоделирования, а остеопороз возникает вследствие главным образом усиления активности остеокластов или, реже, ослабления деятельности остеобластов (Turner et al., 1994). Существенно, что в первые 3—4 года после наступления менопаузы потеря губчатого вещества кости значительно более интенсивна, чем компактного, что, возможно, свидетельствует о большей эстрогенозависимости спонгиозного слоя по сравнению с кортикальным. Тем не менее считается, что роль эстрогенов в развитии остеопороза сохраняется в период менопаузы на протяжении по крайней мере двух десятилетий (Richelson et al., 1984), что, по современным представлениям, оправдывает не менее длительное (но контролируемое в отношении возможных побочных эффектов) применение заместительной эстрогенотерапии, в том числе на базе синтетических эстрогенных аналогов, обладающих селективной остеотропностью (Turner et al., 1994).

Оценка механизмов воздействия эстрогенов на костную ткань в течение длительного времени затруднялась сложностью доказательства присутствия в этой ткани специфических эстрогенных рецепторов. Их содержание в кости по меньшей мере на два порядка ниже, чем в некоторых тканях репродуктивной системы. Преодоление упомянутых, казалось бы лишь технических, трудностей дало, однако, важный дополнительный результат и, по существу, оказалось, что влияние эстрогенов на кости следует так называемому каскадному принципу, т. е. последовательному подключению к процессу генов раннего и позднего ответа, а также вовлечению в него опосредующих элементов, в первую очередь некоторых ростовых факторов и цитокинов (Turner et al., 1994; Raisz, 1996). Важнейшим же итогом названных и выполненных

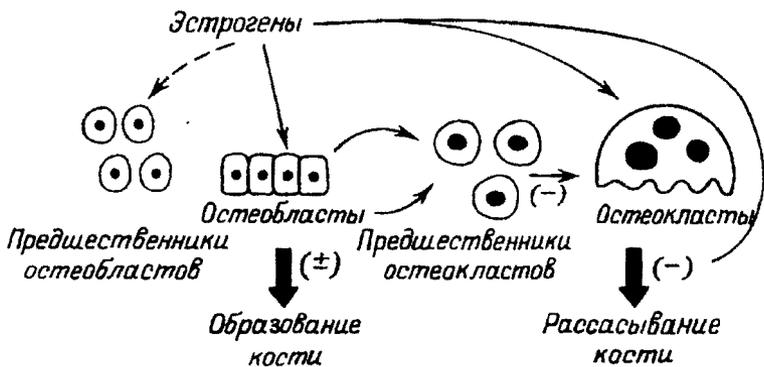


Рис. 16. Влияние эстрогенов на клетки костной ткани (по: Turner et al., 1994).

ранее исследований стало заключение о том, что, хотя роль эстрогенов сводится, как отмечалось, к поддержанию баланса ремоделирования, все-таки в большей степени эти гормоны лимитируют эффект остеокластов (резорбцию кости), чем способствуют новому костеобразованию под воздействием остеобластов (Turner et al., 1994; рис. 16). Так как явления остеопороза в менопаузе развиваются далеко не у всех женщин (Markus et al., 1996), закономерно возникает вопрос о том, как это соотносится с собственной эстрогенпродуцирующей функцией костей и в какой степени подобная особенность присуща костной ткани.

Прежде чем перейти к ответу на эти вопросы, следует отметить, что сопоставление выраженности остеопороза и плотности костной ткани с содержанием эстрогенов и некоторых других стероидных гормонов в крови пока не дало однозначных результатов (Turner et al., 1994; Suzuki et al., 1995). В то же время обнаруженная корреляция плотности костной ткани с уровнем эстрогена в крови оказалась более значимой, чем ее корреляция с уровнем эстрадиола (Nawata et al., 1995; Suzuki et al., 1995). Поскольку в менопаузе эстрогена продуцируется относительно больше, чем эстрадиола (особенно по сравнению с ситуацией у женщин с сохраненным менструальным циклом), и подавляющее его количество при этом синтезируется экстрагонадно (гл. 3, 5), понятно, почему такое внимание уделяется его образованию в этот период в жировой ткани как фактору, модулирующему плотность кости (Suzuki et al., 1995). Понятен также интерес к представленным некоторыми исследователями сведениям о прямо пропорциональной зависимости между плотностью костной ткани и концентрацией в крови дегидроэпиандростерон-сульфата и ряда других надпочечниковых андрогенов (Nawata et al., 1995), поскольку последние, как неоднократно отмечалось, являются предшественниками эстрогенов в реакции ароматизации. Пока неясно, опосредованы ли деструктивное влияние курения (Берштейн, 1995; Markus et al., 1996) и, напротив, протективный эффект ожирения и гиперинсулинемии (Albala et al., 1996; Stolk, 1996) в отношении развития остеопороза

Таблица 8

Активность ароматазы в бедренных костях крыс-самок

Номер животного	Активность ароматазы (фМ/мг белка в час)	
	интактные животные	крысы через 10 дней после билатеральной овариэктомии
1-й	2.56	0.57
2-й	0.74	1.01
3-й	2.45	3.88
4-й	0	3.34
5-й	0.83	0
Средние значения активности ароматазы	1.32±0.51	1.76±0.77

эстрогенно-стероидным механизмом, или они реализуются при участии других факторов. Тем не менее не исключено, что эти особенности у людей с избыточной массой тела или у хронических курильщиков (см. также гл. 8) могут оказывать воздействие и на локальный биосинтез эстрогенов в костной ткани.

Одно из первых заключений о самостоятельной способности костей к образованию эстрогенов было основано на экспериментах, в которых исследовался метаболизм <sup>3</sup>H-тестостерона при его инкубации с измельченной челюстной костью крыс. При этом из тестостерона образовывались как другие андрогены, так и эстридиол и эстриол, а интенсивность образования этих двух эстрогенов находилась на уровне соответственно 73±11 и 36±19 нМ/100 мг ткани (Vittek et al., 1974). Результаты данного исследования с учетом ныне известных сведений вызывают ряд вопросов. Если первый из них (о достаточно активном и несколько неожиданном образовании эстриола) позднее не возникал и внимание исследователей в основном сосредоточилось на биосинтезе в костях эстрогена, то второй (костная ткань крыс как источник эстрогенов) важен до сих пор, поскольку в эволюционно-видовом ряду, как оказалось, тканевому распределению ароматазы присуща «усеченность» при переходе от высших млекопитающих к грызунам, из-за чего, например, в жировой ткани этот фермент не обнаружен не только у грызунов, но и у коров, лошадей и свиней (гл. 1), и как будто не имеется оснований ожидать способности к эстрогенообразованию в костях крыс. Тем не менее и по нашим собственным данным, в цельном гомогенате костной ткани крыс (с массой тела 160—170 г) активность ароматазы хотя и была на низком уровне, но все-таки обнаруживалась примерно в 80 % всех образцов, причем овариэктомия на активность фермента не влияла (табл. 8). Известно еще одно исследование, проводившееся на крысах *in vivo*, когда 12-месячным самцам в течение 4 мес скармливали ингибитор ароматазы

ворозол. При этом у животных на 30 % усиливались резорбционные процессы в кости и на 6—7 % снижалась плотность костей в различных участках скелета, однако, хотя из этих результатов со всей определенностью следует вывод о важности процесса ароматизации для поддержания метаболического баланса костной ткани, можно лишь предполагать, что речь идет об ароматизации непосредственно в самой кости (Vanderschueren et al., 1996).

С костной тканью человека работа проводилась при помощи двух основных приемов: изучения клеточных линий (что, по некоторым данным, упрощает выявление ароматазы, — Lea et al., 1997) и исследования материала, полученного прижизненно во время оперативного вмешательства. В одной из работ второго типа активность ароматазы изучалась в губчатом веществе головки бедренной кости пожилых женщин и мужчин и находилась на уровне 70 фм/г кости в час, или 0.14—1.23 нМ/г ДНК в час, что, по проведенным расчетам, близко в среднем 6 фм/мг белка в час. Отличий между мужчинами и женщинами не отмечалось. Специфичность реакции ароматизации доказывалась 96—97 % -ным ингибированием образования ее конечного продукта в присутствии фазрозола или 4-гидроксиандростендиона (Schweikert et al., 1995). Аналогичным эффектом обладает ингибитор ароматазы 4-гидроксиандростендион в культуре клеток остеосаркомы человека, причем базальная активность ароматазы в этих клетках варьировала от линии к линии, будучи наиболее низкой в клеточной линии MG-63 ( $1.8 \pm 0.2$  фм/ $10^6$  кл. за 20 ч) и наиболее высокой в линии HOS ( $51.0 \pm 1.5$  фм/ $10^6$  кл. за 20 ч) (Purohit et al., 1992). Различия по эстрогенпродуцирующей способности между отдельными линиями остеобластов были обнаружены и в другом исследовании (Nawata et al., 1995), однако при этом активность ароматазы в первичной культуре остеобластоподобных клеток из нормальных костей человека была почти на два порядка выше, чем в линии остеосаркомы HOS. Активность ароматазы и экспрессия транскриптов  $R_{450аром}$  в последних особенно значительно возрастала в результате культивирования клеток с дексаметазоном ( $10^{-7}$  М). Преинкубация нормальных клеток с эстрадиолом, дегидроэпиандростеронсульфатом и  $1\alpha,25$ -дигидроксивитамином  $D_3$  не оказывала влияния на активность эстрогенсинтетазы, однако совместная инкубация  $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина  $D_3$  с дексаметазоном приводила к усилению эффекта последнего пропорционально числу рецепторов витамина  $D_3$  в костной ткани. Еще одно важное и уникальное наблюдение, представленное в этой работе, заключается в преимущественном использовании в нормальных остеобластах человека экзона I.4 гена ароматазы и в меньшей степени — экзонов I.1 и II (Nawata et al., 1995), т. е. комбинации, которая до сих пор не была обнаружена ни в одной из изученных тканей (см. гл. 2). Сведения о синергическом эффекте  $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина  $D_3$  и дексаметазона были подтверждены еще в одном исследовании (Tanaka et al., 1996), однако, по этим данным, экспрессия гена ароматазы в остеобластах человека реализуется при исполь-

зовании лишь промотора и экзона I.4, а о вовлечении в процесс экзонов I.1 и II уже не говорится.

В ряду с уже перечисленными особенностями эстрогенообразования в костной ткани заслуживают упоминания результаты исследования, в соответствии с которыми эмбриональные фибробласты человека (линия FOB) не обладают активностью ароматазы, в то время как первичной линии остеобластов из костной ткани взрослых людей такая активность присуща (Jakob et al., 1996). Это наблюдение свидетельствует об отличии костной ткани, например, от ткани нормальной печени, в которой, наоборот, ароматаза выявляется в эмбриональном периоде и отсутствует у взрослых людей (раздел 4.8). В целом следует отметить что, хотя работ об эстрогенообразовании непосредственно в самой кости относительно немного, этот вопрос в некоторых отношениях изучен, пожалуй, лучше, чем биосинтез эстрогенов в мышечной ткани. Тем не менее практически нет сведений о возрастной динамике активности ароматазы в костной ткани, слабо изучены видовые различия в активности и регуляции ароматазы в ней (объектом исследования, как упоминалось, были лишь человек и крыса), мало известно об аутокринно-паракринном варианте этой регуляции при участии ростовых факторов и цитокинов, секретируемых теми же и/или соседними клетками. Между тем роль подобных факторов весьма существенна как для функционирования остеокластоподобных миелоидных клеток линии THP-1 (Jakob et al., 1996), так и для других клеток гемопоэтического происхождения, которые будут рассмотрены в следующем разделе книги.

#### 4.6. КЛЕТКИ МИЕЛОЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ

По сформировавшимся уже относительно давно базисным представлениям, родоначальницей клеток миелолимфоидной ткани является плюрипотентная стволовая клетка, которая способна превращаться соответственно в лимфоидные и миелоидные стволовые клетки. Лимфоидные стволовые клетки, пройдя ряд этапов, дифференцируются в Т-лимфоциты (супрессоры, CD<sup>8+</sup> или хелперы, CD<sup>4+</sup>) или в В-лимфоциты (клетки памяти и плазматические клетки). Миелоидные стволовые клетки более плодотвы и дают начало четырем росткам: гранулоцитарному (приводящему к образованию эозинофилов, базофилов и нейтрофилов), эритроцитарному (с итоговым образованием зрелых красных клеток крови), мегалокариоцитарному (конечный этап — кровяные пластинки, или тромбоциты) и моноцитарному (завершающемся возникновением моноцитов и их тканевых потомков — макрофагов). В настоящем разделе речь пойдет главным образом о мононуклеарах крови и макрофагах, причем в первую очередь (в качестве перехода к основной теме) заслуживают упоминания некоторые наблюдения, позволяющие не только оценить функциональные особенности этих клеток под обычным углом зрения, но и пока-

зять, что функции, казалось бы, одних и тех же клеток далеко не всегда однонаправлены.

В частности, уже свыше двух десятилетий лимфоциты рассматриваются не только как иммуноциты, но и как своеобразные гормоноциты (Fidler, 1980). Продукция ими и клетками мононуклеарной фагоцитарной системы не только лимфо- и монокинов (цитокинов), но и пептидных гормонов, нейропептидов и нейротрансмиттеров привела наряду с целым рядом других наблюдений к формированию представлений о единстве сети, состоящей из компонентов иммунной, нервной и эндокринной систем (Жорнева, Шхинек, 1988; Weigent, Blalock, 1987; Besedovsky, Del Rey, 1996). В свою очередь, это явилось основой развития учения о нейроиммуномодуляции — феномене, объединяемом общностью как секреторных продуктов, выделяемых миелолимфоидными и соматическими клетками, так и воспринимающего сигнал (рецепторного) аппарата этих клеток (Neveu, Le Moal, 1990; Besedovsky, Del Rey, 1996). Дуалистическая роль Т-лимфоцитов проявляется не только в том, что они при этом как минимум «служат двум хозяевам» — иммунологии и эндокринологии, но и в том, что в зависимости от природы процесса дивергентно поляризуется характер секретируемых ими цитокинов, что (как будет видно из дальнейшего) имеет отношение и к некоторым аспектам экстрагонадного эстрогенообразования. Подобная поляризация, или дихотомия, первоначально была описана на примере Т-хелперов у мышей (Mosmann et al., 1986), а затем с большой долей вероятности подтверждена у человека (Abbas et al., 1996). Кратко (в соответствии с этим представлением) Т-хелперы должны быть подразделены на две субпопуляции: Th1 и Th2. Th1-клоны преимущественно обеспечивают реакцию гиперчувствительности замедленного типа и индуцируют активность макрофагов, а Th2 поддерживают продукцию антител и зависимую от иммуноглобулина Е дегрануляцию тучных клеток и активацию эозинофилов, т. е. участвуют в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Наиболее характерное и фенотипически заметное различие этих клонов состоит в том, что Th1-клетки секретируют в первую очередь ИЛ-2, интерферон- $\gamma$  и фактор некроза опухолей- $\beta$ , а Th2-клоны главным образом ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 (рис. 17). В контексте нашего изложения существенно, что эти группы цитокинов отличаются по способности не только модулировать противоопухолевую резистентность, аутоиммунные, воспалительные и аллергические реакции (Abbas et al., 1996), но и влиять на активность ферментов метаболизма и биосинтеза стероидов, включая активность ароматазы (см. ниже). Макрофаги, участвуя как в деструктивных, так и продуктивных реакциях (Mantovani et al., 1992; Войтенков, Окулов, 1995), тоже как минимум бивалентны в своих функциональных проявлениях, что следует принимать во внимание при оценке роли лимфоцитарно-макрофагального инфильтрата как возможного участника и регулятора процесса стероидогенеза в опухолевой ткани (см. далее и раздел 4.7). Гонадные

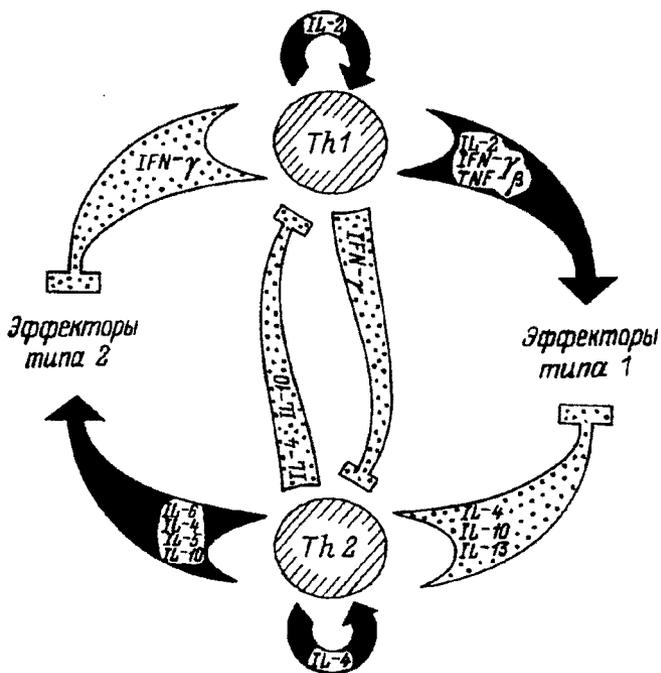


Рис. 17. Цитокины, преимущественно продуцируемые клонами лимфоцитов Th1 и Th2 (по: Abbas et al., 1996).

IL — интерлейкин; IFN — интерферон, TNF — фактор некроза опухоли.

стероиды способны оказывать выраженное влияние на миелолимфоидные клетки, что прежде всего сказывается на состоянии гуморального и клеточного иммунитета (Grossman, 1985; Olsen, Kovacs, 1996). У женщин, находящихся в менопаузе или подвергнутых билатеральной овариэктомии, увеличивается секреция ИЛ-1 и фактора некроза опухоли-α мононуклеарами крови, что устраняется при проведении эстрогензаместительной терапии (Pacifici et al., 1991). Для менопаузы характерно и увеличение числа моноцитов в крови, сочетающееся с уменьшением экспрессии эстрогенных рецепторов на их поверхности (Ven-Hur et al., 1995). Рецепторы эстрогенов выявляются также на поверхности лимфоцитов и макрофагов (Jakob et al., 1992; Cutolo et al., 1996), что позволяет относить все перечисленные клетки к числу клеток-мишеней для женских половых гормонов. В то же время как макрофаги, так и лимфоциты преимущественно за счет вырабатываемых ими цитокинов оказывают влияние на стероидогенез в яичниках (Adashi, 1989; Onami et al., 1996), замыкая тем самым один из контуров цепи миелолимфоидные клетки — половые стероидные гормоны.

Те же клетки обладают способностью и к метаболизму стероидных гормонов. Не затрагивая здесь специально вопрос об обмене глюкокортикоидов в лимфоцитах периферической крови человека (Klein et al., 1980), остановимся лишь на тех данных, которые

имеют отношение к метаболизму и образованию половых стероидов. Известны две работы, в которых изучались взаимопревращения эстрогенов в мононуклеарах крови. В одной из них было показано, что активность эстронсульфатазы (фермента, отщепляющего сульфат от эстрон-сульфата) в лейкоцитах человека более высокая, чем таковая сульфатазы прегненолона и дегидроэпиандростерона, и у женщин она выше, чем у мужчин (Hirato et al., 1991). В другой работе в 3-дневных культурах мононуклеаров крови не удалось установить различий по активности  $17\beta$ -эстрадиолдегидрогеназы (восстановленная форма), т. е. по способности превращать эстрон в эстрадиол, между мужчинами, пре- и постменопаузальными женщинами. При локализованной форме рака молочной железы активность данного фермента в мононуклеарах несколько снижалась ( $3.77 \pm 0.26$  против  $5.64 \pm 0.24$  % у здоровых людей), а при генерализованной форме процесса мало отличалась от нормальных значений. Добавление в среду инкубации глюкозы, эстрадиола, тестостерона, андростендиона на интенсивности данной реакции не отражалось. Поскольку направленность реакции от эстрона к эстрадиолу была значимо большей, чем от эстрадиола к эстрону, авторы пришли к выводу, что мононуклеары крови могут быть существенным источником эстрадиола для периферических тканей (Borkowski et al., 1978), однако вопрос о присутствии или отсутствии ароматазы в этих клетках ими поставлен не был.

Ответ на такой вопрос могли бы дать исследования, в которых использовались андрогенные предшественники эстрогенов и изучались продукты, образующиеся в результате конверсии последних. Подобные исследования проводились как с макрофагами, так и с лимфоцитами. В перитонеальных макрофагах человека, которые инкубировались с  $1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$ -андростендионом, свыше 90 % итогового продукта составил тестостерон. По интенсивности его образования не отмечалось различий между макрофагами здоровых женщин и женщин, больных эндометриозом, хотя между отдельными обследуемыми индивидуальные различия достигали 30-кратной величины (Coddington et al., 1988). При инкубации альвеолярных (легочных) макрофагов человека с тем же меченым по тритию андрогенным предшественником его основными метаболитами были тестостерон и  $5\alpha$ -андростан- $3,17$ -дион и в меньшей степени  $5\alpha$ -дигидротестостерон, андростерон и изоандростерон. Образование эстрона и эстрадиола при этом обнаружено не было. Альвеолярные и перитонеальные макрофаги морской свинки были по этим характеристикам ближе к перитонеальным, а не к альвеолярным макрофагам человека, но отличались более узким спектром образующихся метаболитов (Milewich et al., 1983).

Группа Л. Милевича провела исследования конверсии андростендиона и в лимфоцитах крови человека. С этой целью свежевыделенные лимфоциты из 150 мл крови здоровой женщины с сохраненным менструальным циклом инкубировали с  $1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$ -ан-

дростендином, пробу экстрагировали, подвергали хроматографическому разделению и перекристаллизации до постоянного отношения  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ . Образовавшиеся в итоге продукты были идентичны метаболитам, характерным для конверсии андростендиона в альвеолярных макрофагах человека, с тем отличием, что больше всего образовывалось  $5\alpha$ -андростан- $3,17$ -диона, а продукция тестостерона была в 2-3 раза слабее. Образования эстрона и эстрадиола при этом опять-таки обнаружить не удалось (Milewich et al., 1982). Независимо исследуя этот вопрос, мы использовали для его решения и иные методические подходы.

На первом этапе работа проводилась со свежевыделенными лимфоцитами крови, а для оценки конверсии применялся метод, основанный на регистрации образования тяжелой воды из  $1\beta$ - $^3\text{H}$ -андростендиона. Вследствие стохиометрических особенностей данной реакции (на 1 моль тяжелой воды должен образовываться 1 моль эстрогенов) она с середины 70-х гг. применялась для оценки ароматазной активности в целом ряде тканей (Siiteri, 1982), хотя образование тяжелой воды возможно и без ароматизации кольца А молекулы  $1\beta$ - $^3\text{H}$ -андростендиона (Берштейн и др., 1993б). Использование данного методического приема показало, что лимфоциты крови способны к конверсии андростендиона. Интенсивность этой реакции с возрастом снижается, однако в менопаузе у больных раком молочной железы она выше, чем у здоровых женщин (Берштейн и др., 1994, табл. 9). Обнаружилось также, что у больных раком молочной железы конверсия андростендиона в лимфоцитах крови тем выше, чем выше уровень эстрадиола в крови и чем более продвинута клиническая стадия заболевания. В результате исследования была выявлена, кроме того, обратно пропорциональная связь уровня конверсии андростендиона в лимфоцитах с концентрацией тестостерона в крови, а также с интенсивностью реакции бласттрансформации лимфоцитов (Ларионов, 1997).

Таблица 9

Конверсия андростендиона (А) в лимфоцитах крови у обследованных лиц (Берштейн и др., 1994а)

Группа женщин	Конверсия А (фМ/мг белка в час) у женщин	
	здоровых	больных раком молочной железы
Все обследованные	11.5±1.3(38)	11.0±1.3(36)
В репродуктивном периоде	14.3±1.6(26)	13.6±2.1(11)
В менопаузе	5.4±0.5(12)	9.9±1.6(25)

Примечание. В скобках — число наблюдений.

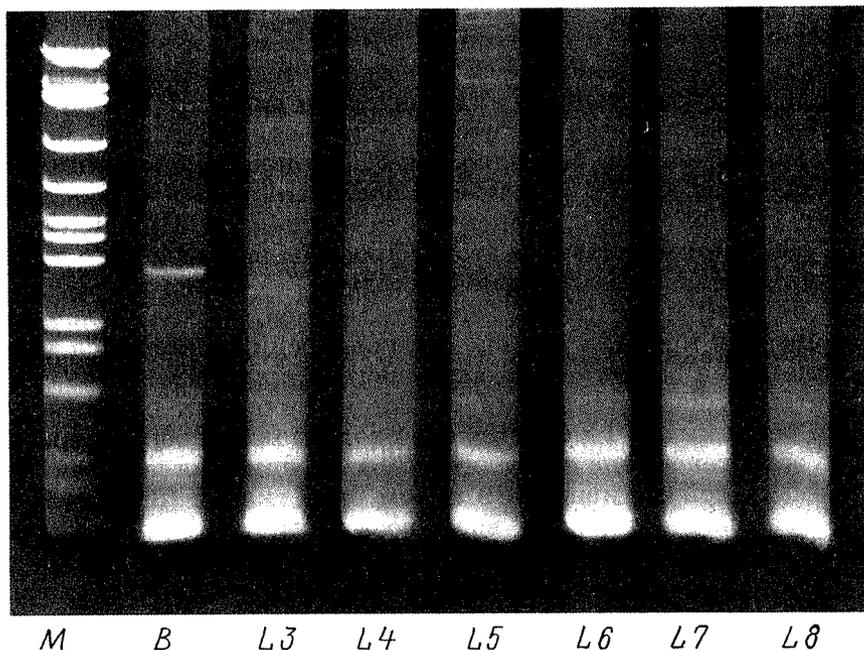


Рис. 18. Полимеразная цепная реакция с праймерами к гену ароматазы с тотальной РНК из некультивированных лимфоцитов крови (L3—L8) и ткани рака молочной железы (B) (по: Берштейн и др., 1993б).

Позитивный результат получен только с материалом из опухоли. M — маркеры молекулярной массы.

Тем не менее, несмотря на логичность многих из представленных данных, проведенное нами изучение конверсии 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-андростендиона в лимфоцитах с изоляцией продуктов реакции (подобно тому, как это уже делалось, — см: Milewich et al., 1982) и использование полимеразной цепной реакции с праймерами к кодирующему участку гена ароматазы (рис.18) не смогло выявить способности к эстрогенообразованию у свежеевыделенных (некультивированных) лимфоцитов крови человека (Берштейн и др., 1993б). Поэтому в последующей работе было решено использовать лимфоциты, культивируемые в течение 72 ч в присутствии сывороточных факторов, а также известных индукторов гена ароматазы (в первую очередь дексаметазона и дибутирил-цАМФ), в надежде, что в совокупности это сможет «подтолкнуть» культивируемые клетки к индукции реакций стероидогенеза. Оказалось, что в таких условиях (при представлении результатов в пересчете на 1 мг белка) дибутирил-цАМФ примерно в 1.5 раза усиливал конверсию андростендиона, оцениваемую по образованию тяжелой воды. Эффект дибутирил-цАМФ и форболового эфира был более заметен у женщин в возрасте до 50 лет, а влияние дексаметазона — у женщин в возрасте 50 лет и старше (Берштейн и др., 1997б; табл. 10). В экспериментах с ингибитором ароматазы фадрозолом (CGS-16949A, 100нМ) отмечалась тенденция к устранению стиму-

Таблица 10

Частота случаев не менее чем 50 %-ной стимуляции конверсии  $1\beta$ - $^3\text{H}$ -андростендиона в культивируемых лимфоцитах крови

Группа женщин	Частота случаев (%) при стимуляции			Объединенные данные
	дексаметазоном (100 нМ)	дибутирил-цАМФ (10 мкМ)	ТРА (100 нМ)	
Все обследуемые	38.9 (14/36)	53.1 (17/32)	27.8 (5/18)	41.9 (36/86)
В возрасте до 50 лет	31.2 (5/16)	62.5 (10/16)	37.5 (3/8)	45.0 (18/40)
50 лет и старше	45.0 (9/20)	43.8 (7/16)	20.0 (2/10)	39.1 (18/46)

Примечание. В скобках: слева от черты — число случаев со стимуляцией конверсии на 50 % и более, справа от черты — суммарное число опытов.

лирующего влияния дибутирил-цАМФ и дексаметазона на конверсию андростендиона в лимфоцитах. Таким образом, исходя из полученных косвенных данных, нельзя полностью исключить, что в определенных условиях в лимфоцитах крови может быть индуцирована активность ароматазы, что, естественно, нуждается в подтверждении при использовании молекулярно-генетических методов исследования. В этом отношении существенно, что как активность ароматазы, так и транскрипты  $P_{450\text{аром}}$  были недавно обнаружены в материале из иммортализованных вирусом Эпштейн-Барр лимфоцитов крови представителей семейства, страдающего ассоциированной с X-хромосомой формой семейной гинекомастии (Stratakis et al., 1998). Хотя, как отмечалось выше, в перитонеальных и альвеолярных макрофагах человека не удалось обнаружить конверсии андростендиона в эстрон или эстрадиол (Milewich et al., 1983), моноциты крови, культивируемые в течение 48 ч и превратившиеся в макрофаги (Mor et al., 1998), лейкоциты крови (т. е. сумма моноцитов и лимфоцитов), культивируемые в присутствии липополисахарида или без него (Lea et al., 1997), а также клетки миелоидной лейкемии ТНР-1, дифференцирующиеся по моноцитарно/фагоцитарному пути, способностью к эстрогенообразованию обладают. В недифференцированном состоянии клетки ТНР-1 экспрессируют незначительное число транскриптов  $P_{450\text{аром}}$  и характеризуются в то же время достаточно заметным уровнем активности ароматазы (Jakob et al., 1995; Shozu et al., 1996; собственные наблюдения). Инкубация недифференцированных клеток с дексаметазоном или форболовым эфиром существенно стимулирует эти показатели (рис. 19). Дифференцировка клеток линии ТНР-1 кальцитриолом (витамин  $D_3$ ) приводит к значительному повышению как базальной активности ароматазы, так и способности фермента реагировать на стимуляцию. В частности, после обработки витамином  $D_3$  число транскриптов  $P_{450\text{аром}}$  возрастает в результате инкубации с форболмиристат-ацетатом в

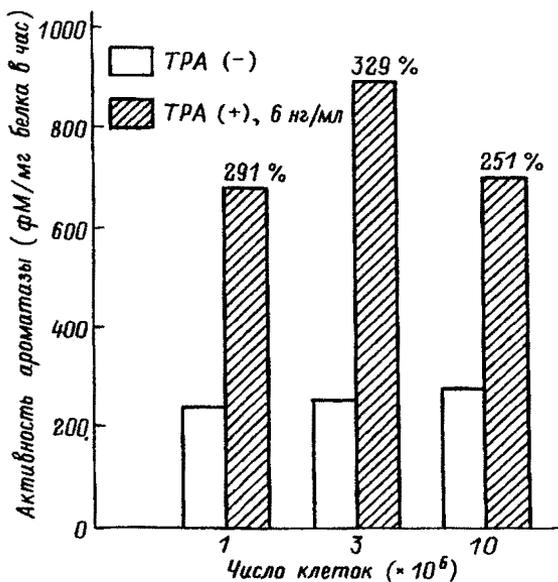


Рис. 19. Активность ароматазы в клетках ТНР-1 до и после инкубации с форболовым эфиром (совместные эксперименты с группой проф. Р. Сантена (Prof. R. Santen, Univ. Virginia, Charlottesville, USA)).

45 раз, с дексаметазоном в 15, с эстрадиолом в 3.7 и с тестостероном в 2.5 раза. Дибутирил-цАМФ и форсколин стимулирующей активностью в этих условиях не обладают. Как следствие, в клетках ТНР-1 практически не удается выявить ассоциированной с цАМФ экспрессии промотора II гена ароматазы, а в клонах, обработанных дексаметазоном или форболовым эфиром, соответственно экспрессируются преимущественно экзон I.4 и I.3+I.4 (Jakob et al., 1995; Shozu et al., 1996). Поскольку заключительным этапом дифференцировки клеток ТНР-1 под влиянием кальцитриола являются остеокластоподобные макрофаги (Jakob et al., 1995), предполагается, что такие реакции особую важность представляют для эстроген-опосредованных процессов обмена в костной ткани, включая развитие остеопороза (см. также раздел 4.5). Гемопоэтическими клетками (как лимфоидного ряда, так и макрофагами) заселен и костный мозг, масса которого достаточно велика (до 3—5 % от массы тела). Поэтому способность костного мозга к ароматизации андрогенов в эстрогены (Frisch et al., 1980) позволяет рассматривать его как важный источник внегонадной продукции эстрогенов, которая может иметь как системное, так и локальное значение.

Как лимфоциты, так и особенно мононуклеарные фагоциты являются своеобразными «секреторными фабриками», что выражается в огромном числе разнообразных по функциям и природе субстанций, которые они продуцируют. Среди них и ферменты, и ингибиторы ферментов, и факторы коагуляции, и метаболиты

кислорода (см. гл. 7), и липидные медиаторы, и факторы хемотаксиса, и, конечно, уже упоминавшиеся цитокины (Фрейдлин, 1995). Именно некоторым из этих цитокинов (в частности, ИЛ-6 из клона Th2, — см. выше), входящим в микроокружение тканевых лимфоцитов и макрофагов, приписывается способность к стимуляции стероидогенеза в фибробластах или опухолевых клетках молочной железы (Purohit et al., 1995; Reed et al., 1995; см. также раздел 4.7). В частности, при совместном культивировании кондиционированной среды лимфоцитов или макрофагов человека с фибробластами из ткани опухолей молочной железы или с клетками MCF-7 наблюдалась умеренная стимуляция активности ароматазы (фибробласты) и более заметная активация эстронсульфатазы и 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы (клетки MCF-7). Активность ароматазы удавалось стимулировать в большей степени, если эффект ИЛ-6 осуществлялся в присутствии его солюбилизованных рецепторов (Reed et al., 1995; Singh et al., 1995). Полученные сведения и анализ проблемы позволили лидеру этой группы М. Риду предположить, что, поскольку с возрастом секреция ИЛ-6 в организме (и в том числе в лимфоцитарных клетках) нарастает и это, не исключено, обусловлено снижением по мере старения продукции дегидроэпиандростерона и его сульфата (Dapnes et al., 1993), данное обстоятельство является отражением Th2/Th1 дисбаланса и опосредует увеличение экстрагонадной продукции эстрогенов в различных тканях молочной железы (Reed, 1995; Reed, Purohit, 1997). Одной из причин усиления эстрогенообразования в опухолевой ткани может быть присутствие в ней лимфоцитарно-макрофагального инфильтрата (см. также раздел 4.7).

На возможную роль лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации опухолей в реакциях стероидогенеза указывалось ранее (Borkowski et al., 1978; Берштейн и др., 1990). Клиническое значение феномена инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами и макрофагами практически никем не оспаривается, хотя до сих пор неясно, чем определяется его выраженная индивидуальная вариабельность и какие факторы опухолей являются (хемо)аттрактантами для миелолимфоидных клеток (Kelly et al., 1988; Бережная, 1994). Существенно, что в новообразованиях гормонозависимых органов инфильтрующие макрофаги могут опосредовать процесс апоптоза опухолевых клеток и что известны препараты, которые, имея и иные точки приложения, в то же время способны оказывать влияние на интенсивность лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации (Adams, Morris, 1994; Vukanovic, Isaacs, 1995). Это важно также и для воздействия на образование стероидов в клетках инфильтрата. Как отчасти говорилось выше (Reed et al., 1995; Reed, Purohit, 1997) и как будет видно из дальнейшего (Берштейн и др., 1995б; раздел 4.7), механизмы вовлечения лимфоцитов и макрофагов в биосинтез стероидов, и в частности эстрогенов в опухолевой ткани, могут быть различными. Допуская возможность прямого участия этих клеток в эстрогенообразовании, мы

Таблица 11

Характеристика материала и данные о конверсии андростендиона (А) в лимфоцитах, инфильтрирующих ткань опухоли молочной железы (Берштейн и др., 1997а)

Группа больных	Возраст (годы)	Масса опухоли (г)	Число лимфоцитов ( $\times 10^6$ )	Число опухолевых клеток ( $\times 10^6$ )	Всего клеток ( $\times 10^6$ )	Доля опухолевых клеток (%)	Конверсия А в лимфоцитах		Активность ароматазы в опухоли (ФМ/мг белка в час)
							(ФМ/мг белка в час)	(ФМ/млн кл.)	
Все (23)	60±2	1.31±0.11	0.586±0.109	0.148±0.032	0.734±0.129	11.8±1.7	8.9±1.0	1.030±0.320	60.1±31.4 (11)
РП (6)	41±4	1.72±0.57	1.32±0.30	0.400±0.190	1.772±0.480	18.5±6.3	5.9±2.9	0.533±0.257	—
МП (17)	64±1	1.17±0.10	0.372±0.059	0.074±0.027	0.446±0.087	9.9±1.4	9.9±1.5	1.200±0.433	—

Примечание. РП — репродуктивный период, МП — менопаузальный период; в скобках — число наблюдений.

исследовали конверсию  $1\beta$ - $^3\text{H}$ -андростендиона, которая оценивалась по высвобождению тяжелой воды, в лимфоцитах, инфильтрующих ткань опухоли молочной железы и выделенных из этих опухолей в результате ферментативной дезагрегации. Из ткани опухолей больных с сохраненным менструальным циклом выделялось больше лимфоцитов, чем из опухолей у больных, находящихся в менопаузе. В то же время сама конверсия андростендиона в лимфоцитах опухоли как в пересчете на 1 мг белка, так и в пересчете на 1 млн клеток демонстрировала тенденцию к более высоким цифрам у больных в менопаузе (табл. 11). Этот результат отличается от данных, полученных при исследовании лимфоцитов крови у женщин различного возраста (см. выше), но соответствует общей тенденции к возрастанию интенсивности экстрагонадного образования эстрогенов по мере старения (гл. 5) и повышению (по крайней мере, по иммуноцитохимическим данным) активности ароматазы в опухольях молочной железы у женщин менопаузального возраста (см. раздел 4.7). По своей величине интенсивность конверсии андростендиона в лимфоцитах, инфильтрующих опухольевую ткань, была ниже активности ароматазы в сопоставляемых образцах опухолевой ткани в 1.8—15.1 раза. Оба эти параметра позитивно коррелировали между собой как при пересчете интенсивности конверсии андростендиона в лимфоцитах на 1 мг белка (+0.60),

так и на 1 млн лимфоцитов (+0.41), причем в первом случае коэффициент корреляции достигал уровня значимости ( $p < 0.05$ ). В то же время не было выявлено практически никакой связи между уровнем конверсии андростендиона в лимфоцитах (на 1 мг белка и на 1 млн лимфоцитов) и числом опухолевых клеток в процентах в выделенной после обработки ферментами и наслаивания на фиколл/верографин клеточной суспензии ( $r$  равнялось соответственно  $-0.16$  и  $-0.21$ ). Естественно, один из путей непосредственного подтверждения присутствия ароматазы в лимфоцитах, инфильтрующих опухолевую ткань, состоит в применении молекулярно-генетических методов исследования, в частности (о чем уже говорилось) полимеразной цепной реакции с праймерами к гену ароматазы, и такой подход составляет задачу наших исследований. В то же время факт обнаружения определенной корреляции между конверсией андростендиона в лимфоцитах и активностью ароматазы в тех опухолях молочной железы, откуда эти лимфоциты были выделены, и, напротив, отсутствие какой-либо связи первого параметра с долей опухолевых клеток (в процентах), присутствующих в выделенной клеточной суспензии, свидетельствуют, как представляется, против решающей роли степени загрязненности образцов опухолевыми клетками в объяснении полученных данных (хотя сама проблема необходимости очистки лимфоцитов от присутствия клеток опухоли, безусловно, существует и несомненно должна решаться). Не менее, а не исключено, что и более важной может оказаться роль в эстрогенообразовании опухолевых макрофагов, составляющих второй основной компонент лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов (Mor et al., 1998).

В целом стероидогенез и метаболизм стероидных гормонов в миелолимфоидных клетках, как следует из вышеизложенного, имеет отношение к состоянию иммунитета, нейроиммуномодуляции, а также, возможно, к исследованию некоторых аутоиммунных заболеваний, лейкозов и достаточно сложных взаимоотношений в регуляции образования эстрогенов в ткани рака молочной железы. Более детальному рассмотрению последнего вопроса посвящен следующий раздел книги.

#### 4.7. МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА И ЕЕ ОПУХОЛИ. АУТОКРИННО-ПАРАКРИННЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЭСТРОГЕНООБРАЗОВАНИЯ

Молочная железа по своему происхождению является модифицированной потовой железой. Клеточный состав ее ткани образован преимущественно эпителиальными, жировыми и фиброзными (соединительнотканными) элементами, соотношение которых в существенной степени определяется фазой онтогенеза и некоторыми иными особенностями. После прихода менархе отмечается достаточно интенсивное развитие протоковой системы и постепенное

созревание долькового аппарата железы. Претерпевая определенные изменения в ходе менструального цикла, эти основные структурные единицы органа достигают своего расцвета во время беременности, когда молочная железа приобретает и способность к секреции молока. Соответственно различной степени выраженности инволюционные изменения железы в послеродовой период и тоже достаточно индивидуальные по своим проявлениям признаки ее атрофии в менопаузе (с постепенным уменьшением доли паренхимы и увеличением доли жира) рассматриваются, с одной стороны, как отражение сдвигов в функциональной активности органа, а с другой — как следствие изменений в состоянии эндокринной системы, связанных не в последнюю очередь с динамикой гонадной и внегонадной продукции эстрогенов (Miller, 1996a).

Само содержание эстрогенов в ткани нормальной молочной железы также меняется, подчиняясь определенным закономерностям. Стандартный и эффективный прием в изучении этого вопроса — сопоставление с величиной соответствующего параметра в крови. При подобном сравнении оказывается, что индивидуальные колебания уровня эстрогенов в ткани молочной железы (особенно, в менопаузе) нередко больше, чем в сыворотке крови. По одним данным, неконъюгированных форм эстрогенов в ткани относительно больше, чем конъюгированных (Miller, 1996a), по другим — ткани молочной железы присуща противоположная закономерность (Pasqualini et al., 1996). Одной из наиболее характерных особенностей тканевой концентрации эстрогенов в нормальной молочной железе (в отличие от того, что свойственно сыворотке крови) является относительно меньшее снижение уровня эстрадиола в менопаузе по сравнению с эстроном (Thijssen, Blankenstein, 1994; Miller, 1996a). Подобное наблюдение является одним из возможных основных доводов против признания ведущей роли захвата эстрогенов из крови как фактора, определяющего их тканевую концентрацию, хотя реальность существования и значимость этого (циркуляторного) источника для пополнения запасов эстрогенов в ткани молочной железы, как правило, не оспаривается (James et al., 1995). По ряду наблюдений, способность ткани действовать «как насос» для эстрогенов относительно усиливается именно в условиях снижения концентрации последних в крови (Masamuga et al., 1997). Двумя другими источниками накопления и модуляторами концентрации отдельных эстрогенных фракций в ткани молочной железы являются их непосредственный локальный синтез ее клеточными элементами, о чем речь пойдет ниже, а также образование в результате метаболических реакций. Среди последних, как уже отмечалось в гл. 1, выделяются сульфатазная реакция, в результате которой из эстрон-сульфата образуется эстрон, и  $17\beta$ -гидроксистероидредуктазная реакция, обеспечивающая взаимопревращения эстрона и эстрадиола. Особенностью ткани молочной железы и ее опухолей является направленность последней реакции, в первую очередь по восстановительному (редуктазному) пути, вследствие чего образование эстра-

диола превалирует над образованием эстрогена (James et al., 1995; Pasqualini et al., 1996).

Такая закономерность более свойственна гормоночувствительным клеточным линиям рака молочной железы (MCF-7, ZR75-1), содержащим эстрогенные рецепторы, по сравнению с линиями (MDA-MB231), в которых рецепторы эстрогенов не найдены (Castagnetta et al., 1995a, 1995b). Что касается ткани самих опухолей молочной железы, то в том случае, если в них обнаруживаются эстрогенные рецепторы, в анализируемом материале, по некоторым наблюдениям, выше и тканевая концентрация эстрогенов (Vermeulen et al., 1986; Bolufer et al., 1992), хотя имеются и работы, в которых подобное заключение не подтверждается (Reschione et al., 1995). Речь в данном случае идет о далеко не банальных проблемах. Существование позитивной корреляции между содержанием эстрогенов и их рецепторов в опухолях молочной железы, с одной стороны, свидетельствует об определенной автономии как первого, так и второго показателя (поскольку, в частности, накопление эстрогенов в ткани должно было бы в соответствии с известными реципрокными закономерностями, приводить к снижению концентрации одноименных рецепторов), а с другой — о возможности реализации в этих условиях биологических эффектов (стимуляция клеточного деления и т. д.) тканевых эстрогенов посредством стандартного, опосредованного рецепторами, механизма.

Согласно большинству имеющихся сведений, содержание эстрогенов в ткани опухолей молочной железы выше, чем в соответствующей нормальной ткани. Чаще эта особенность, которая является одним из отражений своеобразной экспансии внегандадной продукции эстрогенов (о чем мы говорили в гл. 1 и еще неоднократно будем говорить далее), обнаруживается в новообразованиях у больных менопаузального возраста, и в основном это касается содержания в ткани эстрадиола, а не эстрогена (James et al., 1995; Miller, 1996a). В подтверждение такого заключения, тем, что у польских женщин в менопаузе концентрация эстрадиола в ткани нормальной молочной железы снижается в большей степени, чем у нидерландских (табл. 12), объясняют различную частоту заболеваемости раком молочной железы в сравниваемых популяциях (Thijssen, Blankenstein, 1994). Эту информацию следует признать крайне важной, в том числе и потому, что, хотя этническим различиям в метаболизме эстрогенов уделяется достаточно внимания (см. гл. 1), соответствующие сведения о локальном синтезе эстрогенов в различных тканях и о периферической конверсии андрогенов в эстрогены практически отсутствуют (см. гл. 3).

Преобладание эстрадиола в опухолевой ткани находит свое отражение и в величине градиента «ткань—кровь» (табл. 13). Таким образом, не приходится сомневаться в не меньшей, а возможно, и в большей роли локального образования эстрогенов непосредственно в ткани опухолей молочной железы путем аромати-

Таблица 12

Содержание эстрадиола и эстрогена в нормальной и опухолевой ткани молочной железы в разные периоды онтогенеза (Thijssen, Blankenstein, 1994)

Гормон	Содержание гормонов (нМ/г ткани)							
	Польская группа				Нидерландская группа			
	Репродуктивный период		Менопауза		Репродуктивный период		Менопауза	
	I (8)	II (17)	I (8)	II (21)	I (22)	II (19)	I (6)	II (33)
Эстрон	1.14	0.65	0.39	0.29	1.03	1.04	0.38	0.61
Эстрадиол	0.48	0.57	0.19	0.60	0.44	0.67	0.32	0.77

Примечание. I — нормальная ткань, II — опухолевая ткань; в скобках — число наблюдений.

зации андрогенных предшественников, хотя выше и отмечалась значимость захвата эстрогенов из циркуляторного русла и их высвобождения из конъюгированных (в частности, сульфатированных) форм. Исследование активности ароматазы в этих новообразованиях биохимическим методом (по конверсии меченных по тритию андростендиона или тестостерона соответственно в эстрон и эстрадиол) показало значительную вариабельность как величины самой активности, так и частоты выявления фермента. Следует, однако, отметить, что результаты, полученные различными группами исследователей, отчасти зависят от избранного метода тестирования (прямое выделение продукта реакции, оценка по образованию тяжелой воды и т. д.) и от критериев, по которым фиксируется нижняя граница чувствительности метода. В нескольких достаточно часто цитируемых и выполненных в период с 1982 по 1992 г. исследованиях (суммарно 1012 больных) частота обнаружения фермента в опухолях молочной железы варьировала от 42 до 100 % (в среднем 64.3 %), а активность ароматазы находилась в пределах от 0 до 2070 фМ/мг белка в час, по своему среднему значению приближаясь к 7—15 фМ/мг белка в час (Siiteri, 1982; Vermeulen et al., 1986; Bezwoda et al., 1987a, 1987b; Lipton et al., 1987; Silva et al., 1989; Miller et al., 1990; Volufer et al., 1992). Данные, полученные в нашей лаборатории при исследовании 50 новообразований молочной железы методом, основанным на оценке высвобождения тяжелой воды из  $1\beta\text{-}^3\text{H}$ -андростендиона, в целом не расходятся с этими наблюдениями (Ларионов, 1997).

По существу, интерес к присутствию и уровню активности ароматазы в ткани рака молочной железы связан с двумя основными вопросами, а именно: имеет ли это какое-либо 1) клиническое и 2) биологическое значение. Хотя иногда сведения, относящиеся к тому или иному параметру, трудно разграничить (по-скольку многое определяется тем смыслом, который придается

Таблица 13

Отношение концентраций эстрогенов и их сульфатов (опухолевая ткань/кровь) у больных раком молочной железы (Pasqualini et al., 1996)

Больные	Соотношение концентраций гормонов (усл. ед)			
	Эстрогенная фракция			
	Эстрон	Эстрадиол	Эстрон-сульфат	Эстрадиол-сульфат
С сохраненным менструальным циклом	7.0	5.0	0.3	2.0
В менопаузе	6.0	22.0	9.0	4.0

словам «клинический» и «биологический»), ббольшая часть материалов, имеющих отношение ко второму вопросу, будет рассмотрена ниже. Что же касается клинической значимости тестирования ароматазной активности и ее связей с параметрами, так или иначе характеризующими течение опухолевого процесса, то, несмотря на то что имеющиеся данные не всегда однозначны, не создается впечатления о ненужности затрачиваемых усилий и о безрезультатности проведенных исследований. Для большей краткости и четкости изложения накопленные данные целесообразно представить в виде нескольких условных, но важных пунктов.

1. *Сравнение активности ароматазы в опухолевой и нормальной ткани молочной железы.*

По мнению большинства исследователей, активность ароматазы в опухоли выше, чем в нормальной ткани (Vermeulen et al., 1986; Miller, 1996a), причем это касается и новообразований у мужчин (Sasano et al., 1996b), что в целом соответствует приводившимся ранее сведениям о более высокой концентрации эстрогенов в ткани опухолей. По данным, приведенным в одном из сообщений, ароматаза в опухолях выявлялась реже, чем в нормальной ткани молочной железы, однако активность фермента в сравниваемых группах при этом оказалась практически одинаковой (Dikkeschei et al., 1996).

2. *Величина опухоли, вовлечение лимфоузлов, наличие отдаленных метастазов, степень дифференцировки.*

Вовлечение в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов, как правило, не сказывалось на активности ароматазы опухоли (Bezвода et al., 1987b; Miller et al., 1990), равно как не было обнаружено и отличий по величине этой активности в первичной опухоли и пораженных лимфоузлах (Lipton et al., 1987). Повышение ароматазной активности в опухолевой ткани чаще отмечается у больных с отдаленными метастазами (Volufer et al., 1992); аналогичные данные были получены и в отношении содержания эстрадиола в опухолевой ткани, однако методические подходы, использованные в этом исследовании (способ экстракции), не были освещены достаточно четко (Хотченкова и др., 1995). В двух ис-

следованиях было показано, что в низкодифференцированных новообразованиях молочной железы активность ароматазы более высока (Lipton et al., 1988; Evans et al., 1993), а в двух других (включая данные нашей группы), — что активность фермента позитивно ассоциирована с размерами новообразования (Bolufer et al., 1992; Ларионов, 1997). Опухоли с большей клеточностью характеризуются более высокой ароматазной активностью (Miller et al., 1990), к чему мы еще вернемся, рассматривая роль клеточного субстрата в обеспечении продукции эстрогенов в новообразованиях молочной железы.

### 3. *Возраст, менструальный статус.*

Несмотря на существование отдельных работ, в которых не выявлено зависимости активности ароматазы в ткани рака молочной железы от возраста и менструального статуса больных (Vermeulen et al., 1986; Miller et al., 1990), большая часть имеющихся данных свидетельствует о повышении этой активности в новообразованиях у больных, находящихся в менопаузе (Bezwoda et al., 1987b; Bolufer et al., 1992; Берштейн и др., 1996в; Pasqualini et al., 1996).

По некоторым сведениям, посредством иммуноцитохимического метода исследования эта закономерность подтверждается с большей надежностью (Ларионов, 1997), хотя есть аналогичные наблюдения, продемонстрированные с помощью биохимического метода (Bezwoda et al., 1987b; Pasqualini et al., 1996; рис. 20).

### 4. *Рецепция в опухолевой ткани.*

В двух масштабных наблюдениях (суммарно — свыше 450 больных) была установлена позитивная корреляция между активностью ароматазы и содержанием рецепторов эстрогенов в опухолевой ткани (Miller et al., 1990; Bolufer et al., 1992), что повышает не только клиническое, но и биологическое значение первого параметра. Тем не менее в большинстве известных исследований никакой связи между ароматазной активностью и рецепцией стероидных гормонов в опухолях молочной железы обнаружить не удалось (Tilson-Mallett et al., 1983; Vermeulen et al., 1986; Bezwoda et al., 1987b; Evans et al., 1993, и др.), а иногда зависимость между этими показателями была обратной (Esteban et al., 1992).

### 5. *Прогноз, свободный интервал, выживаемость.*

Относительно немногочисленные попытки предсказать клиническое течение рака молочной железы на основе данных об активности ароматазы в опухоли пока не дали четкого результата. Согласно одним данным, какая-либо связь этого показателя с длительностью безрецидивного периода (свободного интервала) или с выживаемостью больных отсутствует (Lipton et al., 1992). По другим сведениям, чем выше была активность ароматазы в опухолевой ткани, тем большим был свободный интервал; однако после наступления рецидива «векторность» параметра менялась прямо противоположным образом: большая его величина была несколько неожиданно связана с меньшей выживаемостью (Evans et al., 1993). Этому как будто соответствует заключение, сделанное Мил-

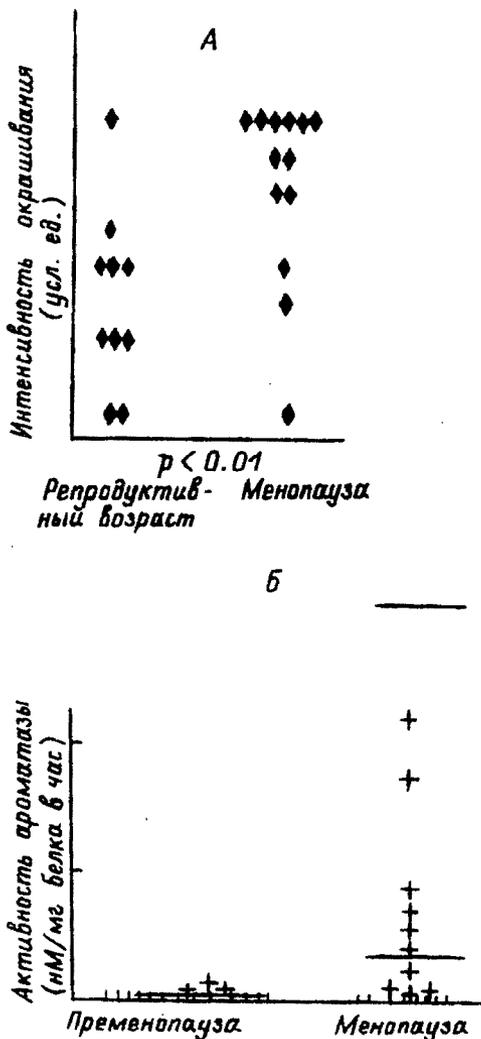


Рис. 20. Зависимость активности ароматазы в опухолях молочной железы от менструального статуса больных.

А — иммуноцитохимический метод (по: Берштейн и др., 1996в), Б — биохимический метод (по: Pasqualini et al., 1996).

лером с соавт. (Miller et al., 1990): в течение 3-летнего периода наблюдений выживаемость больных при отсутствии ароматазы в опухоли была выше, чем в случае обнаружения фермента в новообразовании. Очевидно, что более ясное заключение по данному несомненно важному вопросу будет получено при дальнейшем накоплении первичных материалов. Не менее важным представляется исследование зависимости между течением опухолевого процесса и чувствительностью к ингибиторам ароматазы; эти данные будут приведены ниже (гл. 9).

Вопрос о чувствительности ароматазы опухоли к торможению *in vitro* или *in vivo* косвенным образом смыкается с более широкой проблемой: особенностями регуляции эстрогенообразования в ткани рака молочной железы. Естественно, что бóльшая часть сведений в этом отношении получена при проведении исследований с соответствующими клеточными линиями, хотя небесполезными оказались и некоторые работы, проводившиеся *in vivo*. Следует отметить, что и тип клеточной линии способен оказать существенное влияние на итоговые результаты. Характерным примером являются наблюдения, приведшие к выводу о модулирующем влиянии стероидов на активность ароматазы в опухолевой ткани. Так, на примере двух линий рака молочной железы (DM, MD) с высокой и двух (SA, PP) — с низкой активностью ароматазы была продемонстрирована обратная зависимость между интенсивностью образования эстрогенов и продукцией 5 $\alpha$ -восстановленных андрогенов (5 $\alpha$ -андростандиона, андростерона, дигидротестостерона) и показано, что инкубация с перечисленными андрогенами даже в концентрации 10<sup>-8</sup> M приводит к угнетению ароматазной активности в линии MD (Perel et al., 1984). Надпочечниковые андрогены (андростендион, андростендиол) в экспериментах *in vivo* стимулировали рост опухолей молочной железы, индуцированных у крыс линии ДМБА, при этом эффект андростендиона, как оказалось, опосредован через повышение активности ароматазы в опухолевой ткани (Dauvois, Labrie, 1989). Хотя кортизол стимулировал активность ароматазы в линиях MD и DM (Perel et al., 1988), в значительно более часто используемой линии MCF-7 его эффект существенно зависел от концентрации, а дексаметазон, стимулируя ароматазу в линии T47D (+94 %), ингибировал (!) активность фермента в уже упоминавшейся линии MCF-7 (Ryde et al., 1992). Примечательно, что речь идет не только о различиях ответа между отдельными трансформированными линиями, но и о диапазоне реакций в эпителиальных (злокачественных) клетках, который, как это уже отмечалось в разделе 4.3 и будет видно из дальнейшего (см. ниже), редко превосходит фактор  $\times 2-3$  и существенно уступает в этом отношении интенсивности реакции, характерной для стромальных клеток молочной железы и жировой ткани (Santner et al., 1997).

Не превышала 80—130 % и стимуляция активности ароматазы в клеточных линиях рака молочной железы под влиянием некоторых ростовых факторов, форболовых эфиров (ТРА) и дибутирил-цАМФ. При этом линия T47D оказалась более чувствительной к трансформирующему фактору роста- $\alpha$ , тромбоцитарному и эпидермальному фактору роста и пролактину, а линия MCF-7 — к ТРА и дибутирил-цАМФ; трансформирующий фактор роста- $\beta$  не оказывал на активность ароматазы в этих клеточных линиях никакого влияния (Ryde et al., 1992). Важно, что одни и те же факторы, не влияя на активность ароматазы в трансформированных клетках, могут более заметно стимулировать активность других ферментов, в частности редуцирующей (эстрадиол-образую-

щей) формы 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы. Подобным влиянием на линию MCF-7 обладают, в частности, ИПФР I и II, ИЛ-1, кондиционированная среда фибробластов молочной железы, содержащее кист молочных желез и т. д., но не ИЛ-6, трансформирующий фактор роста- $\alpha$  и эпидермальный фактор роста (Reed et al., 1991b, 1995). В то же время жидкость из кист молочных желез способна стимулировать активность ароматазы в фибробластах из ткани молочной железы и этот эффект коррелирует с содержанием в жидкости ИЛ-6 (Reed et al., 1995). Продукция же ИЛ-6 эксплантами жировой ткани, прилежащими к опухоли, оказалась прямо пропорциональной активности ароматазы в самой ткани новообразования (Purohit et al., 1995). В совокупности эти сведения дополняют уже частично приведенные данные (см. раздел 4.3) о более высокой активности ароматазы и более высоком уровне транскриптов P<sub>450аром</sub> в том квадранте молочной железы, в котором располагается и опухоль (O'Neill et al., 1988; Bulun, Simpson, 1994a). Следует, правда, напомнить, что имеется по крайней мере одна группа авторов, чьи результаты расходятся с данным выводом (Thijssen, Blankenstein, 1994) и в то же время привносят новые аргументы в пользу представления об аутокринно-паракринной природе регуляции эстрогенообразования в ткани опухоли молочной железы. Однако этот вопрос более целесообразно обсудить после рассмотрения особенностей локализации ароматазы в новообразованиях молочной железы.

Состав клеток злокачественных опухолей молочной железы характеризуется выраженной гетерогенностью. Это обстоятельство может быть одной из вероятных причин, скрывающих истинное клиническое и биологическое значение ароматазной активности, поскольку при определении последней биохимическим методом в гомогенате опухолевой ткани результат тестирования может зависеть и от соотношения в опухоли клеток различных типов. В связи с этим существенный интерес представляют данные пока еще немногочисленных работ, проведенных с использованием иммуноцитохимического метода (табл. 14). Несмотря на расхождения в полученных результатах (которые, в частности, могут быть объяснены применением различных антител, а иногда и методическими различиями в трактовке материалов), можно прийти к заключению, что эстрогенсинтетазная активность, скорее всего, присуща и эпителиальным (злокачественным) и стромальным клеткам (Берштейн и др., 1995а, 1995б; Lu et al., 1996). Учитывая тот факт, что многим опухолям молочной железы свойственна достаточно выраженная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация, и полагая, что факторы, секретируемые опухолевой тканью, могут индуцировать экспрессию гена ароматазы в клетках инфильтрата (см. также раздел 4.6), мы предложили трехкомпонентную клеточную модель эстрогенообразования и регуляции пула эстрогенов в ткани новообразований, которая включает в себя эпителиальные и стромальные клетки, а также лимфоциты/макрофаги (Берштейн и др., 1995б). Значение лимфоцитов/макрофа-

Таблица 14

## Иммуноцитохимическое изучение ароматазы в опухолях молочной железы человека

Число изученных опухолей	Материал	Антитела	Кто представил	Основные результаты	Дополнительная информация	Автор
38	БЗП <sup>1</sup>	Поликлональные кроличьи	Д-р П. Холл (Dr. P. Hall)	Преимущественное окрашивание эпителиальных клеток.	Позитивное окрашивание в 40 % опухолей.	Esteban et al., 1992
18+26	Операционный материал+БЗП <sup>1</sup>	То же	Д-р Н. Харада (Dr.N.Harada)	Преимущественное окрашивание стромальных клеток; результаты биохимического тестирования коррелировали с окраской стромальных клеток.	Использование специального критерия (score); признаки более слабого окрашивания других клеточных элементов.	Santen et al., 1994; Santner et al., 1997
33	БЗП <sup>1</sup>	»	Он же	Преимущественное окрашивание стромальных клеток.	Более сильное окрашивание адипоцитов, прилежащих к опухоли, по сравнению с отдаленными.	Sasano et al., 1994
23	»	»	Д-р Е. Симпсон (Dr.E.Simpson)	Преимущественное окрашивание эпителиальных клеток.	Признаки окрашивания различных клеточных элементов.	Берштейн и др., 1995а, 1996в
19	»	Моноклональные мышечные	Он же	Преимущественное окрашивание эпителиальных клеток.	Признаки окрашивания прилежающих стромальных клеток.	Lu et al., 1996

<sup>1</sup> БЗП — блоки, заключенные в парафин.

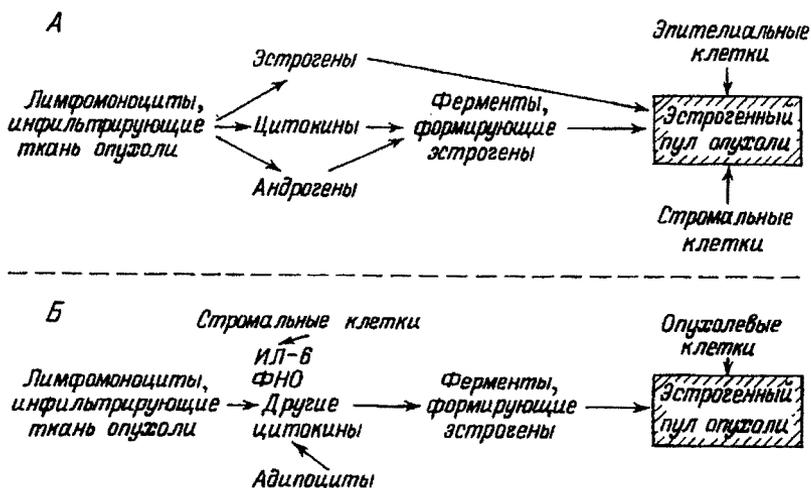


Рис. 21. Вовлечение лимфоцитов/макрофагов в процесс эстрогенообразования в ткани опухолей молочной железы.

А — по: Берштейн и др., 1995б; Б — по: Reed et al., 1995; ИЛ — интерлейкин, ФНО — фактор некроза опухоли.

гов признается и группой М. Рида с тем отличием, что в данном случае клетки инфильтрата рассматриваются лишь как источник цитокинов, оказывающих влияние на активность ароматазы и ряда других ферментов стероидогенеза (Purohit et al., 1995; Reed et al., 1995; рис. 21). Необходимо добавить, что при иммуноцитохимическом изучении фракций ткани рака молочной железы после их центрифугирования позитивное окрашивание осадка объяснялось присутствием там не только стромальных клеток, но и макрофагов, и клеток эндотелия (Price et al., 1992).

Хотя в культивируемых клетках эндотелия пупочного канатика ароматаза обнаружена не была (Milewich et al., 1987), исследования недавнего времени, проводившиеся с васкулярными эндотелиальными клетками методами гибридизации *in situ* и полимеразной цепной реакции, продемонстрировали наличие в этом материале транскриптов P<sub>450аром</sub> (Bayard et al., 1995a; Abdel-Rahman et al., 1996). В этом отношении существенным представляется тот факт, что, секретируя некоторые хемоаттрактанты (хотя это и не единственный механизм обеспечения инфильтрации, см.: Бережная, 1994), опухоль рекрутирует макрофаги, которые, в свою очередь, продуцируют факторы (фактор некроза опухолей- $\alpha$ , сосудистый эндотелиальный ростовой фактор и др.), усиливающие ангиогенез (Leek et al., 1996). В то же время известны факторы (например, ИЛ-10) и лекарственные препараты (линомид), которые, угнетая ангиогенез, ослабляют и макрофагальную инфильтрацию опухолевой ткани (Vukanovic, Isaacs, 1995). Таким образом, не исключено, что следует говорить не о трех, а по крайней мере о четырехкомпонентной модели (Берштейн, 1998а) регуляции эстрогенообразования в опухолях молочной железы (включая и со-

судистую сеть),<sup>1</sup> что позволяет вернуться к вопросу об аутокринно-паракринной природе такой регуляции.

Сведем этот анализ к относительно краткому перечислению основных известных факторов, часть из которых уже упоминалась выше.

1. Доказана способность к взаимоподдержанию фибробластов и эпителиальных клеток молочной железы при их совместном культивировании (Lelong et al., 1993).

2. Продемонстрирована способность факторов опухоли (ростовые факторы, пептиды) влиять на активность ароматазы в стромальных клетках жировой ткани (Miller, Mullen, 1993; James et al., 1995).

3. Факторы из стромальных клеток оказывают влияние на активность ароматазы и других ферментов стероидогенеза в эпителиальных клетках молочной железы (Reed et al., 1991b, 1995).

4. Базальная активность ароматазы в культивируемых стромальных и эпителиальных клетках молочной железы достаточно низкая, но в первых ароматаза на 2—4 порядка более чувствительна к стимуляции дексаметазоном и его комбинацией с флорболовым эфиром и цАМФ (Santner et al., 1997).

5. Некоторые цитокины (например, фактор некроза опухоли- $\alpha$ ) оказывают большее влияние на активность ароматазы в фибробластах, чем в клеточных линиях рака молочной железы человека (Reed et al., 1991b, 1995).

6. Напротив, трансформирующий фактор роста- $\alpha$  стимулирует ароматазу в клеточной линии T47D (Ryde et al., 1992), но ослабляет активность фермента в стромальных клетках жировой ткани (Mendelson et al., 1990).

7.  $5\alpha$ -восстановленные андрогены, продуцируемые стромальными клетками жировой ткани, оказывают ингибирующее влияние на активность ароматазы в эпителиальных клетках молочной железы (Perel et al., 1984).

8. Квадранты молочной железы, в которых локализуется опухоль, отличаются высоким уровнем транскриптов  $P_{450\text{аром}}$  и позитивной корреляцией между уровнем этих транскриптов и числом стромальных клеток (O'Neill et al., 1988; Bulun et al., 1993b).

9. Лимфоциты, выделенные из опухолей молочных желез, обладают способностью к конверсии андростендиона, и эта их способность прямо пропорциональна активности ароматазы в опухолевой ткани (Берштейн и др., 1997а; раздел 4.6).

10. Кондиционированная среда лимфоцитов и макрофагов несколько усиливает эффект дексаметазона на активность ароматазы в фибробластах из ткани молочной железы (Reed et al., 1991b, 1995).

---

<sup>1</sup> Следует отметить, что плотность сосудистой сети в новообразованиях молочной железы сама — прямо или косвенно — обладает чувствительностью к эстрогенной стимуляции (Badwe et al., 1997).

11. Результаты иммуноцитохимических исследований позволяют допустить присутствие ароматазы в макрофагах, инфильтрирующих ткань рака молочной железы (Mor et al., 1998).

12. Интенсивность макрофагальной инфильтрации в опухолях молочной железы позитивно коррелирует с развитием в них сосудистого компонента, плотность которого регулируется некоторыми цитокинами и эстрогенами (Leek et al., 1996; Badwe et al., 1997).

Следствием этой достаточно сложной и, возможно, далекой от завершения картины являются несколько выводов. Во-первых, образование эстрогенов массой клеток, которые локализуются в опухолях молочной железы, есть действительно результат переплетения аутокринных и паракринных механизмов, направленных в первую очередь на поддержание опухолевого роста или на противодействие ему. Во-вторых, соотношение отдельных клеточных элементов в опухолевой ткани (учитывая их, с одной стороны, различную конституитивную способность к биосинтезу эстрогенов, а с другой — различную чувствительность к регуляторам эстрогенообразования) следует расценивать как один из параметров, определяющих суть и значение проблемы в целом. В этом отношении указание на желательность разработки клеточно-специфических методов определения ароматазы (см.: Santner et al., 1997) необходимо признать безусловно оправданным.

Анализ особенностей продукции эстрогенов в молочной железе и ее опухолях был бы неполным без рассмотрения сведений о состоянии гена ароматазы в этих тканях. История исследования данного вопроса относительно непродолжительна. Началась она с демонстрации амплификации гена *CYP19* в клетках MCF-7 (Zhou et al., 1993), однако позднее эти наблюдения не были подтверждены. Ни в одном из 9 кодирующих экзонов гена ароматазы при анализе материала из 5 опухолей молочной железы мутации не были выявлены, а обнаружение 3 случаев генного полиморфизма в экзонах III, VII и X не расходилось с данными о частоте этого явления в общей популяции (Sourdaine et al., 1994). При сравнении экспрессии мРНК  $P_{450аром}$  с активностью ароматазы в одних и тех же 20 новообразованиях в 15 случаях корреляция была достаточно четкой, но в 5 остальных опухолях совпадения не было (рис. 22), из-за чего суммарный ранговый коэффициент корреляции Спирмена не достигал статистической значимости ( $p = 0.22$ ); на основании полученных данных было высказано предположение о возможном присутствии в опухолях эндогенного ингибитора ароматазы в случае высокого уровня транскриптов  $P_{450аром}$  и низкой активности фермента (Sourdaine et al., 1996).

Применение полимеразной цепной реакции позволило оценить частоту экспрессии гена ароматазы в достаточно большом числе опухолей (суммарно, по опубликованным и собственным данным, теперь уже не менее чем в 180). Эта частота варьирует, по разным наблюдениям, от 30 (Esteban et al., 1992) до 80—100 % (Koos et al., 1993; Sourdaine et al., 1996; Zhou et al., 1996). Однако следует

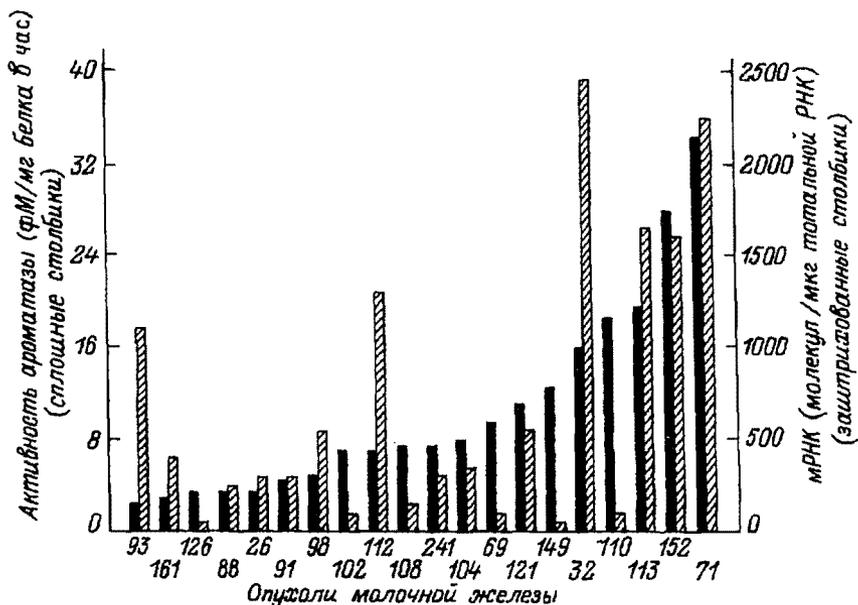


Рис. 22. Сопоставление данных об активности ароматазы и экспрессии гена *CYP19* в одних и тех же опухолях молочной железы (по: Sourdain et al., 1996).  
Цифры по горизонтали — номера проб.

учесть как характер используемого материала (в частности, в одной из работ использовали РНК, выделенную из залитых в парафин тканевых блоков, — см. Esteban et al., 1992), так и постепенное совершенствование самого метода. Наиболее важным итогом исследований, проведенных до настоящего времени, явилось, однако, не столько установление частоты экспрессии гена *CYP19*, сколько выявление так называемого сдвига (switching) в характере утилизируемых вариантов некодирующего экзона I (см. гл. 2). При этом сходные данные были получены основными группами исследователей, которые занимались этим вопросом (Utsumi et al., 1996; Zhou et al., 1996): в то время как в нормальной ткани молочной железы здоровых женщин доминирует экзон I.4 (обычно выявляемый в коже и стромальных клетках жировой ткани), в опухолях этого органа представленность экзонов I.4 и I.3 (Utsumi et al., 1996) или I.4 и I.3/II (Zhou et al., 1996; наши данные, полученные совместно с группой проф. Р. Сантена (R. Santen), — см. табл. 15), т. е. соответственно экзонов кожи—жировой ткани и экзонов так называемого овариального типа, оказывается примерно одинаковой или же утилизация экзонов I.3 и II даже превалирует. Таким образом, в опухолевой ткани молочной железы происходит переключение с использования экзона, чувствительного к глюкокортикоидам (I.4), на экзоны I.3 и II, чувствительные к дибутирил-цАМФ и форболовым эфирам, что может свидетельствовать о большей степени вовлеченности в данном случае адени-

Таблица 15

Особенности использования отдельных вариантов экзона I гена ароматазы в ткани опухолей молочной железы (Берштейн и др., 1998в)<sup>1</sup>

Варианты экзона I	Интенсивность ПЦР <sup>2</sup> (усл. ед.) <sup>3</sup>	Частота превалирования интенсивности ПЦР (%)
I.4	33.2±11.9	36.4 (8)
I.3	31.8±7.6	27.2 (6)
II	62.8±28.2	36.4 (8)

Примечания. 1. Исследована тотальная РНК из 24 новообразований молочной железы; в 2 случаях экспрессия гена *CYP19* не выявлялась. 2. ПЦР — полимеразная цепная реакция. 3. Оценка автордиограмм производилась системой Storm ImageQuant. В скобках — число наблюдений.

латциклазы и протеинкиназ А и С в регуляцию внегонадного эстрогенообразования. Более того, выявленный сдвиг в характере утилизации вариантов экзона I оказался свойственным не только самим новообразованиям молочной железы, но и окружающей их жировой ткани (Narada et al., 1993; Agarwal V. R. et al., 1996; см. также раздел 4.3). Это, с одной стороны (что особенно важно), подтверждает уже отмечавшуюся выше роль не только аутокринных, но и паракринных механизмов в обеспечении происходящих изменений в регуляции гена ароматазы, а с другой — является, пожалуй, своеобразным аргументом в пользу до сих пор не утратившего своего значения представления об «уподоблении» нормальных тканей опухоленосителя свойствам самого новообразования (см.: Шапот, 1975). Вопрос о причинах преимущественного «переключения» на экзоны II и I.3 пока, по-существу, не изучался, и высказанные до сих пор предположения (в частности, о роли в этом процессе накопления в опухоли простагландина  $E_2$ , — Simpson et al., 1997) носят лишь предварительный характер.

Возвращаясь в завершение данного раздела к вопросу о том, имеет ли присутствие ароматазы в ткани молочной железы какую-либо биологическую значимость, следует отметить, что способность данного фермента «нарабатывать» количество эстрогенов, достаточное для индукции заметных эффектов, нередко ставилась под сомнение (Vermeulen et al., 1986), причем иногда (хотя и не на долгий период) даже апологетами «ароматазного направления» (Santen et al., 1986). Исследования, проведенные в последние годы, показали ошибочность подобных сомнений. Сошлемся лишь на некоторые примеры. Клетки MCF-7, трансформированные геном ароматазы, растут в среде, лишенной стероидов, значительно быстрее, чем дикий штамм этой линии (Macauley et al., 1994). При перевивке трансформированных геном *CYP19* клеток MCF-7 овариэктомированным голым мышам рост возникающих опухолей стимулируется андростендионом и предотвращается ингибиторами ароматазы, чего не удается добиться в случае перевивки клеток дикого штамма, для которого характерна низкая актив-

ность эстрогенсинтетазы (Yue et al., 1994; Dowsett et al., 1996). В ткани рака молочной железы человека выявляемая иммуноцитохимическим методом активность ароматазы коррелирует с присутствием в опухоли клеточного маркера пролиферации — так называемого ядерного антигена, PCNA, и с интенсивностью включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК эксплантатов опухоли (Lu et al., 1996). В еще большей степени биологическое значение ароматазы для развития гиперплазии и дисплазий эпителия молочных желез подтверждается результатами экспериментов, проведенных на трансгенных мышах (Tekmal et al., 1996), однако более подробно эти данные будут рассмотрены в гл. 7.

#### 4.8. ДРУГИЕ ТКАНИ

Больше всего информации (причем иногда разноречивой), относящейся к процессу локального эстрогенообразования, имеется о внутренней выстилке полости матки — эндометрии; представлены сведения и о гладкомышечной оболочке этого органа — миометрии. В эндометрии различают два слоя: поверхностный (функциональный) и базальный, или собственный. Поверхностный слой образован эпителием и выстилает, в том числе, маточные железы. Собственный слой состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани, включающей в себя стромальные клетки. При определении содержания эстрогенов в эндометрии эти виды клеток, естественно, разделить не удастся, поскольку тестированию подвергается экстракт цельного гомогената ткани. В проводившихся пока немногочисленных исследованиях ставились две основные задачи: а) сравнить содержание эстрадиола и эстрона в нормальном или трансформированном эндометрии и б) сравнить содержание эстрогенов в трансформированном эндометрии по сравнению с нормальным. Несмотря на бытующее представление о том что в эндометрии (в отличие от молочной железы) превалирует оксидативная форма  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы, которая должна в большей степени обеспечивать конверсию эстрадиола в эстрон (гл. 1; Castagnetta et al., 1995a, 1995b), при исследовании нормального эндометрия менопаузальных женщин (Vermeulen-Meiners et al., 1984) и ткани рака эндометрия (Bonney et al., 1986) было продемонстрировано более высокое содержание в них эстрадиола, чем эстрона. В другой работе отличий между содержанием эстрадиола и эстрона в трансформированном эндометрии обнаружить не удалось (Vermeulen-Meiners et al., 1986). Было выяснено, что содержание эстрадиола в ткани рака тела матки существенно ниже, чем в опухолях молочной железы (см. раздел 4.7; Naitoh et al., 1989). Сам малигнизированный эндометрий по уровню в нем эстрогенов, как правило, не отличается или мало отличается от нормального эндометрия (Vermeulen-Meiners et al., 1986), хотя, по данным, полученным на небольшом материале, уровень эстрадиола в трансформированном эндометрии был достоверно выше, чем

Таблица 16

Содержание эстрадиола в ткани нормального и малигнизированного (опухоль) эндометрия у больных раком тела матки

Больные	Эстрадиол в ткани			
	пг/г сырой массы		пг/мг белка	
	Нормальный эндометрий	Опухоль	Нормальный эндометрий	Опухоль
Все	268±61 (51)	510±100 (78)	6.6±1.5 (51)	21.0±12.0 (78)
С сохраненным менструальным циклом	580±163 (10)	1350±358 (17)	11.5±3.3 (10)	23.1±6.6 (17)
В менопаузе	192±61 (41)	276±52 (61)	5.3±1.6 (41)	20.3±15.2 (61)

Примечание. В скобках — число наблюдений.

в нормальном (Naitoh et al., 1989). При пересчете результатов не на единицу сырой массы ткани (как во многих из перечисленных выше работ), а на единицу белка мы, обследуя свыше 70 больных раком тела матки, выявили у них тенденцию к повышению концентрации эстрадиола в опухоли по сравнению с макроскопически неизменным эндометрием (табл. 16). При этом обнаружилась позитивная корреляция содержания эстрогенов в ткани новообразования со стадией процесса и негативная — со степенью дифференцировки опухоли, что свидетельствует об определенной прикладной значимости этого параметра. Тем не менее очевидно, что отсутствие, по мнению ряда исследователей, выраженных отличий в содержании эстрогенов между нормальным и трансформированным эндометрием находится в определенном диссонансе со сведениями об активности ароматазы в этих тканях (см. ниже) и нуждается в объяснении.

Следует отметить, что само изучение присутствия ароматазы в эндометрии проходило не совсем гладко и может быть подразделено на условные этапы. В итоге первого из них было сделано заключение об отсутствии данного фермента в нормальном эндометрии (Waxendale et al., 1981). Затем последовала серия работ, в которых использовалась процедура, основанная на высвобождении тяжелой воды из  $1\beta$ - $^3\text{H}$ -андростендиона. Реакция оказалась положительной в том случае, когда из эндометрия выделяли стромальные клетки и культивировали их в течение 48—96 ч. Образование продукта реакции успешно стимулировалось прогестинном (медроксипрогестерон-ацетатом), и этот эффект потенцировался эстрадиолом и форсколином, что, по мнению авторов, указывало на вовлечение цАМФ-опосредованного механизма; хорионический гонадотропин, пролактин и инсулин потенцирующим влиянием не обладали (Tseng, 1984; Tseng et al., 1987). Однако в одном из

исследований было показано, что и инсулин может стимулировать ароматазу, но только в культуре стромальных клеток и в очень больших концентрациях — на 4—5 порядков (!) превышавших физиологические (Randolph et al., 1987). Примечательно, что в одной из работ (Taga et al., 1990) не было обнаружено отличий в активности ароматазы в эндометрии в пролиферативную и секреторную фазу цикла, но эти значения были достоверно ниже, чем активность фермента в цилиндрическом и плоском эпителии шейки матки, что выглядело несколько сомнительным.

Последовавшие затем два сообщения быстро стали общеизвестными. В одном из них (Prefontaine et al., 1990) было показано, что применение в случае нормального эндометрия реакции высвобождения тяжелой воды может давать положительные результаты (псевдоароматазная реакция, — см. гл. 1), а использование метода прямого выделения продукта реакции не выявляет у этой ткани способности к эстрогенообразованию. В другом (Bulun et al., 1993a) с помощью полимеразной цепной реакции впервые было продемонстрировано отсутствие транскриптов  $P_{450\text{аром}}$  в нормальном эндометрии. Использование той же реакции подтвердило уже известные данные (Folkerd et al., 1984) об отсутствии ароматазы в нормальном миометрии (Bulun et al., 1994b). Напротив, в ткани фибромиом матки (Folkerd et al., 1984; Bulun et al., 1994b) и в ткани рака эндометрия (Yamaki et al., 1985; Yamamoto et al., 1993; Bulun et al., 1994a) этот фермент выявлялся самыми различными методами: и полимеразной цепной реакцией, и прямым изучением продукта конверсии андрогенных предшественников, и методом, основанным на высвобождении тяжелой воды (который в данном случае вполне пригоден и дает адекватные результаты). Более того, с помощью анализа экспрессии *CYP19* ароматаза была обнаружена как в имплантатах эндометриоза в брюшину, так и (что особенно интересно) в эутопическом эндометрии этих же больных. Промоторы I.4 и II использовались при этом с одинаковой частотой. Поскольку в нормальной брюшине больных эндометриозом и в нормальном эндометрии здоровых женщин транскрипты  $P_{450\text{аром}}$  найдены не были, а воспалительная реакция при эндометриозе нередко опосредуется привлечением перитонеальных макрофагов, было высказано предположение о роли секретируемых этими клетками цитокинов (в том числе ИЛ-6 и ИЛ-11) в индукции гена ароматазы и об аутокринно-паракринной регуляции образования эстрогенов эндометриодными клетками (Noble et al., 1996; см. также разделы 4.6 и 4.7).

Есть ли какая-либо информация об особенностях и природе эстрогенообразования в самом малигнизированном эндометрии? Одна из таких особенностей очевидна: согласно современной точке зрения, продукция эстрогенов в трансформированном эндометрии не просто выше, чем в нормальной ткани, а есть результат истинной ароматизации андростендиона и тестостерона с образованием соответственно эстрона и эстрадиола, что казалось бы, нормальному эндометрию не свойственно. В этой ситуации не совсем понят-

но, каков источник появления эстрогенов в нормальном эндометрии и почему их уровень там близок уровню в малигнизированном эндометрии. Так же как и в случае с молочной железой (см. раздел 4.7), одним из таких источников может быть кровь, хотя градиент концентрации «эндометрий/плазма» в менопаузе весьма высок (Naitoh et al., 1989), что может (в результате сульфатазной реакции) приводить к пополнению запасов эстрогена в нормальной ткани. Следует отметить, что хотя, как говорилось выше, содержание эстрадиола в эндометрии равно или выше концентрации эстрогена, образование последнего в результате ароматизации андрогенного предшественника в трансформированном эндометрии происходит с большей интенсивностью, чем образование эстрадиола (Yamaki et al., 1985; Yamamoto et al., 1993), что оправдывает использование  $^3\text{H}$ -андростендиона, а не  $^3\text{H}$ -тестостерона для оценки этой реакции.

Для характеристики продукции эстрогенов в малигнизированном эндометрии существенно, что в нем при экспрессии гена  $P_{450\text{аром}}$  используются промоторы II и I.3 и реже I.4 (Bulun et al., 1994a), хотя, по предварительным данным, при сопоставлении с результатами иммуноцитохимического исследования оказалось, что специфическое окрашивание на ароматазу наиболее интенсивно именно в последнем случае (Sasano et al., 1996a). Иммуноцитохимическим методом, помимо того, удалось показать, что в ткани рака тела матки окрашиваются преимущественно клетки стромы (Watanabe et al., 1995; Sasano et al., 1996a). Это (даже при скидке на немногочисленность накопленных сведений и на использование только одного класса антител, полученных из лаборатории д-ра Н. Харады (Dr. N. Harada), см. раздел 4.7), как и при исследовании ткани рака молочной железы, указывает на важность клеточного состава опухоли и на возможность (о чем уже не раз говорилось) аутокринно-паракринного взаимодействия различных клеточных элементов в процессе эстрогенообразования и в ткани рака тела матки.

Выше отмечалось, что при исследовании активности ароматазы в эндометрии в одной из работ для сравнения изучался и эпителий шейки матки (Taga et al., 1990). Эта работа пока остается единственной в своем роде. Имеется несколько противоречивых сообщений о том, присутствует ли ароматаза в эпителиальных опухолях яичников (не путать с гранулезоклеточными, что по формальным признакам следовало бы рассматривать как проявление гонадной продукции эстрогенов!). По некоторым данным, ароматазная активность в подобных новообразованиях выявляется, она не всегда высока и чаще всего коррелирует с присутствием в тестируемой ткани рецепторов прогестерона (MacLusky et al., 1987; Noguchi et al., 1993). Однако иммуноцитохимическим методом ароматаза обнаруживается преимущественно не в эпителиальных, а в стромальных клетках; при этом в 4 из 5 изучавшихся случаев с помощью полимеразной цепной реакции было установлено, что при образовании транскриптов  $P_{450\text{аром}}$  используются экзоны I.3 и II,

присущие нормальной ткани яичника (Kaga et al., 1996). Соответственно высказывается мнение, что если ароматаза и выявляется в яичнике, пораженном эпителиальной опухолью, активность фермента, скорее всего, ассоциирована с гиперплазированной стромой, а не с самими опухолевыми клетками (Imai et al., 1994).

Большой интерес (в том числе и в прикладном отношении) представляет анализ вопроса о том, обладает ли ароматазная активность и соответственно способностью к эстрогенообразованию ткань предстательной железы. История изучения этого вопроса весьма близка таковой при исследовании ароматазы в эндометрии и тоже может быть подразделена на противоположные по своим выводам этапы. В кратком изложении она может быть представлена следующим образом. 1. Ароматаза выявляется и в нормальной, и в гиперплазированной ткани железы (Stone et al., 1986). 2. Метод, основанный на высвобождении тяжелой воды из  $1\beta$ - $^3\text{H}$ -андростендиона, для ткани предстательной железы не годится (псевдоароматазная реакция), а прямое исследование продуктов конверсии  $1,2,6,7$ - $^3\text{H}$ -андростендиона выявляет отсутствие образования эстрогенов в нормальной ткани этого органа (Brodie et al., 1989). 3. Привлечение иммуноцитохимических и молекулярно-генетических методов (включая гибридизацию *in situ* и полимеразазную цепную реакцию, правда, пока на очень небольшом материале) позволяет установить присутствие ароматазы в первую очередь в стромальных и реже — в эпителиальных клетках ткани рака предстательной железы (Matzkin, Soloway, 1992; Tsugaya et al., 1996; Hiramatsu et al., 1997), что открывает более широкие перспективы и для применения ингибиторов ароматазы при этом заболевании (гл. 9).

Активность ароматазы не найдена в нормальной ткани надпочечника, но обнаружена в феминизирующей адренокортикальной опухоли у молодого мужчины, страдающего гинекомастией; при дополнительном анализе РНК из опухолевой ткани было выяснено, что при экспрессии *CYP19* используется лишь промотор II (гонадного типа), а I.3 и I.4-специфические последовательности выявлены не были (Young et al., 1996). Важные сведения накоплены в отношении ткани печени. Активность ароматазы обнаруживается в печени плода, гепатоцеллюлярной карциноме и в прилегающих к ней участках органа (Harada et al., 1998), но не в ткани нормальной печени взрослого человека. У плода при экспрессии гена ароматазы утилизируется экзон I.4, а в ткани опухоли печени — промоторы I.3 и II (Bulun et al., 1995). Достаточно высокая активность ароматазы была обнаружена в ткани меланобластомы (Santen et al., 1988), но это исследование пока не нашло дальнейшего продолжения.

Не останавливаясь дополнительно на некоторых установленных или предполагаемых источниках экстрагонадной продукции эстрогенов (корни волос, — Sawaya, Price, 1997; нормальная и трансформированная ткань толстой кишки (English et al., 1998); лейкозные клетки и т. д.) и подводя некоторый итог настоящей

главе, следует отметить необычайную топографическую широту обсуждаемого процесса и ряд других его специфических особенностей, безусловно нуждающихся в более глубоком изучении. Наиболее характерными в этом отношении представляются тканеспецифичность в использовании отдельных типов экзона I гена ароматазы, сдвиг в их утилизации в различных условиях (нередко проявляющийся «в возврате» к гонадному варианту — т. е. к промоторам II и I.3) и те закономерности, которые присущи внегонадному эстрогенообразованию в различные периоды онтогенеза. Некоторые из этих закономерностей будут рассмотрены и в гл. 5.

## ГЛАВА 5

### Возраст и экстрагонадная продукция эстрогенов

В предыдущих главах данный вопрос затрагивался так или иначе неоднократно. Тем не менее, поскольку этот аспект внегонадного эстрогенообразования является одним из ключевых, выделение специальной главы, суммирующей накопленные данные, представляется вполне оправданным. В то же время следует сделать несколько оговорок, которые, по крайней мере отчасти, уже приводились ранее. Так, необходимо раздельно оценивать возрастную динамику концентрации эстрогенов в крови и тканях, а также процесса периферической ароматизации андрогенов в эстрогены, каталитической активности ароматазы и особенностей экспрессии *CYP19*. Далее, не следует сводить возрастные изменения только к тем, которые сопутствуют или свойственны исключительно старению. Наконец, изменения с возрастом эстрогенообразования в отдельных периферических тканях могут иметь свои индивидуальные черты, обусловленные, в том числе, и особенностями внутритканевой регуляции этого процесса.

Хотя основное предназначение книги — анализ внегонадной продукции эстрогенов, невозможно, обсуждая возрастную динамику этого процесса, пройти мимо тех изменений, которые претерпевает с возрастом и функция гонад. Большинство выполненных ранее исследований, имевших целью определение содержания эстрогенов в крови детей допубертатного возраста, сталкивалось с методическими сложностями: чувствительность стандартных методов радиоиммунологического анализа не всегда позволяла оценить уровень этих гормонов из-за их низкой концентрации. Между тем несомненно, что эстрогены оказывают биологическое действие на ткани-мишени даже при таких концентрациях, чем некоторые авторы объясняют наступление телархе (развития молочных желез) и ростового спурта. Последний, отражая созревание костей, у девочек начинается раньше, чем у мальчиков. Этому обстоятельству способствует тот факт, что хотя у девочек в период, предшествующий половому созреванию, уровень эстрогенов практически так же низок, как и у мальчиков, он все же у первых достоверно выше (рис. 23), что удалось доказать лишь при использовании сверхчувствительного рекомбинантного метода биотестирования (Klein et al., 1994). После наступления

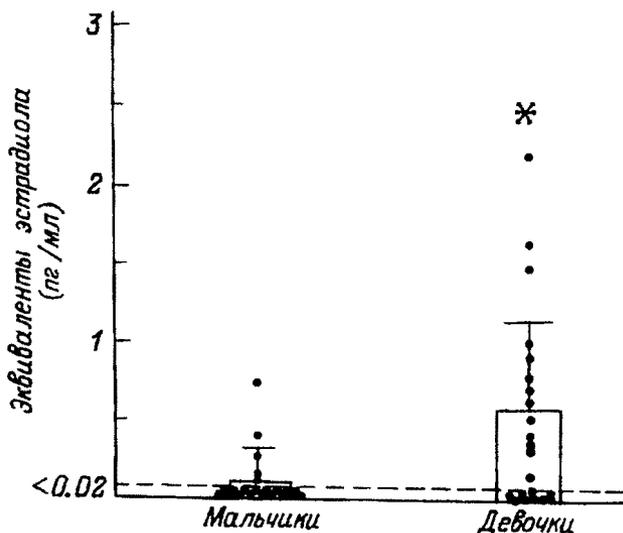


Рис. 23. Концентрация эстрогенов в крови детей препубертатного возраста (по: Klein et al., 1994).

Точки — отдельные пробы; горизонтальные линии — обозначение среднего уровня для группы; звездочка — достоверность различия между сравниваемыми группами ( $p < 0.05$ ).

полового созревания уровень эстрогенов быстро нарастает и достигает «взрослых» значений в сжатые сроки, что, по общему мнению, отражает состояние гонадной функции. Обычно реже обращают внимание на так называемый неонатальный выброс (surge) эстрадиола (Forest et al., 1976), который может быть обусловлен разными причинами, и в том числе внегонадной продукцией эстрогенов во внутриутробном периоде (см. далее). Наибольшее внимание исследователей привлекают, однако, период, предшествующий менопаузе, и сама менопауза.

Считается, что функция яичников начинает изменяться достаточно заметно уже после 25—30-летнего возраста, причем помимо уровня эстрогенов в сыворотке, который как раз в данном отношении представляет собой не самый надежный критерий; существует несколько показателей, фиксирующих эту динамику. К ним относятся, в частности, число маленьких и средних фолликулов в яичнике, а также концентрация ингибина в крови — гормона, преимущественно секретируемого гранулезными клетками (Gosden, Faddy, 1994; Judd, Fournet, 1994). Не вдаваясь здесь в детали крайне важной для старения репродуктивной системы проблемы, а именно что первично: возрастные ли изменения функции гонад или изменения гипоталамо-гипофизарной системы, следует отметить, что повышение секреции гонадотропинов (ФСГ и ЛГ) с возрастом начинается весьма рано, по некоторым данным в 29—30 лет (Дильман, 1987; Ebbiary et al., 1994). Отчасти благодаря этому повышению гонадотропинов и соответственно вследствие избыточной гонадотропной стимуляции, а также из-за того что

эстрадиол преимущественно продуцируется доминантным фолликулом, а ингибин и антральными фолликулами (см. также гл. 1), секреция эстрогенов яичниками непосредственно в циркуляцию с возрастом, до наступления менопаузы в противоположность секреции ингибина снижается мало, а иногда — в так называемый переходный период — может даже возрастать (Цырлина, 1988; Judd, Fournet, 1994). Последнее касается в большей степени не столько эстрадиола, эстрона и эстриола, сколько «неклассических» эстрогенов<sup>1</sup> (Дильман и др., 1968) и подтверждается, как полагают, наличием определенного материального субстрата в виде гиперплазии стромы яичников.

Для понимания проблемы существенны возрастные изменения, которые претерпевает активность ароматазы в ткани гонад.

У стареющих крыс активность фермента в яичниках постепенно повышается; аналогичная тенденция подмечена и в тестикулах жеребцов, что соответствует, по некоторым данным, и повышению с возрастом уровня эстрогенов в крови у представителей и того и другого вида (Hsueh et al., 1984; Almadhidi et al., 1996). В яичниках у женщин ароматаза исследовалась и биохимическим и иммуноцитохимическим методами. В первом случае активность ароматазы заметно снижалась в пременопаузе, причем степень снижения была тем выше, чем более интенсивным был процесс перекисного окисления липидов в ткани органа (Okatani et al., 1993). При использовании иммуноцитохимического метода было установлено, что в яичнике 2.5-месячной девочки ароматаза отсутствует. Это косвенным образом подтверждает упоминавшийся выше факт о том, что усиленный выброс эстрогенов в раннем постнатальном периоде, скорее всего, опосредован внегонадным механизмом. О том же свидетельствует и усиленная конверсия в это время андрогенных предшественников в эстрогены (Siiteri, MacDonald, 1973). В ткани яичников пременопаузальных женщин ароматазу не удавалось обнаружить в строме, а также в маленьких фолликулах размером менее 250 мкм. В более крупных фолликулах ароматаза выявлялась как в клетках гранулезы, так и, по некоторым наблюдениям, в theca interna (см. гл. 1). Особенностью яичников постменопаузальных женщин было обнаружение ароматазы главным образом в их стромальном компоненте (Inkster, Brodie, 1991), чем, возможно, частично объясняется характеристика (спектр) секретируемых в это время яичниками гормонов.

Однако прежде чем перейти к вопросу о продукции эстрогенов у женщин в менопаузе и к тем факторам, от которых она зависит, вернемся на некоторое время к особям мужского пола. Выше уже упоминалось исследование, продемонстрировавшее возрастное увеличение активности ароматазы в ткани гонад у жеребцов. У мужчин наблюдается иная закономерность: активность ароматазы в тестикулах максимальна в возрасте 18—20 лет, а затем посте-

---

<sup>1</sup> К числу «неклассических» эстрогенов, по современным представлениям, относятся и катехолэстрогены (Коваленко и др., 1997).

пенно, хотя и недостоверно, снижается (Inkster et al., 1995). Что касается эстрогенов крови, то возрастной аспект этого вопроса исследовался у мужчин значительно реже, чем у женщин. В относительно недавно выполненной работе было показано, что уровень эстрона в крови 40—80-летних мужчин существенно выше, чем уровень эстрадиола. При этом концентрация эстрона достоверно снижается по мере старения (в 40 лет она составляет  $0.71 \pm 0.034$ , в 80 лет  $0.44 \pm 0.020$  нМ/л), а концентрация эстрадиола абсолютно не меняется — и в той и в другой группе она находилась на уровне  $0.20 \pm 0.004$  нМ/л (Belanger et al., 1994). Существенно, что с возрастом у мужчин происходит и достоверное снижение в крови уровня основного андрогенного предшественника эстрона — андростендиона, в то время как в отношении возрастной динамики тестостеронемии до сих пор наблюдается определенное расхождение во взглядах (Belanger et al., 1994; Гончаров, Кадия, 1995).

У женщин в менопаузе некоторые особенности эстрогенемии, казалось бы, не вызывают разночтений. Так, все согласны с тем, что после наступления менопаузы концентрация эстрогенов в крови достаточно быстро снижается до значений, присущих женщинам, подвергнутым овариэктомии, и что при этом уровень эстрадиола понижается в большей степени, чем уровень эстрона (Longcope, Baker, 1993; Miller, 1996a; см. также гл. 4). Относительное превалирование эстрона обычно объясняется тем, что в менопаузе он образуется преимущественно в результате периферической конверсии (см. также гл. 3 и ниже), что в значительной степени справедливо. Тем не менее очевидно, что в этом отношении не следует полностью игнорировать и яичники, поскольку в крови яичниковой вены менопаузальных женщин концентрация эстрона также превосходит уровень эстрадиола, хотя и не в такой степени, как в периферической крови (Judd, Fournet, 1994).

Важным и приближающим к основной теме является вопрос о том, чем в наибольшей степени определяется уровень эстрогенов в крови женщин, находящихся в менопаузе: их возрастом или массой тела (см. также разделы 4.3 и 4.4). Несмотря на некоторые разногласия, многие исследователи придерживаются точки зрения, что масса тела в этом отношении более важна, чем возраст обследуемых женщин и даже чем время, прошедшее с момента наступления менопаузы, хотя и два последних показателя оказывают определенное воздействие на уровень эстрогенемии (табл. 17). Нередко при этом обнаруживается, что концентрация эстрона в крови коррелирует с массой тела в большей степени, чем концентрация эстрадиола (Vermeulen, Verdonck, 1978), очевидно, по тем же причинам, которые упоминались выше.

В начале главы и ранее уже отмечалось, что не следует ставить знака равенства между возрастными изменениями содержания эстрогенов в крови и некоторых других параметров, характеризующих образование и реакции обмена этих гормонов. Подтверждением сказанному являются данные о конверсии андростендиона в эстрон (или так называемой периферической ароматизации) в раз-

Таблица 17

Коэффициент линейной корреляции уровня гормонов (эстрогенов и андрогенов) в крови с некоторыми параметрами, характеризующими здоровых женщин в менопаузе (Vermeulen, Verdonck, 1978)

Гормон	Коэффициент линейной корреляции уровня гормонов в крови с				
	массой тела	индексом массы тела	содержанием жира в теле	длительность ю менопаузы	возрастом
Эстрон	0.55**	0.72**	0.66**	-0.24	-0.31
Эстрадиол	0.26	0.38*	0.36	-0.30	-0.37*
Андростендион	0.28	0.28	0.21	-0.04	-0.02
Тестостерон	-0.01	-0.09	-0.07	-0.19	-0.12

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.02$ .

личные возрастные периоды (Siiteri, MacDonald, 1973; см. также гл. 3). Действительно, хотя концентрация эстрогенов в крови в менопаузе существенно снижается, интенсивность конверсии андростендиона возрастает в то же время, по некоторым наблюдениям, по сравнению с 30—40-летними женщинами в 5—6 раз (Hemsell et al., 1974). У мужчин отмечается сходная закономерность: в группе здоровых 16—82-летних пробандов наблюдалась достоверная позитивная корреляция ( $r = +0.62$ ) между интенсивностью образования эстрона из андростендиона и возрастом обследуемых, хотя эта связь и была выражена в несколько меньшей степени, чем у соответствующей группы женщин ( $r = +0.86$ ) (Hemsell et al., 1974). Обращает на себя внимание также тот факт (см. гл. 3), что в менопаузе степень связи периферической конверсии андростендиона с массой тела находится на более низком уровне, чем у женщин с сохраненным менструальным циклом, что свидетельствует о повышении значимости самого возраста как фактора, модифицирующего процесс экстрагонадного эстрогенообразования, в период, когда гонадная продукция эстрогенов в существенной степени ослабевает. Значение именно возраста, а не «угасания» гонадной функции подтверждается теми пока еще, к сожалению, немногочисленными данными, из которых следует, что после овариэктомии у женщин с сохраненным до этого менструальным циклом не выявляется признаков усиления периферической ароматизации андрогенных предшественников (Siiteri, MacDonald, 1973; гл. 3), хотя этот вопрос (особенно, при выполнении овариэктомии в разные десятилетия жизни), равно как и в целом проблема возможного компенсаторного усиления внегонадной продукции эстрогенов, безусловно, заслуживает дальнейшего изучения. Кстати, при специально проведенном ступенчатом регрессионном анализе удалось показать, что возраст в действительности оказывает большее влияние, чем избыточная масса тела, на интенсивность ароматизации андростендиона и тестостерона (табл. 18),

Таблица 18

Коэффициент линейной корреляции периферической ароматизации (конверсии) андрогенов в эстрогены с возрастом, массой тела и состоянием менструальной функции у здоровых женщин (Longcope, Baker, 1993)

Конверсия	Коэффициент линейной корреляции конверсии с		
	возрастом	массой тела	менопаузой
Андростендиона в эстрон	0.234*	0.117*	0.010
Тестостерона в эстрадиол	0.169*	0.095*	0.001

\*  $p < 0.001$ .

причем в процессе этого исследования было практически сведено к нулю и значение самой менопаузы (Longcope, Baker, 1993). Таким образом, пока остается не совсем ясным, только ли возраст (прежде всего старше 50 лет) обуславливает усиление периферической конверсии андрогенных предшественников, или же этому дополнительно способствует и наступление менопаузы. Данный вопрос важен и потому, что он имеет отношение к исследованию источников продукции эстрогенов в менопаузе, которое представляет интерес, в частности, с точки зрения взаимосвязи особенностей внегонадного эстрогенообразования и некоторых заболеваний человека (см. гл. 4 и 6). Помимо того, при более позднем наступлении менопаузы и, следовательно, при более длительном воздействии на ткани-мишени гонадных эстрогенов могут модифицироваться условия, предрасполагающие к развитию эстроген-индуцированных опухолей, и, возможно, сам тип гормонального канцерогенеза (гл. 7).

Возрастное изменение экстрагонадного образования эстрогенов может быть оценено также путем непосредственного изучения активности ароматазы в периферических тканях или особенностей экспрессии в них гена *CYP19*. Отдельные сведения такого рода уже обсуждались в гл. 4, другие заслуживают более пристального внимания. Весьма информативными оказались материалы, характеризующие эти параметры в тканях плода человека. Их отличительные особенности сводились к следующему. Во-первых, активность ароматазы во многих исследованных тканях оказалась весьма высокой: например, в печени 19 000 фм/мг белка в час, в ткани головного мозга и кишечнике 2700—2800, в надпочечнике, селезенке, мышечной ткани на уровне 1200—1500 фм/мг белка в час. Во-вторых, ароматаза была обнаружена в тканях, в которых она не выявляется у взрослых людей (печень, надпочечники), или в тканях, в отношении которых соответствующие данные применительно к взрослым людям пока отсутствуют (кишечник). Наконец, в-третьих, преимущественным вариантом экзона I гена  $P_{450аром}$ , используемым в фетальных тканях, оказался экзон I.4 (Doody, Carr, 1989; Toda et al., 1994; табл. 19). На основании этих наблюдений можно сделать ряд выводов: 1) выше упоминавшийся

Таблица 19

Распределение частоты утилизации вариантов экзона I гена ароматазы в разных тканях плода человека (Toda et al., 1994)

Ткань	Частота утилизации вариантов экзона I (число случаев)					
	I.1	I.2	I.3	I.4	I.5	II (усеченный)
Надпочечник	3			6		14
Головной мозг			1	4		
Печень		1		19		
Кишечник	1			3		
Почка				3		
Легкое			1	3	1	
Кожа				2		

«всплеск» в продукции эстрогенов в раннем постнатальном периоде может быть связан и с эстрогенсинтезирующей активностью фетальных тканей; 2) в части тканей эта активность утрачивается после рождения или по крайней мере к зрелому возрасту (иногда проявляясь вновь в опухолях тех же тканей, — см. гл. 4); 3) в большинстве исследованных фетальных тканей, за исключением головного мозга, используются промоторы ароматазы, чувствительные к кортикостероидам, а не к цАМФ (см. гл. 2).

Ароматаза ткани головного мозга (как уже отмечалось в гл. 4) в ранний период жизни, очевидно, включается в цепь реакций, обеспечивающих половую дифференцировку органа. Возможно, этому способствует асимметрия активности ароматазы в отдельных его анатомо-функциональных центрах, выявляемая у крыс в период с 20-го дня эмбрионального периода и вплоть до 15-го дня постнатальной жизни (Lichtensteiger, Von Ziegler, 1991). В подтверждение сказанного ранее следует отметить, что если у 3—4-дневных мышей уровень мРНК ароматазы был равен в ткани диэнцефалона  $0.068 \pm 0.008$  (самцы) и  $0.059 \pm 0.006$  (самки) усл. ед., то в том же отделе у мышей, достигших половой зрелости, соответствующие значения равнялись  $0.022 \pm 0.004$  и  $0.014 \pm 0.003$  усл. ед. (Narada, Yamada, 1992), т. е. были существенно ниже. Таким образом, наряду с менопаузальным, или «пожилым», пиком внегонадной ароматазной активности, который присущ некоторым тканям, второй, не менее важный пик наблюдается во внутриутробном и раннем постнатальном периоде онтогенеза.

К числу тканей, которые характеризуются повышением активности ароматазы по мере старения, относятся, в частности, мышечная (Берштейн и др. 19966; Ларионов, 1997; раздел 4.4) и жировая ткани (Cleland et al., 1985; Simpson et al., 1996). Последняя традиционно привлекает к себе особое внимание в связи с повышением с возрастом доли жира в теле у большей части популяции. По пока неясным причинам на первоначальном этапе исследования этого вопроса отмечалась позитивная корреляция аро-

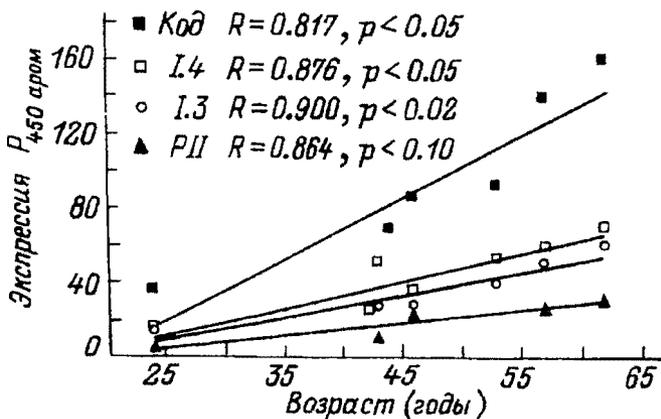


Рис. 24. Возрастная динамика числа транскриптов гена  $P_{450\text{аром}}$  в жировой ткани бедер у здоровых женщин (по: Agarwal et al., 1997).

Код — кодирующая область; I.4, I.3 и PII — тканеспецифические транскрипты.

матазной активности в жировой ткани не с возрастом, а с массой тела (Forney et al., 1981), но в последующем была выявлена именно возрастная зависимость, причем это касалось не только каталитической активности фермента, но и транскриптов гена  $P_{450\text{аром}}$  (Bulun, Simpson, 1994b). Удивительно, однако, что увеличение числа копий транскриптов по мере старения четко затрагивало преимущественно кодирующую область гена, экзон I.4 и в меньшей степени экзон I.3, но было статистически недостоверным в отношении экзона II (Agarwal et al., 1997; рис. 24), что лишний раз подтверждает биологическое значение тканеспецифической регуляции промоторов гена  $CYP19$  (гл. 2) и указывает на ее возрастной аспект.

Не останавливаясь здесь на особенностях изменения с возрастом внегонадной продукции эстрогенов в ряде других периферических тканей (см. также гл. 4), следует коснуться возможных причин усиления этого процесса по мере старения. Однозначного мнения на этот счет пока не достигнуто. По мнению одних исследователей, такая динамика отражает закономерность, изначально присущую каталитической активности ароматазы, причем только в отдельных тканях (Cleland et al., 1985). Другие полагают, что причина заложена в изменении с возрастом чувствительности фермента к широкому спектру регулирующих его факторов. Так, отмечается, что по мере старения может ослабевать влияние эпидермального фактора роста или других эндогенных ингибиторов ароматазы (Mendelson, Simpson, 1987; Bulun, Simpson, 1994b) или усиливаться локальный и системный эффект некоторых стимуляторов активности фермента (глюкокортикоиды, ИЛ-6, — см. Reed, 1995; Zhao et al., 1995), что определяет вовлечение подобных факторов в формирование предрасположенности к развитию ряда заболеваний у человека. О некоторых из таких заболеваний и об их возможной связи с экстрагонадным эстрогенообразованием или с влиянием на него пойдет речь в следующей главе.

## ГЛАВА 6

### Основные неинфекционные заболевания и некоторые другие состояния у человека и внегонадное образование эстрогенов

Спектр заболеваний, которым подвержена человеческая популяция, как известно, очень широк. Тем не менее в этом спектре могут быть выделены болезни, которые встречаются наиболее часто и наиболее часто приводят к смертельным исходам, что, естественно, повышает их медицинскую и социальную значимость. Надо сказать, что порядок, по которому ранжируются отдельные заболевания в зависимости от губительности их воздействия на популяцию, менялся с начала этого столетия и, как предсказывают, будет меняться и впредь, о чем свидетельствуют некоторые примеры, представленные в табл. 20. Тем не менее если в качестве основных заболеваний рассматривать те, от которых умирает большая часть населения, достигшая второй половины жизни, т. е. находящаяся в возрасте старше 40—50 лет, то среди этих болезней (помимо злокачественных новообразований, — см. гл. 7), конечно, выделяются атеросклероз и его различные проявления, артериальная гипертензия, сахарный диабет пожилых и некоторые другие (Дильман, 1987; Murray, Lopez, 1997).

Эстрогены так или иначе связаны с развитием многих из этих заболеваний, и даже если их избыток или дефицит не относится к числу этиологических факторов при возникновении того или иного процесса, модифицирующее влияние женских половых гормонов проявляется весьма ощутимо. Важным дополнительным моментом служит то обстоятельство, что и ишемическая болезнь сердца, и гипертония, и сахарный диабет II типа у людей пожилого возраста нередко сочетаются с избыточной массой тела (ожирением), которая, с одной стороны, способствует более частому развитию упомянутых заболеваний, а с другой (о чем уже говорилось, в частности, в гл. 4) — может приводить к гиперэстрогемии. В то же время даже при обработке данных с поправкой на массу тела было установлено, что у менопаузальных больных диабетом, находящихся в компенсированном состоянии, уровень эстрогенов повышен. Это повышение связано с возрастанием концентрации эстрона и эстрон-сульфата, а концентрация эстрадиола находится на нормальном уровне (Deutsch, Benjamin, 1978; Nyholm et al., 1989), что в соответствии с ранее приводившимися сведениями (см. гл. 3, 5) следует рассматривать как отражение

Таблица 20

Ранжирование некоторых причин смерти по их частоте: данные и прогноз ВОЗ (Murray, Lopez, 1997)

Причина смерти	Порядковый номер в списке ВОЗ		Изменение позиций к 2020 г.
	1990 г.	2020 г.	
Ишемическая болезнь сердца	1	1	0
Цереброваскулярная патология	2	2	0
Инфекции дыхательных путей	3	4	-1
Диарейный синдром	4	11	-7
Перинатальные нарушения	5	16	-11
Туберкулез	7	7	0
Рак легкого	10	5	+5
Диабет	15	19	-4
СПИД	30	9	+21

возраст- или инсулин-зависимого усиления периферической ароматизации андрогенов в эстрогены. Косвенным подтверждением подобного объяснения служит то обстоятельство, что при сахарном диабете I типа у молодых людей, для которого характерна абсолютная недостаточность инсулина, уровень эстрогенов в крови не повышен (Djursing et al., 1985). Хотя, как отмечалось в гл. 1 и 4, для индукции ароматазной (а по нашим собственным наблюдениям, и псевдоароматазной, — Берштейн и др., 1993б) реакции нужны достаточно высокие концентрации инсулина, состояние инсулинорезистентности (Дильман, 1987; Reaven, 1988), обозначаемое ныне нередко как X-синдром, очевидно, в действительности входит в группу гормонально-метаболических факторов, способствующих стимуляции внегонадного эстрогенообразования.

Это следует, в частности, из данных, полученных как при обследовании больных раком тела матки (см. гл. 7), так и менопаузальных больных с гиперплазией эндометрия и кровотечениями, и молодых женщин с синдромом Штейн-Левенталя (поликистозом яичников), для которых инсулинорезистентность весьма характерна (Dunaif et al., 1989). Последняя группа особенно интересна, поскольку у таких больных причиной усиления периферической ароматизации являются, как полагают, не ановуляторный статус и не повышенная продукция гонадотропинов (см. гл. 1, 3), а усиленная секреция яичниками андростендиона, значительная часть которого внегонадно превращается в эстрон. Хотя такой вариант экстрагонадного эстрогенообразования нередко ставится под сомнение, тем не менее доказано, что, несмотря на нормальную массу тела, общая продукция эстронов у этих больных увеличена в 4.4 раза, а продукция эстронов, образуемого на периферии из андростендиона, — в 4.2 раза, и при этом последняя составляет не менее 81 % от общей продукции эстронов, в то время как у здоро-

вых женщин данный показатель в разные дни менструального цикла варьирует от 10 до 50 % (Siiteri, MacDonald, 1973; гл. 3).

Если при поликистозе яичников (который у женщин в возрасте до 35—40 лет нередко рассматривается и как фактор риска развития рака эндометрия) предполагается, что причиной усиления периферической ароматизации является избыточная поставка субстрата (андростендиона), при истинной гинекомастии механизм более интенсивного, чем в норме, превращения андрогенных предшественников в эстрогены не столь очевиден (Siiteri, MacDonald, 1973) и, не исключено, связан по крайней мере в части случаев с повреждением функции печени. Действительно, при более серьезном повреждении этой функции в случае органического заболевания органа (циррозе) конверсия андрогенов в эстрогены может быть усилена, по некоторым данным, в 3—4 раза, однако и здесь объяснение нередко исходит из «недоутилизации» на другие цели андростендиона, метаболизируемого печенью (Gordon et al., 1975). И при поликистозе яичников, и при циррозе печени избыточное эстрогенообразование на периферии нередко способствует возникновению гиперплазии эндометрия и дальнейшим неблагоприятным последствиям (кровотечениям и т. д.). В то же время недостаточная внегонадная продукция эстрогенов может быть одной из причин остеопороза (см. раздел 4.5) или атеросклероза/гиперлипидемии (Стаут, 1985). Таким образом, решение проблемы селективной (тканеспецифической) регуляции эффектов гонадного и особенно экстрагонадного эстрогенообразования — важная задача возрастной физиологии и патологии.

Внешне не отличаются «логикой» те изменения в периферической ароматизации андрогенов в эстрогены, которые выявлены при заболеваниях щитовидной железы: и при тиреотоксикозе, и при гипотиреозе обнаружено усиление этого процесса. Однако если при тиреотоксикозе существенная интенсификация конверсии андростендиона в эстрон (0.040 у мужчин и 0.026 у женщин против 0.021 и 0.010 у соответствующих по полу и возрасту групп здоровых людей) объясняется непосредственным эффектом тиреоидных гормонов (Southren et al., 1974), то при гипотиреозе такое объяснение, естественно, не годится и, возможно, следует принимать во внимание, что у большей части больных из этой группы (Longcope et al., 1990) имелись признаки аутоиммунного тиреоидита, которому свойственны гиперинсулинемия и инсулинорезистентность (Берштейн и др., 1980). Повышение концентрации эстрогенов (особенно эстрона) и 3.5—4-кратное усиление конверсии андростендиона в эстрон и тестостерона в эстрадиол обнаружено через 1 день после кардиохирургических объемных операций (Spratt et al., 1996), что авторы объясняют тяжестью заболевания и стрессорной реакцией, приводящей, в том числе, к избыточной продукции цитокинов (см. раздел 4.6). Сходное объяснение дается и аналогичной ситуации, которая отмечается при септическом шоке, причем предполагается, что секретируемый в этом случае фактор некроза опухолей- $\alpha$  стимулирует активность ароматазы, в

первую очередь в стромальных клетках жировой ткани (Christeff et al., 1988).

Хотя лишь условно беременность может быть названа «нормальной болезнью человеческого организма» (Дильман, 1987), представляет интерес, что ни в нормальном эндометрии, ни в эндометрии псевдобеременных крольчих и свиней ароматаза не выявляется. Однако к середине—концу беременности эстрогенообразование или обнаруживается в этой ткани непосредственно, или устанавливается путем исследования экспрессии *CYP19* в полимеразной цепной реакции (Knight, Jeantet, 1991; Choi et al., 1996), что сближает данный физиологический процесс с тем, что наблюдается в малигнизированном эндометрии (см. раздел 4.7). Не возвращаясь здесь вновь к вопросу об образовании эстрогенов в плаценте, в том числе при ее патологии (см. раздел 4.1), отметим, что беременности и раку свойственны и другие черты сходства эндокринных реакций и гормонально-метаболического статуса (Берштейн, 1973; Дильман, 1987). Сама же внегонадная продукция эстрогенов (и не только в связи с проблемой беременности), безусловно, имеет отношение к проблеме опухолевого роста в гормонозависимых тканях (см. гл. 7).

## Экстрагонадные эстрогены и гормональный канцерогенез

То что природные и синтетические эстрогены могут при определенных условиях (длительность и непрерывность введения, достаточно высокая доза) индуцировать опухоли у некоторых видов млекопитающих, известно давно, и с учетом этих и других фактов им (т. е. эстрогенам) неоднократно приписывалась существенная роль в патогенезе опухолей у человека, в первую очередь рака эндометрия и молочной железы. Проблема, казалось бы, проста и в то же время крайне сложна, поскольку речь идет о соединениях, вырабатываемых в организме ежедневно и основное предназначение которых состоит в обеспечении значительного числа нормальных и жизненно важных функций. Более того, даже достаточно длительное и выраженное повышение уровня эстрогенов в крови, которое присуще, например, беременности, не является, по общему мнению, проканцерогенным и не способствует само по себе возрастанию риска развития злокачественных новообразований. Отчасти на основании подобных наблюдений около 20 лет тому назад И. Беренблум отнес способность эстрогенов самостоятельно вызывать опухоли к числу неразрешенных загадок проблемы канцерогенеза и пришел к выводу, что существует фундаментальное различие между влиянием гормонов на канцерогенез и гормональным канцерогенезом *per se* (Berenblum, 1978). В настоящее время, пожалуй, такого водораздела между этими событиями проводить не следует, что будет видно из дальнейшего изложения.

В монографии, популярной в 50—60-х гг., отмечалось, что «канцерогенное действие эстрогенов, скорее всего, обусловлено — как это было предсказано J. C. Mottram (J. Path. Bact. 1945. Vol. 57. P. 265) — усилением митогенеза, которое они индуцируют в определенных тканях, чем каким-либо особым канцерогенным свойством самих эстрогенов» (Burrows, Horning, 1952). Действительно, многие исследователи полагают, что увеличение концентрации эстрогенов (которым при этом приписывается роль промоторов канцерогенеза), повышающее пролиферативную активность тканей-мишеней, приводит к возрастанию риска развития в них злокачественных новообразований (Pike, 1987a, 1987b). Несомненно, однако, что усиление клеточного деления является важным, но не исчерпывающим механизмом воздействия эстроге-

нов на канцерогенез. На протяжении последних 10—15 лет представления о природе эстроген-индуцированного канцерогенеза постепенно становятся все более сложными и не позволяют отрицать у этих гормонов непосредственного или опосредованного повреждающего действия на клеточный геном (Yager, Liehr, 1996). Соответственно совокупность накопленных к настоящему времени сведений позволяет предположить, что может быть выделено два основных типа гормонального канцерогенеза — физиологический (или промоторный, при котором под влиянием гормонов создаются, в частности, условия для увеличения числа опухолевых клеток) и генотоксический (Берштейн, 1991, 1995). Хотя помимо эстрогенов многие иные гормональные и гормоноподобные факторы способны оказывать влияние на частоту развития опухолей в эстроген-зависимых тканях, например в эпителии молочных желез, одним из выводов в пользу промоторного эффекта эстрогенов является гипотрофия молочных желез и 2—4-кратное снижение риска возникновения рака молочной железы у женщин, перенесших овариэктомию (Miller, 1996a). Напротив, в качестве косвенной демонстрации роли генотоксических механизмов в реализации эстроген-индуцированного канцерогенеза используются наблюдения, свидетельствующие о том, что частота развития опухолей в эксперименте (например, опухолей почек у хомячков) далеко не всегда коррелирует с гормональной (эстрогенной) активностью тестируемых соединений (Liehr et al., 1986).

Генотоксическому варианту канцерогенеза присуще в то же время усиленное образование в процессе метаболизма эстрогенов их реактивных интермедиатов, в частности катехолэстрогенов (2-гидрокси- и 4-гидроксиэстрогенов) и 16 $\alpha$ -гидроксиэстрона (Telang et al., 1992; Yager, Liehr, 1996; Коваленко и др., 1997). Катехолэстрогены путем образования хинонов и семихинонов и последующего высвобождения продуктов свободно-радикальных реакций, а 16 $\alpha$ -гидроксиэстрон, — возможно, за счет своего прямого эффекта приводят к повреждению ДНК и к угнетению репарации этих повреждений. Понятно, что ферменты, которые вызывают окисление классических эстрогенов с образованием перечисленных метаболитов, а также их инактивацию, привлекают к себе все большее внимание. Как ныне полагают, особого анализа заслуживают цитохромы P<sub>450</sub> 1A1 и 1B1, которые в некоторых тканях выполняют соответственно функции 2- и 4-гидроксилаз (Martucci, Fishman, 1993; Spink et al., 1994). При этом важно иметь в виду, что иногда 2-гидроксилаза способна одновременно выполнять и функции ароматазы (см. раздел 4.1; Osawa et al., 1993), что может рассматриваться как один из мостиков, сближающих этот вопрос с проблемой внегонадного биосинтеза эстрогенов. Наиболее важным же среди ферментов, инактивирующих катехолэстрогены, считается катехол-о-метилтрансфераза (КОМТ), изменения активности которой, следовательно, могут иметь значение не только для регуляции обмена катехоламинов, но и для реализации реакций гормонального канцерогенеза (Yager, Liehr, 1996).

Этапом онтогенеза, когда роль эстрогенов, в том числе продуцируемых экстрагонадно, в гормональном канцерогенезе подвергается особенно тщательному анализу, является период менопаузы. Это связано с целым рядом обстоятельств, и мы назовем лишь некоторые из них. В менопаузе существенно увеличивается общее число случаев заболевания раком молочной железы и эндометрия, однако скорость прироста заболеваемости после 50 лет ниже, чем в группах более молодых женщин (Franceschi, 1989). С одной стороны, такие наблюдения можно трактовать, в частности, как следствие прекращения (ослабления) секреции эстрогенов яичниками. С другой стороны, тот факт, что в японской популяции «сглаживание» кривой прироста заболеваемости в менопаузе значительно более заметно, чем в европейской (Pike, 1987), безусловно, свидетельствует о влиянии на заболеваемость и внегонадных механизмов вследствие, например, того, что масса тела у японок, как правило, ниже и соответственно у них меньше суммарное количество эстрогенов, продуцируемых на периферии (см. гл. 4, а также ниже). Двойко можно относиться к результатам проспективных наблюдений о связи уровня эстрогенов в крови с риском развития рака молочной железы у менопаузальных женщин. Так, у женщин, у которых впоследствии развился рак молочной железы, за 5—7 лет до этого концентрация и эстрадиола и эстрона в крови находилась в пределах нормальных значений, хотя и ближе к их верхней границе, и могла отражать остаточную активность яичников. В то же время уровень эстрона (который относительно превалирует в менопаузе и в значительной степени отражает образование эстрогенов в этот период на периферии, — см. гл. 5) был более значимо связан с риском развития рака молочной железы и более тесно, чем эстрадиол, коррелировал с увеличением индекса Кетле как с показателем избыточной массы тела (Tonio et al., 1995; Thomas et al., 1997).

В гл. 5 уже шла речь о том, что функция яичников в менопаузе достаточно долго полностью не угасает. Более того, в ранее опубликованных работах отмечалось, что если эстрогенообразование с возрастом и претерпевает «качественные изменения», то образующиеся при этом неклассические фенолстероиды имеют овариальное происхождение (Дильман, Павлова, 1963; Берштейн и др., 1969). Информация, имеющаяся в настоящее время, позволяет полагать, что, во-первых, то, что ранее обозначалось как «неклассические фенолстероиды», ныне следует рассматривать как катехолэстрогены и другие (возникшие в результате окислительных реакций) метаболиты классических эстрогенов и, во-вторых, многие из этих реакций осуществляются не в яичниках, а в экстрагонадных тканях, создавая там условия для повреждения ДНК. Существенно при этом, что хиноны, образующиеся при метаболизме различных катехолэстрогенов, оказывают дифференцированное влияние на ДНК. Так, 3,4-хиноны способствуют образованию гуаниновых аддуктов, теряемых ДНК и составляющих в ней апуриновые участки, в то время как 2,3-хиноны образуют стабильные

аддукты, сохраняющиеся в молекуле ДНК на длительный срок, по крайней мере до тех пор, пока не завершится процесс репарации (Stack et al., 1996). Тем не менее в нормальной ткани молочной железы до сих пор или не удавалось выявить эстроген-2-гидроксилазу, или ее активность в ткани доброкачественных и злокачественных опухолей этого органа существенно не различалась (Abul-Hajj et al., 1988). В то же время 4-гидроксилирование эстрадиола было достоверно усилено в ткани миом матки, фиброаденом и аденокарцином молочной железы по сравнению с соответствующими нормальными тканями (Liehr, Ricci, 1996). Таким образом, возможно, что меньшая долговечность аддуктов с хинонами, происходящими из 4-катехолэстрогенов, компенсируется более высокой внутритканевой концентрацией последних, что необходимо учитывать при оценке роли внегонадных эстрогенов и их метаболитов в гормональном канцерогенезе (см. также гл. 8, 9).

Ранее уже говорилось о том, что в менопаузе, а по ряду данных, и задолго до нее выявляется возрастное усиление периферической ароматизации, оцениваемое по суммарной конверсии андрогенов в эстрогены *in vivo*. Единодушно отмечая возможную роль этого феномена в создании условий для опухолевого роста в гормоно-зависимых тканях (см.: Enriori, Reforzo-Membrives, 1984), исследователи нередко расходятся в мнении, связано ли подобное усиление действительно с увеличением возраста или (и) с избыточной массой тела и имеется ли ассоциация между повышением интенсивности конверсии андрогенов *in vivo* и концентрацией эстрогенов в крови. Первый из этих вопросов проанализирован в гл. 3 и 5. Что касается второго вопроса, то на примере больных раком тела матки — как нелеченных (Judd et al., 1976; Potischman et al., 1996b), так и не менее чем за год до обследования подвергавшихся оперативному лечению с удалением обоих яичников (Берштейн и др., 1998б; см. также гл. 9) показано, что выявляемое в их крови повышение концентрации эстрона и/или эстрадиола действительно (как и отмечалось в гл. 5) связано с увеличением массы тела. Однако, хотя после поправки на последний параметр выявляется зависимость эстрогемии и от других факторов (Potischman et al., 1996a), доказать связь ее уровня с интенсивностью периферической ароматизации в менопаузе, как правило, не удается (Jacobs et al., 1992), да и доводы в пользу участия внегонадного эстрогенообразования в возникновении и поддержании опухолевого процесса должны, скорее всего, лежать в иной плоскости.

Подход к анализу данного вопроса, который при всех его несомненных недостатках (например, недоучет фактора времени, прошедшего с момента начала формирования предрасположенности к опухоли, и др.) может быть расценен как более непосредственный, сводится к оценке процесса ароматизации у самих онкологических больных. В двух достаточно давно опубликованных работах, результаты которых позднее не воспроизводились, было показано, что в жировой ткани больных раком тела матки *in vitro* конверсия андростендиона в эстрон выше, чем в жировой ткани здоровых

женщин аналогичных возраста и массы тела. Подобные наблюдения остаются по-своему уникальными (Schindler et al., 1972; Forney et al., 1981; раздел 4.3). При оценке у данной группы больных конверсии андростендиона *in vivo* были получены, за редким исключением, однозначные данные: или достоверные различия по сравнению со здоровыми женщинами не были найдены (MacDonald et al., 1978; Reed et al., 1978), или они были весьма выраженными (у больных в среднем в 1.7—2.5 раза выше, чем у здоровых), но ассоциированными в большей степени с массой тела и возрастом больных, чем с диагнозом злокачественного новообразования (Hausknecht, Gusberg, 1973; Siiteri, MacDonald, 1973; Rizkallah et al., 1975). Сходные или близкие к тому наблюдения были сделаны и в отношении больных раком молочной железы (Poortman et al., 1973; Kirschner et al., 1978). Подобное заключение, однако, не следует рассматривать как опровержение основной идеи, поскольку, если комбинация «избыточная масса тела + периферическая ароматизация» создает предрасположенность к развитию опухолей в гормоно-зависимых тканях, то уже одно это свидетельствует о роли внегонадного эстрогенообразования как медиаторного (перчаточного) механизма в данном процессе. Кроме того, по некоторым сведениям, конверсия андростендиона может быть повышена, если повышена его концентрация в крови (см. гл. 3), а именно эта особенность присуща больным раком эндометрия (Potischman et al., 1996b). В то же время складывается впечатление (и в некоторых предыдущих разделах уже предпринималась попытка это подчеркнуть), что отношение к делу имеют и те особенности внегонадного образования эстрогенов, которые реализуются не на периферии, а непосредственно в конкретной ткани-мишени.

Не повторяя того, о чем уже говорилось выше (особенно в разделах 4.7 и 4.8), следует остановиться на одном из направлений исследований, получивших развитие относительно недавно. Первоначально было показано, что клеточный ген в локусе *int-5* участка интеграции вируса, индуцирующего опухоли молочных желез у мышей (MMTV), идентичен гену ароматазы. Интеграция MMTV с 3'-нетранслируемой областью гена ароматазы вызывает гиперэкспрессию гена *int-5/ arom*, что сочетается с усиленным клеточным размножением в линии D2, происходящей из индуцированных диметилбензантраценом альвеолярных узелков в ткани молочных желез. Добавление к культуре ингибитора ароматазы фадрозолла существенно тормозило в данных условиях упомянутую клеточную реакцию (Tekmal, Durgam, 1995). Тем самым удалось доказать, что подобное усиление пролиферации связано с внутритканевым повышением биосинтеза эстрогенов под влиянием гена *int-5/ arom*. Продолжение этой работы привело к еще более важным наблюдениям. Прежде всего, была разработана трансгенная модель на основе внедрения в эмбрионы мышей конструкта, содержащего ген *int-5/ arom* под контролем энхансера/промотора MMTV. Анализу подвергали молочные железы нерожавших и рожавших трансгенных и контрольных мышей. Методом Northern-

гибридизации было показано, что гиперэкспрессия *int-5/аром*, как и следовало ожидать, выявляется лишь в молочных железах трансгенных животных. При морфологическом исследовании у них в отличие от контрольных мышей обнаружилось усиление роста молочных протоков, причем в таких протоках в 65 % случаев выявлялись гиперплазия, в 20 % — дисплазия и в 15 % наблюдений — фиброаденомы. Далее, у контрольных животных после одной беременности, 3 нед лактации и 8 нед инволюции в молочных железах обнаруживались развитые протоки с очень незначительными признаками лобулярно-альвеолярного роста. Напротив, у соответствующих трансгенных мышей выявлялись выраженная альвеолярная гиперплазия (70—80 % случаев), протоковая и лобулярная дисплазия (15 %), а также многоядерные клетки и/или кариомегалия с гиперхроматозом (2—5 %), в совокупности позволившие сделать вывод о том, что гиперэкспрессия *int-5/аром* индуцировала рано проявляющуюся избыточную продукцию эстрогенов, достаточную для пренеопластических изменений в эпителии молочных желез, а возможно, и для его типичной неопластической трансформации (Tekmal et al., 1996). Важное дополнение к этому выводу состоит в том, что для реализации описанной модели, по существу, нет необходимости в гонадных эстрогенах (Keshava, Tekmal, 1997).

К похожему заключению (хотя роль яичниковых эстрогенов в гормональном канцерогенезе, конечно, не нуждается в специальной защите, — см. начало данной главы) пришли исследователи, которые перевивали на левый и правый бок голых мышей клетки линии рака молочной железы MCF-7, трансфицированные или не трансфицированные геном ароматазы. На основании данных, представленных в табл. 21, можно согласиться с тем, что аутокринно-паракринные эффекты ароматазы, присутствующей в трансфицированных опухолевых клетках, при оценке по влиянию на

Таблица 21

Сравнение аутокринно-паракринных и эндокринных эффектов, индуцируемых опухолевой тканью (Yue et al., 1996)

Материал, перевитый мышам	Масса опухолей (мг)	Содержание эстрадиола в опухолевой ткани (пг/г сырой массы)
Клетки		
MCF-7 (контроль), на оба бока	28.0±2.6	31.0±7.2
MCF-7 (+«ароматаза»), на оба бока	189.0±17.0	343.0±145.0
MCF-7 (контроль), на левый бок	50.0±7.9	114.0±14.3
MCF-7 (+«ароматаза»), на правый бок	93.0±19.0	243.3±21.7

Примечание. Объяснение см. в тексте.

рост опухолей и содержанию эстрогенов в них, оказываются значительно более выраженными, чем эндокринное (системное) влияние фермента на контрольные (не трансфицированные) опухолевые клетки, перевитые на противоположный бок животных (Yue et al., 1996). К этому можно добавить, что эстрогены, образующиеся экстрагонадно в непосредственной близости от тканей-мишеней (молочная железа, эндометрий) или в них самих, имеют больше шансов индуцировать генотоксические повреждения, чем эстрогены, циркулирующие в крови (Берштейн и др., 1996а; Берштейн, 1997а), чему может способствовать, в частности, сочетанное воздействие внутритканевых эстрогенов и факторов, секретлируемых клетками лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов и генерирующих свободно-радикальные реакции (Ho, Roy, 1994; Берштейн и др., 1996а, 1997а; Zhuang, Wogan, 1997; раздел 4.6).

Если признать наличие двух типов гормонального канцерогенеза (физиологического и генотоксического), рано или поздно может возникнуть вопрос о том, существует ли какая-либо этапность в их реализации, т. е., например, всегда ли «генотоксический» механизм следует за «промоторным», или первый может возникать и *de novo*, минуя этап усиленной пролиферации. Одним из заслуживающих изучения аспектов этой проблемы может быть сопоставление гонадной и внегонадной продукции эстрогенов с активностью индуцируемой ими пероксидазы, т. е. фермента, способствующего метаболизму эстрогенов с образованием повреждающих ДНК интермедиатов (Newbold et al., 1991). Важно также оценить, как экстрагонадный синтез эстрогенов меняется под влиянием экзогенных факторов (см. гл. 8), что имеет отношение и к предыдущему вопросу, в частности потому, что такие присутствующие в выбросах промышленных предприятий соединения, как диоксины, могут усиливать реакции гидроксирования эстрогенов (Spink et al., 1994) со всеми вытекающими отсюда последствиями (см. ранее).

## Внешняя среда и экстрагонадные эстрогены

Функциональное состояние репродуктивной системы — одна из лучших иллюстраций уже практически аксиоматичного утверждения, что особенности гормонально-метаболического статуса (помимо половых и отчасти генетических различий) есть суммарный результат влияния эндогенных (чаще всего возрастного) факторов и тех условий обитания (воздействий внешней среды), в которых существует или которым подвержен конкретный человек (Дильман, 1987). Не является исключением и эстрогенообразовательная функция, хотя следует отметить, что изменения продукции эстрогенов в яичниках под влиянием экзогенных факторов исследовались чаще и тщательнее, чем особенности внегонадного биосинтеза этих гормонов. В последнем случае нередко приходится пользоваться косвенными данными или экстраполяциями.

Многие эпидемиологические и иные наблюдения свидетельствуют, что характер питания (диеты) необходимо относить к числу тех факторов внешней среды, которые могут оказывать реальное модифицирующее воздействие на организм и на частоту возникновения в популяции основных неинфекционных заболеваний человека, включая атеросклероз и рак (Willett, Trichopoulos, 1996). Для того чтобы доказать, что диета может оказывать влияние на метаболизм и концентрацию эстрогенов в циркуляции, использовались различные методологические подходы (Goldin, Gorbach, 1988): сравнительному обследованию подвергались представители различных этнических групп (например, североамериканцы и европейцы с жителями азиатских стран), вегетарианцы и невегетарианцы, а также люди, не соблюдающие диету или выполняющие определенные диетические предписания (в частности, изменяющие соотношение белков и углеводов в своем рационе, ограничивающие количество потребляемых жиров и т. д.). Был сделан вывод о том, что особенности питания могут изменять рециркуляцию эстрогенов в системе кишечник—печень, соотношение связанных и свободных (биологически активных) форм этих гормонов, образование различных их дериватов и метаболитов, включая катехолэстрогены (Adlercreutz, 1990; Stoll, 1996). Так, было показано, что отношение 2-гидроксиэстрона к 4-гидроксиэстроу у женщин из стран Юго-Восточной Азии ниже,

Таблица 22

Взаимосвязь (коэффициент корреляции Пирсона) между потреблением макронутриентов и показателями обмена эстрогенов (Adlercreutz et al., 1994a)

Параметры	Коэффициент корреляции Пирсона		
	доля калорий, поставляемых жирами	доля углеводов на 1000 ккал.	отношение жир/пищевые волокна
Эстрон в крови	0.42	-0.36	0.27
Эстрадиол в крови	0.46	-0.33	0.42
Эстрон в моче	0.49	-0.30	н. д.
Эстрадиол в моче	0.52	-0.42	0.29
2-ОНЕ1 в моче	0.52	-0.30	0.38
4-ОНЕ1 в моче	0.32	н. д.	н. д.
2-ОНЕ1/4-ОНЕ1	0.43	-0.35	0.30

- Примечания. 1. 2-ОНЕ1-2-гидроксиэстрон, 4-ОНЕ1-4-гидроксиэстрон.  
 2. Достоверность:  $r = 0.22$  ( $p < 0.05$ ),  $r = 0.29$  ( $p < 0.01$ ),  $r = 0.36$  ( $p < 0.001$ ).  
 3. н. д. — величина коэффициента корреляции статистически недостоверна.

чем у североамериканок, использующих так называемый западный тип диеты. Величина упомянутого соотношения, равно как и некоторых других параметров метаболизма эстрогенов, позитивно коррелировала с долей калорий рациона, обеспечиваемой жирами, и с соотношением жир/пищевые волокна и негативно — с количеством потребляемых за день углеводов (Adlercreutz et al., 1994a, 1994b; табл. 22).

Следует, однако, отметить, что большинство исследований такого рода выполнялось на женщинах с сохраненным менструальным циклом, из-за чего оценить особенности внегонадной продукции и метаболизма эстрогенов практически не представлялось возможным. Не всегда также в подобных работах проводится разграничение эффектов особенностей питания и массы тела; последняя нередко является следствием этих особенностей (Берштейн, 1997б). Поэтому с вниманием следует отнестись к работе, в которой женщины, находившиеся в менопаузе не менее 5 лет, переводились на диету с низким (не более 15 %) содержанием жира. К 6-му месяцу наряду с некоторым снижением массы тела отмечалось уменьшение концентрации эстрадиола в крови в среднем на 20 %, однако содержание в крови эстрона и эстроин-сульфата на подобной низкожировой диете не менялось (Rose et al., 1992). Поскольку продукция и концентрация эстрона в циркуляции в менопаузе возрастают и относительно превалируют над аналогичными характеристиками для эстрадиола в сравнении с периодом, когда менструальный цикл сохранен (гл. 3, 5), очевидно, можно заключить, что упомянутые выше диетические воздействия не способны существенным образом влиять на внегонадный биосинтез эстрогенов. Этот вывод подтверждает и пока, к сожалению, единственное в своем роде наблюдение, в котором оценива-

лась суммарная ароматизация (периферическая конверсия андростендиона в эстрогены *in vivo*) до и после курса диетотерапии, направленной на снижение массы тела, и которое также не выявило изменений изучавшегося показателя (Siiteri et al., 1976). Тем не менее здесь необходимо сделать оговорку, что при таком пищевом режиме уменьшается главным образом диаметр адипоцитов, а число стромальных клеток жировой ткани меняется мало, хотя именно последние (раздел 4.3) являются важным клеточным субстратом, в котором локализуется ароматаза.

Наряду с оценкой влияния макронутриентов (жиров, белков, углеводов) на продукцию и метаболизм эстрогенов уделяется внимание и соответствующему эффекту некоторых микроэлементов. Так, например, было показано, что образование эстрадиола из тестостерона в печени крыс, которым давали корм с ограниченным содержанием цинка, было усилено (Om, Chung, 1996), что может, в частности, иметь отношение и к механизмам повышения интенсивности внегонадного эстрогенообразования с возрастом (см. гл. 5). В качестве модификаторов обмена эстрогенов и их эффектов особое место занимают также некоторые продукты растительного происхождения. К числу таких соединений относится индол-3-карбинол (ИК), в значительных количествах присутствующий в растениях семейства крестоцветных. По некоторым данным, ИК обладает противоопухолевым действием, однако отношение к этим фактам и рекомендациям увеличить потребление ИК бывает прямо противоположным, поскольку хотя ИК и способен ограничивать синтез андростендиона и использование последнего в реакции ароматизации в эстрон (Jellinck et al., 1993), он в то же время усиливает 2-гидроксилирование эстрогена (Michnovicz, Bradlow, 1990). Как уже отмечалось (гл. 7), это может быть одним из элементов патогенетической цепи, приводящей к реализации генотоксического варианта гормонального канцерогенеза.

Другой важной группой химических соединений, имеющих отношение к анализируемой проблеме и содержащихся в растениях, являются фитоэстрогены. Они подразделяются на изофлавоноиды и лигнаны. Первые представлены, в частности, генистеином, даидзеином и куместролом, а вторые — энтеролактоном и энтеродиолом. Изофлавоноидов довольно много в сое, а лигнанов — в зерне, ягодах и орехах. Было показано, что у людей, потребляющих много сои и зерновых типа риса (например, у японцев), экскретируется с мочой значительно больше изофлавоноидов и лигнанов, чем у лиц, находящихся на уже упоминавшемся «западном типе» диеты. Данный факт связали со структурными особенностями онкологической заболеваемости в этих популяциях, и был сделан вывод о способности фитоэстрогенов оказывать противоопухолевое действие. Последнее объясняли, в частности, своеобразным эффектом изофлавоноидов и лигнанов, который проявляется в комбинации проэстрогенных и антиэстрогенных свойств. Слабые эстрогенные свойства фитоэстрогенов характеризуются, в частности, способностью к стимуляции биосинтеза половых гормо-

ны связывающего глобулина и соответственно к уменьшению доли свободных эстрогенов в циркуляции, а антиэстрогенные свойства этих нутриентов — ингибированием под их влиянием процесса связывания истинных эстрогенов с рецепторами (Adlercreutz, 1995). Оказалось, что еще одна особенность лигнанов, а также флавоноидов состоит в их способности угнетать активность ароматазы, в частности в преадипоцитах человека (Wang et al., 1994), что имеет самое непосредственное отношение к воздействию на внегонадную продукцию эстрогенов и, возможно, дополнительно объясняет противоопухолевый эффект фитоэстрогенов.

Выше (раздел 4.1) говорилось о способности кофе и алкоголя влиять на массу плаценты. В то время как потребление кофе связано со снижением концентрации эстрогенов в крови во время беременности, суточная доза алкоголя, напротив, позитивно коррелирует с уровнем эстрогемии у беременных женщин (Petridou et al., 1992). Очевидно, следует различать изменения продукции и метаболизма эстрогенов у хронических алкоголиков и сдвиги в этих же процессах при умеренном потреблении спиртных напитков. У «хроников»-мужчин интенсивность периферической ароматизации — конверсии андрогенов в эстрогены, как оказалось, достоверно усилена (Heinz et al., 1995). У женщин, обследованных на 5—7, 12—15 и 21—23-й дни менструального цикла, употребление алкоголя не оказывало достоверного влияния на концентрацию эстрадиола, эстрона и эстрон-сульфата, но способствовало увеличению уровня андростендиона в крови (Dorgan et al., 1994). Хотя риск развития рака молочной железы в менопаузе очень умеренно возрастал у женщин на заместительной эстрогенотерапии, если они были склонны к употреблению спиртного (Potter et al., 1993), алкоголь в то же время не является фактором риска возникновения постменопаузального рака эндометрия (Gapstur et al., 1993). В связи с вышеуказанным, скорее всего, нет оснований говорить об изменении внегонадной продукции эстрогенов под влиянием умеренного потребления алкоголя, хотя дополнительные исследования, посвященные этому вопросу, могли бы оказаться полезными (в частности, было показано, что малые дозы алкоголя способствуют повышению концентрации «антиатерогенного» холестерина липопротеидов высокой плотности; к такому же результату приводят применение в менопаузе заместительной эстрогенотерапии).

Много копий было сломано и ломается до сих пор по поводу особенностей влияния курения (табачного дыма) на эффекты, обмен и продукцию эстрогенов. Подробное изложение этого вопроса могло бы составить целую главу (см.: Берштейн, 1995), но мы ограничимся здесь лишь изложением самых необходимых сведений. Курение оказывает многопрофильное воздействие на репродуктивную систему. В частности, отмечается уменьшение периода и вероятности зачатия, большая частота вторичной аменореи и других нарушений менструального цикла, более раннее наступление менопаузы и более выраженный постменопаузальный («эстрогендефицитный») остеопороз и целый ряд иных проявлений. Важ-

Таблица 23

Модифицирующее влияние курения на частоту развития рака эндометрия  
(Lawrence et al., 1987, с изменениями)

Больные	Относительный риск заболевания у курящих* при массе тела (кг)		
	< 68	68—80	> 80
Пременопаузальные или использующие эстроген-заместительную терапию	0.519	0.850	0.450
Постменопаузальные, не использующие эстроген-заместительную терапию	—	0.714	0.161(!)

\* По сравнению с некурящими, риск для которых принят за 1.

нейшие из них — редкое возникновение токсикозов во время беременности у курящих женщин и по крайней мере двукратное снижение риска развития у последних рака эндометрия. Поскольку оба эти процесса нередко трактуются как эстроген-зависимые, то и ограничивающее влияние курения чаще всего расценивается как отражение его антиэстрогенных свойств (Levi et al., 1987). В частности, у женщин, которые курят во время беременности, экскреция эстрогенов с мочой и их содержание в крови уменьшаются более отчетливо, чем это можно зарегистрировать у курильщиц в любой другой период их жизни (Берштейн, 1995), и это снижение сочетается с уменьшением массы новорожденных, которая в немалой степени определяется размерами и функциональным состоянием плаценты (Petridou et al., 1990; раздел 4.1). Тем не менее установить какие-либо различия в активности ароматазы в ткани плаценты курящих и некурящих женщин пока не удалось (Pasanen, Pelkonen, 1989).

У курящих людей, больных раком эндометрия, удается выявить лишь тенденцию к снижению уровня эстрогенов в крови, и эта тенденция наиболее отчетливо проявляется у постменопаузальных больных, имеющих избыточную массу тела (Austin et al., 1993). Такое наблюдение представляется не случайным и помогает отчасти составить мнение об одной из «антиэстрогенных точек приложения» табачного дыма. Известно, что риск развития рака тела матки существенно возрастает по мере увеличения массы тела, однако у курящих женщин такая закономерность не проявляется (Lawrence et al., 1987). При анализе этих данных выясняется, что более всего «противоопухолевый» эффект курения заметен у женщин в менопаузе, не пользующихся эстрогензаместительной терапией (табл. 23). Такое заключение подтверждает мнение о преимущественном влиянии курения на внегонадную продукцию эстрогенов. К этому можно добавить, что, хотя, как отмечалось выше, не было найдено различий ароматазной активности в плаценте неку-

рящих и курящих женщин, табачные алкалоиды никотин, котинин и их дериваты в условиях *in vitro* способны подавлять активность эстрогенсинтазы не только в клетках трофобласта и гранулезы (Barbieri et al., 1986a, 1986b), но и в клетках линий рака молочной железы человека MDA-MB-231 и SK-BR-3, причем последние были несколько более чувствительны к подобному торможению, если активность ароматазы предварительно индуцировалась в них кокультивированием с дибутирил-цАМФ или дексаметазоном (Kadohama et al., 1993). По нашим собственным наблюдениям, хотя активность ароматазы в опухолях молочной железы у курящих женщин в среднем не отличается от таковой у некурящих, активность фермента в менопаузе по результатам полимеразной цепной реакции и экспрессия гена P<sub>450аром</sub> у больных репродуктивного возраста демонстрируют тенденцию к снижению в ткани новообразований у курильщиц. Кроме того, содержание эстрогенов (эстрадиола) в ткани рака эндометрия было у курящих больных с сохраненным менструальным циклом ниже, чем у некурящих, что позволяет сделать заключение об ослаблении внегонадного биосинтеза эстрогенов в ткани новообразований под влиянием табачного дыма и связать данный факт с некоторыми особенностями клинического течения опухолевого процесса у курильщиц (Берштейн и др., 1998а).

Тем не менее очевидно, что эффекты курения должны оцениваться комплексно и в итоге следует принимать во внимание как минимум следующие моменты.

1. Внутритканевая экстрагонадная продукция эстрогенов, по-видимому, более чувствительна к влиянию курения, чем их биосинтез в гонадах, из-за чего не всегда выявляются различия между курящими и некурящими людьми по содержанию эстрогенов в циркуляции.

2. В зависимости от продолжительности воздействия табачного дыма его влияние на специфический (утеротропный) эффект эстрогенов может модифицироваться, проходя через фазу стимуляции к фазе угнетения (депрессии) (Берштейн и др., 1997в).

3. Влияние курения на эффекты эстрогенов может обнаруживаться и в модификации их нейротоксического действия, что приводит к ускоренному старению репродуктивной системы, механизмы которого имеют черты сходства с генотоксическим типом гормонального канцерогенеза (Берштейн, 1995, 1998б).

4. Реализации этого типа гормонального канцерогенеза может способствовать усиление превращения классических эстрогенов в катехолэстрогены, что уже обсуждалось в гл. 7, и один из эффектов табачного дыма связан со стимуляцией 2-гидроксилирования эстрогенов и с угнетением инактивации их 4-гидроксипроизводных (Michnovicz et al., 1989; Zhu, Liehr, 1993; Берштейн, 1995). Таким образом, тенденция к ослаблению внегонадного эстрогенообразования является лишь одним из компонентов многообразного воздействия курения на процессы или непосредственно регулируемые эстрогенами, или иначе зависящие от них, что, естественно, не уменьшает важности каждой их этих реакций при их

рассмотрении применительно к конкретным физиологическим и патологическим состояниям, наблюдаемым у человека.

К факторам внешней среды, способным оказывать влияние на продукцию эстрогенов, относится и воздействие радиации. Эффект этого воздействия, естественно, в первую очередь определяется его дозой, что наиболее наглядно демонстрируется теми изменениями в стероидогенезе, которые выявляются при лучевой терапии области малого таза (Inskip, 1994). Анализируя отдаленные последствия влияния естественного лучевого фона на состояние репродуктивной функции у лиц, находившихся в зоне аварий на атомных электростанциях или участвовавших в их ликвидации (Всемирная Организация Здравоохранения, 1996), можно по косвенным признакам (некоторому снижению уровня эстрогенов в крови по сравнению с их нормальной концентрацией в менопаузе), также прийти к выводу об определенном угнетении периферической ароматизации при такого рода воздействиях.

Мало исследовано влияние химических канцерогенов в различных классах на процессы эстрогенообразования, однако, по отношению старым данным, некоторые из таких соединений демонстрировали способность к усилению конверсии андрогенов в эстрогены на периферии и превращения последних в катехолэстрогены типа 2-гидроксиэстрона (Jellinck, 1966). Эстрогенной активностью обладают многие природные соединения и субстанции, попадающие во внешнюю среду в результате промышленной и иной деятельности человека. Среди подобных соединений — так называемых ксеноэстрогенов — выше уже упоминались изофлавоноиды и лигнаны, а также (см. гл. 7) диоксины. О влиянии многих эстрогеноподобных промышленных поллютантов на внегонадную продукцию эстрогенов в организме пока ничего не известно, однако существует опасение, что собственное их воздействие на ткани-мишени может быть аддитивным и синергическим и, по-видимому, способно постепенно привести к серьезным изменениям в частоте и особенностях клинико-лабораторных проявлений целого ряда заболеваний (Dewailly et al., 1997; Feldman, 1997).

Физическая активность человека, конечно, не является фактором внешней среды, но бывает настолько тесно и своеобразно переплетена с влиянием некоторых уже упоминавшихся экзогенных факторов, что рассмотрение вопроса о ее самостоятельном воздействии на метаболизм и продукцию эстрогенов вполне укладывается в контекст настоящей главы. Однако, как и в случае с потреблением спиртных напитков (где соответствующие изменения у алкоголиков-хроников отличаются от таковых у людей, умеренно потребляющих алкоголь, — см. выше), очевидно, следует различать последствия «хронического» (профессионального) занятия спортом и умеренно повышенных, разумных физических нагрузок. У профессиональных спортсменов (с определенной поправкой на их спортивную специализацию) превалируют макронарушения, проявляющиеся дисменореей и даже аменореей, а у более юных девушек — достаточно частой задержкой менархе; эти сдвиги сочета-

Таблица 24

Содержание половых гормонов в крови менопаузальных женщин в зависимости от уровня физической нагрузки (Cauley et al., 1989)

Квартили интенсивности физической активности (индекс Паффенбаргера)	Содержание гормонов в крови (пг/мл; $M \pm m$ )		
	Эстрадиол	Эстрон	Тестостерон
I	33.9±2.0	5.0±0.6	43.4±4.9
II	28.1±1.4	3.8±0.3	43.0±5.0
III	30.7±2.2	4.0±0.4	41.3±4.8
IV	25.5±1.7	3.4±0.3	40.3±3.1
В сравнении с I	<0.006	<0.01	0.59

ются с более низкой концентрацией классических эстрогенов и прогестерона в крови и с усилением 2-гидроксилирования эстрона, что в совокупности может быть и следствием и причиной изменений гонадотропинов (Snow et al., 1989). Если женщины занимаются спортом не с соревновательной, а с рекреационной целью, когда физические нагрузки относительно невелики, но достаточно регулярны, то в этом случае при сохранении нормального менструального цикла уровень эстрогенов (эстрадиола) в крови все равно достоверно ниже, чем у женщин, ведущих сидячий образ жизни (Brooks et al., 1990). Умеренная степень предварительно достигнутой физической тренированности предотвращает нежелательное повышение уровня 4-гидроксикатехолэстрогенов в ответ на острую и интенсивную физическую нагрузку (De Cree et al., 1997) и благодаря этому и иным механизмам снижает риск развития рака молочной железы у молодых женщин (Bernstein et al., 1994). Опасность возникновения опухолей репродуктивной системы снижена также у менопаузальных женщин, в студенческие годы непрофессионально занимавшихся спортом, и одной из причин этого предположительно считают некоторое укорочение активного периода (интервала между сроками наступления менархе и менопаузы) и ослабление эстрогенной стимуляции тканей-мишеней (Frisch et al., 1987). В том же случае, когда женщины уделяют внимание достаточно регулярной физической нагрузке и в менопаузальном возрасте, выявляется негативная корреляция между интенсивностью этой нагрузки и уровнем эстрогенов в крови (табл. 24). Описанное наблюдение представляется безусловно важным, независимо от того, связано ли данное явление с изменением состава тела (содержанием жира в теле) у таких женщин или с другими факторами, модифицирующими у них интенсивность внегонадной продукции эстрогенов (Cauley et al., 1989).

Более закономерные и нередко более выраженные изменения экстрагонадного эстрогенообразования наблюдаются в результате некоторых лекарственных воздействий. Рассмотрению этого вопроса и посвящена заключительная глава книги.

### Ингибиторы ароматазы и другие модификаторы внегонадного биосинтеза эстрогенов: использование в терапии и профилактике заболеваний

По некоторым данным, не менее чем в 40 % всей литературы, посвященной ароматазе, уделяется внимание ее ингибиторам. Такой несколько односторонний интерес объясняется в первую очередь тем, что патологические процессы, связанные с избыточной эстрогенной стимуляцией, в течение достаточно длительного времени казались более важными и заслуживающими анализа, чем состояния, сопровождающиеся эстрогенодефицитом. Этот перекос начинает постепенно выравниваться, хотя в практическом плане по-прежнему сложно назвать соединение, способное стимулировать активность ароматазы и уже сегодня готовое занять место среди соответствующих фармацевтических средств.

Иное дело, когда речь идет об ингибиторах эстрогенсинтазы — уже сегодня многие из них дошли до клиники и широко используются в ней прежде всего онкологами и онкоэндокринологами. Созданию широкого набора ингибиторов (а ассортимент предложенных химических веществ с такими свойствами, естественно, многократно превосходит число препаратов, реально применяемых в клинической медицине) способствовало накопление знаний о механизмах ароматизации (см. гл. 1). Эти данные углублялись благодаря дополнительным сведениям о связях между структурой и функцией фермента, предположениям о локализации его активного центра и роли гемсодержащего участка в обеспечении его жизнеспособности, результатам исследований по молекулярному (трехмерному) моделированию ароматазы и по направленному (*site-directed*) мутагенезу *CYP19* (Kao et al., 1996; Akkani et al., 1997). В настоящее время отстаивается мнение, что активный участок молекулы фермента довольно большой по размерам и образует специальный карман дистальнее места расположения гема, что расширяет круг потенциальных ингибиторов ароматазы за счет соединений с весьма различной структурой, включая пептиды (Kao et al., 1996; Kimura et al., 1997). Помимо отличий в структуре определенную важность представляют и отличия в эффективности отдельных ингибиторов в видовом ряду (France et al., 1987), что может иметь отношение к оценке эволюционных аспектов внегонадного биосинтеза эстрогенов (см. также гл. 1, 2).

Таблица 25

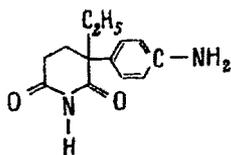
Принадлежность ингибиторов ароматазы к различным группам  
(на основании структуры и механизма действия)

Структурная группа	Тип по механизму действия	
	I	II
Глютетимиды		Аминоглютетимид Роглетимид
Стероиды	4-гидроксиандростендион (форместан, лентарон) 6-метилен-андростандиен- дион (экземестан)	
Дериваты имидазола		Фадрозол Летрозол (фемара <sup>R</sup> ) Анастрозол (аримидекс) Ворозол

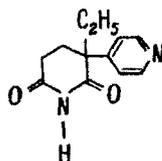
Примечание. Объяснение см. в тексте.

Что же касается характеристики тех ингибиторов ароматазы, которые уже используются в клинике или близки к этому, то их принято классифицировать либо по химической природе, либо по механизму действия. В первом случае выделяют глютетимиды, стероиды и дериваты имидазола. Во втором случае ингибиторы делятся на два типа (I и II). Ингибиторы I типа препятствуют присоединению природного андрогенного субстрата реакции (андростендиона или тестостерона) к каталитическому участку ароматазы и являются аналогами—конкурентами этого субстрата. Некоторые (так называемые суицидные) ингибиторы I типа способны превращаться в реактивные промежуточные соединения, которые могут связываться с ферментом и инактивировать его; в этом случае восстановление биосинтеза эстрогенов может быть достигнуто лишь путем образования новых молекул ароматазы. Действие ингибиторов II типа направлено непосредственно на часть фермента, представленную цитохромом P<sub>450</sub>, и сводится не к инактивации, а только к ингибированию энзиматической активности. Важным элементом в усовершенствовании ингибиторов этого типа является повышение специфичности действия таким образом, чтобы при их использовании не повреждались другие (не имеющие отношения к ароматазе) простетические группы цитохромов P<sub>450</sub> (Cole, Robinson, 1990; Miller, 1996a, 1996b). Распределение наиболее известных в настоящее время ингибиторов ароматазы по упомянутой «классификационной сетке» представлено в табл. 25, а их строение приведено на рис. 25.

Хотя в этой главе речь пойдет преимущественно о лекарственных воздействиях на образование и метаболизм эстрогенов, следует отметить в качестве достаточно важного момента, что в организме могут присутствовать и быть обнаружены эндогенные ингиби-



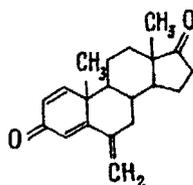
*Аминоглютетимид*



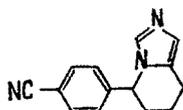
*Роглетимид*



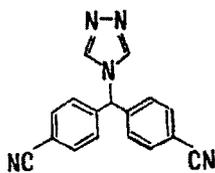
*Форместан*



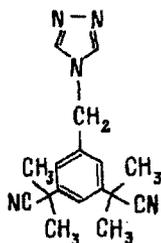
*Экземестан*



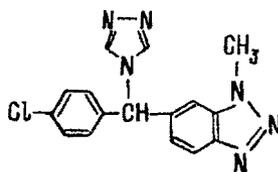
*Фадрозол*



*Летрозол*



*Анастрозол*



*Ворозол*

Рис. 25. Химическая структура некоторых ингибиторов ароматазы.

торы активности ароматазы. При этом одни из них представляют собой природные гормоны или гормоноподобные соединения типа 5 $\alpha$ -восстановленных андрогенов (Perel et al., 1984; гл. 4) или кортиколиберина (Calogero et al., 1996), а другие являются пока неохарактеризованными по своей химической структуре субстанциями (Agarwal S. K. et al., 1996). Интерес к таким соединениям связан, в частности, с тем, что они могут подавлять и гонадную продукцию эстрогенов (Agarwal S. K. et al., 1996; Calogero et al., 1996), которая считается резистентной к влиянию большинства из ингибиторов ароматазы, выпускаемых фармацевтической промышленностью. Эта резистентность обусловлена, как полагают,

во-первых, достаточно высокой активностью ароматазы в гонадах, а во-вторых (и это, видимо, главное), тем, что после непродолжительного угнетения секреции эстрогенов яичниками и снижения их концентрации в крови по механизму обратной связи повышается секреция гонадотропинов, что приводит к избыточной стимуляции активности гонадной ароматазы и делает ее нечувствительной к ингибированию (Santen et al., 1980; Miller, 1996a).

Подобная резистентность отчасти преодолевается сочетанием ингибиторов ароматазы с агонистами гонадотропин-рилизинг факторов (например, с золадексом), что позволило рекомендовать эту комбинацию именно при пременопаузальном раке молочной железы, поскольку препараты типа золадекса не оказывают влияния на внегонадную продукцию эстрогенов (Dowsett et al., 1992). Возможно, необходим поиск и других методов (средств), препятствующих усилению выброса ФСГ и ЛГ и вторичной стимуляции активности ароматазы в яичниках (Santen, 1987).

У мужчин и крыс-самок (в отличие от крыс-самцов) также наблюдаются проявления растремаживания гонадотропного звена при назначении ингибиторов ароматазы, что происходит на фоне прямых или косвенных признаков достаточно продолжительного снижения концентрации эстрогенов в крови (Bhatnagar et al., 1992; Schieweck et al., 1993). Причина различной чувствительности к подавлению ингибиторами ароматазы эстрогенообразования в гонадах у мужчин и крыс-самок по сравнению с женщинами с сохраненным менструальным циклом пока неясна. Тем не менее существенно, что большая чувствительность к ингибированию активности ароматазы в яичниках крыс сочетается у них с эффективным задерживающим влиянием таких препаратов, как фадрозол и экземестан, на рост опухолей молочной железы, индуцированных диметилбензантраценом (ДМБА) (Schieweck et al., 1993; Zaccaro et al., 1993). Фадрозол значительно подавлял развитие и спонтанных опухолей молочной железы у крыс (табл. 26), однако, в связи с тем что препарат начинали давать крысам с питьевой водой с 2-месячного возраста и продолжали это делать в течение 2 лет, в данном случае было трудно разделить эффекты, которые реализовались в период, когда функция яичников еще была интактна, либо когда крысы уже перешли в состояние постоянного диэструса, что в определенном смысле может быть уподоблено менопаузе (Gunson et al., 1995). Естественно, что при специальном моделировании ситуации, напоминающей менопаузу (овариэктомиа + введение андростендиона с целью усиления внегонадной продукции эстрогенов), противоопухолевый эффект ингибитора ароматазы (фадрозола) был весьма выражен как на уже упоминавшейся ДМБА-модели (Tanaka et al., 1994), так и при перевивке животным клеток опухоли молочной железы D2, трансформированных геном *int5/ arom* (Tekmal, Durgam, 1997). Эти весьма важные в познавательном отношении эксперименты хронологически были осуществлены, однако, значительно позже, чем было начато накопление ныне уже многочисленных клинических наблюдений,

Таблица 26

Влияние фадрозала на развитие спонтанных опухолей молочных желез у крыс Спрейгг-Доули (Gunson et al., 1995)

Тип патологии молочной железы	Число выявленных опухолей в зависимости от дозы фадрозала (мг/кг массы в сут)			
	0*	0.05*	0.25*	1.25*
Аденома	4	3	3	0
Фиброаденома	22	14	5	0
Аденокарцинома	12	5	0	0
Карциносаркома	1	0	0	0

\* В каждой группе было по 60 животных.

позволяющих рассматривать ингибиторы ароматазы как важное средство гормонотерапии злокачественных опухолей, в первую очередь рака молочной железы (Santen, 1996; Семиглазов, 1997).

Следует отметить, что привлекательной стороной применения ингибиторов ароматазы (по крайней мере, их оптимальных вариантов) является возможная обратимость эффекта, его специфичность и способность к подавлению биосинтеза эстрогенов на весьма широком пространстве, прежде всего во внегонадных периферических тканях, включая опухолевую (Miller, 1996a). До сих пор наиболее широко ингибиторы ароматазы применялись как препараты преимущественно второй линии (после антиэстрогена тамоксифена) при диссеминированных и местно распространенных формах рака молочной железы у больных, находящихся в менопаузе, хотя уже активно обсуждается предложение (и делаются соответствующие практические шаги) в отношении их использования как средств первой линии, а также в целях адъювантной и неадъювантной (дооперационной) терапии. Тем не менее поскольку наша задача состоит в оценке влияния этих препаратов главным образом на продукцию и метаболизм эстрогенов, то и чисто клинических проблем мы будем касаться лишь в том объеме, в каком это необходимо для понимания вопроса в целом.

Принято выделять четыре генерации ингибиторов ароматазы. К первой из них относят аминоклутетимид (ориметен), ко второй 4-гидроксиандростендион (форместан, лентарон), к третьей фадрозол и к четвертой прежде всего летрозол (фемара<sup>R</sup>), анастрозол (аримидекс) и ворозол. Отличие между отдельными генерациями, как это будет видно из дальнейшего, не только хронологическое, однако исторически перечисленные препараты становились доступными именно в таком порядке. Аминоклутетимид первоначально использовался в онкологии в целях «лекарственной адrenaлэктомии», поскольку его применение как не очень эффективного противоэпилептического средства показало, что он блокирует продукцию гормонов коры надпочечников. Во второй половине 70-х гг. выяснилось, что прием аминоклутетимида приводит к

Таблица 27

Сравнительная эффективность ингибиторов ароматазы при тестировании на микросомальной фракции плаценты *in vitro* (Miller, 1996b)

Ингибитор	Относительная ингибирующая активность (усл. ед.)	Ингибитор	Относительная ингибирующая активность (усл. ед.)
Аминоглутетимид	1	Анастрозол	200
4-ОНА (форместан)	60	Фадрозол	380
Экземестан	60	Ворозол	1000
Летрозол	200		

Примечание. В условиях *in vivo* соотношения между отдельными ингибиторами могут быть иными из-за различной фармакокинетики препаратов и других причин.

снижению концентрации эстрогенов в крови, при этом угнетается и конверсия андростендиона в эстрон (периферическая ароматизация). Данное наблюдение послужило основанием для введения в обращение такого термина, как «ингибитор ароматазы» (Santen et al., 1978). В течение более чем 20-летнего использования аминоглутетимидом было пролечено значительное количество больных, и до сих пор результаты, которые получены при назначении этого препарата, и его эндокринные эффекты остаются своеобразной точкой отсчета в случае применения других ингибиторов ароматазы. У больных раком молочной железы в менопаузе с поражением мягких тканей позитивный ответ при использовании аминоглутетимида можно ожидать в 25—35 % случаев и средняя продолжительность ремиссии приближается к 12—14 мес (Santen, Wells, 1980; Гершанович, Константинова, 1988; Miller, 1996b). При назначении аминоглутетимида после тамоксифена клинический эффект оказывается выраженным в большей степени, чем в случае применения этих препаратов в обратном порядке (Smith et al., 1981), возможная причина чего будет рассмотрена позже. Прием аминоглутетимида сопровождается некоторыми побочными явлениями: сонливостью, слабостью, иногда дерматитом и др. Из-за угнетения продукции гормонов коры надпочечников аминоглутетимид, как правило, приходится сочетать с назначением кортизона. Неселективность аминоглутетимида в отношении влияния на внегонадную продукцию эстрогенов находит выражение и в ряде других реакций. В частности, наиболее заметной является способность этого препарата индуцировать различные цитохром Р<sub>450</sub>-оксигеназы, ускорять клиренс эстрон-сульфата и приводить (в случае приема кортизона) к накоплению в циркуляции андростендиона, что со временем может ослаблять влияние аминоглутетимида на биосинтез эстрона (Lonning et al., 1990). Вследствие этого ранние и отсроченные эффекты аминоглутетимида могут в определенной степени различаться, о чем речь пойдет ниже.

Таблица 28

Подавление конверсии андростендиона в эстрон и снижение уровня эстрогенемии различными ингибиторами ароматазы (Harris et al., 1983; Pickles et al., 1990; Iveson et al., 1993; Geisler et al., 1996; Lonning, 1996; Santen, 1996)

Ингибитор (доза)	Торможение конверсии (%)	Снижение уровня эстрогенов в крови (%)
Аминоглютетимид (1000 мг/сут)	90.6	48—63
4-гидроксиандростендион (250—500 мг/1 раз в 2 нед)	84.8—91.9	36—59
Фадрозол (2—4 мг/сут)	82.4—92.6	35—68
Летрозол (0.5—2.5 мг/сут)	98.4—98.9	75—90
Анастрозол (1—10 мг/сут)	96.7—98.1	≥80—90

Основной момент, на который, однако, в настоящее время обращается внимание, — это относительно невысокая способность данного препарата подавлять активность ароматазы *in vitro* по сравнению с более современными средствами (табл. 27). Важно при этом отметить, что когда сравнивается влияние используемых в клинике ингибиторов ароматазы на интенсивность периферической ароматизации, то оно оказывается у них практически одинаковым и близким к возможному максимуму. В то же время препараты третьей и особенно четвертой генерации снижают уровень эстрогенов в крови в большей степени, чем аминоглютетимид и 4-гидроксиандростендион (табл. 28). Причины подобных различий (конверсия/концентрация в крови) не совсем понятны, и вряд ли объясняются лишь отличиями методологического характера, связанными с использованием в настоящее время более совершенных, чем ранее, наборов для радиоиммунологического определения эстрадиола и эстрона (Miller, 1996a). Возможно, в частности, что отдельные «компарменты» внегонадного биосинтеза эстрогенов (в итоге оцениваемые по уровню эстрогенемии, конверсии андрогенных предшественников в эстрогены и активности ароматазы в периферических тканях, — см. гл. 1) обладают различной чувствительностью к ингибиторам. Эти отличия могут проявляться и на других уровнях, включая клиническую эффективность препаратов. Так, среди ингибиторов ароматазы не наблюдается в полной мере так называемый *cross-resistance* (взаимный перекрест), и опухолевый процесс, резистентный к 4-гидроксиандростендиону, может сохранять чувствительность не только к формально более мощному ингибитору — фадрозолу, но и к аминоглютетимиду (Miller, 1996a). В то же время, принимая во внимание различия в эффективности воздействия отдельных ингибиторов ароматазы на концентрацию эстрогенов в крови (по которой предлагается судить о степени «эстрогенной депривации»), высказывается мнение о том, что, возможно, следует, как правило, начинать терапию с более «слабых» в этом отношении препаратов и, лишь

добившись от них максимального эффекта, переходить к препаратам четвертого поколения с еще более выраженным воздействием на уровень эстрогенемии (Lonning, 1996). Представляется, однако (особенно с учетом различий во влиянии ингибиторов на разные элементы системы экстрагонадного эстрогенообразования), что подобное предположение нуждается в специальной и тщательной проверке, которая прежде всего должна базироваться на сведениях о долгосрочной клинической эффективности сравниваемых средств.

В этом отношении препараты более поздних, чем аминоклоротимид, поколений (прежде всего третьей и четвертой) не столь долго применяются на практике, чтобы можно было с полным основанием судить об их реальных возможностях. Селективность некоторых из этих средств также не абсолютна: в частности, при назначении фадрозолола может частично подавляться и биосинтез альдостерона (Demers et al., 1990); нельзя не упомянуть и о побочных реакциях, которые индуцируются препаратами нового поколения (см., напр.: Raats et al., 1992; Santen, 1996). Тем не менее в последнее время начинают накапливаться сведения об определенном клиническом превосходстве препаратов четвертого поколения (легрозол и анастрозол) над другими ингибиторами ароматазы (Possinger et al., 1997) или прогестинами (Buzdar et al., 1996; Dombernowsky et al., 1998) у женщин в менопаузе при прогрессирующем раке молочной железы, утратившем чувствительность к антиэстрогенам. В данном случае (помимо сравнения отдельных ингибиторов ароматазы между собой) возникает вопрос о том, как можно объяснить механизм благоприятной в клиническом отношении реакции опухолевой ткани на эти ингибиторы после предварительной терапии антиэстрогенами, которая приводит к относительному эстрогенодефициту. Выше уже говорилось о большей эффективности аминоклоротимиды, если он назначается после тамоксифена, а не до него (Smith et al., 1981). Одно из современных объяснений данного наблюдения сводится к признанию повышенной чувствительности опухолевых клеток к эстрогенам и ингибиторам ароматазы в случае предварительного пребывания их в микроокружении со сниженной концентрацией эстрогенов (Masamura et al., 1995, 1997; Santen, 1996). Это состояние может проявляться и усиленной реакцией на андрогенные предшественники, вследствие чего большее количество эстрогенов может синтезироваться в самой опухолевой ткани (Yue, Santen, 1996) и дополнительно повышать ее чувствительность к ингибиторам ароматазы.

Действительно, по некоторым пока еще немногочисленным данным, есть основание рассматривать содержание эстрогенов в опухоли и активность ароматазы в ней как критерии, определяющие клиническую эффективность по крайней мере некоторых препаратов этой группы. Так, у больных раком молочной железы, reagировавших на лечение аминоклоротимидом, исходная активность ароматазы в опухолевой ткани была выше, чем у больных,

оказавшихся нечувствительными к подобной терапии (Bezwarda et al., 1987a; Miller, O'Neill, 1987). Реакция на лечение аминоклетимидом была, по отдельным наблюдениям, сильнее и в том случае, если в опухоли присутствовали эстрогенные рецепторы, однако никакой закономерной динамики этих рецепторов в процессе терапии выявить не удалось (см.: Miller, 1996a, 1996b). В то же время не было установлено связи между активностью ароматазы в опухолевой ткани и эффективностью применения 4-гидроксиандростендиона, что, возможно, объясняется «суицидным» механизмом действия данного препарата (Miller et al., 1995). Отсутствуют сведения о том, определяется ли реакция на лечение ингибиторами ароматазы исходным индивидуальным уровнем периферической ароматизации (конверсии андростендиона) или исходной концентрацией эстрогенов в крови, хотя в настоящее время имеется возможность более точно оценивать последний параметр до начала и по завершении лечения с помощью не радиоиммунологического, а сверхчувствительного рекомбинантного биологического метода (Klein et al., 1995). Предпринимались попытки определить, как меняется активность ароматазы в опухоли под влиянием ингибиторов этого фермента, чтобы в будущем попытаться использовать выявившиеся изменения как возможный критерий клинической эффективности. При этом было установлено, что, в то время как препараты четвертого поколения летрозол (лечение в течение 3 мес по 2.5 мг/сут) или ворозол (лечение в течение 1 нед по 2.5 мг/сут) достоверно снижали активность ароматазы в опухоли (DeJong et al., 1997; Miller, 1997), направленность действия 4-гидроксиандростендиона не была закономерной (Reed et al., 1990) (хотя он и снижал содержание эстронов в опухоли, — Reed et al., 1991a), а аминоклетимид после 5—16 нед лечения в значительном числе случаев даже повышал активность фермента благодаря, как считается, его способности индуцировать *in vivo* систему цитохромов P<sub>450</sub> (Miller, O'Neill, 1987), что в конечном итоге может приводить к «ускользанию» опухолевого процесса из-под влияния препарата.

Немногочисленны пока сведения о том, как ингибиторы ароматазы влияют на ее активность при их инкубации с опухолевой тканью *in vitro*. В одной из работ лишь в 4 из 25 случаев рака молочной железы не удалось существенно снизить активность ароматазы при воздействии 10 и 100 нМ 4-гидроксиандростендиона (Miller, 1991). В нашем собственном исследовании сопоставлялся эффект летрозола (1 и 10 нМ) и 4-гидроксиандростендиона (10, 50 нМ и 10 мкМ). 10 из 14 изученных опухолей реагировали на ингибиторы в доз-зависимой манере, причем чем выше была исходная активность ароматазы в опухоли, тем большей была ее чувствительность к ингибиторам *in vitro* (Берштейн и др., 1998в).

Делались также попытки выяснить, не связана ли реакция на ингибиторы ароматазы со структурными или функциональными особенностями гена *CYP19*. В модельных экспериментах с арома-

тазой плаценты направленный мутагенез, приводивший к замене аспарагина на аланин в позиции 309, вызывал снижение чувствительности фермента к 4-гидроксиандростендиону, а замена пролина на фенилаланин в позиции 308, напротив, повышала чувствительность к этому ингибитору (Kadohama et al., 1992). В кодирующих экзонах гена ароматазы из ткани опухолей молочной железы мутации обнаружены не были, а выявленный на основании исследования электрофоретической подвижности участков ДНК полиморфизм гена не был закономерно связан с утратой или сохранением чувствительности ароматазы этих новообразований к 4-гидроксиандростендиону (10 нМ) *in vitro* (Sourdaine et al., 1994). По нашим данным, степень подавления активности ароматазы в опухолях молочной железы 4-гидроксиандростендионом или летрозолом *in vitro* не была достоверно связана с вариантом утилизируемого тканеспецифического экзона I гена P<sub>460аром</sub> (см. гл. 2), хотя и отмечалась определенная тенденция к утрате чувствительности фермента в опухоли к его ингибиторам в случае превалирования в новообразовании не свойственных ткани нормальной молочной железы экзонов I.3 и II (Берштейн и др., 1998в). В целом же вполне очевидно, что исследование как самой активности ароматазы, так и гена *CYP19* и в опухоли, и в других способных к внегонадному эстрогенообразованию тканях онкологических больных представляет собой пока недостаточно изученный, но весьма перспективный материал для понимания фундаментальных и прикладных аспектов реакции на ингибиторы ароматазы и утраты чувствительности (развития резистентности) к ним, столь важной с лечебной точки зрения. Кстати, на активность ароматазы в опухолевой ткани могут оказывать влияние и некоторые другие воздействия (химиотерапия, прогестинотерапия и др.) (Purohit et al., 1989; Miller, Mullen, 1993), что следует принимать во внимание, если они предшествовали назначению ингибиторов ароматазы, поскольку эффект последних может быть именно по этой причине смазан или неполон.

Хотя лечение тамоксифеном приводит, по некоторым наблюдениям, к снижению содержания эстрадиола в крови менопаузальных больных раком молочной железы (Lonning et al., 1995), нет четких данных о влиянии этого препарата на активность ароматазы в опухолевой или других внегонадных тканях. Особый интерес представляет вопрос, не способен ли тамоксифен индуцировать активность ароматазы в эндометрии больных раком молочной железы, поскольку в нормальной эндометрии, как известно, ароматазу современными методами выявить не удается (раздел 4.8), и в то же время у части больных раком молочной железы, лечившихся тамоксифеном, развивается гиперплазия, а иногда и рак эндометрия (Assikis et al., 1996). Пока неясно, «реагирует» ли как-либо процесс внегонадного эстрогенообразования на эстрогензаместительную терапию, проводящуюся в менопаузе, хотя данный вопрос представляется достаточно значимым для оценки как последствий этого важного лечебно-профилактического воздейст-

вия, так и механизмов его влияния на различные ткани-мишени (эпителий молочных желез, эндометрий, кости и т. д.).

Из специфических средств воздействия на активность ароматазы, отличающихся высокой селективностью, но находящихся на стадии разработки, следует упомянуть ингибирование экспрессии гена ароматазы антисмысловыми олигонуклеотидами, возможность чего была продемонстрирована на клетках хориокарциномы (Ackermann et al., 1994). Не исключено с той же целью использование методов иммуно- (Washida et al., 1996) и генотерапии. Реальность и обоснованность развития последнего метода, который может быть использован при различных формах (в том числе генетической) недостаточности ароматазы, доказывается созданием соответствующих трансгенных моделей (Tekmal, Durgam, 1995, 1997), о чем, в частности, шла речь в гл. 7. Как отмечалось ранее (см. гл. 8), было высказано предположение, что определенные изменения во внегонадной продукции эстрогенов могут происходить на фоне диетических и лекарственных воздействий, сопровождающихся снижением массы тела. Хотя концентрация эстрогенов в крови и моче, эстрогенная насыщенность вагинальных мазков, уровень половые гормоны связывающего глобулина могут при этом действительно подвергаться изменениям (DeWaard, Schwartz, 1964; Rose et al., 1992; Crave et al., 1995), интенсивность конверсии андростендиона в эстрон не меняется (Siiteri et al., 1976), что, однако, нуждается в дополнительном изучении (см. гл. 8). Другим аспектом данной проблемы является вопрос о том, зависит ли чувствительность к ингибиторам ароматазы от массы тела у лиц, подвергающихся терапии. Таких наблюдений выполнено пока немного. Скорее, как случайность было расценено отсутствие снижения уровня эстрона в крови у 3 менопаузальных женщин, лечившихся аминоглютетимидом и имевших массу тела в пределах 83—105 кг (Lonning et al., 1989). В то же время, по нашим данным, краткосрочное (48-часовое) воздействие 0.5 мг (0.25 мг/сут) фемара<sup>®</sup> (летрозол) на концентрацию эстрадиола в крови оказалось обратно пропорциональным исходной массе тела (содержанию жира в теле): при более высоких значениях этих антропометрических показателей были выше и уровень эстрадиола в крови, и его реакция на прием ингибитора ароматазы (табл. 29).

Естественно, что обоснованное заключение о зависимости чувствительности к ингибиторам ароматазы от массы тела пробандов может быть сделано при оценке последствий более длительного приема препаратов этой группы. Тем не менее заслуживают упоминания и данные, которые были получены нами в описанном наблюдении в отношении уровня гонадотропинов крови: очевидно, что за 48 ч, прошедших от начала приема ингибитора ароматазы, этот показатель не изменился, хотя уровень эстрадиола снизился довольно заметно (табл. 29). Более того, даже при 28-дневном приеме тот же ингибитор ароматазы, вызывая 70—90 %-ное подавление исходного уровня эстрогемии, не вли-

Зависимость 48-часового эффекта ингибитора ароматазы от антропометрических параметров (Берштейн и др., 1998б)

Параметр	Содержание гормонов в крови							
	E <sub>2</sub> (пМ/л)		% изменений	ЛГ (мМЕ/мл)		ФСГ (мМЕ/мл)		Б
	А	Б		А	Б	А	Б	
Индекс Кетгле <30	130.2±46.9 (6)	80.0±26.9 (6)	31.6±14.8	33.6±14.8 (3)	31.1±6.8 (3)	131.0±20.6 (3)	121.0±50.0 (3)	
Индекс Кетгле >30	224.6±57.5 (10)	74.8±20.9 (10)	60.8±6.4	27.6±3.5 (6)	29.5±5.0 (6)	48.8±8.4 (6)	56.4±7.7 (6)	
СЖТ <40 кг	144.6±40.2 (12)	78.4±20.1 (12)	41.4±8.6	30.6±3.8 (7)	29.6±4.2 (7)	82.4±19.6 (7)	86.2±23.3 (7)	
СЖТ >40 кг	323.0±85.6 (4)	71.8±4.8 (4)	75.2±5.8	25.9±4.1 (2)	31.5±11.8 (2)	54.3±19.7 (2)	49.1±8.1 (2)	

Примечание. Индекс Кетгле = масса (кг)/[рост, м]<sup>2</sup>, СЖТ — содержание жира в теле; E<sub>2</sub> — эстрадиол, ЛГ и ФСГ — гонадотропины; А — до приема препарата, Б — после приема; в скобках — число наблюдений.

ял каким-либо образом на концентрацию гонадотропинов (Iveson et al., 1993). Через 14 дней от начала приема не отмечалось изменения содержания ФСГ и ЛГ в крови и у больных, лечившихся аримидексом (Yates et al., 1996), и лишь прием ворозола (по 2.5 мг/сут) приводил через 1 мес к повышению концентрации ФСГ и ЛГ по сравнению с исходным уровнем соответственно на 26.3 и 35.9 % (Goss et al., 1995). На нынешнем этапе полученным данным может быть дано два объяснения.

1. Изменение продукции гонадотропинов после приема ингибитора ароматазы, как правило, запаздывает по времени по отношению к снижению содержания эстрогенов крови (хотя срок в 28 дней в случае летрозола представляется вполне достаточным для подобного изменения).

2. Экстрагонадная продукция эстрогенов в менопаузе (а также чувствительность этого процесса к действию ингибиторов ароматазы) может зависеть от массы тела (содержания жира в теле), но в отличие от эстрогенов, продуцируемых в гонадах, не оказывает регуляторного влияния на секрецию гонадотропинов. Понятно, что дальнейшее изучение этого вопроса представляет интерес для целого ряда разделов эндокринологии.

У ингибиторов ароматазы выявлен значительный набор дополнительных эффектов, не всегда связанных с воздействием данных препаратов на внегонадное эстрогенообразование, но иногда все-таки обус-

ловленных медиаторным действием эстрогенов. Очевидно, не связано со снижением концентрации эстрогенов в крови повышение уровня ИПФР I, зарегистрированное у больных, лечившихся аминоглютетимидом, поскольку оно не наблюдалось в ходе терапии 4-гидроксиандростендионом (Frost et al., 1996). И самостоятельным и опосредованным может быть ангиостатическое действие некоторых ингибиторов ароматазы (Steiner, 1992). Предполагается, что вследствие изменения концентрации эстрогенов в крови или числа эстрогенных рецепторов на лимфоидных клетках регулируются регенерация тимуса у стареющих крыс-самцов, которым вводился ингибитор ароматазы (Greenstein et al., 1992), и нарастание активности естественных киллеров у больных, лечившихся аминоглютетимидом (Berry et al., 1987). Однако, что уже отмечалось выше, в опухолевой ткани под влиянием аминоглютетимида и 4-гидроксиандростендиона не удалось обнаружить закономерной динамики в количестве рецепторов эстрогенов (Miller, 1996a, 1996b); уровень рецепторов прогестерона при этом снижается, возможно, из-за ослабления индукции их биосинтеза эстрогенами (Murray et al., 1994). Обращает также на себя внимание способность некоторых ингибиторов ароматазы, в частности фад-розола и летрозола, снижать и экскрецию некоторых катехолаэстрогенов, соответственно преимущественно 2-гидроксиэстрадиола и 4-гидроксиэстрона (Masamura et al., 1994), что может иметь по крайней мере косвенное отношение к проблеме связи особенностей внегонадного эстрогенообразования и его регуляции с типом гормонального канцерогенеза (см. гл. 7).

Помимо применения ингибиторов ароматазы могут быть и другие способы лекарственного воздействия на метаболизм эстрогенов и внутритканевую (внегонадную) концентрацию отдельных их фракций. В гл. 1 говорилось о том, что в реакциях взаимопревращения отдельных эстрогенов большую роль играют 17 $\beta$ -эстрадиолдегидрогеназы (известно несколько их основных форм) и эстронсульфатаза. В последние годы уделяется существенное внимание ингибиторам и инактиваторам этих ферментов, причем среди таких соединений наряду с уже известными препаратами имеются и средства, синтезированные относительно недавно (Penning, 1996; Reed et al., 1996). Хотя основное направление в использовании и этих соединений, и ингибиторов ароматазы связано прежде всего с проблемой рака молочной железы, имеются и другие клинические мишени для их применения. В свое время считалась достаточно успешной комбинация аминоглютетимида и тамоксифена при далекозашедшем раке эндометрия, резистентном к прогестинам (Quinn et al., 1981), хотя несомненно, что вопрос об использовании ингибиторов ароматазы в лечении этого заболевания еще ждет своего разрешения. Не ясны пока перспективы и оправданность подобного воздействия и при заболеваниях предстательной железы, хотя по крайней мере в отношении доброкачественной гипертрофии этого органа такие предложения делались неоднократно (Habenicht et al., 1993). Истинная гинекомас-

тия, по ряду данных, также может быть объектом для терапии ингибиторами ароматазы, хотя рандомизированные испытания такого вида лечения, насколько нам известно, пока не проводились.

Особняком стоит вопрос о возможности использования ингибиторов ароматазы в целях профилактики некоторых, прежде всего онкологических, заболеваний человека. Такой подход вполне реален, если принимать во внимание, что ароматаза в периферических тканях более чувствительна к влиянию ингибиторов, чем ароматаза яичников. Это, в свою очередь, позволяет ограничиваться сравнительно невысокой дозой таких препаратов, способной ослаблять биосинтез эстрогенов в ткани-мишени. В то же время ее применение не вызывает неблагоприятных последствий, обычно связанных с хроническим эстрогенодефицитом (остеопороз, нарушения липидного обмена, атеросклероз и т. д.) (Santen, 1996; Kelloff et al., 1998). Между тем представляется, что и с профилактической и с лечебной целью в перспективе следует вести поиск не только ингибиторов, но скорее тканеспецифических модуляторов активности ароматазы (Берштейн, 1997а, 1997б), которые позволили бы в необходимых случаях локально стимулировать процесс внегонадного эстрогенообразования на фоне ограничения общего пула синтезируемых эстрогенов или ослабления иным путем эстрогенного влияния в *locus minoris resistentiae*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уже до начала работы над этой книгой, которая посвящена особенностям внегонадной продукции эстрогенов, было ясно, что потребность в ней достаточно велика. Мысль о необходимости обработки и осмысления большого и разнообразного материала несколько сдерживала процесс, однако, отбросив скромность, вслед за Н. Н. Петровым (1910) можно повторить, что «увлечение предметом превозмогло опасения». В процессе подготовки книги автор старался не скрывать своих симпатий и «лоббировал» обсуждение лишь основных (как ему представляется) направлений в анализе этой крайне широкой проблемы.

Ответить на вопрос о том, почему появляется экстрагонадный биосинтез эстрогенов и почему недостаточно одного гонадного механизма, одновременно и просто и сложно. Одна часть ответа связана с эволюционными аспектами проблемы (гл. 1, 2), другая, — очевидно, с тем, что длительность активного периода репродукции значительно уступает общей продолжительности жизни, в то время как потребность в эстрогенах, если можно так выразиться, бесконечна. В этом отношении характерно название одной из работ Роберта Вильсона (хотя автор имел в виду эстрогены вообще, а не только экстрагонадные): «Мольба о поддержании адекватного уровня эстрогенов от периода полового созревания до гроба» (Wilson, Wilson, 1963). Сходной точки зрения на протяжении достаточно длительного времени придерживался и В. М. Дильман (1968). Однако дело заключается не только в «полезности» эстрогенов для многих систем организма и даже не столько в выяснении причин самого существования эстрогенообразования в периферических тканях, сколько в том, что речь в последнем случае идет о весьма гибкой системе, способной к индукции и экспансии (гл. 2—5), причем не только по мере старения. Расширение зоны внегонадного биосинтеза наблюдается и в ходе эволюции, и в раннем периоде жизни, и при беременности, и при злокачественных новообразованиях, и поэтому понятно, что сам этот процесс в определенных пределах регулируем и обратим, что важно с точки зрения как механизмов возникновения некоторых состояний, так и их терапии и профилактики, если в этом возникает потребность (гл. 6, 9).

Даже самые мощные ингибиторы ароматазы не могут, однако, противодействовать влиянию эстрогенов, содержащихся в диете, или надпочечниковых андрогенов с эстрогенной активностью типа андростендиола (Labrie, 1991; Miller, 1996a), и уже на этом маленьком примере очевидно, как «уживаются» вместе эндогенные и экзогенные источники эстрогенов и эстрогеноподобных соединений в организме. Помимо того, имеется довольно много факторов внешней среды, непосредственно способных оказывать влияние на внегонадное эстрогенообразование (гл. 8). Существенно, что, хотя ключевая ферментативная реакция превращения андрогенных предшественников в эстрогены катализируется ароматазой (эстрогенсинтегазой), внутритканевая концентрация эстрогенов определяется и активностью метаболизирующих их ферментов (17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназ, эстрогенсульфатаз, эстрогенгидроксилаз и др.) (гл. 1, 9). Тем не менее ароматаза оправданно привлекает и привлекала к себе (в том числе и в настоящей работе) наибольшее внимание. Диапазон ее активности в организме весьма широк, достигая трех, а то и четырех порядков. Если не полностью уникальной, то весьма своеобразной оказалась природа кодирования ароматазы геном семейства цитохромов P<sub>450</sub> — CYP19, реализующаяся тканеспецифически путем альтернативного сплайсинга (гл. 2). При определении топографии экстрагонадного образования эстрогенов — в нормальных периферических тканях организма и в ткани злокачественных опухолей — выясняется, что в целом ряде случаев для опухолевой ткани характерен сдвиг (switching) в использовании альтернативных промоторов гена ароматазы, носящий (за небольшим исключением) достаточно закономерный характер: от промоторов, чувствительных к влиянию глюкокортикоидов, к промоторам, регулируемым цАМФ (гл. 4). Косвенным образом это дополнительно подтверждает обсуждавшееся ранее (Берштейн и др., 1993a) значение системы цАМФ для механизмов опухолевого роста, в том числе применительно к новообразованиям, возникновение и прогрессирование которых в значительной степени являются эстрогено-зависимыми.

Другая обнаруженная при анализе (хотя также не универсальная) закономерность состоит в наличии признаков экспрессии ароматазы в некоторых доброкачественных или злокачественных опухолях в ситуации, когда в соответствующих нормальных тканях эстрогенообразование *in situ* не выявляется. Это справедливо в отношении опухолей печени, эндометрия и миометрия (гл. 4) и свидетельствует не только об особенностях молекулярно-генетической регуляции процесса экстрагонадной продукции эстрогенов, но и о возможной роли подобных реакций в более общих механизмах гормонального канцерогенеза. Даже когда ароматаза не является «новым белком» для опухоли (рак молочной железы), эксперименты на трансгенных мышах демонстрируют важность высокой активности этого фермента непосредственно в периферических тканях-мишенях для индукции в последних эстроген-опосредованных неопластических изменений (гл. 7). В будущем не-

сомненную важность представит сравнительный анализ особенностей полиморфизма гена ароматазы, в частности у больных раком молочной железы и эндометрия, и прежде всего из-за только что упомянутой причины (выявление фермента в нормальной ткани молочной железы, его отсутствие в нормальной эндометрии и обнаружение в злокачественных опухолях и той и другой ткани).

Многие вопросы и после проведенной тщательной разработки проблемы остаются без ответа и сохраняют свою актуальность. При далеко не полном перечислении в этом отношении следует отметить практически неизученную проблему этнических различий во внегонадном эстрогенообразовании (очевидно, связанную и с различиями в частоте некоторых заболеваний у отдельных этнических групп), необходимость большей детализации взаимодействия гонадной и экстрагонадной систем биосинтеза эстрогенов при различных физиологических и патологических состояниях (включая проблемы компенсации при «выпадении» одной из систем, например в случае билатеральной овариэктомии), несомненный перекос в сторону целенаправленного поиска ингибиторов ароматазы при практически полном отсутствии внимания к ее селективным тканеспецифическим стимуляторам (хотя, например, вопрос о важности эстрогено-заместительной терапии в менопаузе стоит крайне остро, и разработка препаратов, избирательно активирующих ароматазу, допустим, в костной ткани в целях противодействия остеопорозу и не оказывающих влияния на тот же фермент в эндометрии и эпителии молочных желез, могла бы только приветствоваться) и т. д.

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что проблемой гонадного, а затем и экстрагонадного эстрогенообразования, коллектив, в котором работает автор, занимается свыше 25 лет. Благодаря некоторым фундаментальным обобщениям, касающимся деятельности репродуктивной системы, высказанным ранее (Дильман, 1968, 1987) и развитым в последующие годы, удалось посмотреть на вопрос об экстрагонадном образовании эстрогенов в значительно более широком, чем это традиционно принято, плане. Это позволило привлечь к анализу элементы эволюционного подхода, связать внегонадный биосинтез эстрогенов с выбором типа гормонального канцерогенеза, сопоставить особенности возрастных изменений процессов ароматизации в тканях и экстрагонадной конверсии *in vivo*, оценить способность к эстрогенообразованию мало изучавшихся в этом отношении тканей — мышечной и лимфоидной, сформулировать представление о существенной роли лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации в стероидной ауто- и паракринной регуляции роста клеток рака молочной железы, проанализировать влияние на экстрагонадную продукцию эстрогенов ряда важных факторов окружающей среды (включая эффект табачного дыма) и т. д. Существенным моментом в изучении перечисленных проблем явилось также использование современных методических подходов. Все это в совокупности привело к

заклучению о более значимой, чем это представлялось, роли вне-  
гонадного образования эстрогенов в физиологии и патологии чело-  
веческого организма и может, в свою очередь, явиться основой  
дальнейших разработок в данной области в комбинации с реаль-  
ными и необходимыми на практике подходами прикладного ха-  
рактера.

## ЛИТЕРАТУРА

- Анисимов В. Н. Спонтанные опухоли у крыс разных линий // *Вопр. онкол.* 1976. Т. 22, № 8. С. 98—110.
- Бабичев В. Н. Нейроэндокринная регуляция репродуктивной системы. Пуццино, 1995. 225 с.
- Бережная Н. М. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль: фенотип, функциональная активность, биологическое значение, роль в терапии // *Эксперим. онкол.* 1994. Т. 16. С. 253—269.
- Берштейн Л. М. Ретроспективные данные о весе новорожденных у онкологических больных // *Вопр. онкол.* 1973. Т. 19, № 3. С. 48—54.
- (Берштейн Л. М.) Berstein L. M. Newborn macrosomy and cancer // *Adv. Cancer Res.* 1988. Vol. 50. P. 231—278.
- Берштейн Л. М. Типы макросомии и механизмы ее влияния на развитие злокачественных опухолей // *Усп. соврем. биол.* 1991. Т. 111. С. 765—781.
- (Берштейн Л. М.) Berstein L. M. Trophoendocrinology // *J. Endocrinol.* 1993. Vol. 137. P. 163—166.
- Берштейн Л. М. Онкоэндокринология курения. СПб.: Наука, 1995. 127 с.
- Берштейн Л. М. Экстрагонадные эстрогены и гормональный канцерогенез // *Вестн. Рос. акад. мед. наук.* 1997. № 8. С. 54—58.
- Берштейн Л. М. Молекулярно-генетические аспекты продукции эстрогенов. Ген ароматазы // *Молек. биол.* 19976. Т. 31, № 5. С. 773—777.
- (Берштейн Л. М.) Berstein L. M. Macrosomy, obesity and cancer. New York: Nova Sci. Publ., 1997в. 195 p.
- Берштейн Л. М. Мультикомпонентная модель эстрогенообразования в ткани опухоли молочной железы // *Вопр. онкол.* 1998а. Т. 44, № 1. С. 7—11.
- Берштейн Л. М. Механизмы старения репродуктивной системы и гормонального канцерогенеза: модификация под влиянием табачного дыма // *Рос. физиол. журн.* 1998б. Т. 84, № 3. С. 244—248.
- Берштейн Л. М., Бокман Я. В., Мандельштам В. А., Дильман В. М. О происхождении и действии неклассических фенолстероидов при раке тела матки в менопаузе // *Вопр. онкол.* 1969. № 4. С. 34—38.
- Берштейн Л. М., Окулов В. Б., Александров В. А., Евтушенко Т. П. Масса тела плодов у крыс, предварительно иммунизированных экстрактом ткани гетерологичной и гомологичной цитовидной железы // *Пробл. эндокринологии.* 1980. № 2. С. 71—74.
- Берштейн Л. М., Кондратьев В. Б., Дильман В. М. Активность ароматазы в лимфоцитах онкологических больных и здоровых людей // *Вопр. онкол.* 1990. Т. 36, № 4. С. 438—441.
- Берштейн Л. М., Прохорова В. И., Конопля Е. Ф. Рак и циклические нуклеотиды (механизмы опухолевого роста, гормоночувствительность опухолевой ткани, проблемы клинической онкологии) // Минск: Наука и техника, 1993а. 230 с.
- (Берштейн Л. М. и др.) Berstein L. M., Santner S. J., Brodie A. M., Koos R. D., Naftolin F., Santner R. J. Pseudoaromatase in circulating lymphocytes // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993б. Vol. 44. P. 647—649.
- Берштейн Л. М., Ларионов А. А., Крюкова О. Г. Конверсия андростендиона в лимфоцитах периферической крови людей // *Бюл. эксперим. биол. мед.* 1994а. № 5. С. 517—519.

Берштейн Л. М., Цырлина Е. В., Семиглазов В. Ф., Ларионов А. А., Коваленко И. Г., Иваиова О. А. Содержание жира в теле и величина тощей массы у пре- и постменопаузальных больных раком молочной железы с избыточной массой тела: модифицирующая роль курения // *Вопр. онкол.* 1994б. Т. 40, № 7—9. С. 303—310.

Берштейн Л. М., Ларионов А. А., Кыштообаева А. Ш., Пожарисский К. М., Семиглазов В. Ф. Активность ароматазы в ткани рака молочной железы: роль клеточного субстрата // *Бюл. эксперим. биол. мед.* 1995а. № 10. С. 410—413.

(Берштейн Л. М. и др.) Berstein L. M., Santen R. J., Santner S. J. Three-component model of oestrogen formation and regulation of intratumoural oestrogen pool in breast neoplasms // *Med. Hypotheses.* 1996б. Vol. 45. P. 588—590.

(Берштейн Л. М. и др.) Berstein L. M., Bakhidze E. V., Evtushenko T. P., Gamajunova V. B., Krjukova O. G., Kovalenko I. G., Tsyrlina E. V., Bokhman J. V. Estrogen content and DNA unwinding in tumor and normal endometrial tissue of aging endometrial cancer patients // *Mutat. Res.* 1996а. Vol. 356. P. 203—208.

Берштейн Л. М., Ларионов А. А., Крюкова О. Г., Кочнев В. А., Семиглазов В. Ф. Исследование ароматазной активности в мышечной ткани человека // *Вопр. мед. хим.* 1996б. Т. 42, № 1. С. 76—82.

(Берштейн Л. М. и др.) Berstein L. M., Larionov A. A., Kyshtoobaeva A. Sh., Pozharisskii K. M., Semiglazov V. F., Ivanova O. A. Aromatase in breast cancer tissue — localization and relationship with reproductive status of patients // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1996в. Vol. 122. P. 495—498.

Берштейн Л. М., Порошина Т. Е., Зимарина Т. С., Ларионов А. А., Уповров А. В. Конверсия андростендиона в лимфоцитах, инфильтрирующих ткань опухоли молочной железы // *Бюл. эксперим. биол. мед.* 1997а. № 10. С. 440—443.

Берштейн Л. М., Порошина Т. Е., Ларионов А. А., Зимарина Т. С., Крюкова О. Г. Дексаметазон и дибутрил-цАМФ стимулируют конверсию андростендиона в лимфоцитах крови // *Докл. Акад. наук.* 1997б. Т. 352, № 2. С. 276—277.

Берштейн Л. М., Цырлина Е. В., Крюкова О. Г., Джумасултанова С. В. Влияние табачного дыма на утеротропный и генотоксический эффект эстрогенов в матке крыс // *Рос. физиол. журн.* 1997в. Т. 83, № 10. С. 84—86.

(Берштейн Л. М. и др.) Berstein L. M., Gamajunova V. B., Larionov A. A., Kovalenko I. G., Kolesnik O. S. Estrogen content and aromatase activity in tumor tissues of female smokers // *J. Endocrinol.* 1998а. Vol. 156, suppl. P. 105.

Берштейн Л. М., Гершанович М. Л., Гамаюнова В. Б., Цырлина Е. В., Лоскутова Г. П., Блинов Н. Н., Максимов С. Я. Эффект ингибитора ароматазы на уровень эстрогенов в крови у менопаузальных женщин с нормальным и избыточным весом // *Пробл. эндокринолог.* 1998б. № 3.

(Берштейн Л. М. и др.) Berstein L. M., Pauley R. J., Yue W., Santen R. J. Aromatase activity and transcripts in breast cancer tissue in relation to the effect of aromatase inhibitors in vitro // *Proc. X Intern. Congr. on Breast Diseases.* Porto, 1998в. А 353.

Войтенков Б. О., Окулов В. Б. Основные характеристики макрофага как клетки-эффектора // *Вестн. АМН.* 1995. № 4. С. 59—64.

Всемирная Организация Здравоохранения. Медицинские последствия Чернобыльской аварии: Науч. отчет. Женева, 1996. 559 с.

Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. Минск: Наука, 1989. 254 с.

Гершанович М. Л., Константинова М. М. Сравнительное изучение двух режимов применения аминоклоротетимида в сочетании с кортизоном у больных раком молочной железы с неизвестным содержанием рецепторов эстрогенов // *Тр. 2-го Республ. съезда онкол., рентгенол., радиол. Казахстана.* 1988. С. 126—127.

Гончаров Н. П., Кацян Г. В. Гормональная функция половых и надпочечных желез человека в различные возрастные периоды // *Пробл. эндокринолог.* 1995. № 2. С. 19—22.

Дильман В. М. Старение, климакс и рак. Л.: Медицина, 1968. 378 с.

Дильман В. М. Четыре модели медицины. Л.: Медицина, 1987. 287 с.

Дильман В. М., Павлова М. В. Выделение гонадотропинов, эстрогенов и 17-кетостероидов при некоторых предопухолевых и опухолевых заболеваниях // *Вопр. онкол.* 1963. № 11. С. 74—77.

(Дильман В. М. и др.) Dilman V. M., Berstein L. M., Bobrov J. F., Bokhman J. V., Kovaleva I. G., Krylova N. V. Hypothalamo-pituitary hyperactivity and endometrial carcinoma // Amer. J. Obstet. and Gynecol. 1968. Vol. 102. P. 880—890.

Коваленко И. Г., Колесник О. С., Берштейн Л. М. Катехоластрогены: образование, свойства и роль в канцерогенезе // Вопр. онкол. 1997. Т. 43, № 3. С. 257—262.

Корнева Е. А., Шхинек Э. К. Гормоны и иммунная система. Л.: Наука, 1988. 251 с.

Ларионов А. А. Конверсия андростендиона в опухолевой и экстрагонадных тканях и ее связь с гормонально-метаболическими факторами у больных раком молочной железы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1997. 21 с.

Перцева М. Н. Молекулярные основы развития гормонокомпетентности. Л.: Наука, 1989. 251 с.

Петров Н. Н. Общее учение об опухолях. СПб., 1910. 374 с.

Резников А. Г. Половые гормоны и дифференциация мозга. Киев: Наукова думка, 1982. 275 с.

Резников А. Г. Метаболизм половых стероидов в гипоталамусе и его роль в нейроэндокринной регуляции репродукции // Пробл. эндокринологии. 1990. № 4. С. 26—29.

Семиглазов В. Ф. Проблема рака молочной железы на пороге XXI века: Актовая речь / НИИ онкол. им. проф. Н. Н. Петрова. СПб., 1997. 16 с.

Стаут Р. У. Гормоны и атеросклероз. М.: Медицина, 1985. 312 с.

Толкачёва Т. В., Карпычев И. В., Эльдаров М. А., Скрябин К. Г. Роль G-белков в специфичности клеточного ответа: особенности строения и функционирования  $\alpha$ -субъединицы // Молек. биол. 1996. Т. 30, № 6. С. 1002—1013.

Тэннер Дж. Рост и конституция человека. Анализ и классификация типов телосложения // Биология человека / Под ред. Дж. Харрисона и др. М.: Мир, 1979. С. 439—460.

Фрейдлин И. С. От иммунорегуляции к иммунокоррекции: Актовая речь на заседании Ученого совета ИЭМ РАМН. СПб., 1995. 28 с.

Хотченкова Н. В., Кушлинский Н. Е., Дегтярь В. Г., Денисов Л. Е., Летагин В. П. Эндогенные стероиды в тканях молочной железы у больных в постменопаузе при раке молочной железы // Вестн. ОНЦ. 1995. № 4. С. 34—40.

Цырлина Е. В. Возрастные изменения в репродуктивном гомеостате // Материалы V Всесоюз. съезда геронтологов и гернатров. Тбилиси, 1988. С. 695.

Шапот В. С. Биохимия опухолевого роста. М.: Медицина, 1975. 243 с.

Яковлев Н. Н. Гормонорецепторы скелетных мышц, значение и регуляция их функций и изменения при мышечной деятельности и тренировке // Учен. зап. Тартус. гос. ун-та. 1990. Т. 884. С. 6—21.

Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. Functional diversity of helper T-lymphocytes // Nature. 1996. Vol. 383. P. 787—793.

Abdel-Rahman E., Mangione S., Ward P., Osawa Y., Ricotta J. J., Dandona P. Human microvascular endothelial cells express aromatase P450 mRNA // Proc. X Intern. Congr. Endocrinol. (Abstr.) California (USA), 1996. P. 3—479.

AbeDohmae S., Takagi Y., Harada N. Neurotransmitter-mediated regulation of brain aromatase: protein kinase C- and G-dependent induction // J. Neurochem. 1996. Vol. 67. N 5. P. 2087—2095.

Abul-Hajj Y. J., Thijssen J. H., Blankenstein M. A. Metabolism of estradiol by human breast cancer // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1988. Vol. 24. P. 1171—1178.

Ackerman G. E., Smith M. E., Mendelson C. R., MacDonald P. C., Simpson E. R. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. 1981. Vol. 53. P. 412—417.

Ackerman K., Fauss J., Pyerin W. Inhibition of cyclic AMP-triggered aromatase gene expression in human choriocarcinoma cells by antisense oligodeoxynucleotides // Cancer Res. 1994. Vol. 54. P. 4940—4946.

Adams W. J., Morris D. L. Short-course cimetidine and survival in patients with colorectal cancer: rate of lymphocyte infiltration // Lancet. 1994. Vol. 344. P. 1768—1769.

- Adashi E. Y.** Cytokine-mediated regulation of ovarian function: encounters of a third kind // *Endocrinology*. 1989. Vol. 124, N 5. P. 2043—2045.
- Adashi E. Y., Hsueh A. J. W.** Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 275. P. 6077—6081.
- Adlercreutz H.** Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations // *Scand. J. Clin. and Lab. Investig.* 1990. Vol. 50, suppl. 201. P. 3—23.
- Adlercreutz H.** Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection // *Environ. Health Perspect.* 1995. Vol. 103, suppl. 7. P. 103—112.
- Adlercreutz H., Gorbach S. L., Goldin B. R., Woods M. N., Fotsis T.** Diet and urinary estrogen profile in various populations // *Polycyc. Aromat. Comp.* 1994a. Vol. 6. P. 261—273.
- Adlercreutz H., Gorbach S. L., Goldin B. R., Woods M. N., Dwyer J. T., Hamalainen E.** Estrogen metabolism and excretion in oriental and caucasian women // *J. Nat. Cancer Inst.* 1994b. Vol. 86. P. 1076—1082.
- Agarwal S. K., Judd H. L., Magoffin D. A.** A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996. Vol. 81. P. 3686—3691.
- Agarwal V. R., Bulun S. E., Leitch J., Rohrich R., Simpson E. R.** Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissue of cancer free and breast cancer patients // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996. Vol. 81. P. 3843—3849.
- Agarwal V. R., Ashanullah C. I., Simpson E. R., Bulun S. E.** Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1997. Vol. 82. P. 70—74.
- Ahmad N., Morse W. I.** Metabolites of tritiated testosterone in healthy men // *Can. J. Biochem.* 1965. Vol. 43. P. 25—31.
- Aitken J., Parbhoo S. P., Cooke B. A.** Lack of correlation between breast carcinoma location and aromatase cytochrome P450 activity in breast adipose tissue // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California, 1996.* Abstr. B-2.
- Akhtar M., Njar V. C. O., Wright J. N.** Mechanistic studies on aromatase and related C-C bond cleaving P450 enzymes // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 375—387.
- Akkani A., Paterlini G., Gleason W. B., Ojala W. H., Abul-Haji Y. J.** 6-beta-propynyl-substituted steroids: mechanism-based enzyme-activated irreversible inhibitors of aromatase // *J. Med. Chem.* 1997. Vol. 40, N 20. P. 3263—3270.
- Albala C., Yanez M., Devoto E., Zeballos L., Santos J.** Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis // *Intern. J. Obesity.* 1996. Vol. 20. P. 1027—1032.
- Albrecht E. D., Pepe G. J.** Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy // *Endocrine Rev.* 1990. Vol. 11. P. 124—150.
- Almadhidi J., Moslemi S., Drosdowsky M. A., Seralini G. E.** Equine cytochrome P450 aromatase exhibits an estrogen 2-hydroxylase activity in vitro // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1996. Vol. 59. P. 55—61.
- Assikis V. J., Heren P., Jordan V. C.** A realistical clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis // *Eur. J. Cancer.* 1996. Vol. 32A. P. 1464—1476.
- Austin H., Drews C., Partridge E. E.** A case-control study of endometrial cancer in relation to cigarette smoking, serum estrogen levels, and alcohol use // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1993. Vol. 169. P. 1086—1090.
- Badwe R. A., Fentiman I. S., Millis R. R., Gregory W. M.** Body weight and vascular invasion in post-menopausal women with breast cancer // *Brit. J. Cancer.* 1997. Vol. 75. P. 910—913.
- Baird D. T., Horton R., Longcope C., Tait J. F.** Steroid dynamics under steady state conditions // *Recent Progr. Hormone Res.* 1969. Vol. 25. P. 611—656.
- Balthazart J.** Steroid control and sexual differentiation of brain aromatase // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1997. Vol. 61. P. 323—339.
- Barash I. A., Cheung C. C., Weigle D. S., Ren H., Kabigting E. B., Kuijper J. L., Clifton D. K., Steiner R. A.** Leptin is a metabolic signal to the reproductive system // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. P. 3144—3147.

**Barbieri R. L., Gochberg J., Ryan K. J.** Nicotine, cotinine, and anabesine inhibit aromatase in human trophoblast in vitro // *J. Clin. Invest.* 1986a. Vol. 77. P. 1727—1733.

**Barbieri R. L., McShane P. M., Ryan K. J.** Constituents of cigarette smoke inhibit human granulosa cells aromatase // *Fertil. and Steril.* 1986b. Vol. 46. P. 232—236.

**Barker D.** Growth in utero and coronary heart disease // *Nutr. Rev.* 1996. Vol. 54, pt 2. P. 1—7.

**Baxendale P., Reed M., James V. H. T.** Inability of human endometrium or myometrium to aromatize androstenedione // *J. Steroid Biochem.* 1981. Vol. 14. P. 305—306.

**Bayard F., Clamens S., Delsol G., Blaes N., Maret A., Faye J. C.** Oestrogen synthesis, oestrogen metabolism, and functional oestrogen receptors in bovine aortic endothelial cells // *CIBA Found. Symp.* 1995a. Vol. 191. P. 122—132.

**Bayard F., Clamens S., Meggetto F., Blaes N., Delsol G., Faye J.-Ch.** Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture // *Endocrinology.* 1995b. Vol. 136. P. 1523—1529.

**Bedin M., Ferre F., Alsat E., Cedard L.** Regulation of steroidogenesis in the human placenta // *J. Steroid Biochem.* 1980. Vol. 12. P. 17—21.

**Belanger A., Caudas B., Dupont A., Cusak Z., Labrie F.** Changes in serum concentrations of steroids in 40- to 80-year-old men // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1994. Vol. 79. P. 1086—1091.

**Belizario J. E., Katz M., Chenker E., Raw I.** Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factors (PIF) in the plasma proteins from cancer patients with weight loss // *Brit. J. Cancer.* 1991. Vol. 63. P. 705—710.

**Ben-Hur H., Mor G., Insker V., Blickstein I., Amir-Zaltsman Y., Kohen F.** Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes // *Amer. J. Reprod. Immunol.* 1995. Vol. 34. P. 363—369.

**Berenblum I.** Established principles and unresolved problems in carcinogenesis // *J. Nat. Cancer Inst.* 1978. Vol. 60. P. 723—726.

**Bernstein L., Henderson B. E., Hanisch R., Sellivan-Halley J., Ross R. K.** Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women // *J. Nat. Cancer Inst.* 1994. Vol. 86. P. 1403—1408.

**Berry J., Green B. J., Matheson D. S.** Modulation of natural killer cell activity in stage I postmenopausal breast cancer patients on low-dose aminoglutethimide // *Cancer Immunol. and Immunotherap.* 1987. Vol. 24. P. 72—75.

**Besedovsky H. O., Del Rey A.** Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses // *Endocrine Rev.* 1996. Vol. 17. P. 64—102.

**Bezwoda W. R., Mansoor N., Dansey R.** Correlation of breast tumour aromatase activity and response to aromatase inhibition with aminoglutethimide // *Oncology.* 1987a. Vol. 44. P. 345—349.

**Bezwoda W. R., Mansoor N., Dansey R., Esser J. D.** Aromatization of androstenedione by human breast cancer tissue: correlation with hormone receptor activity and possible biologic significance // *Oncology.* 1987b. Vol. 44. P. 30—33.

**Bhatnagar A. S., Muller P., Schenkel L., Trunet P. F., Beh I., Schilweck K.** Inhibition of estrogen biosynthesis and its consequences on gonadotrophin secretion in man // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1992. Vol. 41. P. 437—443.

**Bjorntorp P.** The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease // *Acta Med. Scand.* 1988. Suppl. 723. P. 121—134.

**Bleau G., Roberts K. D., Chapdeleine A.** The in vitro and in vivo uptake and metabolism of steroids in human adipose tissue // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1974. Vol. 39. P. 236—246.

**Bolufer P., Ricart E., Lluch A.** Aromatase activity and estradiol in human breast cancer: its relationship to estradiol and EGF receptors and to tumor-node metastasis staging // *J. Clin. Oncol.* 1992. Vol. 10. P. 438—446.

**Bonney R. C., Scanlon M. J., Jones D. L., Reed M. J., Anderson M. C., James V. H. T.** The relationship between oestradiol metabolism and adrenal steroids in the endometrium of postmenopausal women with and without endometrial cancer // *Eur. J. Cancer.* 1986. Vol. 22. P. 953—961.

- Borkowski A., Dosogne M., Declerq P., Muquardt C., Machin D. Estrogen to estradiol conversion by blood mononuclear cells in normal subjects and in patients with mammary and nonmammary carcinomas // *Cancer Res.* 1978. Vol. 38. P. 2174—2179.
- Brodie A., Inkster S. Aromatase in the human testis // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 549—555.
- Brodie A. M. H., Son C., King D. A., Meyer K. M., Inkster S. E. Lack of evidence for aromatase in human prostatic tissues: effects of 4-hydroxyandrostenedione and other inhibitors on androgen metabolism // *Cancer Res.* 1989. Vol. 49, N 23. P. 6551—6555.
- Broocks A., Pirke K. M., Schweiger U., Tusche R. J., Laessle R. G., Jeschke D. Cyclic ovarian function in recreational athletes // *J. Appl. Physiol.* 1990. Vol. 68. P. 2083—2086.
- Bujalska I. J., Kumar S., Hewison M., Stewart P. M. Aromatase and 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human omental and subcutaneous adipose tissue // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California, 1996.* P. 26.
- Bulun S. E. Aromatase deficiency in women and men: would you have predicted the phenotypes // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996. Vol. 81. P. 867—871.
- Bulun S. E., Simpson E. R. Breast cancer and expression of aromatase in breast adipose tissue // *Trends Endocrinol. and Metabol.* 1994a. Vol. 5. P. 113—119.
- Bulun S. E., Simpson E. R. Competitive RT-PCR analysis indicates levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with age // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1994b. Vol. 78. P. 426—432.
- Bulun S. E., Mahendroo M. S., Simpson E. R. PCR amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1993a. Vol. 76. P. 1458—1463.
- Bulun S. E., Price T. M., Aitken J., Mahendroo M. S., Simpson E. R. A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive PCR // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1993b. Vol. 77. P. 1622—1628.
- Bulun S. E., Economos K., Miller D., Simpson E. R. CYP19 (aromatase cytochrome P450) gene expression in human malignant endometrial tumors // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1994a. Vol. 79. P. 1831—1834.
- Bulun S. E., Simpson E. R., Word R. A. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human leiomyoma tissues and cells in culture // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1994b. Vol. 78. P. 736—743.
- Bulun S. E., Van Wyk J. J., Jones G., Simpson E. R. Molecular basis for gynecomastia associated with aromatase expression in hepatocellular carcinoma // *Proc. 77th Annual Endocrine Soc. (USA) Meet. Anaheim, 1995.* Abstr. OR 46-5.
- Burrows H., Horning E. Oestrogens and neoplasia. Springfield : Charles C. Thomas Publ., 1952. 189 p.
- Buzdar A., Jonat W., Howell A., Jones S. E., Blomquist C. Anastrozole, a potent and selective aromatase inhibitor, versus megestrol acetate in postmenopausal women: results of overview analysis of two phase III trials // *J. Clin. Oncol.* 1996. Vol. 14. P. 2000—2011.
- Callard G. V., Petro A., Ryan K. J. Aromatization of androgen to estrogen by cultured turtle brain cells // *Brain Res.* 1980. Vol. 202. P. 117—119.
- Callard G. V., Pudney J. A., Kendell S. L., Reinboth R. In vitro conversion of androgen to estrogen in amphioxus gonadal tissue // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1984. Vol. 56. P. 53—58.
- Calogero A. E., Burrello N., Negri Cesi P. Effects of CRF on ovarian estrogen production in vitro // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. P. 4161—4166.
- Cardinali D. P., Ritta M. N., Gejman P. V. Norepinephrine stimulates testosterone aromatization and inhibits 5 $\alpha$ -reduction via  $\beta$ -adrenoreceptors in rat pineal gland // *Molec. and Cell. Endocrinol.* 1982. Vol. 28. P. 199—205.
- Castagnetta L. A. M., Gradnata O. M., Farruggin R., Cannella S., Mesiti M., Carruba G. Oxidative and reductive pathways of estrogens in hormone responsive and non-responsive human breast cancer cells in vitro // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1995a. Vol. 53. P. 367—374.
- Castagnetta L. A. M., Montesanti A. M., Gradnata O. M., Oliveri G., Sorci C. M. G., Amodio R., Lignori M., Carruba G. 17-beta-hydroxysteroid dehydro-

genase activity in endometrial cancer cells: different metabolic pathways of estradiol in hormone-responsive and non-responsive intact cells // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1995b. Vol. 55. P. 573—579.

**Cauley J. A., Gutai J. P., Kuller Z. H., LeDonne D., Powell J. G.** The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women // *Amer. J. Epidemiol.* 1989. Vol. 129. P. 1120—1131.

**Chen S., Besman M. J., Sparkes R. S., Zollman S., Klisak I., Hall P. F., Shively J. E.** Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15 // *DNA.* 1988. Vol. 7. P. 27—38.

**Choi I., Simmen R. C. M., Simmen F.** Molecular cloning of cytochrome P450 aromatase complementary DNA from periimplantation porcine and equine blastocysts // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. P. 1457—1467.

**Christeff N., Benassayay C., Carli-Vielle C., Carli A., Nunez E.** Elevated estrogen and reduced testosterone levels in the serum of male septic shock patients // *J. Steroid Biochem.* 1988. Vol. 29. P. 435—440.

**Chung B.-C., Picado-Leonard J., Haniu M., Bienkowski M., Hall P. F., Shively J. E., Miller W. L.** Cytochrome P450c 17 $\alpha$ -(steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* 1987. Vol. 84. P. 407—411.

**Cleland W. H., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1985. Vol. 60. P. 174—178.

**Coddington C. C., Letterie G. S., Klein T. A., Winkee C. A.** Androgen metabolism by human peritoneal macrophages // *Steroids.* 1988. Vol. 51. P. 143—161.

**Cole P. A., Robinson C. H.** Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase // *J. Med. Chem.* 1990. Vol. 33. P. 2933—2942.

**Corbin C. J., Graham-Lorence S., McPhaul M., Mason J. I., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P450 // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* 1988. Vol. 85. P. 8948—8952.

**Crave J.-Ch., Fimbel S., Lejeune H., Cugnardey N., Dechaud H., Pugeat M.** Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1995. Vol. 80. P. 2057—2062.

**Cutolo M., Accardo S., Villaggio B., Barone A., Castagnetta L.** Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996. Vol. 81. P. 820—827.

**Dauvois S., Labrie F.** Androstenedione and androstene — 3-beta, 17-beta-diol stimulate DMBA-induced rat mammary tumors — role of aromatase // *Breast Cancer Res. Treatment.* 1989. Vol. 13. P. 61—69.

**Daynes R. A., Araneo B., Ershler W. B., Maloney C., Li G. Z., Ryu S. Y.** Altered regulation of IL-6 production with normal aging // *J. Immunol.* 1993. Vol. 150. P. 5219—5230.

**De Cree C., Fujimory Y., Van Kranenburg G., Keizer H. A., Geurten P.** 4-hydroxy-catecholesterol metabolism responses to exercise and training: possible implications for menstrual cycle irregularities and breast cancer // *Fertil. and Steril.* 1997. Vol. 67. P. 505—516.

**DeJong P. C., van de Ven J., Nortier H. W. R., Thijssen J. H. H., Blankenstein R. A.** Inhibition of breast cancer tissue aromatase activity and estrogen concentrations by the third-generation aromatase inhibitor vorozole // *Cancer Res.* 1997. Vol. 57. P. 2109—2111.

**Demers L. M., Melby J. C., Lipton A., Santen R. J.** The effects of CGS 16949A, an aromatase inhibitor on adrenal mineralocorticoid biosynthesis // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1990. Vol. 70. P. 1162—1166.

**Desjardins G. C., Brawer J. R., Euaudet A. B.** Estradiol is selectively neurotoxic to hypothalamic  $\beta$ -endorphin neurons // *Endocrinology.* 1993. Vol. 132. P. 86—93.

**Deslypere J. P., Verdonck L., Vermeulen A.** Fat tissue: A steroid reservoir and site of steroid metabolism // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1985. Vol. 61. P. 564—570.

**Deutsch S., Benjamin F.** Effect of diabetic status on fractionated estrogen levels in postmenopausal women // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1978. Vol. 130. P. 105—106.

- DeWaard F., Schwartz F. Weight reduction and postmenopausal estrogenic effect // *Acta cytol.* 1964. Vol. 8. P. 449—453.
- Dewailly E., Ayotte P., Dodin S. Could the rising levels of estrogen receptor in breast cancer be due to estrogenic pollutants? // *J. Nat. Cancer Inst.* 1997. Vol. 89. P. 888.
- Dikkeschei L. D., Wolther B. G., Boszuur I., Nagel G. T., Willemsse P. H. B. Optimization of a classical aromatase activity assay and application in normal, adenomatous and malignant breast parenchyma // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1996. Vol. 59. P. 305—313.
- Djursing H., Hagen C., Molsted-Pedersen L. Serum sex hormone concentrations in insulin-dependent diabetic women // *Clin. Endocrinol.* 1985. Vol. 23. P. 147—154.
- Dombrowsky P., Smith I., Falkson G., Leonard R., Bezwoda W. Letrozole, a new oral aromatase inhibitor for advanced breast cancer: double-blind randomized trial showing a dose effect and improved efficacy and tolerability compared with megestrol acetate // *J. Clin. Pathol.* 1998. Vol. 16. P. 453—461.
- Doody K. J., Carr B. R. Aromatase in human fetal tissues // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1989. Vol. 161. P. 1694—1697.
- Dorgan J. F., Reichman M. E., Judet J. T., Brown C., Longcope C., Schatzkin A., Taylor P. R. The relation of reported alcohol ingestion to plasma levels of estrogens and androgens in premenopausal women // *Cancer Causes Control.* 1994. Vol. 5. P. 53—60.
- Dörner G. Hormones, brain differentiation and fundamental processes of life // *J. Steroid Biochem.* 1977. Vol. 8. P. 531—536.
- Dorrington J. H., Bendell J. J., Lobb D. K. Aromatase activity in granulosa cells: regulation by growth factors // *Steroids.* 1987. Vol. 50. P. 411—421.
- Dowsett M., Stein R. C., Coombes R. C. Aromatization inhibition alone or in combination with GnRH agonists for the treatment of premenopausal breast cancer patients // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1992. Vol. 43. P. 155—159.
- Dowsett M., Detre S., Rowlands M., Grimshaw R. Oestrogen formation in breast: clinical and biological importance // *J. Endocrinol.* 1996. Vol. 150. P. 559—563.
- Dunaif A., Segal K. R., Futterweit W., Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance independent of obesity in polycystic ovary syndrome // *Diabetes.* 1989. Vol. 38. P. 1165—1174.
- Ebbiary N. A. A., Lenton E. A., Cooke I. D. Hypothalamic-pituitary ageing: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women // *Clin. Endocrinol.* 1994. Vol. 41. P. 199—206.
- Edman C. D., MacDonald P. C. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in ovulatory and anovulatory young women // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1978. Vol. 130. P. 456—461.
- Ekblom A., Hsieh C. C., Limworth L., Adami H.-O., Trichopoulos D. Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study // *J. Nat. Cancer Inst.* 1997. Vol. 88. P. 71—76.
- English M. A., Kane K., Crisckshank N., Langman M. J. S., Stewart P. M., Hewison M. Variations in oestrogen metabolism in normal human colon and colonic cancer // *J. Endocrinol.* 1998. Vol. 156, suppl. P. 289.
- Enriori C. L., Reforzo-Membrives J. Peripheral aromatization as a risk factor for breast and endometrial cancer in postmenopausal women: a review // *Gynecol. and Oncol.* 1984. Vol. 17. P. 1—21.
- Esteban J. M., Warsi Z., Haniu M., Hall P., Shively J. E., Chen S. Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation // *Amer. J. Pathol.* 1992. Vol. 140. P. 337—343.
- Evans C. T., Merrill J. C., Corbin C. J., Saunders C., Simpson E. R., Mendelson C. R. Regulation of estrogen biosynthesis in human adipose stromal cells // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 6914—6921.
- Evans D. J., Hoffman R. G., Kalkhoff R. K., Kissebah A. H. Relationship of androgenic activity to body fat topography, fat cell morphology, and metabolic aberrations in premenopausal women // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1983. Vol. 57. P. 304—310.
- Evans T. R. J., Rowlands M. G., Silva M. C., Law M., Coombes R. C. Prognostic significance of aromatase and estrone sulfatase enzymes in human breast cancer // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 583—587.

- Feldman D.** Estrogens from plastic — are we being exposed? // *Endocrinology*. 1997. Vol. 138. P. 1777—1779.
- Ferreri K., Gill G., Montminy M.** The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 1994. Vol. 91. P. 1210—1213.
- Fidler J.** Lymphocytes are not only immunocytes // *Biomedicina*. 1980. Vol. 32, N 1. P. 1—3.
- Folkerd E. J., James V. H. T.** The action of dexamethasone and prolactin on aromatase activity in human adipose tissue // *J. Steroid Biochem*. 1984. Vol. 20, N 2. P. 679—681.
- Folkerd E. J., Newton C., Davidson K., Anderson M. C., James V. H. T.** Aromatase activity in uterine leiomyomata // *J. Steroid Biochem*. 1984. Vol. 20. P. 1195—1200.
- Forbes G. B.** Human Body Composition. Growth, aging, nutrition, and activity. New York etc.: Springer-Verlag, 1987. 350 p.
- Forest M. G., Peretti E., Bertrand J.** Hypothalamic-pituitary-gonadal relationships in man from birth to puberty // *Clin. Endocrinol*. 1976. Vol. 5. P. 551—569.
- Forney J. P., Milewich L., Chen G. T., Garlock J. L., Schwarz B. E., Edman C. D., McDonald P.** Aromatization of androstenedione to estrone by human adipose tissue in vitro: correlation with adipose tissue mass, age, and endometrial neoplasia // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol*. 1981. Vol. 53. P. 192—199.
- Fournet-Dulguerov N., MacLusky N. J., Leranath C. Z., Todd R., Mendelson C. R., Simpson E. R., Naftolin F.** Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol*. 1987. Vol. 65. P. 757—762.
- France J. T., Mason J. I., Rosenfeld C. R., Magness R. R.** Ovine placental aromatase: study of activity levels, kinetic characteristics and effects of aromatase inhibitors // *J. Steroid Biochem*. 1987. Vol. 28. P. 155—160.
- Franceschi S.** Reproductive factors and cancers of the breast, ovary and endometrium // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*. 1989. Vol. 25. P. 1933—1943.
- Freeman L. M., Rissman E. F.** Neural aromatization and the control of sexual behavior // *Trends Endocrinol. and Metabol*. 1996. Vol. 7. P. 334—337.
- Frisch R. E., Canick J. A., Tulchinsky D.** Human fatty marrow aromatizes androgen to estrogen // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol*. 1980. Vol. 51. P. 394—396.
- Frisch R. E., Wyshak G., Witschi J., Albright N. L., Albright T. E., Schiff I.** Lower lifetime occurrence of breast cancer and cancers of the reproductive system among former college athletes // *Intern. J. Fertil*. 1987. Vol. 32. P. 217—225.
- Frost P. G., Reed M. J., James V. H. T.** The aromatization of androstenedione by human adipose and liver tissue // *J. Steroid Biochem*. 1980. Vol. 13. P. 1427—1431.
- Frost V. J., Helle S. I., Lønning P. E., Stappen J., Holly J. M. P.** Effects of treatment with megestrole acetate, aminoglutethimide, or formestane on insulin-like growth factors I and II // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol*. 1996. Vol. 81. P. 2216—2221.
- Gapstur S. M., Potter J. D., Sellers T. A., Kushi L. H. J., Folsom A. R.** Alcohol consumption and postmenopausal endometrial cancer: results from the Iowa Women's Health Study // *Cancer Causes Control*. 1993. Vol. 4. P. 323—329.
- Garzo V. G., Dorrington J. H.** Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle stimulating hormone and insulin // *Amer. J. Obstet. and Gynecol*. 1984. Vol. 148. P. 657—663.
- Geisler J., King N., Dowsett M., Ottestad L., Lundgren S., Walton P., Kormeset P. O., Lonning P. E.** Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatization and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer // *Brit. J. Cancer*. 1996. Vol. 74. P. 1286—1291.
- Gerhard I., Fitzer C., Klinga K., Rahman N., Runnebaum B.** Estrogen screening in evaluation of fetal outcome and infants development // *J. Perinat. Med*. 1986. Vol. 14. P. 279—291.
- Goldin B. R., Gorbach S. L.** Effect of diet on the plasma levels, metabolism and excretion of estrogens // *Amer. J. Clin. Nutr*. 1988. Vol. 48. P. 787—790.
- Gordon G. G., Olivo J., Raffi F., Southren A. L.** Conversion of androgens to estrogens in cirrhosis of the liver // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol*. 1975. Vol. 40. P. 1018—1023.

- Gosden R. G., Faddy M. J. Ovarian aging, follicular depletion, and steroidogenesis // *Experim. Gerontol.* 1994. Vol. 29. P. 265—274.
- Goss P. E., Clark R. M., Ambus U., Weizel H. A. E., Wadden N. A., Crump M., Walde D., Tye L. M., Coster R. E., Bruynseels J. Phase II study of vorozole (R83842), a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women with advanced breast cancer in progression on tamoxifen // *Clin. Cancer Res.* 1995. Vol. 1. P. 287—294.
- Graham-Lorence S., Amarneh B., White R. E., Peterson J. A., Simpson E. R. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450 // *Protein Sci.* 1995. Vol. 4. P. 1065—1080.
- Greenstein B. D., Debridges E. F., Fitzpatrick F. T. A. Aromatase inhibitors regenerate the thymus in aging male rats // *Intern. J. Immunopharmacol.* 1992. Vol. 14. P. 541—554.
- Grodin J. M., Siiteri P. K., MacDonald P. S. Source of estrogen production in postmenopausal women // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1973. Vol. 36. P. 207—214.
- Grohe C., Kahlert S., Lobbert K., Vetter H. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis // *J. Endocrinol.* 1998. Vol. 156. P. R1—R5.
- Grossman C. J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system // *Science.* 1985. Vol. 227. P. 257—261.
- Gunson D. E., Steele R. E., Chau R. Y. Prevention of spontaneous tumours in female rats by fadrozole hydrochloride, an aromatase inhibitor // *Brit. J. Cancer.* 1995. Vol. 72. P. 72—75.
- Habenicht U.-F., Tunn U. W., Senge Th., Scroder F. H., Schweikert H. U., Bartsch G., ElEtrey M. F. Management of benign prostatic hyperplasia with particular emphasis on aromatase inhibitors // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 557—563.
- Harada N. Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: immunochemical identification and sequence analysis // *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1988. Vol. 156. P. 725—732.
- Harada N. Genetic analysis of human placental aromatase deficiency // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 331—340.
- Harada N., Yamada K. Ontogeny of aromatase messenger RNA in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction // *Endocrinology.* 1992. Vol. 131. P. 2306—2312.
- Harada N., Utsumi T., Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* 1993. Vol. 90. P. 11312—11316.
- Harada N., Utsumi T., Takagi Y. Molecular and epidemiological analysis of abnormal expression of aromatase in breast cancer // *Pharmacogenetics.* 1995. Vol. 5. P. S59—S64.
- Harada N., Ota H., Yoshimura N., Katsuyama T., Takagi Y. Localized aberrant expression of cytochrome P450 aromatase in primary and metastatic malignant tumors of human liver // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1998. Vol. 83. P. 697—702.
- Harris A. L., Dowsett M., Smith I. E., Jeffcoate S. L. Endocrine effects of low-dose aminoglutethimide alone in advanced postmenopausal breast cancer // *Brit. J. Cancer.* 1983. Vol. 47. P. 621—627.
- Hausknecht R. U., Gusberg S. B. Estrogen metabolism in patients at high risk for endometrial carcinoma. II. The role of androstenedione as an estrogen precursor in postmenopausal women with endometrial carcinoma // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1973. Vol. 116. P. 981—984.
- He H., Herington A. C., Roupas P. Involvement of G proteins in the effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin-induced rat granulosa cell differentiation // *Growth Regul.* 1994. Vol. 4. P. 20—28.
- Heinz A., Rommelspacher H., Graf K. J., Baumgartner A. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in alcoholics: comparison with healthy control subjects // *Psychiatry Res.* 1995. Vol. 56. P. 81—95.
- Hemsell D. L., Grodin J. M., Brenner P. F., Siiteri P. K., MacDonald P. C. Plasma precursors of estrogens. II. Correlation of the extent of conversion of plasma andros-

tenedione to estrogen with age // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1974. Vol. 38. P. 476—479.

**Hillier S. G., Miro F.** Local regulation of primate granulosa cell aromatase activity // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 435—439.

**Hinshelwood M. M., Michael M. D., Sun T. J., Simpson E. R.** Regulation of aromatase expression in the ovary and placenta: a comparison between human and bovine species // *Proc. 77th Annual Endocrine Soc. (USA) Meet. Washington, 1995.* OR 32-1.

**Hiramatsu M., Maehara I., Ozaki M., Harada N., Orikasa S., Sasano H.** Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate // *Prostate.* 1997. Vol. 31, N 2. P. 118—124.

**Hirato K., Suzuki T., Hondo T., Saito H., Yamaiharu T.** Steroid sulfatase activities in human leukocytes: biochemical and clinical aspects // *Endocrinol. jap.* 1991. Vol. 38. P. 597—602.

**Hirsch J., Leibel R. L.** Clinical review. A biological basis of human obesity // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1991. Vol. 73. P. 1153—1157.

**Ho S. M., Roy D.** Sex hormone-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation in the dorsolateral prostates of Noble rats // *Cancer Lett.* 1994. Vol. 84. P. 155—162.

**Honda S. I., Harada N., Takagi Y.** Novel exon I of the aromatase gene specific aromatase transcripts in brain // *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1994. Vol. 198. P. 1153—1160.

**Hsieh C. C., Lan S. J., Ekblom A., Petridou E., Adami H. O., Trichopoulos D.** Twin membership and breast cancer risk // *Amer. J. Epidemiol.* 1992. Vol. 136. P. 1321—1326.

**Hsueh A. J. W., Adashi E. Y., Jones P. B. C., Welsh T. H., jr.** Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells // *Endocrine Rev.* 1984. Vol. 5: P. 76—127.

**Hytten F. E., Leitch T.** *Physiology of human pregnancy.* Oxford etc.: Blackwell Sci. Publ., 1971. 599 p.

**Imai A., Ohno T., Takakashi K., Furui T., Tamaya T.** Lack of evidence for aromatase expression in human ovarian epithelial carcinoma // *Ann. Clin. Biochem.* 1994. Vol. 31, pt 1. P. 65—71.

**Inkster S. E., Brodie A. M. H.** Expression of aromatase cytochrome P450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1991. Vol. 73. P. 717—726.

**Inkster S. E., Yue W., Brodie A. M. H.** Human testicular aromatase: immunocytochemical study // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1995. Vol. 80. P. 1941—1947.

**Inskip P. D.** Pelvic radiotherapy, sex hormones, and breast cancer // *Cancer Causes Control.* 1994. Vol. 5. P. 471—478.

**Isomaa V. V., Ghersevich S. A., Maentausta O. K., Peltoketo E. H., Vihko R. K.** Steroid biosynthesis enzymes: 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase // *Ann. Med.* 1993. Vol. 25. P. 91—97.

**Ito Y., Fisher C. R., Conte F. A., Grumbach M. M., Simpson E. R.** The molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* 1993. Vol. 90. P. 11673—11677.

**Iveson T. J., Smith I. E., Ahern J., Smithers D. A., Trunet P. F., Dowsett M.** Phase I study of the oral non-steroidal aromatase inhibitor CGS 20267 in postmenopausal patients with breast cancer // *Cancer Res.* 1993. Vol. 53. P. 266—270.

**Jakob F., Tony H.-P., Thole H.** Immunological detection of the oestradiol receptor protein in cell lines derived from the lymphatic system and the haematopoietic system: variability of specific hormone binding in vitro // *J. Endocrinol.* 1992. Vol. 134. P. 397—404.

**Jakob F., Homann D., Seufert J., Schneider D., Kohrle J.** Expression and regulation of aromatase cytochrome P450 in THP1 human myeloid leukemia cells // *Molec. and Cell. Endocrinol.* 1995. Vol. 110. P. 27—33.

**Jakob F., Siggelkow H., Schneider D., Adamski J., Schutze N.** Estradiol metabolism in osteoblasts and osteoclast-like cells // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California.* 1996. P. 13.

**Jacobs S., Macheill F., Lønning P., Dowsett M., Powles T.** Aromatase activity, serum oestradiol and their correlation with demographic indices // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1992. Vol. 41. P. 769—772.

- James V. H. T., Reed M. J., Lai L. C., Ghilchik M. W., Tart G. H., Newton C. J., Coldman N. G.** Regulation of estrogen concentrations in human breast tissues // *Ann. NY Acad. Sci.* 1995. Vol. 595. P. 227—236.
- Jellinck P. H.** The relation of chemical carcinogens to steroid metabolism // *Canad. Cancer Conf.* 1966. Vol. 6. P. 124—142.
- Jellinck P. H., Makin H. L., Sepkovic D. W., Bradlow H. L.** Influence of indole carbinols and growth hormone on the metabolism of 4-androstenedione by rat liver microsomes // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 46. P. 791—798.
- Juchau M. R.** Substrate specificities and functions of P450 cytochromes // *Life Sci.* 1990. Vol. 47. P. 2385—2394.
- Judd H. L., Fournet N.** Changes of ovarian hormonal function with aging // *Experim. Gerontol.* 1994. Vol. 29. P. 285—298.
- Judd H. L., Lucas W. E., Yen S. S. C.** Serum 17-beta-oestradiol and oestrone levels in postmenopausal women with and without endometrial carcinoma // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1976. Vol. 43. P. 272—278.
- Judd H. L., Shamoni I. M., Frumar A. M., Lagasse L. D.** Origin of serum estradiol in postmenopausal women // *Obstet. and Gynecol.* 1982. Vol. 59. P. 680—686.
- Kadohama N., Yarborough C., Zhou D., Chen S., Osawa Y.** Kinetic properties of aromatase mutants Pro308Phe, Asp309Asn and Asp309Ala and their interactions with aromatase inhibitors // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1992. Vol. 43. P. 693—701.
- Kadohama N., Shintai K., Osawa Y.** Tobacco alkaloid derivatives as inhibitors of breast cancer aromatase // *Cancer Lett.* 1993. Vol. 75. P. 175—182.
- Kaga K., Sasano N., Harada N., Sato S., Nagura H.** Aromatase in human common epithelial ovarian neoplasms // *Amer. J. Pathol.* 1996. Vol. 146. P. 45—52.
- Kao Y. Ch., Cam L. L., Laughton Ch. A., Zhou D., Chen S.** Binding characteristics of seven inhibitors of human aromatase: a site-directed mutagenesis study // *Cancer Res.* 1996. Vol. 56. P. 3451—3460.
- Kaye S. A., Folsom A. R., Soler J. I.** Associations of body mass and fat distribution with sex hormone concentrations in postmenopausal women // *Intern. J. Epidemiol.* 1991. Vol. 20. P. 151—156.
- Kelley D. E., Slasky S. S., Janovsky J.** Skeletal muscle density: effects of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Amer. J. Clin. Nutr.* 1991. Vol. 54. P. 509—515.
- Kelloff G. J., Lubet R. A., Lieberman R., Sigman C. C.** Aromatase inhibitors as potential cancer chemopreventives // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998. Vol. 7. P. 65—78.
- Kelly P. M. A., Davison R. S., Bliss E., McGee J. O. D.** Macrophages in human breast disease // *Brit. J. Cancer.* 1988. Vol. 57. P. 174—177.
- Keshava N., Tekmal R. R.** Role of mammary tissue estrogen in breast cancer: int-5/aromatase transgenic model // *Proc. AACR.* 1997. Vol. 38. P. 297.
- Killinger D. W., Perel E., Daniilescu V. D., Kharlip L., Lindsay W. R.** The relationship between aromatase activity and body fat distribution // *Steroids.* 1987. Vol. 50. P. 61—72.
- Kimura K., Nakayama S., Nakamura J.** SNA-60-367, new peptide enzyme inhibitor against aromatase // *J. Antibiot.* 1997. Vol. 50. P. 529—531.
- Kirschner M. A., Samojlik E.** Sex hormone metabolism in upper and lower body obesity // *Intern. J. Obesity.* 1991. Vol. 15. P. 101—108.
- Kirschner M. A., Cohen F. B., Ryan C.** Androgen-estrogen production rates in postmenopausal women with breast cancer // *Cancer Res.* 1978. Vol. 38. P. 4029—4035.
- Kissebah A. H., Krakower G. R.** Regional adiposity and morbidity // *Physiol. Rev.* 1994. Vol. 74. P. 761—812.
- Klein A., Kaufman H., Arie R., Barkan A.** Cortisol metabolism in lymphocytes isolated from patients with different diseases (multiple sclerosis, Cushing's disease, and inflammatory diseases) // *J. Steroid Biochem.* 1980. Vol. 13. P. 401—404.
- Klein K. O., Baron J., Colli M. J., McDonnell D. P., Cutter G. B.** Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 94. P. 2475—2480.
- Klein K. O., Demers L. M., Santner S. J., Baron J., Santen R.** Use of ultrasensitive recombinant cell bioassay to measure estrogen levels in women with breast cancer

receiving the aromatase inhibitor, letrozole // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1995**. Vol. 80. P. 2658—2660.

**Knight J. W., Jeantet M. A.** Effects of pregnenolone, cAMP and human chorionic gonadotropin on estrone synthesis by porcine placenta and endometrium // *Dom. Anim. Endocrinol.* **1991**. Vol. 8. P. 331—341.

**Koos R. D., Banks P. K., Inkster S. E., Yue W., Brodie A. M. H.** Detection of aromatase and keratinocyte growth factor expression in breast tumors using reverse transcription polymerase chain reaction // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1993**. Vol. 45. P. 217—226.

**Koot R. W., Amelink G. J., Blankenstein M. A., Bar P. R.** Tamoxifen and oestrogen both protect the rat muscle against physiological damage // *J. Steroid Biochem.* **1991**. Vol. 40, N 4—6. P. 689—695.

**Korzekwa K. R., Trager W. F., Mancewicz J., Osawa Y.** Studies on the mechanism of aromatase and other cytochrome P450 demethylation reactions // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1993**. Vol. 44. P. 367—373.

**Krasnow J. S., Hickey G. J., Richards J. A.** Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin // *Molec. Endocrinol.* **1990**. Vol. 4. P. 13—21.

**Kristensen V. N., Andersen T. I., Lindblom A., Erikstein B., Magnus P., Borresen-Dale A. L.** A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer // *Pharmacogenetics.* **1998**. Vol. 8. P. 43—48.

**Krotkiewski M., Bjorntorp P.** Muscle tissue in obesity with different distribution of adipose tissue. Effects of physical training // *Intern. J. Obesity.* **1986**. Vol. 10. P. 331—341.

**Labrie F.** Intracrinology. At the cutting edge // *Molec. and Cell. Endocrinol.* **1991**. Vol. 78. P. C113—C118.

**Labrie F.** Structure, regulation, and role of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues // *Baillieres Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1994**. Vol. 8. P. 451—474.

**Lawrence C., Tessaro I., Durgerian S., Caputo Th., Richard R., Jacobson H., Greenwald P.** Smoking, body weight, and early-stage endometrial cancer // *Cancer.* **1987**. Vol. 59. P. 1665—1669.

**Lea C. K., Ebrahim H., Tennant S., Flanagan A. M.** Aromatase cytochrome P450 transcripts are detected in fractured human bone but not in normal skeletal tissue // *Bone.* **1997**. Vol. 21. P. 433—440.

**Leek R. D., Lewis C. E., Whitehouse R., Greenall M., Clarke J., Harris A. L.** Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma // *Cancer Res.* **1996**. Vol. 56. P. 4625—4629.

**Lelong J. C., Adam L., Guillot C., Sontton B., Lefebvre M. F., Saez S., Crepin M.** Breast fibroblast and epithelial cell interaction in cocultures // *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **1993**. Vol. 34. P. 578.

**Lephart E. D.** A review of brain aromatase cytochrome P450 // *Brain Res. Rev.* **1996**. Vol. 22. P. 1—26.

**Levi F., LaVecchia C., Decarli A.** Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer // *Eur. J. Cancer.* **1987**. Vol. 23. P. 1025—1028.

**Levin S., Mullens R., jr.** Estrogen administered neonatally affects adult behavior in male and female rats // *Science.* **1964**. Vol. 144. P. 185—187.

**Levitz M., Young B. K.** Estrogens in pregnancy // *Vitam. Hormones.* **1977**. Vol. 35. P. 109—143.

**Lichtensteiger W., Von Ziegler N. I.** Regional, sex-dependent asymmetries of brain aromatase activity during pre- and postnatal development of the rat // *Neuroendocrinol. Lett.* **1991**. Vol. 13. P. 194—197.

**Liehr J. G., Ricci M. J.** 4-hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* **1996**. Vol. 93. P. 3294—3296.

**Liehr J. G., Stancel G. M., Chorich L. P., Bousfield G. R., Ulubelen A. A.** Hormonal carcinogenesis: separation of estrogenicity from carcinogenicity // *Chem. Biol. Interact.* **1986**. Vol. 59. P. 173—184.

**Lipton A., Santen R. J., Santner S. J., Harvey H. A., Feil P. D., Antle C. E.** Aromatase activity in primary and metastatic human breast cancer // *Cancer.* **1987**. Vol. 59. P. 779—782.

**Lipton A., Santen R. J., Santner S. J.** Correlation of aromatase activity with histological differentiation of breast cancer. A morphometric analysis // *Breast Cancer Res. Treatment.* 1988. Vol. 12. P. 31—35.

**Lipton A., Santen R. J., Santner S. J., Harvey H. A., Sanders S. I., Matthews Y. L.** Prognostic value of breast cancer aromatase // *Cancer.* 1992. Vol. 70. P. 1951—1955.

**Lobo J. O., Bellino F. L., Bankert L.** Estrogen synthetase activity in human term placental cells in monolayer culture // *Endocrinology.* 1985. Vol. 116. P. 889—893.

**Longcope C.** Methods and results of aromatization studies in vivo // *Cancer Res.* 1982. Suppl. 42. P. 3307S—3311S.

**Longcope C.** Peripheral aromatization: studies on controlling factors // *Steroids.* 1987. Vol. 50. P. 253—267.

**Longcope C., Baker S.** Androgen and estrogen dynamics: relationship with age, weight, and menopausal status // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1993. Vol. 76. P. 601—604.

**Longcope C., Kato T., Horton R.** Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women // *J. Clin. Invest.* 1969. Vol. 48. P. 2191—2201.

**Longcope C., Pratt J. H., Schneider S. H., Fineberg S. E.** Aromatization of androgens by muscle and adipose tissue in vivo // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1978. Vol. 46. P. 146—152.

**Longcope C., Abend S., Braverman L. E., Emerson C. H.** Androstenedione and estrone dynamics in hypothyroid women // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1990. Vol. 70. P. 903—907.

**Lønning P. E.** Pharmacology of new aromatase inhibitors // *Breast.* 1996. Vol. 5. P. 202—208.

**Lønning P. E., Johannessen D. C., Thorsen T., Ekse D.** Effects of aminoglutethimide on plasma estrone sulfate not caused by aromatase inhibition // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1989. Vol. 33. P. 541—545.

**Lønning P. E., Dowsett M., Powles T. J.** Postmenopausal oestrogen synthesis and metabolism: alterations caused by aromatase inhibitors used for the treatment of breast cancer // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1990. Vol. 35. P. 355—366.

**Lønning P. E., Johannessen D. C., Lien E. A., Adlercreutz H.** Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1995. Vol. 52. P. 491—496.

**Lu Q., Nakamura J., Savinov A., Yue W., Weisz J., Dabbs D. J., Wolz G., Brodie A.** Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. P. 3061—3068.

**Lueprasitsakul P., Longcope C.** Aromatase activity of human adipose tissue stromal cells: effects of thyroid hormones and progestogens // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1990. Vol. 194. P. 337—341.

**Macaulay V. M., Nicholls J. E., Gledhill J., Dowsett M.** Biological effects of stable overexpression of aromatase in human hormone-dependent breast cancer cells // *Brit. J. Cancer.* 1994. Vol. 69. P. 77—83.

**MacDonald P. C., Rombaut R., Siiteri P. K.** Plasma precursors of estrogen. I. Extent of conversion of plasma 4-androstenedione to estrone in normal males, castrate and adrenalectomized females // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1967. Vol. 27. P. 1103—1111.

**MacDonald P. C., Edman C. D., Hemsell D. L., Porter J. C., Siiteri P. K.** Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1978. Vol. 130. P. 448—454.

**MacLusky N. J., Voit R., Lazo J. S., Naftolin F.** Aromatase activity in human ovarian cancer // *Steroids.* 1987. Vol. 50. P. 423—433.

**Mahendroo M. S., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 19463—19470.

**Mantovani A., Botazzi B., Colotta F., Sozzani S., Ricco L.** The origin and function of tumor associated macrophages // *Immunol. Today.* 1992. Vol. 13. P. 265—270.

- Markus R., Feldman D., Kelsey J.** Osteoporosis. San Diego: Acad. Press Inc., 1996. 1373 p.
- Martucci C. P., Fishman J.** P450 enzymes of estrogen metabolism // *Pharmacol. Ther.* 1993. Vol. 57. P. 237—257.
- Masamura S., Adlercreutz H., Harvey H., Lipton A., Demers L., Santen R. J., Santner S. J.** Aromatase inhibitor development for treatment of breast cancer // *Breast Cancer Res. Treatment.* 1994. Vol. 33. P. 19—26.
- Masamura S., Santner S. J., Heitjan D. F., Santen R. J.** Estradiol deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1995. Vol. 80. P. 2918—2925.
- Masamura S., Santner S. J., Gimotty P., George J., Santen R. J.** Mechanism for maintenance of high breast tumor estradiol concentrations in the absence of ovarian function: role of very high affinity tissue uptake // *Breast Cancer Res. Treatment.* 1997. Vol. 42. P. 215—226.
- Matsumine H., Hirato K., Yanaihara T., Tamada T., Yoshida M.** Aromatization by skeletal muscle // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1986. Vol. 63. P. 717—720.
- Matzkin H., Soloway M. S.** Immunohistochemical evidence of the existence and localization of aromatase in human prostatic tissues // *Prostate.* 1992. Vol. 21. P. 309—314.
- May J. V., Schomberg D. W.** Granulosa cell differentiation in vitro: effect of insulin on growth and functional integrity // *Biol. Reprod.* 1981. Vol. 25. P. 421—431.
- McPhaul M. J., Herbst M. A., Matsumine H., Young M., Lephart E. D.** Diverse mechanisms of control of aromatase gene expression // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 341—346.
- McPheron A. C., Lawler A. M., Lee S. J.** Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member // *Nature.* 1997. Vol. 387. P. 83—86.
- Means G. D., Mahendroo M. S., Corbin C. J., Mathis J. M., Powell F. E., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 19385—19391.
- Mendelson C. R., Simpson E. R.** Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells in vitro // *Molec. and Cell. Endocrinol.* 1987. Vol. 52. P. 169—176.
- Mendelson C. R., Corbin C. J., Smith M. E., Smith J., Simpson E. R.** Growth factor suppress and phorbol ester potentiate the action of dibutyl adenosine 3',5'-monophosphate to stimulate aromatase activity of human adipose stromal cells // *Endocrinology.* 1986. Vol. 118. P. 968—973.
- Mendelson C. R., Means G. D., Mahendroo M. S., Simpson E. R.** Use of molecular probes to study regulation of aromatase cytochrome P-450 // *Biol. Reprod.* 1990. Vol. 42. P. 1—10.
- Michael M. D., Simpson E. R.** A CRE-like sequence in promoter II is necessary for cyclicAMP-induced transcription of the human aromatase (CYP19) gene in the ovary // *Proc. 10th Intern. Congr. Endocrinol. California,* 1996. OR 27-8.
- Michels K. B., Trichopoulos D., Robins J. M., Rossner B. A., Manson J., Hunter D. J., Colditz G. A., Hankinson S. E., Speizer F. E., Willett W. C.** Birthweight as a risk factor for breast cancer // *Lancet.* 1996. Vol. 348, N 9041. P. 1542—1546.
- Michnovicz J. J., Bradlow H. L.** Dietary and pharmacological control of estradiol metabolism in humans // *Ann. NY Acad. Sci. (USA).* 1990. Vol. 595. P. 291—298.
- Michnovicz J. J., Hershcopf R. J., Hally N. P., Bradlow H. L., Fishman J.** Cigarette smoking alters hepatic estrogen metabolism in men: implications for atherosclerosis // *Metabolism.* 1989. Vol. 38. P. 537—541.
- Milewich L., Whisenant M. G., Sawyer M. K.** Androstenedione metabolism by human lymphocytes // *J. Steroid Biochem.* 1982. Vol. 16. P. 81—85.
- Milewich L., Kaimal V., Toews G. B.** Androstenedione metabolism in human alveolar macrophages // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1983. Vol. 56. P. 920—924.
- Milewich L., Kaimal V., Johnson A. R.** Steroid 5 $\alpha$ -reductase activity in endothelial cells from human umbilical cord vessels // *J. Steroid Biochem.* 1987. Vol. 26. P. 561—567.
- Miller W. R.** In vitro and in vivo effects of 4-hydroxyandrostenedione on steroid and tumour metabolism // 4-hydroxyandrostenedione — a new approach to hormone-dependent cancer / Eds R. C. Coombes, M. Dowsett. London, 1991. P. 45—49.

- Miller W. R. Estrogen and breast cancer. Austin: R. G. Landes Comp., 1996a. 207 p.
- Miller W. R. Aromatase inhibitors // *Endocrine-Related Cancer*. 1996b. Vol. 3. P. 65—79.
- Miller W. R. Letrozole: a potent inhibitor of tumour aromatase // *Eur. Cancer Conf. (ECCO 9): Satellite Symp. «Aromatase inhibitors»*. Hamburg, 1997. P. 6.
- Miller W. R., Mullen P. Factors influencing aromatase activity in the breast // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 597—604.
- Miller W. R., O'Neill J. The importance of local synthesis of estrogen within the breast // *Steroids*. 1987. Vol. 50. P. 537—548.
- Miller W. R., Anderson T. J., Jacic W. J. L. Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics, and response to therapy // *J. Steroid Biochem.* 1990. Vol. 37. P. 1055—1059.
- Miller W. R., Hawkins R. A., Mullen P., Sourdain P., Telford J. Aromatase inhibition: determinants of response and resistance // *Endocrine-Related Cancer*. 1995. Vol. 2. P. 73—85.
- Mizutani T., Nishikawa Y., Adachi H., Enomoto T., Ikegami H. Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1994. Vol. 78. P. 950—954.
- Mor G., Yue W., Santen R. J., Gutierrez L., Eliza M., Berstein L. M., Harada N., Wang J., Lysiak J. J., Diano S., Naftolin F. Macrophages, estrogen, and the micro-environment of breast cancer // *Cancer Res*. 1998.
- Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L. Two types of murine helper T-cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins // *J. Immunol.* 1986. Vol. 136. P. 2348—2357.
- Murray C. J. L., Lopez A. D. Alternate projections of mortality and disability by cause in 1990—2020: global burden of disease study // *Lancet*. 1997. Vol. 349. P. 1498—1504.
- Murray P. A., Gomm J., Ricketts D., Powles T., Coombes R. C. The effect of endocrine therapy on the levels of oestrogen and progesterone receptors and transforming growth factor-beta 1 in metastatic human breast cancer: an immunocytochemical study // *Eur. J. Cancer*. 1994. Vol. 30A. P. 1218—1222.
- Naeye R. L., Tafari N. Risk factors in pregnancy and diseases of the fetus and newborn. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1983. 347 p.
- Naftolin F. Brain aromatization of androgens // *J. Reprod. Med.* 1994. Vol. 39. P. 257—261.
- Naftolin F., Ryan K. J., Davies T. J., Reddy V. V., Flores F., Petro Z., Wolin L. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues // *Rec. Progr. Horm. Res.* 1975. Vol. 31. P. 295—319.
- Nagamani M., Stuart Ch. A., Doberty M. G. Increased steroid production by the ovarian stromal tissue of postmenopausal women with endometrial cancer // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1992. Vol. 74. P. 172—177.
- Naitoh K., Honjo H., Yamamoto T., Urabe T. Estrone sulfate and sulfatase activity in human breast cancer and endometrial cancer // *J. Steroid Biochem.* 1989. Vol. 33. P. 1049—1054.
- Nankin H. R., Lin T., Clark R. V. Disorders of male reproductive function // *Diagnostic Endocrinology* / Eds W. T. Moore, R. C. Eastman. Toronto, Philadelphia: B. C. Decker Inc., 1990. P. 247—281.
- Nawata H., Tanaka S., Tanaka S., Haji M. Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1995. Vol. 53. P. 165—174.
- Negri Cesi P., Poletti A., Celotti F. Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 $\alpha$ -reductase and aromatase in brain differentiation and functions // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1996. Vol. 58. P. 455—466.
- Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W. The P450 superfamily: Update of new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature // *DNA Cell Biol.* 1993. Vol. 12. P. 1—51.
- Nestler J. E. Insulin-like growth factor-II is a potent inhibitor of the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts // *Endocrinology*. 1990. Vol. 127. P. 2064—2070.

- Nestler J. E.** IL-1 stimulates the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts // *Endocrinology*. **1993a**. Vol. 132. P. 566—570.
- Nestler J. E.** Sex hormone-binding globulin: a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1993b**. Vol. 76. P. 273—275.
- Neveu P. J., LeMoal M.** Physiological basis for neuroimmunomodulation // *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1990**. Vol. 4. P. 281—305.
- Newbold R. R., Jellinck P. H., Metzler M., McLachlan J. A.** Ontogeny of peroxidase activity in epithelium and eosinophils of mouse uterus // *Teratog., Carcinog., Mutag.* **1991**. Vol. 11. P. 267—278.
- Newton C. J., Samuel D. L., James V. H. T.** Aromatase activity and concentration of cortisol, progesterone, and testosterone in breast and abdominal adipose tissue // *J. Steroid Biochem.* **1986**. Vol. 24. P. 1033—1040.
- Nimrod A., Ryan R.** Aromatization of androgens by human abdominal and breast fat tissue // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1975**. Vol. 40. P. 367—372.
- Noble L. S., Simpson E. R., Johns A., Bulun S.** Aromatase expression in endometriosis // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1996**. Vol. 81. P. 174—179.
- Noguchi T., Kitawaki J., Tamura T., Kim T., Kanno H., Okada H.** Relationship between aromatase activity and steroid receptor levels in ovarian tumors from postmenopausal women // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1993**. Vol. 44. P. 657—660.
- Nyholm H., Djursing H., Hagen C., Svenstrup B.** Androgens and estrogens in postmenopausal insulin-treated diabetic women // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1989**. Vol. 69. P. 946—949.
- Oin Ke-nan, Fisher C. R., Grumbach M., Morishima A., Simpson E. R.** Aromatase deficiency in a male subject: characterization of a mutation in the CYP19 gene in an affected family // *Proc. 10th Intern. Congr. Endocrinol. California*, **1996**. P3-27.
- Okatani Y., Morioka N., Wakatsuki A., Nakano Y., Sagara Y.** Role of the free radicals scavenger system in aromatase activity of the human ovary // *Hormone Res.* **1993**. Vol. 39, suppl. 1. P. 22—27.
- Olsen N. J., Kovacs W. J.** Gonadal steroids and immunity // *Endocrine Rev.* **1996**. Vol. 17. P. 369—384.
- Om A. S., Chung K. W.** Dietary zinc deficiency alters 5-alpha-reduction and aromatization of testosterone and androgen and estrogen receptors in rat liver // *J. Nutr.* **1996**. Vol. 126. P. 842—848.
- Onami S., Matsuyama S., Nishihara M., Takakashi M.** Splenic macrophages can modify steroidogenesis of Leydig cells // *Endocrine J.* **1996**. Vol. 43. P. 477—486.
- O'Neill J. S., Miller W. R.** Aromatase activity in breast adipose tissue from women with benign and malignant breast diseases // *Brit. J. Cancer.* **1987**. Vol. 56. P. 601—605.
- O'Neill J. S., Elton R. A., Miller W. R.** Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site // *Brit. Med. J.* **1988**. Vol. 296. P. 741—748.
- Osawa Y., Higashiyama T.** Aromatase and its regulation // *Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis* / Eds M. J. Coon et al. New York: Acad. Press, **1988**. Vol. 1. P. 225—228.
- Osawa Y., Higashiyama T., Shimizu Y., Yarborough C.** Multiple functions of aromatase and the active site structure; aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase // *J. Steroid Biochem.* **1993**. Vol. 44. P. 469—480.
- Osawa Y., Higashiyama T., Yarborough C.** Formation of 6 $\alpha$ -hydroxyestradiol from estradiol by aromatase // *Proc. 77th Annual Endocrine Soc. (USA) Meet. Washington*, **1995**. OR 31-6.
- Othman Y. S. H., Oakey R. E.** Why so much oestriol? A comparison of the aromatization of androstenedione and 16 $\alpha$ -hydroxyandrostenedione when incubated alone or together with human placental microsomes // *J. Endocrinol.* **1996**. Vol. 148. P. 399—408.
- Pacifici R., Brown C., Puscheck E., Friedrich E., Slatopolsky E., Avioli L. V.** Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. **1991**. Vol. 88. P. 5134—5138.
- Parfitt A. M.** Quantum concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis // *Calcif. Tissue Int.* **1979**. Vol. 28. P. 1—5.

**Pasanen M., Pelkonen O.** Human placental xenobiotic and steroid biotransformation: relation to maternal cigarette smoking // *Drug Metabol. Rev.* 1989. Vol. 21. P. 427—461.

**Pasqualini J. R., Chetrite G., Nguyen B. L.** Estrone sulfate-sulfatase and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: a hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1995. Vol. 53. P. 407—412.

**Pasqualini J. R., Chetrite G., Blacker C., Feinstein M.-C., Delalonde L., Talbi M., Maloche C.** Concentrations of estrone, estradiol and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996. Vol. 81. P. 1460—1464.

**Pathology of tumours in laboratory animals.** Vol. 1. Tumours of the rat. 2nd ed. / Eds V. S. Turusov, U. Mohr. Lyon: IARC, 1990. 748 p. (IARC Sci. Publ.; N 99).

**Penning T. M.** 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase: inhibitors and inhibitor design // *Endocrine-Related Cancer.* 1996. Vol. 3. P. 41—56.

**Perel E., Stolee K. H., Kharlip L., Blackstein M. E., Killinger D. W.** The intracellular control of aromatase activity by 5-alpha-reduced androgens in human breast carcinoma cells in culture // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1984. Vol. 58. P. 467—472.

**Perel E., Daniilescu D., Kindler S., Killinger D. W., Kharlip L.** The formation of 5-alpha-reduced androgens in stromal cells from human breast adipose tissue // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1986. Vol. 62. P. 314—318.

**Perel E., Daniilescu D., Kharlip L., Blackstein M., Killinger D. W.** Steroid modulation of aromatase activity in human cultured breast carcinoma cells // *J. Steroid Biochem.* 1988. Vol. 29. P. 393—399.

**Petridou E., Panagioutopoulou K., Katsouyanni K., Spanos E., Trichopoulos D.** Tobacco smoking, pregnancy estrogens, and birth weight // *Epidemiology*, 1990. Vol. 1. P. 247—250.

**Petridou E., Katsouyanni K., Spanos E., Skaldikis Y., Trichopoulos D.** Pregnancy estrogens in relation to coffee and alcohol intake // *Ann. Epidemiol.* 1992. Vol. 2. P. 241—247.

**Pickles T., Perry L., Murray P., Plowman P.** 4-hydroxyandrostenedione — further clinical and extended endocrine observations // *Brit. J. Cancer.* 1990. Vol. 62. P. 309—313.

**Pike M. C.** Age-related factors in cancers of the breast, ovary and endometrium // *J. Chron. Dis.* 1987a. Vol. 40. P. 59s—69s.

**Pike M. C.** Endogenous hormones // *Cancer risk and prevention.* Oxford: Oxford Press, 1987b. P. 195—210.

**Poortman J., Thijssen J. H. H., Schwartz F.** Androgen production and conversion to estrogens in healthy postmenopausal women and in selected patients with breast cancer // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1973. Vol. 37. P. 101—104.

**Possinger K., Gershanovich M., Campos D., Romieu G., Lurie H.** Letrozole (Femara<sup>R</sup>), a new potent, selective aromatase inhibitor superior to aminoglutethimide in postmenopausal women with advanced breast cancer // *Eur. J. Cancer.* 1997. Vol. 33, suppl. 8. P. S145.

**Potischman N., Swanson Ch. A., Siiteri P., Hoover R.** Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status // *J. Nat. Cancer Inst.* 1996a. Vol. 88. P. 755—758.

**Potischman N., Hoover R., Brinton L. A., Siiteri P., Lurain J. R.** Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer // *J. Nat. Cancer Inst.* 1996b. Vol. 88. P. 1127—1135.

**Potter J., Cerhan J., Sellers T., McGovern P., Folsom A.** Risk factors for postmenopausal breast cancer differ according to joint progesterone and estrogen receptor status // *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 1993. Vol. 34. P. A1573.

**Prefontaine M., Shih C., Pan C. C., Bhavnani B. R.** Applicability of product isolation and the radiometric aromatase assays for the measurement of low levels of aromatase: lack of the aromatase activity in the human endometrium // *J. Endocrinol.* 1990. Vol. 127. P. 539—551.

**Price T., Aitken J., Head J., Mahendroo M., Simpson E.** Determination of aromatase cytochrome P450 mRNA in human breast tissue by competitive PCR amplification // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1992. Vol. 74. P. 1247—1252.

- Purohit A., Lai L. C., Singh A., James V. H. T.** The effect of MPA on aromatase and DNA polymerase- $\alpha$  activities in breast tumours // *J. Steroid Biochem.* **1989.** Vol. 34. P. 443—446.
- Purohit A., Flanagan A. M., Reed M. J.** Estrogen synthesis by osteoblast cell lines // *Endocrinology.* **1992.** Vol. 131. P. 2027—2029.
- Purohit A., Ghilchik M. W., Duncan L., Wang D., Reed M. J.** Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1995.** Vol. 80. P. 3052—3058.
- Quinn M. A., Campbell J. J., Murray R.** Tamoxifen and aminoglutethimide in the management of patients with advanced endometrial carcinoma not responsive to medroxyprogesterone // *Austral. N. Z. J. Obstet. and Gynecol.* **1981.** Vol. 21. P. 226—229.
- Raats J. I., Falkson G., Falkson H. C.** A study of fadrozole, a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women with advanced metastatic breast cancer // *J. Clin. Oncol.* **1992.** Vol. 10. P. 111—116.
- Rahima A., Bruce N. W.** Fetal and placental growth in young, primiparous and old, multiparous rats // *Experim. Gerontol.* **1987.** Vol. 22. P. 257—261.
- Raisz L. G.** Estrogen and bone: new pieces to the puzzle // *Nat. Med.* **1996.** Vol. 2. P. 1077—1079.
- Randolph J. F., Kipersztok S., Ayers J. W. T., Ansbacher R., Peegel H., Menon K. M. J.** The effect of insulin and aromatase activity in isolated human endometrial glands and stroma // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* **1987.** Vol. 157. P. 1534—1539.
- Reaven G. M.** Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes.* **1988.** Vol. 37. P. 1595—1607.
- Recchione C., Venturelli E., Manzari A., Cavalerri A., Martinetti A., Secreto G.** Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol levels in postmenopausal breast cancer tissue // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1995.** Vol. 52. P. 541—546.
- Reddy V. V. R., Naftolin F., Ryan K. J.** Aromatization in the central nervous system of rabbits: effects of castration and hormone treatment // *Endocrinology.* **1973.** Vol. 92. P. 589—594.
- Reed M. J.** The discriminant-function test: a marker of Th1/Th2 cell cytokine secretion and breast tumour oestrogen synthesis // *Molec. Med. Today.* **1995.** Vol. 1. P. 98—103.
- Reed M. J., Purohit A.** Breast cancer and the role of cytokines in regulation of estrogen synthesis: an emerging hypothesis // *Endocrine Rev.* **1997.** Vol. 18. P. 701—715.
- Reed M. J., Hutton J. D., Baxendale P. M., Goodall A. B., Fern M., James V. H. T.** Plasma hormone levels and the conversion of androstenedione to oestrone in women with endometrial cancer // *J. Endocrinol.* **1978.** Vol. 79. P. 54—55.
- Reed M. J., Beranek P. A., Frank S., James V. H. T.** The effect of glucocorticoids on the in vivo conversion of androstenedione to estrone // *Hormone Metabol. Res.* **1986.** Vol. 18. P. 635—637.
- Reed M. J., Lai L. C., Owen A. M., Singh A., Coldham N. G., Purohit A., James V. H. T.** Effect of treatment with 4-hydroxyandrostenedione on the peripheral conversion of androstenedione to estrone and in vitro tumor aromatase activity in postmenopausal women with breast cancer // *Cancer Res.* **1990.** Vol. 50. P. 193—196.
- Reed M. J., Aherne G. W., Ghilchick M. W., Patel S., Chakraborty J.** Concentrations of oestrone and 4-hydroxyandrostenedione in malignant and normal breast tissues // *Intern. J. Cancer.* **1991a.** Vol. 49. P. 562—565.
- Reed M. J., Singh A., Ghilchik M., Coldman N. G., Purohit A.** Regulation of oestradiol 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in breast tissues: the role of growth factors // *J. Steroid Biochem.* **1991b.** Vol. 39. P. 791—798.
- Reed M. J., Purohit A., Singh A., Roberts C. J., Potter B. V. L.** The role of cytokines, and sulphatase inhibitors in regulating oestrogen synthesis in breast tumours // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1995.** Vol. 53. P. 413—420.
- Reed M. J., Purohit A., Woo L. W. L., Potter B. V. L.** The development of steroid sulphatase inhibitors // *Endocrine-Related Cancer.* **1996.** Vol. 3. P. 9—23.
- Richelson L. S., Wahner H. W., Melton L. J., Riggs B. L.** Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss // *New Engl. J. Med.* **1984.** Vol. 311. P. 1273—1275.

**Rigaudiere N., Grizard G., Boucher D.** Aromatase activity in purified Leydig cells from adult rat. Comparative effects of insulin, IGF-I, and chorionic gonadotropin // *Acta endocrinol.* **1989.** Vol. 121. P. 677—685.

**Rizkallah T. H., Tovell H. M. M., Kelly W. G.** Production of estrone and fractional conversion of circulating androstenedione into estrone in women with endometrial cancer // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1975.** Vol. 40. P. 1045—1056.

**Robinson D., Friedman L., Marcus R., Tinklenberg J., Yesavage J.** Estrogen replacement therapy and memory in older woman // *J. Amer. Geriatr. Soc.* **1994.** Vol. 42. P. 919—922.

**Roncari D. A. K., Van R. L. R.** Promotion of human adipocyte precursor replication by 17 $\beta$ -estradiol in culture // *J. Clin. Invest.* **1977.** Vol. 62. P. 503—508.

**Rose D. P., Chlebowski R. T., Connolly J. M.** Effect of tamoxifen adjuvant therapy and a low-fat diet on serum sex-hormones binding proteins and estradiol bioavailability in postmenopausal breast cancer patients // *Cancer Res.* **1992.** Vol. 52. P. 5386—5390.

**Roselli C. E., Ellinwood W. E., Resko J. A.** Regulation of brain aromatase activity in rats // *Endocrinology.* **1984.** Vol. 114. P. 192—199.

**Rosenbaum M., Nicolson M., Hirsch J., Heymsfield S., Leibel R.** Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1996.** Vol. 81. P. 3424—3427.

**Ryde C. M., Nicholls J. E., Dowsett M.** Steroid and growth factor modulation of aromatase activity in MCF7 and T47D breast carcinoma cell lines // *Cancer Res.* **1992.** Vol. 52. P. 1411—1415.

**Sanghera M. K., Simpson E. R., McPhaul M. J., Kozlowski G., Conley A. J., Lephart E. D.** Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies // *Endocrinology.* **1991.** Vol. 129. P. 2834—2844.

**Santen R. J.** Perspectives for clinical use of aromatase inhibitors // *Proc. Bien. Intern. Breast Cancer Res. Conf. Miami, Fl., 1987.* P. A19.

**Santen R. J.** Estrogen synthesis inhibitors for breast cancer: an introductory overview // *Endocrine-Related Cancer.* **1996.** Vol. 3. P. 1—8.

**Santen R. J., Wells S. A.** The use of aminoglutethimide in the treatment of patients with metastatic carcinoma of the breast // *Cancer.* **1980.** Vol. 46. P. 1066—1068.

**Santen R. J., Santner S., Davis S., Veldhuis J., Samojlik E., Ruby E.** Aminoglutethimide inhibits extraglandular estrogen production in postmenopausal women with breast carcinoma // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1978.** Vol. 47. P. 1257—1265.

**Santen R. J., Samojlik E., Wells S. A.** Resistance of the ovary to blockade of aromatization with aminoglutethimide // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1980.** Vol. 51. P. 473—477.

**Santen R. J., Leszczynski D., Tilson-Mallett N., Feil P. D., Wright C., Manni A., Santner S. J.** Enzymatic control of estrogen production in human breast cancer: relative significance of aromatase versus sulfatase pathways // *Ann. NY Acad. Sci.* **1986.** Vol. 464. P. 126—137.

**Santen R. J., Santner S. J., Harvey H. A., Lipton A., Feil P. D., Manders E., Davis T. S.** Marked heterogeneity of aromatase activity in human malignant melanoma // *Eur. J. Cancer.* **1988.** Vol. 24. P. 1811—1816.

**Santen R. J., Martel J., Hoagland M., Naftolin F., Roa L., Harada N., Hafel L., Zaino R., Santner S.** Stromal spindle cells contain aromatase in human breast tumors // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1994.** Vol. 79. P. 627—632.

**Santner S. J., Kaseta J., Berstein L., Pauley R. J., Smith H., Santen R. J.** Regulation of aromatase in stromal cells from human breast cancer and peripheral breast tissue: effects of dexamethasone, phorbol esters and cAMP // *Proc. 77th Annual Endocrine Soc. (USA) Meeting. Washington, 1995.* P 2-654.

**Santner S. J., Pauley R. J., Tait L., Kaseta J., Santen R. J.** Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1997.** Vol. 82. P. 200—208.

**Sasano H., Nagura H., Harada N., Goukon Y., Kimura M.** Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders // *Hum. Pathol.* **1994.** Vol. 25. P. 530—535.

**Sasano H., Kaga K., Sato S., Yajima A., Nagura H., Harada N.** Aromatase cytochrome P450 gene expression in endometrial carcinoma // *Brit. J. Cancer.* 1996a. Vol. 76. P. 1541—1544.

**Sasano H., Kimura M., Shizawa S.** Aromatase and steroid receptors in gynecomastia and male breast cancer: an immunohistochemical study // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996b. Vol. 81. P. 3063—3067.

**Sawaya M. E., Price V. H.** Different levels of 5-alpha-reductase type I and II, aromatase, and androgen receptors in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia // *J. Invest. Dermatol.* 1997. Vol. 109. P. 296—300.

**Schade K., Schubert K.** Estrogen biosynthesis and its inhibition — a review // *Endocrinology.* 1979. Vol. 74. P. 90—100.

**Schieweck K., Bhatnagar A. S., Batzl Ch., Lang M.** Antitumor and endocrine effects of non-steroidal aromatase inhibitors on estrogen-dependent rat mammary tumors // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 633—636.

**Schindler A. E., Abert A., Fredrich E.** Conversion of androstenedione to estrogen by human fat tissue // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1972. Vol. 35. P. 627—629.

**Schmidt M., Renner C., Loffler G.** Aromatase induction by PDGF or serum fractions depends on the origin of human adipose tissue stromal cells // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California,* 1996. P. 26.

**Schneider J., Kirschner M. A., Berkowitz R., Ertel N. H.** Increased estrogen production in obese men // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1979. Vol. 48. P. 633—638.

**Schneider J., Bradlow H. L., Strain G., Levin J., Anderson K., Fishman J.** Effects of obesity on estradiol metabolism: decreased formation of nonuterotropic metabolites // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1983. Vol. 56. P. 973—978.

**Schweikert H. U., Wolf L., Romalo G.** Oestrogen formation from androstenedione in human bone // *Clin. Endocrinol.* 1995. Vol. 43. P. 37—42.

**Segal K. R., Dunaif A., Gutin B., Albu J.** Body composition, not body weight, is related to cardiovascular disease risk factors and sex hormone levels in men // *J. Clin. Invest.* 1987. Vol. 80. P. 1050—1055.

**Seidell J. C., Cigolini M.** Androgenicity in relation to body fat distribution // *J. Clin. Epidemiol.* 1990. Vol. 43. P. 21—35.

**Shen P.** An atlas of aromatase mRNA expression in the zebra finch brain // *J. Comp. Neurol.* 1995. Vol. 360. P. 172—184.

**Shimizu Y., Yarborough C., Osawa Y.** Competitive product inhibition of aromatase by natural estrogens // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 651—656.

**Shimozawa O., Sakaguchi M., Ogawa H., Harada N., Mihara K., Omura T.** Core glycosylation of cytochrome P-450 (arom) // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 21399—21402.

**Shozu M., Akasofu K., Harada T., Kubota Y.** A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1991. Vol. 72. P. 560—566.

**Shozu M., Takayama K., Zhao Y., Simpson E. R.** Hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase expression in human THP-1 cells // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California,* 1996. A-15.

**Shozu M., Zhao Y., Bulun S. E., Simpson E. R.** Multiple splicing events involved in regulation of human aromatase expression by a novel promoter, I.6 // *Endocrinology.* 1998. Vol. 139. P. 1610—1617.

**Siiteri P. K.** Review of studies on estrogen biosynthesis in the human // *Cancer Res.* 1982. Vol. 42, suppl. P. 3269S—3273S.

**Siiteri P. K., MacDonald P. C.** The utilization of circulating dehydroisoandrosterone sulfate for estrogen synthesis during human pregnancy // *Steroids.* 1963. Vol. 2. P. 713—717.

**Siiteri P. K., MacDonald P. C.** Role of extraglandular estrogens in human endocrinology // *Handbook of Physiology (USA).* 1973. Vol. 2, pt 1. P. 615—629.

**Siiteri P. K., Williams J. E., Takaki N. K.** Steroid abnormalities in endometrial and breast carcinoma: a unifying hypothesis // *J. Steroid Biochem.* 1976. Vol. 7. P. 897—903.

- Silva M. C., Rowlands M. G., Dowsett M., Gusterson B., McKinna J. A., Fryatt I., Coombes R. C.** Intratumoral aromatase as a prognostic factor in human breast carcinoma // *Cancer Res.* 1989. Vol. 49. P. 2588—2591.
- Simpson E. R., Merrill J. C., Hollub A. J., Graham-Lorence S., Mendelson C.** Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells // *Endocrine Rev.* 1989. Vol. 10. P. 136—148.
- Simpson E. R., Mahendroo M. S., Means G. D., Kilgore M., Bulun S.** Aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis // *Endocrine Rev.* 1994. Vol. 15. P. 342—355.
- Simpson E. R., Bulun S. E., Nichols J. E., Zhao Y.** Estrogen biosynthesis in adipose tissue: regulation by paracrine and autocrine mechanisms // *J. Endocrinol.* 1996. Vol. 150, suppl. P. S51—S58.
- Simpson E. R., Zhao Y., Bulun S. E., Mendelson C. R., Agarwal V. R.** Mesenchymal-epithelial interactions and breast cancer — role of local estrogen production. // *Endocrine-Related Cancer.* 1997. Vol. 4. P. 407—422.
- Singh A., Purohit A., Wang D. Y., Duncan M. W., Reed M. J.** IL-6sR: release from MCF-7 breast cancer cells and role in regulating of peripheral oestrogen synthesis // *J. Endocrinol.* 1995. Vol. 147. P. 9—12.
- Smith I. E., Harris A. L., Morgan M., Ford H. T., Gazet J. C.** Tamoxifen versus aminoglutethimide in advanced breast carcinoma: a randomized trial // *Brit. Med. J.* 1981. Vol. 283. P. 1432—1434.
- Snow R. C., Barbieri R. L., Frisch R. E.** Estrogen 2-hydroxylase oxidation and menstrual function among elite oarswomen // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1989. Vol. 69. P. 369—376.
- Sourdaine P., Parker M. G., Telford J., Miller W. R.** Analysis of the aromatase cytochrome P450 gene in human breast cancer // *J. and Molec. Endocrinol.* 1994. Vol. 13. P. 331—337.
- Sourdaine P., Mullen P., White R., Telford J., Parker M. G., Miller W. R.** Aromatase activity and CYP19 gene expression in breast cancers // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1996. Vol. 59. P. 191—198.
- Southren A. L., Olivo J., Gordon G. G., Vittek J., Brener J., Rafii F.** The conversion of androgens to estrogens in hyperthyroidism // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1974. Vol. 38. P. 207—214.
- Spearrow J. L., Bergeron L., Hung F., Chien P., Tran M., Welsh J., Barkley M.** Mapping genes controlling differences in hormone-induced aromatase activity to mouse chromosome 2 // *Proc. 10th Intern. Congr. Endocrinol. California, 1996.* P. 732a.
- Spink D. C., Hayes C. L., Young N. R., Sutter T. R.** The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17-beta-estradiol 4-hydroxylase // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1994. Vol. 51. P. 251—258.
- Spratt D., Loughlin J.** The hypothalamic-pituitary-ovarian axis // *Diagnostic Endocrinology / Eds W. T. Moore, R. C. Eastman.* Toronto, Philadelphia: B. C. Decker Inc., 1990. P. 227—245.
- Spratt D. I., Lapp P. R., Nye L., Longcope C.** Peripheral aromatization is markedly increased during critical illness // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California, 1996.* P. 26.
- Stack D. E., Byun J., Gross M. L., Rogan E. G., Cavaliere E. L.** Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. Vol. 9. P. 851—859.
- Steiner R.** Aromatase inhibitors with angiostatic activity // *Proc. Ann. Meet. Amer. Assoc. Cancer Res.* 1992. Vol. 33. P. A590.
- Stolk R. P.** Hyperinsulinemia and bone mineral density in an elderly population: the Rotterdam study // *Bone.* 1996. Vol. 18. P. 545—549.
- Stoll B. A.** Diet and exercise regimens to improve breast carcinoma prognosis // *Cancer.* 1996. Vol. 78. P. 2465—2470.
- Stone N., Fair W. R., Fishman J.** Estrogen formation in human prostatic tissue from patients with and without benign prostatic hyperplasia // *Prostate.* 1986. Vol. 9. P. 311—318.
- Stratakis C. A., Brodie A., DeAtkine D., Vottero A., Chrousos G. P.** The syndrome of increased aromatase activity causes isosexual precocious puberty in girls and

prepubertal gynecomastia in boys // *Proc. 10th Intern. Congr. Endocrinol. California, 1996*. P. 732b.

**Stratakis C. A., Vottero A., Brodie A., Kirschner L. S., DeAtkine D., Lu Q., Yue W., Mitsiades C., Flor A. W., Chrousos G. P.** The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant P<sub>450</sub> aromatase gene transcription // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1998**. Vol. 83. P. 1348—1357.

**Suzuki N., Yano T., Nakazawa N., Yoshikawa H., Taketani Y.** A possible role of estrone produced in adipose tissues in modulating postmenopausal bone density // *Maturitas*. **1995**. Vol. 22. P. 9—12.

**Swinney D. C., Watson D. M., So O. Y.** Accumulation of intermediates and isotopically sensitive enolization distinguish between aromatase from rat ovary and human placenta // *Arch. Biochem. and Biophys.* **1993**. Vol. 305. P. 61—67.

**Taga S., Yoshida N., Sekiba K.** Distribution and cyclic changes of aromatase cytochrome P<sub>450</sub> activity in human uteri // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1990**. Vol. 37. P. 741—745.

**Tagatz G. E., Gurpide E.** Hormone secretion by the normal human ovary // *Handbook of Physiology / Eds S. Geiger et al. Bethesda, MD, Amer. Physiol. Soc.* **1973**. Vol. 2, pt 1. P. 603—614.

**Tanaka M., Yano S., Hasegawa Y., Nakao K.** Antiproliferative effect of the new aromatase inhibitor fadrozole on pre- and postmenopausal models of rat mammary tumor // *Arzneimittelforschung*. **1994**. Bd. 44. S. 774—778.

**Tanaka S., Haji M., Takayanagi R., Tanaka S., Sugioka Y., Hawata H.** 1.25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the enzymatic activity and expression of aromatase cytochrome P<sub>450</sub> mRNA synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts // *Endocrinology*. **1996**. Vol. 137. P. 1860—1869.

**Tang M. X., Jacobs D., Stern Y.** Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease // *Lancet*. **1996**. Vol. 348. P. 429—432.

**Tchoudakova A., Callard G. V.** Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P<sub>450</sub> aromatase isozymes in brain and ovary // *Endocrinology*. **1998**. Vol. 139. P. 2179—2189.

**Tekmal R. R., Durgam V. R.** The overexpression of int-5/aromatase a novel MMTV integration locus gene, is responsible for D2 mammary tumor cell proliferation // *Cancer Lett.* **1995**. Vol. 88. P. 147—155.

**Tekmal R. R., Durgam V. R.** A novel in vitro and in vivo breast cancer model for testing inhibitors of estrogen biosynthesis and its action using mammary tumor cells with an activated int-5/aromatase gene // *Cancer Lett.* **1997**. Vol. 118. P. 21—28.

**Tekmal R. R., Ramachandra N., Gubba S., Durgam V. R., Mantione J., Toda K., Shizuta Y., Dillehy D. L.** Overexpression of int-5/aromatase in mammary glands of transgenic mice results in the induction of hyperplasia and nuclear abnormalities // *Cancer Res*. **1996**. Vol. 56. P. 3180—3185.

**Telang N. T., Suto A., Wong G. Y., Osborne M. P., Bradlow H. L.** Induction by estrogen metabolite 16-alpha-hydroxyoestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells // *J. Nat. Cancer Inst.* **1992**. Vol. 84. P. 634—638.

**The occurrence of tumors in domestic animals** // NIH, NCI, Bethesda. **1980**. P. 210. (National Cancer Inst.; Monogr. N 54).

**Thijssen J. H. H., Blankenstein M. A.** Steroid hormones in the human breast // *Endocrine-Related Cancer*. **1994**. Vol. 1. P. 43—48.

**Thijssen J. H. H., Blankenstein M. A., Donker G. H., Daroszewski J.** Endogenous steroid hormones and local aromatase activity in the breast // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1991**. Vol. 39. P. 799—804.

**Thomas H. V., Key T. J., Allen D. S., Fentiman I., Wang D. Y.** A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in postmenopausal women on the island of Guernsey // *Brit. J. Cancer*. **1997**. Vol. 76. P. 401—405.

**Thompson E. A., Siiteri P. K.** Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione // *J. Biol. Chem.* **1974**. Vol. 249. P. 5364—5372.

**Tilson-Mallett N., Santner S. J., Feil P. D., Santen R. J.** Biological significance of aromatase activity in human breast tumors // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1983.** Vol. 57. P. 1125—1128.

**Toda K., Simpson E. R., Mendelson C. R., Shizuta Y., Kilgore M. W.** Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P-450 (CYP19) in fetal tissues // *Molec. Endocrinol.* **1994.** Vol. 8. P. 210—217.

**Toda K., Nomoto S., Shizuta Y.** Identification and characterization of transcriptional regulatory elements of the human aromatase cytochrome P-450 gene (CYP19) // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1996.** Vol. 56. P. 151—159.

**Toniolo P., Levitz M., Banerjee S., Strax Ph., Pasternak B. S.** A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women // *J. Nat. Cancer Inst.* **1995.** Vol. 87. P. 190—195.

**Tseng L.** Effect of estradiol and progesterone on human endometrial activity in primary cell culture // *Endocrinology.* **1984.** Vol. 115. P. 833—837.

**Tseng L., Mazella J., Chen G.** Effect of relaxin on aromatase activity in human endometrial stromal cells // *Endocrinology.* **1987.** Vol. 120. P. 2220—2226.

**Tsugaya M., Harada N., Tozawa K., Yamada Y.** Aromatase mRNA levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer // *Intern. J. Urol.* **1996.** Vol. 3. P. 292—296.

**Turner R. T., Riggs B. L., Spelsberg T. C.** Skeletal effects of estrogen // *Endocrine Rev.* **1994.** Vol. 15. P. 275—300.

**Utsumi T., Harada N., Maruta M., Takaji Y.** Presence of alternatively spliced transcripts of aromatase gene in human breast cancer // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* **1996.** Vol. 81. P. 2344—2349.

**Vanderschueren D., VanHerck E., DeCoster R., Bouillon R.** Aromatization of androgens is important for skeletal maintenance of aged male rats // *Calcif. Tissue Int.* **1996.** Vol. 59. P. 179—183.

**Veldhuis J. D., Kolp L. A., Toaff M. E.** Mechanisms subserving the trophic actions of insulin on ovarian cells: in vitro studies using swine granulosa cells // *J. Clin. Invest.* **1983.** Vol. 72. P. 1046—1057.

**Vermeulen A., Verdonck L.** Sex hormone concentrations in post-menopausal women // *Clin. Endocrinol.* **1978.** Vol. 9. P. 59—66.

**Vermeulen A., Deslypere J. P., Paridaens R., Leclercq G., Roy F., Heuson J. C.** Aromatase, 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and abnormal glandular breast tissue in postmenopausal women // *Eur. J. Cancer.* **1986.** Vol. 22. P. 515—525.

**Vermeulen-Meiners C., Jozsmann J. B., Haspels A. A., Poortman J., Thijsen J. H. H.** The endogenous concentration of estradiol and estrone in normal human postmenopausal endometrium // *J. Steroid Biochem.* **1984.** Vol. 21. P. 607—612.

**Vermeulen-Meiners C., Poortman J., Haspels A. A., Thijsen J. H. H.** The endogenous concentration of estradiol and estrone in pathological human postmenopausal endometrium // *J. Steroid Biochem.* **1986.** Vol. 24. P. 1073—1078.

**Vittek J., Altmann K., Gordon G. G., Southren A. L.** The metabolism of 7-alpha-<sup>3</sup>H-testosterone by rat mandibular bone // *Endocrinology.* **1974.** Vol. 94. P. 325—329.

**Vukanovic J., Isaacs J. T.** Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration within rat prostatic cancers // *Cancer Res.* **1995.** Vol. 55. P. 1499—1504.

**Wang C., Makeba T., Hase T., Adlercreutz H., Kurzer M. S.** Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* **1994.** Vol. 50. P. 205—212.

**Wang J., Chen S.** Identification of a promoter and a silencer at the 3'-end of the first intron of the human aromatase gene // *Molec. Endocrinol.* **1992.** Vol. 6. P. 1479—1488.

**Washida N., Yazawa P., Harada N.** Preparation of an activity-inhibiting monoclonal antibody against human placental aromatase cytochrome P450 // *Steroids.* **1996.** Vol. 61. P. 126—132.

**Watanabe K., Sasano H., Harada N., Ozaki M., Niikura H., Sato S., Yajima A.** Aromatase in human endometrial carcinoma and hyperplasia: immunohistochemical, in situ hybridization, and biochemical studies // *Amer. J. Pathol.* **1995.** Vol. 146. P. 491—500.

- Weigent D. A., Blalock J. E.** Interaction between neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors // *Immunol. Rev.* 1987. Vol. 100. P. 79—108.
- Weisz J., Brown B. L., Ward I. L.** Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses // *Neuroendocrinology.* 1982. Vol. 35. P. 374—379.
- Willett W. C., Trichopoulos D.** Nutrition and cancer: a summary of the evidence // *Cancer Causes Control.* 1996. Vol. 7. P. 178—180.
- Wilson R., Wilson T. A.** The fate of the nontreated postmenopausal women: a plea for the maintenance of adequate estrogen from puberty to the grave // *J. Amer. Geriatr. Soc.* 1963. Vol. 11. P. 347—362.
- Yager J. D., Liehr J. G.** Molecular mechanisms of oestrogen carcinogenesis // *Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* 1996. Vol. 36. P. 203—232.
- Yamada K., Harada N.** Expression of estrogen synthetase P450 aromatase during adipose differentiation of 3T3-L1 cells // *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1990. Vol. 169. P. 531—536.
- Yamaki J., Yamamoto T., Okada H.** Aromatization of androstenedione by normal and neoplastic endometrium of the uterus // *J. Steroid Biochem.* 1985. Vol. 22. P. 63—66.
- Yamamoto T., Kitawaki J., Urabe M., Honjo H., Tamura T., Noguchi T., Okada H., Yoshimata M.** Estrogen productivity of endometrium and endometrial cancer tissue; influence of aromatase on proliferation of endometrial cancer cells // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 463—468.
- Yates R. A., Dowsett M., Fisher G. V., Selen A., Wyld P. J.** Arimidex (ZD 1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers // *Brit. J. Cancer.* 1996. Vol. 73. P. 543—548.
- Yki-Jarvinen H., Koivisto V. A.** Effects of body composition on insulin sensitivity // *Diabetes.* 1983. Vol. 32. P. 965—969.
- Yoshida K., Shimada K., Saito N.** Expression of P-450 (17 $\alpha$ ) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonads before and after sexual differentiation // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1996. Vol. 102. P. 233—240.
- Young J., Bulun S. E., Agarwal V., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Aromatase expression in a feminizing adrenocortical tumor // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* 1996. Vol. 81. P. 3173—3176.
- Youngblood G. L., Nesbitt M. N., Payne A. H.** The structural genes encoding P450 scc and P450 arom are closely linked on mouse chromosome 9 // *Endocrinology.* 1989. Vol. 125. P. 2784—2786.
- Yue W., Santen R. J.** Aromatase inhibitors: rationale for use following antiestrogen therapy // *Seminars Oncol.* 1996. Vol. 23, suppl. 9. P. 21—27.
- Yue W., Zhou D. J., Chen S. A., Brodie A. M. H.** A new nude mouse model for postmenopausal breast cancer using MCF-7 cells transfected with the human aromatase gene // *Cancer Res.* 1994. Vol. 54. P. 5092—5095.
- Yue W., Wang J.-P., Hamilton C., Demers L., Santen R. J.** Estrogen produced in situ by breast tumors increases tissue estradiol level and tumor growth rate more than blood borne estradiol // *Proc. IV Intern. Aromatase Conf. Tahoe City, California,* 1996. P. B-3.
- Zaccheo T., Giudici D., DiSalle E.** Inhibitory effect of combined treatment with the aromatase inhibitor exemestane and tamoxifen on DMBA-induced mammary tumors in rats // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 677—680.
- Zhao Y., Nichols J. E., Bulun S. E., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Aromatase P-450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 16449—16457.
- Zhao Y., Nichols J. E., Valdez R., Mendelson C. R., Simpson E. R.** Tumor necrosis factor-alpha stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter I. 4 // *Molec. Endocrinol.* 1996. Vol. 10. P. 1350—1357.
- Zhou C. B., Zhou D. J., Esteban J., Murai J., Siiteri P. K., Wylczynski S., Chen S.** Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase mRNA by rt-polymerase chain reaction // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1996. Vol. 59. P. 163—172.

Zhou D., Wang J., Chen E., Murai J., Siiteri P. K., Chen S. Aromatase gene is amplified in MCF-7 human breast cancer cells // *J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.* 1993. Vol. 46. P. 147—153.

Zhu B. Th., Liehr J. G. Inhibition of the catechol-o-methyltransferase catalysed o-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by catecholamines: implication for the mechanism of estrogen-induced carcinogenesis // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1993. Vol. 304. P. 248—256.

Zhuang J. C., Wogan G. N. Genotoxicity associated with long term production of nitric oxide in activated murine macrophages // *Proc. AACR.* 1997. Vol. 38. P. 77.

Zondek B. Estrogenic hormone in the urine of the stallion // *Nature.* 1934. Vol. 133. P. 494.

Zumoff B., Strain G. W., Kream J., O'Connor J., Levin J., Fukushima D. K. Obese young men have elevated plasma estrogen levels but obese premenopausal women do not // *Metabolism.* 1981a. Vol. 30. P. 1011—1017.

Zumoff B., Strain G. W., Levin J., Fukushima D. K. Sex difference in the influence of obesity on the retention of a tracer of <sup>3</sup>H-estradiol // *Metabolism.* 1981b. Vol. 30. P. 568—573.