

© И. М. ЯСИНСКАЯ, В. В. СУМБАЕВ, 2006

УДК 577.151.08

И. М. Ясинская, В. В. Сумбаев

УНИВЕРСАЛЬНАЯ И КОМПЛЕКСНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ АРОМАТАЗЫ

Кафедра биохимии Одесского национального университета им. И. И. Мечникова

Структурная организация ароматазы и ее положение в Международной классификации ферментов

Цитохром Р-450-ароматаза (цитохром Р-450 XIXA1, КФ 1.14.14.1) является ключевым ферментом биосинтеза эстрогенов. Это единственный фермент, катализирующий процессы, приводящие к ароматизации первого кольца стероидного ядра, и, следовательно, дающий начало эстрогенам — эстрону, эстрадиолу и эстриолу. Другие эстрогены — эстриол, эквилин и эквilenин — образуются главным образом путем гидроксирования или дегидрирования эстрадиола, поэтому ароматазу можно считать единственным ферментом, лимитирующим образование эстрогенов.

Биосинтез эстрогенов осуществляется в различных органах и тканях большинства позвоночных обоего пола [1]. У самок позвоночных и у женщин эстрогены синтезируются главным образом в яичниках (клетки зернистого слоя фолликулярного эпителия) [2], а также в жировой ткани, эндометрии матки, головном мозге (миндалевидное тело, преоптический отдел, гипоталамус), плаценте, корковом веществе надпочечников, в фибробластах кожи, мышцах и клетках костной ткани [3–7]. У самцов позвоночных и у мужчин синтез эстрогенов имеет место в жировой ткани, головном мозге (в тех же отделах, что и у самок позвоночных и женщин), семенниках (в клетках Лейдига и в клетках Сертоли), корковом веществе надпочечников, фибробластах кожи, мышцах и клетках костной ткани [3–6, 8, 9].

Эстрогены синтезируются из андрогенов. Превращению подвергаются андростендион, тестостерон и реже — их 16-гидроксипроизводные [10]. Андростендион превращается в эстрон, тестостерон — в эстрадиол, а их 16-гидроксипроизводные — в 16-оксистерон и эстриол соответственно [11].

Несмотря на то что в яичниках каталитическому действию ароматазы подвергается главным образом тестостерон, основным ее субстратом в организме в целом является андростендион. Это обуславливает преимущественное экстрагонадное образование эстрона, который затем может быть восстановлен в более мощный эстроген — эстрадиол — при участии 17-гидроксистероиддегидрогеназы. Ароматаза гидроксилирует субстрат в положении 19 (трижды) и в положении 2 (однократно), что приводит к отщеплению 19-го углеродного атома, сопровождающемуся ароматизацией первого кольца стероидного ядра [10, 12–23].

Схема, обобщающая ароматазную реакцию и биосинтез эстрогенов, представлена на рис. 1.

Мол. масса фермента составляет 55 кД [24]. Гем в структуре ароматазы удерживается тиоловыми

группами остатков цистеина, т. е. является тиолсвязанным [25, 26]. Пятый координационный лиганд геминового железа, обуславливающий максимум светопоглощения гемопротеида (450 нм), является тиолатным анионом в составе консервативного цистеина 437, находящегося в гемсвязывающей области ароматазы [27]. При разрушении фермента он, как и все изоформы цитохрома Р-450, превращается в цитохром Р-420 (максимум светопоглощения 420 нм). Превращение фермента из формы Р-450 в форму Р-420 является первой стадией его распада. Переход цитохрома Р-450 в цитохром Р-420 обусловлен замещением тиолатного аниона имидазольной группой гистидина, в результате которого фермент утрачивает каталитическую активность [28].

Ароматаза, как и другие изоформы цитохрома Р-450, является гемопротеидом. В настоящее время известно, что аминокислотная последовательность изученных изоформ идентична примерно на 20% [28, 29]. Кристаллографические исследования большого количества изоформ цитохрома Р-450 показали, что, несмотря на такую вариабельность, общая топография и конформация ферментов данного суперсемейства сходны. Наибольшее сходство наблюдается в структуре участка апофермента, ответственного за связывание гема, что обуславливает общность механизма транспорта электронов и протонов, а также активации кислорода для всех изоформ цитохрома Р-450 [30]. Установлено, что аминокислотная последовательность ароматазы примерно на 30% гомологична по отношению к другим изоформам цитохрома Р-450, а с ферментами данной группы, участвующими в стероидогенезе, она сходна всего на 17,9–23,5 % [31]. Данная гомология распространяется именно на гемсвязывающий регион фермента [32].

Ароматаза является мономерным мембраносвязанным ферментом, как и все эукариотические изоформы цитохрома Р-450 [33]. Наиболее охарактеризованной является ароматаза лошади и человека. Фермент состоит из 503 аминокислотных остатков [34–36] и имеет атипичный N-конец по сравнению с другими микросомальными изоформами цитохрома Р-450. Микросомальные изоформы цитохрома Р-450 характеризуются гидрофобным N-концом, выполняющим функцию "якорения" фермента на мембране, в то время как у ароматазы гидрофобным является только субдомен С в составе N-конца. Ему предшествует более гидрофильный субдомен В, что нетипично для других микросомальных изоформ цитохрома Р-450. Субдомен В в структуре N-конца ароматазы содержит последовательности, способные формировать амфифильную спираль. Субдомен С непосредственно входит в мембрану, в то время как субдомен В, со-

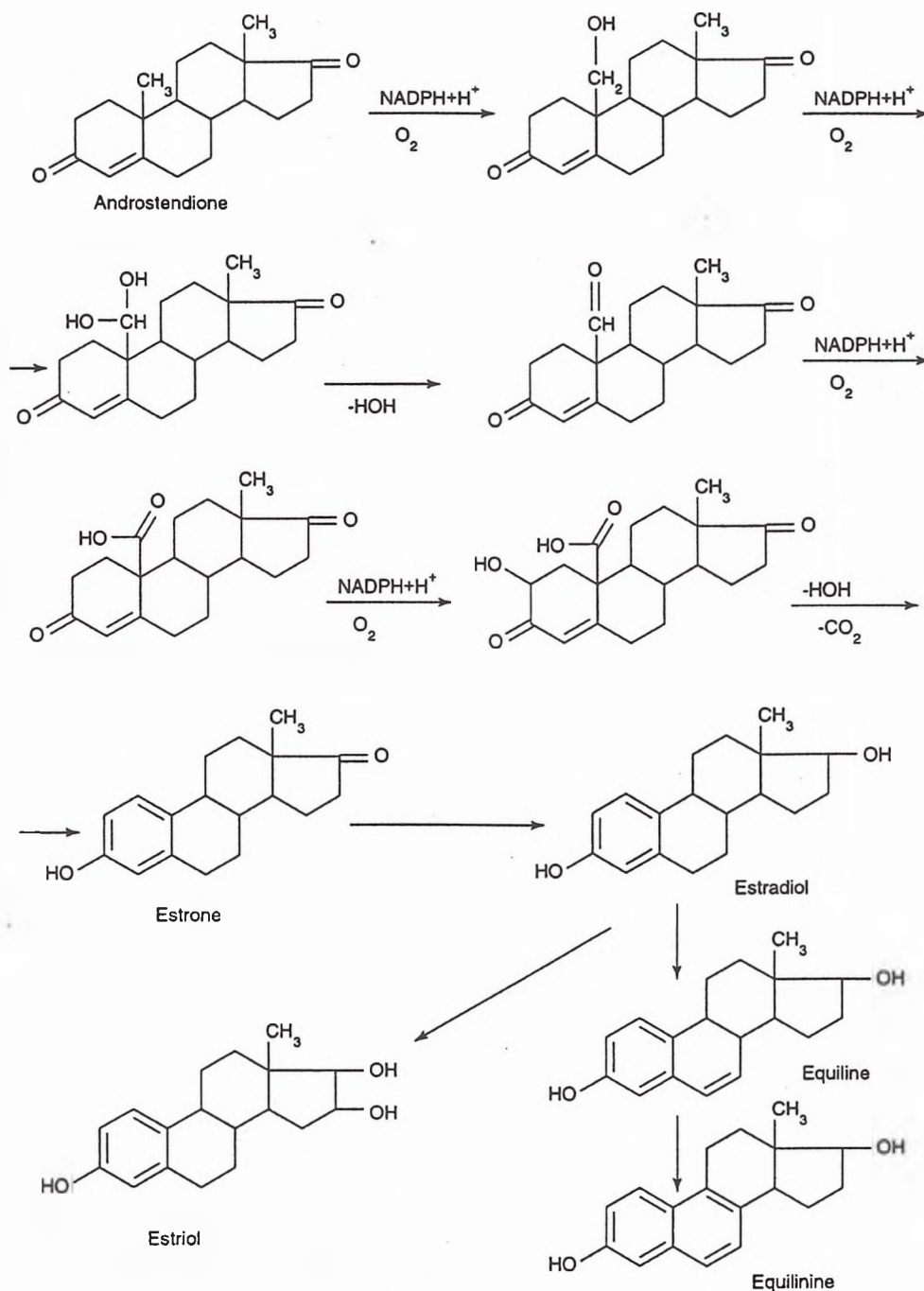


Рис. 1. Ароматазная реакция и биосинтез эстрогенов.

держаний два кислых аминокислотных остатка, препятствует дальнейшему вхождению фермента в мембрану и "заякоривает" его [37].

Следует отметить, что ароматаза форели содержит в своем N-конце 19 дополнительных аминокислотных остатков, формирующих субдомен А, который в целом гидрофобен. Однако из-за наличия в данном субдоме аргинина в положении 10 он может лишь частично внедряться в мембрану [37]. Положение субдоменов N-конца ароматазы (включая субдомен А) в мембране показано на рис. 2.

Исследование структурной организации ароматазы представляет особый интерес, так как играет первостепенную роль в поиске высокоспецифич-

ных ингибиторов данного фермента, что необходимо для химиотерапии эстрогензависимых злокачественных новообразований.

Наиболее приемлемым путем выявления новых ингибиторов ароматазы человека *in vitro* является скрининг химических соединений, основанный на данных о структуре субстрата, а также на сравнительном анализе их воздействия на ароматазу, выделенную из источников животного происхождения. Дизайн наиболее специфичных и используемых в медицинской практике ингибиторов ароматазы можно улучшить при наличии исчерпывающих данных о структуре ее активного центра. В связи с этим моделирование данной части аромата-

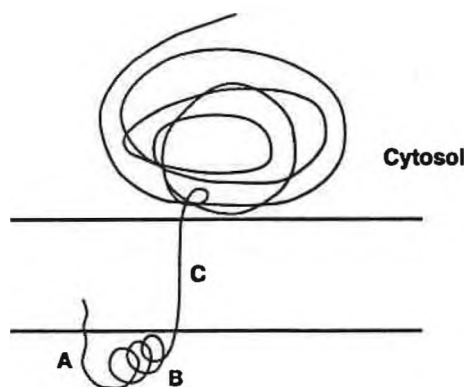


Рис. 2. "Заякоривание" ароматазы на микросомальной мембране.

тазной молекулы, равно как и всего белка в целом, является необходимым [34].

Данные о структуре ароматазы были получены во многом благодаря сравнительному анализу с растворимыми бактериальными цитохромами — цитохромом P-450camphor (P-450cam), выделенным из *Pseudomonas putida*, цитохромом P-450BM-3, полученным из *Bacillus megaterium*, α -терпеновым цитохромом P-450 *Pseudomonas putida* (P-450terp) и цитохромом P-450, конвертирующим эритромицин F (P-450eryF) *Saccharopolyspora erythraea*, которые были получены в кристаллическом виде и хорошо охарактеризованы [38–42]. Главной основой для построения структурной модели ароматазы служил цитохром P-450BM-3 [18].

Теоретическая молекулярная модель ароматазы была предложена S. Graham-Lorence и соавт. [18]. С использованием координатных систем были рассчитаны расположения электростатических и вандер-ваальсовых взаимодействий. Эта модель в целом отражает структурную организацию фермента, хотя в недостаточной степени характеризует участок между 150-м и 250-м аминокислотными остатками [34]. Для более полной характеристики молекулярной структуры ароматазы и выявления аминокислотных участков, необходимых для связывания субстрата, Р. Auvray и соавт. [34, 43] использовали иной методический подход — сайт-специфичный мутагенез, предполагавший замену определенных аминокислотных остатков на близкие по размеру, но отличные по свойствам. В основу такого мутагенеза положена полимеразная цепная реакция с двумя комплементарными нуклеотидными праймерами, содержащими мутацию. Реакцию проводили с использованием Pfu ДНК полимеразы в течение 16 циклов. Было установлено, что Лиз130, Фен134, Асп309 и Асп476 непосредственно выполняют связывание субстрата (в качестве примера на рис. 3 приведено положение андростендиона в связывающем центре ароматазы). Также в связывании субстрата принимают участие Иле474 и Гис475. Наиболее критическими для поддержания конформации фермента являются Фен320 и Сер470 [34].

Механизм каталитического действия ароматазы

Биосинтез стероидных гормонов происходит главным образом на микросомах и сводится к реакциям гидроксилирования их стероидных предшественников, приводящим к отщеплению алифатических радикалов и образованию полярных продуктов, а также к дегидрогеназным реакциям, обеспечивающим взаимопревращения гидроксильных и кетогрупп [44]. Реакции гидроксилирования осуществляют изоформы цитохрома P-450, являющиеся конечным пунктом микросомальной цепи переноса электронов [45]. Акцептируя электроны, изоформы цитохрома P-450 осуществляют гидроксилирование субстрата. Цепь переноса электронов к каталитическому центру ферментов может включать различные компоненты, на основании чего цитохромы P-450 делятся на четыре основных класса [29]. Ароматаза является представителем четвертого класса изоформ цитохрома P-450, акцептирующим электроны от НАДФН+Н⁺ при участии НАДФН+Н⁺-зависимой цитохром P-450-редуктазы [23, 31, 46, 47].

На рис. 4 представлен механизм каталитического гидроксилирования субстрата, являющийся общим для всех изоформ цитохрома P-450 [28, 29] независимо от состава цепи переноса электронов. Он включает следующие основные этапы [16]. Геминное железо, находясь в окисленном состоянии (Fe³⁺), акцептирует один электрон от НАДФН+Н⁺, приобретая степень окисления Fe²⁺. Восстановившись, железо передает электрон кислороду, в ре-

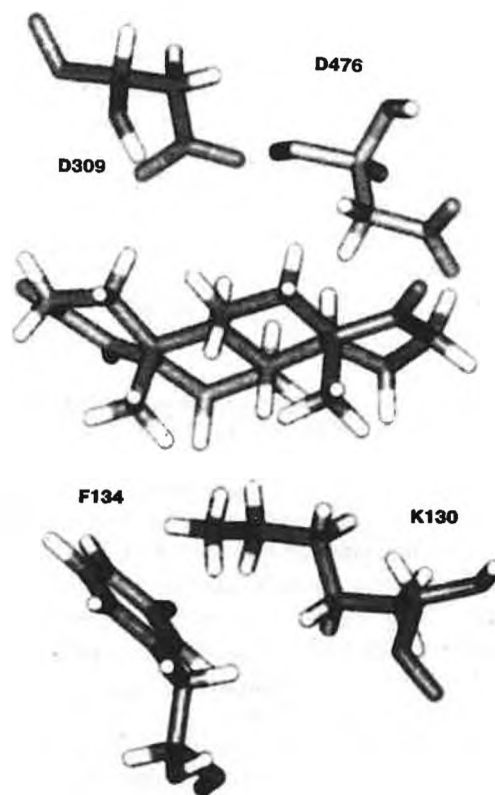


Рис. 3. Положение андростендиона в связывающем центре ароматазы.

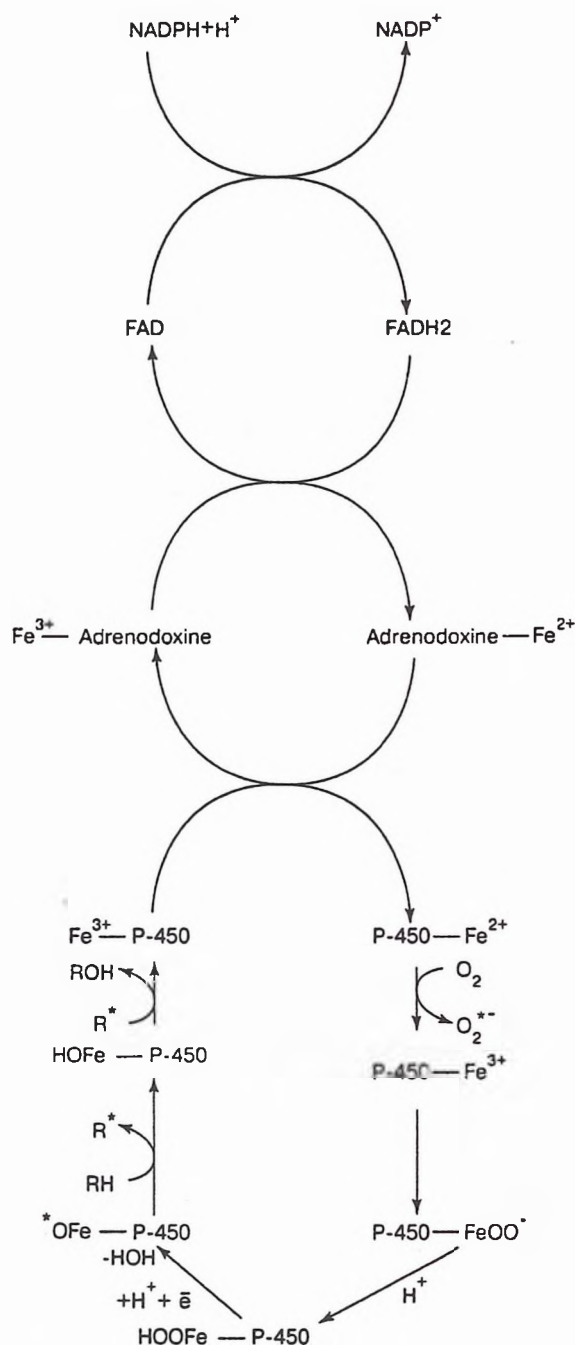


Рис. 4. Схема переноса электронов при микросомальном окислении и механизм действия цитохрома P-450.

зультате чего последний превращается в супероксидный радикал [48], способный взаимодействовать с Fe^{3+} в составе цитохрома P-450. После связывания Fe^{3+} с супероксидом образуется неустойчивый комплекс FeOO^- , который протонируется с образованием FeOOH . Второй электрон, поставляемый НАДФН+Н⁺-зависимой цитохром P-450-редуктазой, разрушает пероксидную связь в составе комплекса FeOOH с образованием радикала FeO^* и гидроксил-аниона, акцептирующего протон с образованием воды. Радикал FeO^* акцептирует водород от гидроксилируемого участка стероидной молекулы с образованием стероидного радикала и

FeOH . Далее образовавшийся стероидный радикал, отнимая гидроксил от гемевого железа цитохрома P-450, превращается в гидроксильированный стероид, а каталитический центр цитохрома P-450 готов к приему новых электронов и гидроксильированию следующей молекулы субстрата. Механизм каталитического действия ароматазы, включающий несколько процессов гидроксильирования, идущих по описанной выше схеме, представлен на рис. 5. На схеме отражены пути переноса электронов, протонов и кислорода, а также изменения валентности железа. Данная схема была впервые предложена S. Graham-Lorence и соавт. [18].

Регуляция ароматазной активности

Ароматаза, как и любая другая изоформа цитохрома P-450, является индуцибельным ферментом [49]. Ее биосинтез на геномном и посттрансляционном уровнях контролируется рядом факторов.

Регуляция активности ароматазы на геномном уровне. Ген ароматазы человека (CYP19) локализован в длинном плече 15-й хромосомы. Он содержит 10 экзонов (I–X), причем только 9 из них (II–X) являются кодирующими [49, 50]. кДНК ароматазы человека содержит 2736 п. н. и кодирует белок с мол. массой 55 кД, состоящий из 503 аминокислотных остатков [34]. Особую роль в изучении молекулярно-генетических механизмов эстрогенообразования сыграло доказательство тканевой специфичности регуляции этого процесса, поддерживаемой за счет существования множественных альтернативных промоторов транскрипции гена ароматазы и их селективного использования в отдельных тканях [31, 49, 51, 52]. Так, промотор, активирующий экспрессию ароматазы в плаценте, отстоит на 40 п. н. от сайта инициации транскрипции [53]. Экспрессия гена ароматазы в яичнике человека обеспечивается промотором II, лежащим непосредственно перед сайтом инициации транскрипции и обозначаемым как овариальный. Его особенностью является чувствительность к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) [54, 55]. Промотор II и другой, до сих пор не охарактеризованный промотор активны в жировой ткани, коже и ткани нормальной молочной железы. В данных тканях они не чувствительны к ФСГ и регулируются через посредство цАМФ и глюкокортикоидов, в том числе синтетических (дексаметазон и др.) [56, 57]. Ключ к пониманию механизма сАМР-зависимой активации экспрессии гена ароматазы дает открытие чувствительности промотора II ароматазного гена к CREB (сАМР responsible element binding protein) [58]. Глюкокортикоиды, по всей видимости, индуцируют экспрессию ароматазного гена в виде гормон-рецепторного комплекса, действующего непосредственно как транскрипционный фактор.

В последнее время получены убедительные доказательства в пользу индукции ароматазной активности на геномном уровне при участии стероидогенного фактора (SF-1). Н. Yang и соавт. [59] показали, что промотор II, являющийся преобладающим в структуре ароматазного гена, является чувствительным к действию SF-1 в клетках эндометриомы человека. Известно также, что в клетках

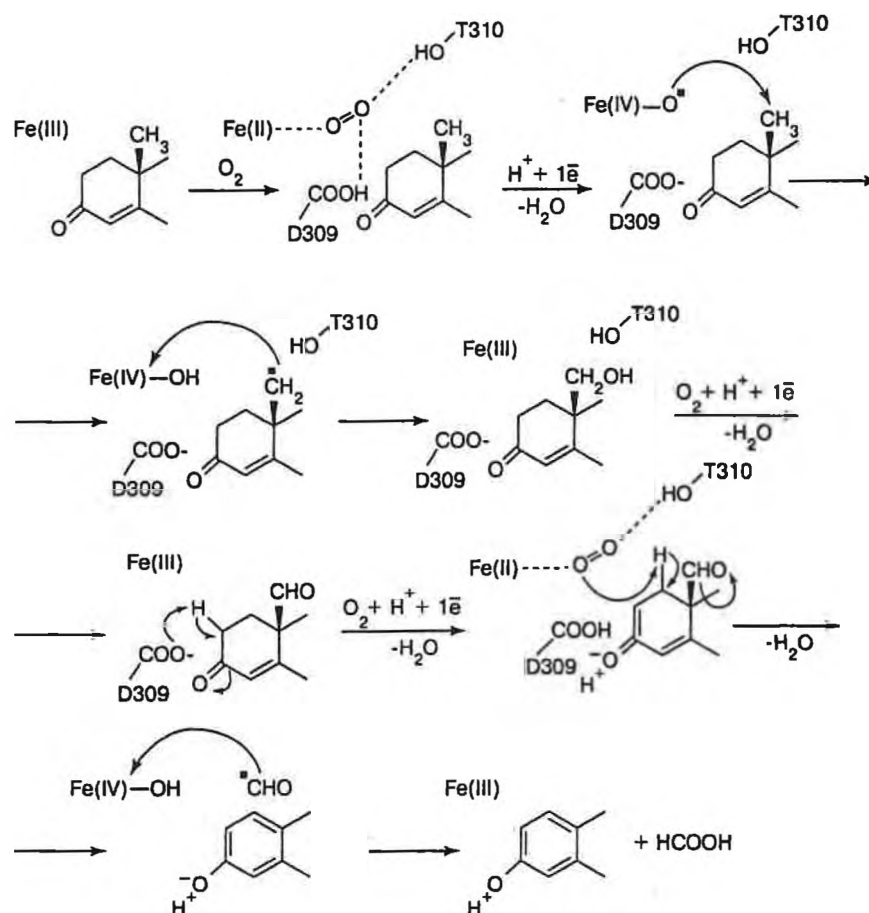


Рис. 5. Механизм каталитического действия ароматазы по S. Graham-Lorence и соавт. [18, 34].

жировой ткани молочной железы на промотор II в составе ароматазного гена воздействует SF-1-подобный фактор, именуемый LRH1 (liver receptor homologue 1). Данный фактор особо активен в проадипоцитах. При дифференцировке последних в зрелые адипоциты уровень экспрессии LRH1 и, соответственно, ароматазы резко снижается благодаря ингибирующему воздействию γ -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PPAR- γ — peroxisome proliferator activated receptor), гиперэкспрессирующегося и аккумулирующегося в условиях вышеупомянутой дифференцировки [60].

Ген ароматазы жировой ткани молочных желез экспрессируется также при участии дистального, цитокинзависимого промотора I.4 [50]. Некоторые проинфламаторные цитокины, такие как интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухолей α (TNF α), а также фактор TGF- β (Transforming growth factor β) и фактор роста эпидермиса, индуцируют экспрессию ароматазного гена благодаря опосредованному воздействию именно на этот промотор. С другой стороны, показано, что IL-1 β не оказывает какого-либо влияния на активность ароматазы в клетках эндометриомы человека, что свидетельствует о тканевой специфичности чувствительности ароматазного гена к цитокинам [61–64].

Интересна роль простагландинов (PG, в частности PGE2) в индукции экспрессии ароматазы в клетках жировой ткани молочной железы. В работах C. Clyne и некоторых других авторов [65, 66] показано, что PGE2 является мощным активатором экспрессии ароматазного гена в данных клетках. Механизм данного процесса остается неизвестным, но его роль, по всей видимости, занимает одно из центральных мест в активации биосинтеза эстрогенов в жировой ткани молочной железы. Так, установлено, что действие TNF α , который сам по себе способен активировать экспрессию ароматазного гена как цитокин, на клетки жировой ткани молочной железы приводит к активации циклооксигеназы 2 и простагландинсинтазы — ключевых ферментов биосинтеза простагландинов. Исходя из этих данных можно предположить, что PGE2, а возможно и другие простагландины, участвует в цитокинзависимой индукции экспрессии ароматазного гена в жировой ткани молочной железы.

Нами было показано, что полихлорбифенил (ДДТ) и генистеин, как ксеноэстрогены, т. е. регуляторы экспрессии большого количества генов, подавляют экспрессию генов, кодирующих фермент-производитель стероидных эстрогенов — ароматазу [67]. В опытах *in vivo* установлено, что активность ароматазы в яичниках и матке крыс достоверно снижается под влиянием ДДТ и генистеина (изофлавоноид — фитоэстроген). Данные

изменения обусловлены снижением количества активного фермента в соответствующих органах. Позже аналогичный эффект был обнаружен для других хлорированных пестицидов с эстрогеноподобным эффектом [68].

Регуляция активности ароматазы на посттрансляционном уровне. Посттрансляционная регуляция ароматазной активности прямо зависит от продукции гема и его включения в структуру апофермента. В данном случае следует прежде всего отметить активность δ -аминолевулинатсинтетазы, катализирующей первую реакцию в гемпродуцирующей цепи и являющейся главным лимитирующим фактором посттрансляционной модификации всех изоформ цитохрома Р-450, в том числе и ароматазы [69].

Следует отметить также роль оксидативного стресса в регуляции ароматазной активности. В частности в ряде работ отмечено ингибирующее влияние оксидативного стресса на содержание изоформ цитохрома Р-450 в микросомах печени и почек. Известно, что в условиях оксидативного стресса, вызванного действием хлорида кобальта, ингибируется биосинтез гема, который необходим для формирования каталитической активной изоформ цитохрома Р-450 [70]. Показано, что кобальтзависимый оксидативный стресс подавляет активность ароматазы [71]. В данном случае, как и в случаях с АФК-зависимым снижением содержания других изоформ цитохрома Р-450, очевидно, имеет место подавление посттрансляционной модификации апофермента на уровне включения гема в его состав. С другой стороны, ингибирование Р-450-зависимого биосинтеза глюкокортикоидов приводит к торможению активности δ -аминолевулинатсинтетазы, так как именно глюкокортикоиды индуцируют биосинтез данного фермента [72]. Данный процесс в свою очередь приводит к ингибированию биосинтеза гема.

Регуляция активности ароматазы на каталитическом уровне. Фармакологическая коррекция ароматазной активности. Активность ароматазы, как и любого металлопротеина, подвержена различного рода изменениям, связанным с воздействием на каталитический центр (геминное железо), также существует множество природных и синтетических изостерических ингибиторов данного фермента.

В частности установлено, что восстановители-антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, глутатион, гидрохинон и цистеин, активируют ароматазу [73]. Как мы уже отмечали выше, в ходе ароматазной реакции $\text{НАДФН} + \text{H}^+$ отдает электрон и восстанавливает Fe^{3+} в каталитическом центре фермента до Fe^{2+} , который взаимодействует с молекулярным кислородом и последовательно гидроксилирует субстрат, используя также оставшийся у НАДФ электрон и два протона [10, 23]. Таким образом, в ходе активации ароматазы восстановители, очевидно, поддерживают железо в структуре ароматазы в восстановленном состоянии, а также, окисляясь, отнимают электроны и протоны у $\text{НАДФН} + \text{H}^+$ и ускоряют их передачу к каталитическому центру ароматазы на всех этапах катализа.

Особое место в современной биохимии и фармакологии занимает поиск ингибиторов аромата-

зы, в связи с тем что они дают определенный лечебный эффект при эстрогензависимом канцерогенезе [74–77]. К гормонзависимым злокачественным новообразованиям относят рак молочной железы, эндометрия, яичников, остеосаркому и некоторые другие [78, 79].

В настоящее время открыто и синтезировано множество конкурентных ингибиторов цитохрома Р-450 ароматазы. Благодаря тому что ароматаза обладает низкой структурной гомологией с другими изоформами цитохрома Р-450, участвующими в стероидогенезе, а также катализирует одну из конечных реакций в биосинтезе стероидных гормонов, применение ее селективных ингибиторов не влияет на продукцию других стероидов, таких как глюко- и минералокортикоиды, что делает их использование особенно привлекательным и удобным [80–82].

В зависимости от химической природы ингибиторы ароматазы подразделяют на стероидные и нестероидные [83]. Стероидные ингибиторы составляют 80% от общего количества ингибиторов ароматазы [84, 85]. В настоящее время к используемым в клинике ингибиторам ароматазы относят форместан (4-ОН-андростендион), экзестан, атаместан и 10-пропаргиландростендион (структурные

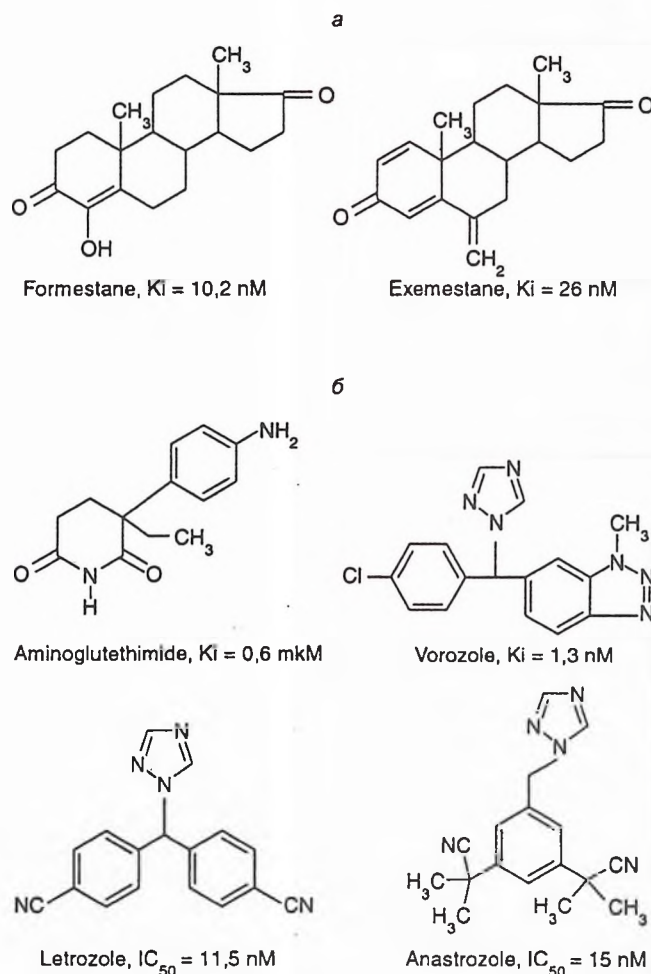


Рис. 6. Ингибиторы ароматазы.

а — стероидные — форместан и экзестан; б — нестероидные — аминоглутетимид, ворозол, летрозол и анастрозол.

Формулы и ингибиторные константы форместана и экземестана представлены на рис. 6, а) [31]. Данные вещества, называемые также "суицидными ингибиторами", являются необратимыми изостерическими ингибиторами ароматазы. Они необратимо связываются с ее активным центром, полностью инактивируя фермент [86], или же действуют как субстрат, будучи превращены ферментом в реактивные промежуточные продукты, которые ковалентно связываются с активным центром фермента, приводя к полной потере каталитической активности [87, 88]. К недостаткам ингибиторов данной группы можно отнести многочисленные побочные эффекты, такие как андрогенное действие (чрезмерное оволосение, угревая сыпь), приливы, повышенная потливость, тошнота и др. [31].

Нестероидные ингибиторы ароматазы содержат в своей структуре гетероатом (обычно азот), отличаются высокой эффективностью действия и меньшим уровнем привыкания. Данные вещества являются конкурентными обратимыми ингибиторами ароматазы [89]. По своей орбитальной структуре данные соединения близки к стероидам и могут входить в активный центр ароматазы. При этом механизм ингибирования заключается в связывании с каталитическим центром — геминным железом, что препятствует гидроксигированию субстрата [90]. К данным веществам относятся аминоглутетимид и подобные ему соединения, а также некоторые производные триазола с хиральной (ворозол, фадразол и др.) и нехиральной (летрозол, анастрозол и др.) структурой. Структурные формулы, ингибиторные константы и IC_{50} данных веществ приведены на рис. 6, б) [31]. Недостатком этих ингибиторов как фармпрепаратов является их инородность по отношению к человеческому организму и живым организмам в целом. В силу своей структуры многие из них обладают сродством к некоторым другим ферментам, участвующим в стероидогенезе. Так, например, аминоглутетимид действует на активность многих ферментов, относящихся к суперсемейству цитохрома P-450 (в частности на активность цитохрома P-450_{ssc} и 11-β-гидроксилазы или цитохрома P-450XIB1) [91]. Фадразол ингибирует 11-β-гидроксилазу и 18-α-гидроксилазу (цитохром P-450XVIA1), тормозя, таким образом, биосинтез кортизола и альдостерона [91]. С другой стороны, такие селективные ингибиторы ароматазы, как анастрозол, летрозол и другие, являются высокоспецифичными и не влияют на каталитическую активность других ферментов стероидогенеза, однако обладают рядом побочных эффектов, в целом характерных для всех ингибиторов данной группы: тошнота, утомляемость, приливы, головная боль, боль в скелетной мускулатуре и суставах, а также повышенный рвотный рефлекс и затрудненное дыхание [75].

Известные в настоящее время природные ингибиторы ароматазы, например, некоторые сесквитерпены, такие как 8-эпи-8-дезоксикумамбрин В, дегидролейкодин и другие, мало специфичны к ферменту (ингибиторные константы составляют 4 и 21 мкМ соответственно) по сравнению с ингибиторами, применяемыми в фармакологической

практике и оказывающими лечебное действие в отношении рака молочной железы [93].

В последнее время установлено, что кверцетин тормозит активность ароматазы в ничтожно малых концентрациях по сравнению с другими природными фармагентами со сходным эффектом — от 18, 75 до 100 нМ [94]. По данным кинетического анализа, ингибирование носит конкурентный характер. Ингибиторная константа составляет 15,6 нМ. Данная величина близка к величинам ингибиторных констант для необратимых конкурентных ингибиторов ароматазы — форместана (10,2 нМ), экземестана (26 нМ) и некоторых других [31]. Из приведенных данных следует, что кверцетин обладает высоким сродством к связывающему сайту активного центра ароматазы. Дальнейшие исследования показали, что ингибирование ароматазы кверцетином носит конкурентный необратимый характер [93, 94]. Данные результаты позволяют рекомендовать кверцетин к исследованиям в качестве фармакологического агента, способного уменьшать активность ароматазы и тормозить биосинтез эстрогенов в организме человека.

Перспективы изучения энзимологии ароматазы и регуляции ее активности

Приведенные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о том, что в настоящее время существует значительная база экспериментальных данных по структурной организации, биосинтезу и регуляции активности ароматазы. Исследовано действие поллютантов окружающей среды на ароматазную активность, разработан целый комплекс терапевтических мер, направленных на коррекцию ароматазной активности. Данные о высокоспецифичном и, возможно, необратимом изостерическом ингибировании ароматазы рядом соединений раскрывают новые перспективы в плане поиска природных и неприродных фармакологических агентов, подавляющих ароматазную активность.

Тем не менее ряд важных вопросов, связанных с биохимическими механизмами регуляции активности ароматазы, остается на сегодняшний день открытым. Выяснение данных вопросов необходимо для глубокого понимания процессов стероидогенеза и его регуляции и откроет новые перспективы, связанные с изучением молекулярных механизмов гормонзависимого канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siiteri P. K. // Cancer Res. — 1982. — Vol. 42, N 8. — P. 3269—273.
2. Волкова О. В. // Арх. анат. — 1980. — № 8. — С. 5—18.
3. Berkovitz G. D., Fujimoto M., Brown T. R. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1984. — Vol. 59, N 4. — P. 665—671.
4. Longcope C., Pratt J. H., Schneider S. H., Fineberg S. E. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1978. — Vol. 46. — P. 146—152.
5. Roselli C. E. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1995. — Vol. 52, N 5. — P. 469—477.
6. Siiteri P. K. // Am. J. Clin. Nutr. — 1987. Vol. 45. — P. 277—282.
7. Tseng L. // Endocrinology. — 1984. — Vol. 115, N 2. — P. 833—835.
8. Brodie A., Inkster S. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1993. — Vol. 44. — P. 549—556.
9. Papadopoulos V., Goly E., Simon M. Q., Drosdovsky M. // Pathol. biol. — 1984. — Vol. 32, N 8. — P. 843—846.

10. Korzekwa K. R., Trager W. F., Smith S. J. et al. // *Biochemistry*. — 1991. — Vol. 30, N 25. — P. 6155–6162.
11. Numazawa M., Osada R., Tsuji M., Osawa Y. // *Anal. Biochem.* — 1985. — Vol. 146, N 1. — P. 75–81.
12. Hahn Elliot F., Miyairi S., Fishman J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — Vol. 82, N 9. — P. 2728–2730.
13. Korzekwa K. R., Trager W. F., Mancewicz J., Osawa Y. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1993. — Vol. 44. — P. 367–373.
14. Thompson E. A., Siiteri P. K. // *J. Biol. Chem.* — 1974. — Vol. 249. — P. 5364–5373.
15. Thompson E. A., Siiteri P. K. // *J. Biol. Chem.* — 1974. — Vol. 249. — P. 5373–5378.
16. Akhtar M., Njar V. C. O., Wright J. N. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1993. — Vol. 44. — P. 375–387.
17. Hahn Elliot F., Fishman J. // *J. Steroid Biochem.* — 1985. — Vol. 22, N 59. — P. 597–600.
18. Graham-Lorence S., Amarnah B., White R. E. et al. // *Protein Sci.* — 1995. — Vol. 4, N 6. — P. 1065–1080.
19. Bulun S. E., Zeitoun K. M., Takayama K., Sasano H. // *Hum. Reprod. Update*. — 2000. — Vol. 6, N 5. — P. 413–418.
20. Берштейн Л. М. // *Вестн. ПАМН.* — 1997. — Т. 36, № 4. — С. 438–441.
21. Le Bail J. C., Champavier Y., Chulia A. J., Habrioux G. // *Life Sci.* — 2000. — Vol. 66, N 14. — P. 1281–1291.
22. Le Bail J. C., Laroche T., Marre-Fournier F., Habrioux G. // *Cancer Lett.* — 1998. — Vol. 133, N 1. — P. 101–106.
23. Кучеренко Н. Е., Германюк Я. Л., Васильев А. Н. Молекулярные механизмы гормональной регуляции обмена веществ. — Киев, 1986.
24. Tan L., Muto N. // *Eur. J. Biochem.* — 1986. — Vol. 156, N 2. — P. 243–250.
25. Brueggemeier R. W. // *J. Enzym Inhib.* — 1990. — Vol. 4. — P. 101–111.
26. Liu Xing-Ping, Lambert D. M., Abul H., Iusuf J. // *J. Med. Chem.* — 1995. — Vol. 38, N 20. — P. 4135–4138.
27. Adashi E. Y. // *Korean Cent. J. Med.* — 1996. — Vol. 61, N 2. — P. 159–160.
28. Omura T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — Vol. 226, N 3. — P. 690–698.
29. Werk-Reichhart D., Feyereisen R. // *Genome Biol.* — 2000. — Vol. 1, N 6. — P. 3003.1–3003.9.
30. Graham S. E., Peterson J. A. // *Arch. Biochem.* — 1999. — Vol. 369. — P. 24–29.
31. Njar V. C. O., Brodie A. M. // *Drugs*. — 1999. — Vol. 58, N 2. — P. 233–255.
32. Ahmed S. // *Drug Des. Disc.* — 1998. — Vol. 15, N 4. — P. 239–252.
33. Kellis J. T., Vickery L. E. // *J. Biol. Chem.* — 1987. — Vol. 262, N 9. — P. 4413–4420.
34. Auvray P., Nativelle C., Bureau R. et al. // *Eur. J. Biochem.* — 2002. — Vol. 269. — P. 1393–1405.
35. Corbin C. J., Graham-Lorence S., McPhaul M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1988. — Vol. 85. — P. 8948–8952.
36. Tomilin A., Auvray P., Moslemi S. et al. // *IV International Aromatase Conference, Tahoe-City, California, 1996.* — Abstr. 2.
37. Chen S., Zhou D. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267. — P. 22587–22594.
38. Poulos T. L., Finzel B. C., Howard A. J. // *J. Mol. Biol.* — 1987. — Vol. 195. — P. 687–700.
39. Ravichandran K. G., Boddupalli S. S., Hasemann C. A. et al. // *Science*. — P. 1993. — Vol. 261. — P. 731–736.
40. Hasemann C. A., Ravichandran K. G., Peterson J. A., Deisenhofer J. // *J. Mol. Biol.* — 1994. — Vol. 236. — P. 1169–1185.
41. Curp-Vickery J. R., Poulos T. L. // *Nat. Struct. Biol.* — 1995. — Vol. 2. — P. 144–153.
42. Curp-Vickery J. R., Poulos T. L. // *Steroids*. — 1997. — Vol. 62. — P. 112–116.
43. Auvray P., Sourdaine P., Moslemi S. et al. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 70. — P. 59–71.
44. Hasler J. A., Esyabrook R., Murray M. // *Mol. Aspects Med.* — 1999. — Vol. 20. — P. 1–137.
45. Mansuy D. // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1998. — Vol. 121, Pt C. — P. 5–14.
46. Margaret J. // *Arch. Biochem.* — 1990. — Vol. 282. — P. 8–17.
47. Tseng L., Bellino F. L. // *J. Steroid Biochem.* — 1985. — Vol. 22, N 4. — P. 555–557.
48. Ясинская И. М. Выделение, исследование каталитических свойств и механизмов регуляции активности цитохрома P-450 ароматазы: Дис. ... канд. биол. наук. — Одесса, 2002.
49. Берштейн Л. М., Ларионов А. А., Полю Р. и др. // *Вопр. онкол.* — 1999. — Т. 45, № 5. — С. 504–510.
50. Shozu M., Sumitani H., Segawa T. et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Vol. 87. — P. 2540–2548.
51. Simpson E. R., Mehendroo M. S., Means G. D. et al. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1993. — Vol. 44. — P. 321–330.
52. Tchoudakova A., Callard G. V. // *Endocrinology*. — 1998. — Vol. 139. — P. 2179–2189.
53. Harada N., Utsumi T., Takagi Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1993. — Vol. 90. — P. 11312–11316.
54. Hseuh A. J. W., Adashi E. Y., Jones P. B. C., Welsh T. H. Jr. // *Endocr. Rev.* — 1984. — Vol. 5. — P. 76–127.
55. Tapanainen J., McCamant S., Orava M. et al. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1991. — Vol. 39, N 1. — P. 19–25.
56. Mendelson C. R., Cleland W. H., Smith M. E., Simpson E. R. // *Endocrinology*. — 1982. — Vol. 111. — P. 1077–1085.
57. Simpson E. R., Ackerman G. E., Smith M. E., Mendelson C. R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1981. — Vol. 78. — P. 5690–5694.
58. Sofi M., Young M. J., Papamakarios T. et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2003. — Vol. 79. — P. 399–407.
59. Yang H.-J., Shozu M., Murakami K. et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Vol. 87. — P. 3745–3753.
60. Clyne C. D., Speed C. J., Zhou J., Simpson E. R. // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 20591–20597.
61. Singer C. F., Hudelist G., Schreiber M., Kubista E. // *Drugs Today*. — 2003. — Vol. 39. — P. 115–125.
62. Ferrari L., Bajetta E., Martinetti A. et al. // *Int. J. Oncol.* — 2003. — Vol. 22. — P. 1081–1089.
63. Silva J. M., Price C. A. // *J. Endocrinol.* — 2002. — Vol. 174. — P. 499–507.
64. Honma S., Shimodaira K., Shimizu Y. et al. // *Endocr. J.* — 2002. — Vol. 49. — P. 371–377.
65. Karuppu D., Kalus A., Simpson E. R., Clyne C. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2002. — Vol. 76. — P. 103–109.
66. Richards J. A., Petrel T. A., Brueggemeier R. W. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 80. — P. 203–212.
67. Ясинская И. М., Розанов А. Я. // *Укр. биохим. журн.* — 2001. — Т. 73, № 3. — С. 121–125.
68. Andersen H. R., Vinggaard A. M., Rasmussen T. H. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 179. — P. 1–12.
69. Калиман П. А., Беловецкая И. В. // *Биохимия*. — 1986. — Т. 51, № 8. — С. 1302–1307.
70. Калиман П. А., Загайко А. Л., Шаламов П. В. и др. // *Укр. биохим. журн.* — 1997. — Т. 69, № 5–6. — С. 138–148.
71. Ясинская И. М., Розанов А. Я. // *Укр. биохим. журн.* — 2001. — Т. 73, № 6. — С. 131–133.
72. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия: Учебник / Под ред. С. С. Дебова. — М., 1990.
73. Ясинская И. М. // *Укр. биохим. журн.* — 2000. — Т. 72, № 2. — P. 47–50.
74. Смирнов М. И. Витамины. — М., 1974.
75. Brodie A. M., Njar V. C. // *Steroids*. — 2000. — Vol. 65, N 4. — P. 171–170.
76. Chetrite G. S., Cortes-Prieto J., Philippe J. C. et al. // *Horm. and Cancer Res. Unit.* — 2000. — Vol. 72, N 1–2. — P. 23–27.
77. Masayoshi H., Ikuo M., Masahiko O. et al. // *Prostate*. — 1997. — Vol. 31, N 2. — P. 118–124.
78. Henderson B. E., Feigelson H. S. // *Carcinogenesis*. — 2000. — Vol. 21, N 3. — P. 427–433.
79. Sasano H., Sato S., Ito K. et al. // *Endocr. Relat. Cancer*. — 1999. — Vol. 6, N 2. — P. 197–204.
80. Ahmed S., Amanuel Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2000. — Vol. 267, N 1. — P. 356–361.
81. Brodie A., Lu Q., Long B. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 69, N 1–6. — P. 205–210.
82. Murphy M. J. Jr. // *Oncologist*. — 1998. — Vol. 3, N 2. — P. 129–130.
83. Brueggemeier R. W. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 1994. — Vol. 30, N 1. — P. 31–42.
84. Numazawa M., Yoshimura A., Oshibe M. // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 329. — P. 151–156.
85. Geisler J., King N., Anker G. // *Clin. Cancer Res.* — 1998. — Vol. 4, N 9. — P. 2089–2093.
86. Brodie A. M. // *Cancer Res.* — 1982. — Vol. 42, N 8. — P. 3312–3314.

87. Numazawa M., Mutzumi A., Hoshi K. et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 39, N 6. — P. 959–966.
88. Numazawa M., Mutzumi A., Tachibana M. // Biochem. Pharmacol. — 1996. — Vol. 52, N 8. — P. 1253–1259.
89. Wickings E. J., Middleton M. C., Hillier S. G. // J. Steroid Biochem. — 1987. — Vol. 26. — P. 641–646.
90. Brodie A., Lu Q., Nakamura J. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1997. — Vol. 61, N 3–6. — P. 281–286.
91. Brodie A., Lu Q., Liu Y., Long B. // Endocr. Relat. Cancer. — 1999. — Vol. 6. — P. 205–210.
92. Blanco J. G., Gil R. R., Alvarez C. I. et al. // FEBS Lett. — 1997. — Vol. 409. — P. 396–400.
93. Yasinska I. M. // Mol. Cell. Proteomics. — 2003. — Vol. 9. — P. 766.
94. Ясинская И. М. // Укр. биохим. журн. — 2002. — Т. 74, № 4а. — С. 94–95.

Поступила 18.08.04

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 617.7-02:616.379-008.64]-092

М. Т. Азнабаев, У. Р. Алтынбаев, И. Н. Серезин, А. Р. Шамратова

РОЛЬ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ ГЛАЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан (дир. — проф. М. Т. Азнабаев)

В последние годы сахарный диабет (СД) и его так называемые поздние сосудистые осложнения приобретают масштабы всемирной эпидемии, требующей повышенного внимания не только эндокринологов-диабетологов, но и специалистов смежных дисциплин [3].

Ежегодно в мире до 40 тыс. больных СД теряют зрение. Пролiferативная диабетическая ретинопатия (ДР) является основной причиной слепоты среди лиц трудоспособного возраста [4, 29].

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют об участии ренин-ангиотензиновой системы (РАС) в развитии и прогрессировании диабетической органной патологии [1–4]. РАС является основным биохимическим механизмом, посредством которого реализуются вазомоторные и ангиогенные реакции. Она тесно взаимодействует со своим антагонистом — калликреин-кининовой системой. Обе системы представляют собой каскад протеолитических реакций, приводящих к образованию вазоактивных пептидов ангиотензина (АГ) II и брадикинина. Эти эндогенные регуляторы оказывают противоположное действие на гемодинамику и водно-солевой баланс [1].

АГII выполняет роль универсального медиатора повреждений тканей органов-мишеней и самих сосудов, принимает участие в механизмах повреждения почек, эндотелия сосудов и сосудистой стенки, действует как фактор роста и фиброгенный пептид. При участии брадикинина образуются вазодилаторы простагландин и оксид азота, посредством которых оказывается антимиграционное и антипролиферативное действие на гладкомышечные клетки стенки сосудов, а также ингибирование адгезии тромбоцитов [1–3, 45, 46]. Важнейшим из всех ферментов, связывающих между собой эти системы, является ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) [1]. АПФ присутствует в большинстве тканей и в жидких средах организма, но наибольшее его количество содержится в мембранно-связанном состоянии на люминальной поверхности плазматических мембран эндотелиальных и эпителиальных клеток. Вследствие этого именно кровеносные сосуды служат основным местом превращения

АГ в АГII [1, 12, 13, 49, 59]. Кроме АПФ, в сосудистой стенке обнаружены и другие компоненты РАС: ренин, ангиотензиноген, АГ и рецепторы к нему [12, 13, 30, 50, 60].

В различных исследованиях установлено, что при сердечно-сосудистых заболеваниях наблюдается гиперактивация преимущественно локальной (тканевой) РАС, которая в 1000 раз превышает ее активность в системном кровотоке, а это способствует повышению интереса к изучению эффектов РАС на тканевом, клеточном и внутриклеточном уровнях [2, 3].

Тканевая РАС глаза

Впервые предположение о существовании РАС глаза было сделано после обнаружения активности АПФ в гомогенатах сетчатки [30]. В последующем компоненты РАС были обнаружены у экспериментальных животных и человека в слезной жидкости, водянистой влаге, стекловидном теле, а также в кровеносных сосудах хориоидеи, сетчатки и цилиарного тела [18, 28, 48], причем уровень ретинального АГII и проренина (предшественника ренина) значительно превышал содержание их в плазме крови [12]. В результате иммуногистохимических исследований установлена локализация специфических ангиотензиновых рецепторов (АГI и АГII) в ганглиозных и амакриновых клетках сетчатки [42, 50]. Ренин и АГII обнаружены в мюллеровых и амакриновых клетках. При этом ренин содержался в отростках мюллеровых клеток, контактирующих со стенкой сосудов сетчатки, что указывает на вероятное участие их в локальных эффектах РАС [7, 14]. В норме АГI и АГII не обнаруживаются во внутриглазных жидкостях, однако при нарушении гемоторетинального барьера возможно поступление компонентов РАС из плазмы в среды глаза [13].

Изучение физиологической функции РАС глаза свидетельствует об участии ее компонентов в регуляции тока крови в увеальном тракте и сетчатке, продукции внутриглазной жидкости, а также в ряде патологических процессов [18, 37, 52, 53]. В 1999 г. J. Nadal и соавт. показали, что АГII индуцирует миграцию перицитов микрососудов сетчатки, стиму-