

УДК 577.152.199.1/175.64

Ясинська І. М., аспірант

Одеський державний університет, кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АКТИВНІСТЬ АРОМАТАЗИ ЗА ВПЛИВУ ГІДРОКОРТИЗОНУ ТА ГЕНІСТЕЇНУ

Встановлено, що гідрокортизон *in vitro* не впливає на активність ароматази (КФ 1.14.14.1), але активує її в яєчниках та матці щурів *in vivo*, можливо індукуючи експресію генів, що кодують цей фермент. Фітоестроген геністеїн у дослідях *in vitro* ізостерично інгібує ароматазу, а *in vivo*, крім того, знижує її вміст в яєчниках та матці щурів.

Ключові слова: ароматаза, гідрокортизон, геністеїн.

Цитохром Р450-ароматаза (ароматаза, або естрогенсинтаза, КФ 1.14.14.1) каталізує перетворення андростендіону на естрон та тестостерону на естрадіол, гідроксильючи субстрати в положеннях 19 (тричі) та 2 (одноразово), після чого відбувається неферментативна ароматизація першого циклу стероїдного ядра, яка супроводжується втратою 19-го вуглецевого атома у вигляді CO_2 та дегідратацією субстрату [8]. Для прояву каталітичної активності ароматази не потрібний електронтранспортний ланцюг, тобто флавопротеїд та адрендоксин. Фермент використовує у якості донора електронів та протонів безпосередньо $\text{NADPH} + \text{H}^+$ [8]. Встановлено, що глюкокортикоїд гідрокортизон у дослідях *in vivo* активує ароматазну реакцію, але досі невідомо, чи він впливає на ароматазу безпосередньо, чи активує експресію відповідних генів як дерепресор ДНК [9].

Висувалися гіпотези про можливе інгібування ароматази за участю фітоестрогенів, таких як ізофлавоноїди [7], але ці припущення досі не знайшли остаточного експериментального підтвердження. В зв'язку з цим механізми впливу цих сполук на ароматазну активність залишаються не з'ясованими.

Виходячи з вищенаведеного, дослідження впливу глюкокортикоїдів та ізофлавоноїдів на активність цитохрому Р450-ароматази та механізмів цього впливу викликає не тільки теоретичний, але й практичний інтерес, тому що інгібування ароматази гальмує проліферацію клітин злоякісних пухлин молочних залоз [6], а її активація важлива для профілактики маскулінізації у жінок [5].

Метою наведеної роботи є вивчення впливу глюкокортикоїду гідрокортизону та ізофлавоноїду геністеїну (4',5,7-тригідроксиізофлавонону) на активність ароматази в дослідях *in vitro* та *in vivo*.

Матеріали та методи

Дослідження впливу гідрокортизону та геністеїну на активність ароматази *in vitro* провадили на високоочищеному ферментному препараті з матки щурів. Використовували білих щурів лінії Вістар віком 7 місяців, що мали вагу 250 ± 20 г. Об'єктом для очищення ферменту було обрано матку, тому що саме в цьому органі,

а також в яєчниках ароматаза характеризується найвищою питомою активністю. Очищення ферменту провадили за описаною нами раніше методикою [3, 10], основаною на афінному осадженні ароматази на 16-метилтестостерон-агарозі після попереднього очищення, яке складається із екстракції ферменту з мікросом холатом натрію та осадження його ацетоном при -18°C . Активність ароматази визначали, як описано раніше [3, 4]. Про активність ароматази судили за кількістю $\text{NADPH} + \text{H}^+$, що окислюється ферментом у присутності 17-метилтестостерону протягом однієї хвилини на 1 мг білка. Для вивчення впливу гідрокортизону та геністеїну на активність ароматази в реакційні системи вносили відповідні агенти в кінцевих концентраціях: гідрокортизон — 1, 2, 4, 6, 8 та 10 мкМ, а геністеїн — 25, 50, 100, 250 та 500 мкМ, після чого визначали ароматазну активність при концентрації субстрату 6 мМ [3, 4]. Кінетику впливу цих агентів на активність ароматази визначали при концентраціях субстрату 0,5, 1, 2, 4 та 6 мМ.

Для вивчення *in vivo* впливу гідрокортизону та геністеїну на активність ароматази використовували дві групи (по 10 голів) однопоносних щурів-самок лінії Вістар у віці 3-х місяців та вагою 150 ± 20 г. Кожну групу тварин розподіляли на дві підгрупи (по 5 голів). Перша підгрупа в обох випадках була контрольною. Цим тваринам вводили по 0,2 мл персикової олії. Другій підгрупі в першому випадку вводили розчин гідрокортизону в дозі 20 мг на 1 кг ваги, а у другому — розчин геністеїну в дозі 500 мкг (як дуже сильного естрогену) на 1 кг ваги. Всі ін'єкції здійснювали внутрішньочеревинно з інтервалом в 24 години протягом трьох діб. Через дві години після останньої ін'єкції щурів декапітували та визначали ароматазну активність в гомогенатах матки та яєчників цих тварин [3, 4].

Статистичну обробку результатів провадили у відповідності з *t*-критерієм Стьюдента [2].

Результати досліджень

В ході очищення ароматази з матки щурів було отримано ферментний препарат, ступінь очищення ферменту в якому дорівнював 257 разів, а вихід — 23,3% (табл. 1). K_m очищеної ароматази дорівнює 0,5 мМ, а $V_{\max}$ — $1,25 \text{ мкмоль} \times \text{хв}^{-1}$ на 1 мг білка.

Таблиця 1

Очищення ароматази з матки щурів

Стадія очищення	Блок, мг	Загальна активність, нмоль/хв $\times$ 1 г тканини	Вихід ферменту, %	Питома активність, нмоль/хв $\times$ 1 мг білка	Ступінь очищення, разів
Гомогенат	888,8	771,7	100	3,4	0
Екстракція білків з мікросом холатом натрію	67,5	200,5	25,9	11,4	3,3
Осадження ацетоном	15,8	186,9	24,2	44,7	13
Афінне осадження	0,7	179,5	23,3	881,9	257,2

Дослідження впливу гідрокортизону на активність очищеної ароматази показали, що в концентраціях 1—10 мкМ він не впливає на ароматазну активність (рис. 1).

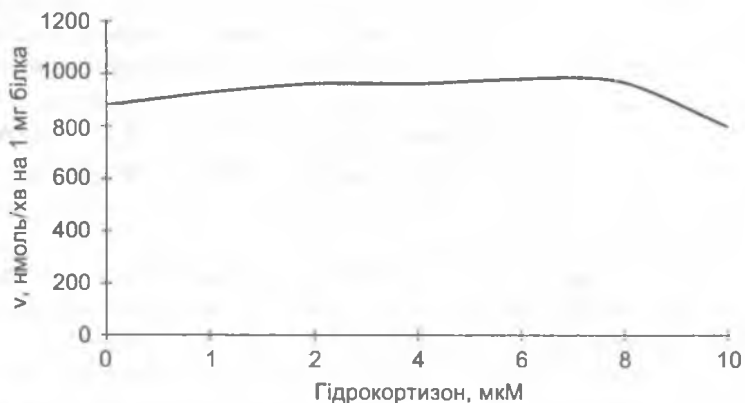


Рис. 1. Залежність швидкості ароматазної реакції від концентрації гідрокортизону в реакційній системі

Отже, в концентраціях, близьких до фізіологічних, і навіть у тих, що значно перевищують фізіологічні, гідрокортизон не змінює швидкість ароматазної реакції.

Дослідження впливу геністеїну на активність ароматази *in vitro* показали, що геністеїн інгібує ароматазу в концентраціях від 0,025 мМ та вище (рис. 2).

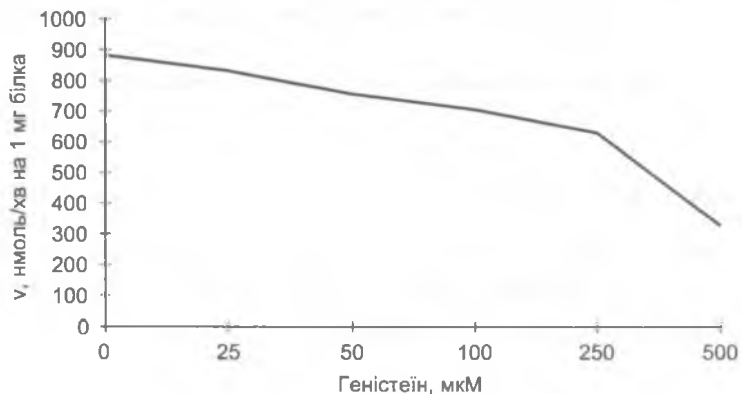


Рис. 2. Залежність швидкості ароматазної реакції від концентрації геністеїну в реакційній системі

Кінетику інгібування досліджували при концентрації геністеїна 0,25 мМ. Залежність швидкості ароматазної реакції від концентрації субстрату, що відображена в координатах Лайнуівера-Берка, свідчить про ізостеричне (конкурентне) інгібування ароматази геністеїном (рис. 3). Розрахована інгібіторна константа (K_i) [1]; вона складає — 229,8 мкМ. Отже, можна припустити, що геністеїн як конкурентний інгібітор попадає в активний центр ферменту, конкуруючи з субстратом за приєднання до нього.

В дослідях *in vivo* встановлено, що гідрокортизон в дозі 20 мг на 1 кг ваги тіла щурів підвищує ароматазну активність в яєчниках та матці щурів (таблиця 2).

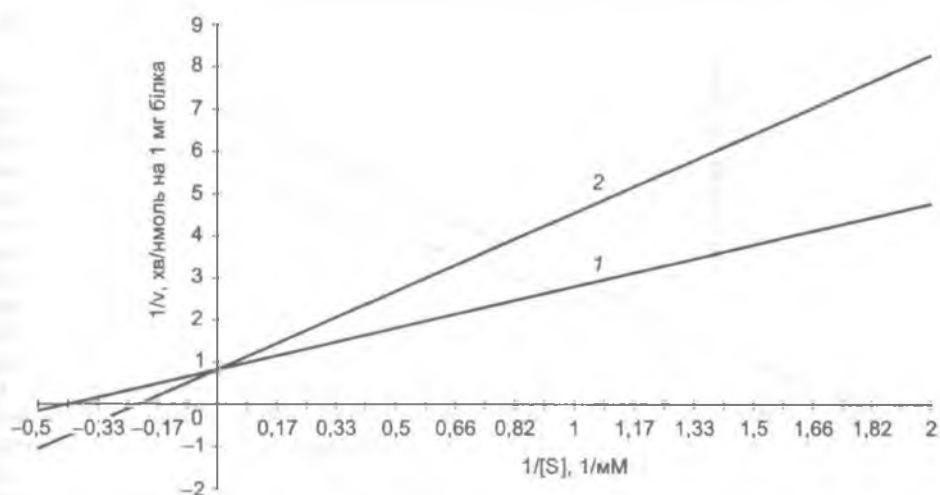


Рис. 3. Залежність швидкості ароматазної реакції від концентрації субстрату в координатах Лайнувера—Берка у відсутності інгібіторів (1) та у присутності 100 мкМ геністеїну (2)

Таблиця 2

Активність ароматази в яєчниках і матці контрольних та ін'єкованих гідрокортизоном щурів ($n = 5$)

Групи щурів	Активність ароматази, нмоль $\times$ хв ⁻¹ на 1 мг білка	
	матка	яєчники
Контрольна	28,6 $\pm$ 4,5	8,6 $\pm$ 1,5
Дослідна	49,3 $\pm$ 3,4*	38,3 $\pm$ 6,0*

Примітка: * — розбіжності достовірні у порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Тракувати цей результат, враховуючи те, що *in vitro* гідрокортизон не впливає на ароматазну активність, можна таким чином: гідрокортизон (як дерепресор ДНК) активує експресію генів, що кодують ароматазу, підвищуючи кількість її молекул у відповідних органах.

Геністеїн *in vivo* знижує активність ароматази в яєчниках та матці щурів (таблиця 3).

Таблиця 3

Активність ароматази в яєчниках і матці контрольних та ін'єкованих геністеїном щурів ($n = 5$)

Групи щурів	Активність ароматази, нмоль $\times$ хв ⁻¹ на 1 мг білка	
	матка	яєчники
Контрольна	18,2 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,03
Дослідна	9,0 $\pm$ 2,05*	1,05 $\pm$ 0,1*

Примітка: * — розбіжності достовірні у порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Для з'ясування механізму інгібування досліджували кінетику ароматазної реакції у відповідних органах щурів контрольної та дослідної груп (рис. 4, 5). Вста-

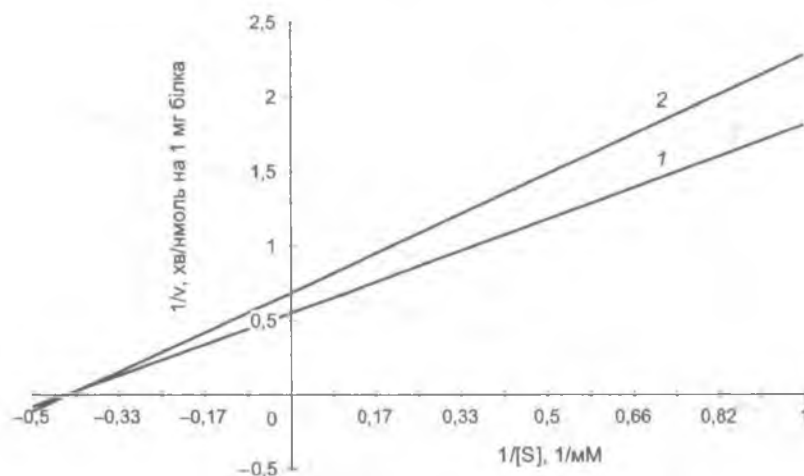


Рис. 4. Залежність швидкості ароматазної реакції від концентрації субстрату в гомогенатах яєчників контрольних (1) та ін'єкованих геністеїном (2) щурів в координатах Лайнувера—Берка

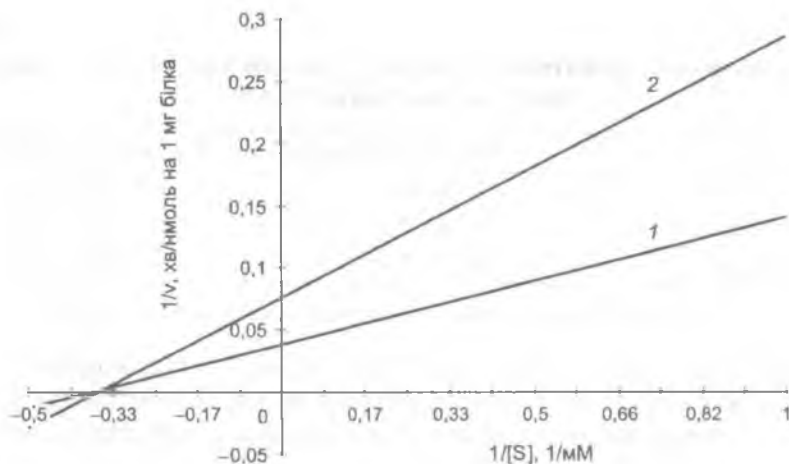


Рис. 5. Залежність швидкості ароматазної реакції від концентрації субстрату в гомогенатах матки контрольних (1) та ін'єкованих геністеїном (2) щурів в координатах Лайнувера—Берка

новили, що константа Міхаеліса в обох випадках однакова (0,51 мМ для матки та 0,5 мМ для яєчників), а $V_{\max}$ ароматази у щурів, що отримували геністеїн, значно нижча, ніж у контрольної групи (25 і 12,5 нмоль $\times$ хв $^{-1}$ на 1 мг білка, відповідно, для матки та 1,86 і 1,48 нмоль $\times$ хв $^{-1}$ на 1 мг білка, відповідно, для яєчників — рис. 4, 5). Ці кінетичні особливості переконують у тому, що ін'єкований щурам геністеїн призводить до зменшення вмісту ароматази в досліджуваних органах щурів. Відомо, що геністеїн є потужним естрогеном [7]. Тому можливо, що як естроген він інгібує експресію генів ферменту, який синтезує природні стероїдні естрогени — естрадіол та естрон. Таким чином, є підстави вважати, що геністеїн безпосередньо ізостерично інгібує ароматазу, а також гальмує експресію генів, що кодують цей фермент, знижуючи його вміст у тканинах.

Література

1. Диксон Р., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1961. — 728 с.
2. Зайцев Г. Н. Методика биометрических расчетов. — М.: Наука, 1973. — 256 с.
3. Ясинська І. М. Виділення та очищення цитохрому Р450 ароматази з яєчників щурів // Науковий вісник Одеського державного політехнічного університету. — 1999. — № 7. — С. 86—90.
4. Ясинская И. М. Влияние восстановителей-антиоксидантов на активность ароматазы матки крыс *in vitro* // Укр. биохим. журн. — 2000. — Т. 72, № 3 (в печати).
5. Adashi E. Y. Aromatase deficiency: gestational and non-gestational implications // Korean Cent. J. Med. — 1996. — V. 61, № 2. — P. 159—160.
6. Brodie A., Lu Q., Long B. Aromatase and its inhibitors // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1999. — V. 69. — P. 205—210.
7. Kellis J. T., Vickery L. E. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones // Science. — 1984. — V. 225, № 4666. — P. 1032—1034.
8. Korzekwa K. R., Trager W. F., Smith S. J., Osawa Y., Gillette J. R. Theoretical studies on the mechanism of conversion of androgens to estrogens by aromatase // Biochemistry. — 1991. — V. 30. — P. 6155—6162.
9. Schmidt M., Loffler G. Induction of aromatase in stromal vascular cells from human breast adipose tissue depends on cortisol and growth factors // FEBS Lett. — 1994. — V. 341, № 2—3. — P. 177—181.
10. Yasinska I. M. Glutamate and aspartate as spacers for aromatase purification by affinity precipitation // Amino Acids. — 1999. — V. 17, № 1. — P. 66—67.

Ясинская И. М.

Одесский государственный университет, кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АКТИВНОСТЬ АРОМАТАЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНА И ГЕНИСТЕИНА

Резюме

Установлено, что гидрокортизон *in vitro* не влияет на активность ароматазы, но активирует ее в яичниках и матке крыс *in vivo*, возможно, индуцируя экспрессию генов, кодирующих данный фермент. Фитоэстроген генистеин в опытах *in vitro* изостерически ингибирует ароматазу, а *in vivo*, кроме того, снижает ее содержание в яичниках и матке крыс.

Ключевые слова: ароматаза, гидрокортизон, генистеин.

Yasinska I. M.

Odessa State University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya st., 2, Odessa, 65026, Ukraine.

HYDROCORTISONE AND GENISTEIN EFFECT ON THE AROMATASE ACTIVITY

Summary

It was established that hydrocortisone *in vitro* doesn't change the aromatase activity, but *in vivo* it activates it in rat ovaries and uteri by inducing the expression of aromatase genes. Fitoestrogen genistein *in vitro* is a isosteric aromatase inhibitor and *in vivo* it decreases the quantity of this enzyme in rat ovaries and uteri.

Key words: aromatase, hydrocortisone, genistein.