

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 616-006.04-092:577.175.641-092.2

Л. М. Берштейн, Е. В. Цырлина, Т. Е. Порошина, В. Б. Гамаюнова, Д. А. Васильев, И. Г. Коваленко, Н. В. Бычкова

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИВАЛЕНТНОСТЬ ЭСТРОГЕНОВ И ФЕНОМЕН ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ ЭСТРОГЕННОГО ЭФФЕКТА: РОЛЬ В РАЗВИТИИ ВОЗРАСТНОЙ ПАТОЛОГИИ¹

Лаборатория онкоэндокринологии НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Работа подготовлена на основании доклада, представленного на 4-м Российском конгрессе эндокринологов. Апробирована экспериментальная модель, с помощью которой изучены факторы, модифицирующие утеротропное действие эстрогенов таким образом, что при этом: а) усиливается ДНК-повреждающее действие этих гормонов и ослабляется их гормональный эффект; б) отмечается лишь усиление генотоксического компонента в действии эстрогенов. На этом основании подтверждается представление о существовании соответственно полного и неполного варианта "феномена переключения эстрогенного эффекта" и высказывается предположение о его связи с одновременным возрастным нарастанием частоты заболеваний, являющихся следствием как дефицита эстрогенов, так и избыточной эстрогенной стимуляции.

This paper is based on the report presented at the 4th Russian Congress of Endocrinology. An experimental model is tried; using this model, we studied factors modifying the uterotrophic effects of estrogens so that (1) the DNA-damaging effects of these hormones are stimulated and their hormonal effect attenuated and (2) only the genotoxic component in the estrogen effect is stimulated. This corresponds to existence of two types (complete and incomplete) of the estrogen effect switching (EES). EES is hypothesized to be related to the simultaneous age-associated increase in the incidence of diseases resulting from estrogen deficiency (due to decrease of hormonal component) or excessive stimulation (due to genotoxic effect of estrogens).

Эстрогены относятся к числу гормонов, которые "следовало бы выдумать, если бы их не было" [1]. Понятно, что так можно говорить лишь о соединениях, чей недостаток в организме весьма заметен и приводит к серьезным последствиям. Действительно, целый ряд заболеваний, выявляемых в период менопаузы (в первую очередь сердечно-сосудистые заболевания, ассоциированные с гиперлипидемией, остеопороз, некоторые проявления старческой деменции и т. д.) развиваются и/или прогрессируют на фоне эстрогенодефицита. С другой стороны, по мере старения регистрируется все большее число заболеваний, существенным стимулом для развития которых является избыточная эстрогенная стимуляция: к их числу следует отнести прежде всего некоторые эстрогензависимые опухоли, в частности рак эндометрия и молочной железы.

Если придерживаться представления о том, что вышеупомянутые патологические процессы, которыми в значительной степени определяется/ограничивается продолжительность жизни современного человека, в действительности есть следствие, с одной стороны, дефицита эстрогенов, а с другой, — их избытка, то естественно возникает вопрос, каким образом совмещаются столь разные "векторы" и как они приводят к одновременному возрастному нарастанию частоты заболеваний, характеризующихся прямо противоположной зависимостью от эстрогенов. Задача настоящей работы (основанной на материалах доклада, представленного на 4-м Российском конгрессе эндокринологов) состоит в том, чтобы попытаться дать один из возможных от-

ветов, разрешающих эту дилемму. В основе развиваемой точки зрения лежит представление о бифункциональности эстрогенов и о формировании на ее основе и под влиянием некоторых дополнительных условий так называемого "феномена переключения эстрогенного эффекта" (ФПЭ).

Своеобразная двойственность эстрогенов способна проявляться и проявляется различными способами, далеко не полной иллюстрацией чего может служить табл. 1. В интересах дела и краткости изложения перейдем сразу к заключительному пункту этой таблицы, в определенном смысле отражающему суть обсуждаемой проблемы, а именно к вопросу о том, что следует понимать под гормональным и генотоксическим эффектом эстрогенов и почему исследование этих их свойств представляет несомненную важность.

В данном отношении необходимо отметить, что эстрогены характеризуются определенным своеоб-

Таблица 1

Примеры бифункциональности эстрогенов

Процесс	Способ(ы) его выражения
Производство эстрогенов	Гонадная и внегонадная
Воздействие на клетку (генотоксическое/гормональное)	Отсроченное и быстрое (в основе чего лежит существование соответственно ядерных и мембранных эстрогенных рецепторов, а также вне-рецепторных способов воздействия эстрогенов на клетку)
Эффекты и последствия (А)	Репродуктивные (например, влияние на развитие матки и молочных желез) и нерепродуктивные (например, влияние на липидный обмен или деятельность центральной нервной системы)
Эффекты и последствия (Б)	Гормональный (эндокринный: например, увеличение массы матки) и генотоксический (повреждение ДНК)

¹Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 00-04-48512).

разием во влиянии на чувствительные к ним ткани, что является одной из ключевых проблем для понимания путей реализации процессов эстрогено-посредованного роста в органах репродуктивной системы. В матке эти гормоны способны вызывать пролиферативный ответ, сопровождающийся экспрессией значительного числа генов и кодируемых ими белков (к их числу относятся, в частности, пероксидаза и рецепторы прогестерона). Считается, что обычно эффект эстрогенов опосредуется их взаимодействием с одноименными рецепторами и не сопровождается повреждением ДНК. Действительно, в условиях, которые принято считать нормальными или физиологическими, продемонстрировать ДНК-повреждающий эффект так называемых классических эстрогенов удается далеко не всегда. В то же время в последние два десятилетия накапливается все большее число наблюдений, подтверждающих представление о том, что вовлечение эстрогенов в процесс гормонального канцерогенеза сводится к исполнению ими роли факторов не только промоции (в первую очередь усиленной пролиферации), но и инициации, способных прямо или опосредованно (в частности, через образование свободнорадикальных продуктов обмена производных классических эстрогенов — так называемых катехолэстрогенов) повреждать ДНК. Как следствие это явилось основанием для выделения 2 основных типов гормонального канцерогенеза: промоторного и генотоксического [2, 7]. Естественно, возникает вопрос об условиях или воздействиях, способствующих повышению доли генотоксического компонента в общем эффекте эстрогенов (в частности, на ткань матки), так как под влиянием этих факторов могут "складываться" как тип гормонального канцерогенеза, так и биологические свойства возникающих гормонозависимых опухолей, которые в случае превалирования индуцированных гормонами генотоксических повреждений отличаются менее благоприятным клиническим течением [2].

В поисках решения данной проблемы, представляющей несомненную значимость и для различных аспектов фундаментальной эндокринологии, мы разработали и использовали экспериментальную модель, позволившую оценить и сопоставить выраженность гормонального (эндокринного) и генотоксического эффекта эстрогенов и изменение соотношения этих эффектов под влиянием разнообразных модифицирующих факторов. В числе этих факторов были апробированы комбинированные с эффектом эстрадиола воздействия табачного дыма, различных концентраций этанола и различных доз гамма-облучения всего тела. С другой стороны, параллельно предпринималась попытка репарировать возникающие изменения с помощью средств, которые реально или предположительно обладают антигенотоксическими свойствами.

Материалы и методы

Было использовано более 350 крыс-самок разведения питомника "Рапполово". В типичном эксперименте крысам (имевшим в начале опыта возраст 2,5—3 мес) спаивали обычную питьевую воду или

5% раствор этанола в течение 4 мес. Среди других средств воздействия использовали следующие: а) влияние обработки табачным/сигаретным дымом (в специальной пластиковой камере, 5 раз в неделю, длительность сеанса 90 мин); б) спаивание 15% раствора этанола (с помощью которого в противоположность "обычному" 5% раствору моделируется ситуация, эквивалентная состоянию хронического алкоголизма); в) однократное тотальное облучение тела в дозе 0,2 Гр за 2 мес до конца эксперимента (так называемая "меньшая доза облучения" — МД); г) то же воздействие в дозе 2 Гр ("большая доза облучения" — БД). За 2,5 нед до конца эксперимента всех крыс подвергали билатеральной овариэктомии и в течение 11 дней, предшествующих завершению опыта, животные получали по 2 мкг/день эстрадиола внутримышечно. Следует отметить, что перед началом каждого опыта всех крыс подразделяли на 7 групп. Крысы, вошедшие в 2-ю группу, служили "контролем" (эстрадиол), а животных 2—7-й группы в качестве основного компонента подвергали тому или иному из вышеупомянутых воздействий в комбинации с эстрадиолом. Кроме того, крысам 3-й группы с 1-го дня эксперимента 5 раз в неделю вводили N-ацетилцистеин (100 мг/кг массы тела внутрь с помощью зонда), 4-й — аскорбиновую кислоту (витамин С 50 мг/кг и альфа-токоферол, витамин Е 40 мг/кг внутримышечно), 5-й — мелатонин (1 мг/кг подкожно) и 6-й — карнозин (100 мг/кг внутривентрально). Крысы 7-й группы 5 раз в неделю плавали в развивающем режиме (т. е. с постепенным увеличением длительности сеанса плавания от 5 до 60 мин). Утром последнего дня опыта крыс взвешивали (так же, как до начала опыта и перед овариэктомией) и декапировали, быстро собирая кровь для определения в сыворотке концентрации эстрадиола радиоиммуннологическим методом (наборы фирмы "Белорис", Беларусь) и холестерина энзимокolorиметрическим методом (наборы фирмы "Рэндокс", Англия). Матки выделяли, взвешивали, при необходимости гомогенизировали на холоду в физиологическом растворе или 0,05 М трис-буфере (рН 7,4) и делили на аликвоты для оценки содержания рецепторов прогестерона, активности эстрогензависимой пероксидазы гваяковым методом, содержания ядерной ДНК методом проточной цитометрии (доля клеток в S- и G₂M-фазах и индекс пролиферации и повреждения ДНК методом гель-электрофореза — (COMET-assay) в модификации, пригодной для клеток, изолированных из солидных тканей. Для оценки толщины интраматочного эпителиального слоя материал фиксировали в 10% формалине, заливали в парафин и проводили гистоморфометрический анализ. Для изучения возможного влияния исследуемых факторов на метаболизм эстрогенов у части крыс определяли активность эстрадиол-2-гидроксиферменты в печени (поскольку в ткани матки активность этого фермента весьма низка). Содержание белка в гомогенатах ткани определяли методом Лоури. Результаты работы подвергали статистической обработке с расчетом *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна—Уитни (при отсутствии нормального распределения данных в сравниваемых группах). Необходимо лишь раз уточнить,

Таблица 2

Гормональный и ДНК-повреждающий эффект E_2 и его комбинации с этанолом ($M \pm m$)

Группа	Масса матки, мг	ПР, фМ/мг белка	Оценка COMET-assay		
			число, %	СДХ/1 клетка с кометой	СДХ/100 сосчитанных клеток
E_2	373 ± 21	365 ± 25	19,1 ± 9,1	3,6 ± 0,32	0,52 ± 0,2
E_2 + 5% этанол	378 ± 28	335 ± 28	38,6 ± 9,4	4,5 ± 0,30	2,4 ± 0,49*
E_2 + 15% этанол	336 ± 14	89 ± 37	32,9 ± 10,2	5,3 ± 1,1	3,5 ± 0,8
E_2 + 15% этанол	298 ± 11*	45 ± 8	83,1 ± 5,2*	9,8 ± 1,4*	8,8 ± 1,3*

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: E_2 — эстрадиол; ПР — содержание рецепторов прогестерона в ткани матки.

СДХ — средняя длина хвоста кометы (в усл. ед.) при измерении в люминесцентном микроскопе.

* — $p < 0,05$ при сравнении с группой " E_2 " (эффекты 5% и 15% этанола исследовали в отдельных экспериментах).

В каждой группе в 1 опыте использовали 12–14 крыс.

что масса матки крыс, индукция в ней рецепторов прогестерона и активности пероксидазы, интенсивность пролиферации и толщина эпителия во внутренней выстилке матки рассматривались как показатели гормонального (эндокринного) эффекта эстрогенов, а результаты анализа "комет" свидетельствовали о степени повреждения ДНК (генотоксическом эффекте).

Результаты и обсуждение

Основные типичные данные, полученные в ходе исследования, представлены в табл. 2–3 (соответствующие сведения, характеризующие модифицирующее влияние табачного дыма на эффект эстрогенов, приведены в нашей предыдущей работе [5]). Как видно из табл. 2, 3, в зависимости от использованного средства воздействия его комбинация с эстрадиолом привела к увеличению степени повреждения ДНК и/или к ослаблению гормонального эстрогенного эффекта. Кажущееся парадоксальным влияние больших доз облучения (меньший генотоксический эффект при комбинировании с эстрадиолом, чем при использовании меньших доз радиации — см. табл. 3) может быть объяснено более интенсивной стимуляцией репарации ДНК в первом случае [6]. Отметим также, что исследовать изолированное (без сопутствующего введения эстрадиола) влияние модифицирующего агента (например, этанола или облучения) на изучавшиеся параметры в условиях настоящего эксперимента было затруднительно, поскольку если эстрадиол не вводится, размеры маток у крыс, подвергнутых овариэктомии, оказываются малы и получить из них количество материала, достаточное для проведения COMET-assay без значимой технической ошибки, практически не представляется возможным. Для разрешения этих и некоторых других пограничных проблем был поставлен дополнительный опыт, в котором оценивали эндокринный и генотоксический эффект 3 доз эстрадиола — используемой обычно (2 мкг/день) и еще 2 доз, соответственно на порядок (0,2 мкг/день) и на 2 поряд-

Таблица 3

Гормональный и ДНК-повреждающий эффект E_2 и его комбинации с гамма-облучением ($M \pm m$)

Группа	Масса матки, мг	ПР, фМ/мг белка	Оценка COMET-assay		
			число, %	СДХ/1 клетка с кометой	СДХ/100 сосчитанных клеток
E_2	359 ± 26	195 ± 33	58,8 ± 13,1	47,1 ± 4,9	27,5 ± 7,1
E_2 + МД	341 ± 13	133 ± 3	87,1 ± 6,9	91,0 ± 17,5*	84,0 ± 19,3*
E_2 + БД	357 ± 14	91 ± 3*	74,2 ± 10,0	29,7 ± 4,2**	25,2 ± 4,7**

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой " E_2 "; ** — $p < 0,05$ по сравнению с группой " E_2 + МД".

ка (0,02 мкг/день) меньших. Основной вывод, который следует из суммирующей эти наблюдения табл. 4, сводится к тому, что дозозависимость присуща лишь гормональному эффекту эстрадиола и, следовательно, в индукции феномена переключения эстрогенного эффекта (см. также ниже) в действительности играет роль не столько концентрация эстрогена, сколько скорее всего вовлечение в процесс модифицирующих факторов.

Суммируя представленные наблюдения, следует прежде всего напомнить, что, как мы уже отмечали ранее [3], ФПЭ может обозначаться как полный (при котором как усилен генотоксический, так и ослаблен гормональный компонент эстрогенного действия) и неполный (при котором выявляется только усиление повреждения ДНК), и соответствующим же образом могут классифицироваться его индукторы. Действительно, под влиянием значительного числа изученных воздействий отмечено достоверное увеличение средней длины хвоста комет или их числа, что свидетельствовало о возрастании степени повреждения ДНК в исследованном материале. В ряде случаев это сопровождалось ослаблением гормонального эффекта эстрогенов, о чем можно было судить, в частности, по уменьшению содержания рецепторов прогестерона в ткани матки или массы последней (см. табл. 2–3) и работа [5]. Согласно полученным нами данным к числу полных индукторов упомянутого феномена следует относить продолжительное курение и мо-

Таблица 4

Содержание E_2 в крови и утеротропные эффекты E_2 при его внутримышечном введении в различных концентрациях в течение 11 дней ($M \pm m$)

Группа	Показатель			Число комет в ткани матки, %
	E_2 крови, пМ/л	Масса матки, кг	ПР, фМ/мг белка	
Контроль	299 ± 55	66 ± 4	12 ± 6	30,4 ± 9,8
E_2 (0,02 мкг/день)	241 ± 31	96 ± 3	42 ± 7	24,8 ± 9,2
E_2 (0,2 мкг/день)	385 ± 48	213 ± 16	93 ± 7	16,6 ± 13,3
E_2 (2,0 мкг/день)	435 ± 47*	288 ± 23*	157 ± 28*	388 ± 16,9

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой " E_2 (0,02 мкг/день)". В каждой группе 9–10 овариэктомизированных 3-месячных крыс. В отношении данных о числе комет в группе "контроль" (где эстрадиол не вводили) — см. дополнительно текст.

Таблица 5

Классификация и индукторы феномена переключения эстрогенного эффекта (суммация накопленных экспериментальных данных)

Фактор (воздействие)	Вариант ФПЭ		
	неполный (Ген+)	полный (Горм-/Ген+)	отсутствует (Горм =/-)
Кратковременная обработка табачным дымом			X
Продолжительная обработка табачным дымом		X	
5% этанол	X		
15% этанол		X	
МД	X		
БД			X
Старение	В процессе изучения		

Примечание. Ген+: усиление генотоксического эффекта; Горм-/=: гормональный эффект ослаблен или не изменен.

делирующее состояние хронического алкоголизма спавивание крысам 15% этанола, а к числу неполных — потребление алкоголя в более умеренных концентрациях и однократное тотальное гамма-облучение животных в меньшей из 2 исследованных доз. Потенциальным индуктором того или другого варианта ФПЭ может явиться и постарение организма (табл. 5), что является в настоящее время предметом дальнейших исследований.

В отличие от особенностей устранения ФПЭ, индуцированного этанолом, когда наиболее эффективной формой воздействия оказывается сочетание N-ацетилцистеина с витаминами С и Е [3], коррекция модифицирующего действие эстрогенов влияния облучения достигается, по полученным нами данным, преимущественно под влиянием плавания и введения карнозина. В последнем случае, как оказалось, лишь карнозин препятствовал и ослаблению гормонального эффекта эстрадиола (при оценке по индукции рецепторов прогестерона), и усилению его ДНК-повреждающего действия. В совокупности это, скорее всего, свидетельствует как об определенных различиях в механизмах индукции феномена переключения эстрогенного эффекта под влиянием различных модифицирующих факторов, так и о разнообразии биохимических реакций, вовлекаемых в предупреждение развития ФПЭ. В частности, карнозин, который на протяжении многих лет рассматривался преимущественно как антиоксидант, является и природным антигликирующим агентом [4]. В этом отношении важно подчеркнуть, что усиление процессов гликозилирования, характерное для старения и реакции организма на облучение, возможно, так или иначе вовлечено и в процесс передачи эстрогенного сигнала [8].

Возвращаясь к началу настоящей работы и принимая во внимание полученные данные, можно сделать заключение о том, что одновременное нарастание по мере старения частоты заболеваний, связанных как с недостаточностью эстрогенов, так и с проявлениями избыточной эстрогенной стимуляции, может объясняться формированием в определенных условиях ФПЭ. Последний, как указано выше, характеризуется сочетанием ослабленных гормональных свойств эстрогенов с усилением их генотоксического эффекта. Таким образом, в условиях реального возрастного эстрогенодефицита относительное превалирование генотоксического компонента создает условия для развития тех заболеваний, для которых повреждение ДНК имеет ведущее, ключевое значение, в частности, для возникновения ряда гормонозависимых опухолей. Данное обстоятельство следует принимать во внимание при уточнении как подходов к профилактике эстрогениндуцированного канцерогенеза, так и групп лиц, которым показано или не показано проведение заместительной эстрогенотерапии в менопаузе [1].

Выводы

1. Апробирована экспериментальная модель, с помощью которой изучены факторы, модифицирующие утеротропное действие эстрогенов таким образом, что при этом: а) усиливается ДНК-повреждающее действие этих гормонов и ослабляется их гормональный эффект; б) отмечается лишь усиление генотоксического компонента в действии эстрогенов.

2. На этом основании подтверждается представление о существовании соответственно полного и неполного варианта ФПЭ и высказывается предположение о связи ФПЭ с одновременным возрастным нарастанием частоты заболеваний, являющихся следствием как дефицита эстрогенов, так и избыточной эстрогенной стимуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л. М. Внегонадная продукция эстрогенов (роль в физиологии и патологии). — СПб, 1998.
2. Берштейн Л. М. Гормональный канцерогенез. — СПб, 2000.
3. Берштейн Л. М., Цырлина Е. В., Порошина Т. Е. и др. // Рос. физиол. журн. — 2001. — Т. 87, № 3. — С. 373—377.
4. Болдырев А. А. Карнозин. — М., 1998.
5. Berstein L. M., Tsyrlina E. V., Gamajunova V. B. et al. // Horm. Metab. Res. — 1999. — Vol. 31. — P. 27—30.
6. Feinendegen L. E. // Stem Cells. — 1995. — Vol. 13. — Suppl. 1. — P. 7—21.
7. Liehr J. G. // Eur. J. Cancer Prev. — 1997. — Vol. 6. — P. 3—10.
8. Tanaka N., Yonekura H., Yamagishi S. et al. // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 25781—25790.

Поступила 13.03.01