

УДК 577.152.199.1/175.64

## КВЕРЦЕТИН – НОВЫЙ НЕОБРАТИМЫЙ ИНГИБИТОР ЦИТОХРОМА P450 АРОМАТАЗЫ

*Ясинская И. М.*

Цитохром P450 XIXA1 ароматаза (КФ: 1.14.14.1) – НАДФН+Н<sup>+</sup> зависимый фермент, катализирующий последовательное гидроксирование андростендиона и тестостерона в положениях 19 (трижды) и 2 (однократно), сопровождающееся ароматизацией кольца А стероидного ядра с образованием эстрона и эстрадиола, соответственно [1].

Известно, что ароматаза играет значительную роль в развитии рака молочной железы у человека [2]. Чувствительные к эстрогенам рецепторы оказывают положительный эффект на деление клеток и соответственно рост опухоли [2]. Активность ароматазы значительно повышается в клетках злокачественных новообразований молочной железы. Установлено, что ингибирование ароматазы при раке молочной железы тормозит эстроген – зависимый опухолевый рост [2, 3].

Недостатком ингибиторов ароматазы, применяемых в фармакологической практике, является их инородность по отношению к человеческому организму, а также их способность влиять на активность различных ферментов, участвующих в стероидогенезе [2]. В связи с этим, поиск природных высокоспецифичных ингибиторов ароматазы представляет научный и практический интерес.

Нами установлено, что изофлавоноид генистеин конкурентно ингибирует ароматазу в опытах *in vitro* и как фитоэстроген тормозит экспрессию ее гена в опытах *in vivo* [4, 5]. К данному агенту чрезвычайно близок по орбитальной структуре фармакологически активный флавоноид – кверцетин [6]. Однако данные о влиянии кверцетина на активность ароматазы и образование эстрогенов практически отсутствуют в современной литературе.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния кверцетина на активность высокоочищенной ароматазы в опытах *in vitro*, а также исследование активности фермента в яичниках и матке крыс, получавших кверцетин в опытах *in vivo*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования *in vitro* влияния кверцетина на активность ароматазы был получен высокоочищенный ферментный препарат из матки крыс описанным нами ранее методом [7]. Степень очистки фермента в нем составила 301 раз, а выход фермента – 78,5 %. Активность ароматазы определяли описанным ранее методом, основанном на регистрации количества окисляемого ферментом НАДФН+Н<sup>+</sup> в присутствии субстрата (тестостерона) в течение 1 минуты на 1 мг белка [8]. Влияние кверцетина на активность ароматазы изучали при его конечных

концентрациях – 18,75 – 100 нМ. Концентрация субстрата при этом составляла 4 мМ. Кинетику реакции изучали при концентрациях субстрата – 0,5; 1; 2 и 4 мМ.

In vivo влияние кверцетина на активность ароматазы и образование эстрогенов изучали на 10 однопометных крысах – самках (возраст 5 месяцев, масса тела –  $200 \pm 20$  г). Крыс делили на две группы (по 5 голов). Животным первой группы внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл 0,9 % раствора хлористого натрия, а животным второй группы – раствор кверцетина в 0,9 % растворе хлористого натрия из расчета 20 мг на 1 кг массы тела. Все инъекции производили в течение 3-х дней с интервалом в 24 часа. Через два часа после последней инъекции животных усыпляли хлороформом и производили забор крови из правого желудочка сердца, гепаринизировали и центрифугировали для получения сыворотки. В сыворотке крови животных определяли суммарное содержание эстрогенов по известной методике [9]. После забора крови животных декапитировали и изолировали матку и яичники. Органы гомогенизировали в девятикратном объеме 0,25 М сахарозы и определяли активность ароматазы описанным выше методом при концентрациях субстрата в реакционных системах – 0,5; 1; 2 и 4 мМ.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с *t* – критерием Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что кверцетин тормозит активность ароматазы в ничтожно малых концентрациях по сравнению с ксено- и фитоэстрогенами – от 18,75 до 100 нМ (рис. 1). По данным кинетического анализа ингибирование носит конкурентный характер (рис. 2). Ингибиторная константа, рассчитанная методом Диксона [10] составила 15,6 нМ.

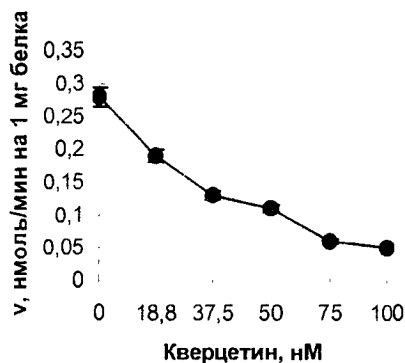


Рис.1. Зависимость скорости ароматазной реакции от концентрации кверцетина в реакционной системе

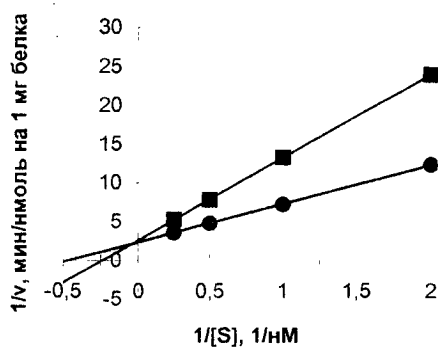


Рис.2. Зависимость скорости ароматазной реакции от концентрации субстрата в отсутствии (●) и в присутствии (■) 18,75 нМ кверцетина

Данная величина близка к величинам ингибиторных констант для необратимых конкурентных ингибиторов ароматазы – форместана (10,2 нМ), экземестана (26 нМ) и т. д. Из полученных данных видно, что кверцетин обладает высоким сродством к связывающему сайту активного центра ароматазы, но не ясно, является ингибирование обратимым или же носит необратимый характер.

В ходе исследования *in vivo* влияния кверцетина на активность цитохрома P450 ароматазы установлено, что в яичниках и матке крыс, получавших кверцетин, активность фермента достоверно снижалась (табл. 1).

Таблица 1.

Активность ароматазы в яичниках и матке крыс, получавших кверцетин ( $n = 5$ )

Условия эксперимента	Активность ароматазы, нмоль $\times$ мин <sup>-1</sup> на 1 мг белка
<b>Яичники</b>	
Контроль	0,30 $\pm$ 0,08
Кверцетин, 20 мг/кг	0,12 $\pm$ 0,02*
<b>Матка</b>	
Контроль	1,02 $\pm$ 0,06
Кверцетин, 20 мг/кг	0,8 $\pm$ 0,07*

\* – различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Этому соответствовало достоверное снижение суммарного содержания эстрогенов в сыворотке крови животных, получавших кверцетин (рис. 3).

Исследования кинетики ароматазной реакции в органах крыс, получавших кверцетин, показало, что ингибирование носит конкурентный характер. Максимальная скорость реакции по сравнению с контролем носила постоянный характер, в то время как константа Михаэлиса увеличивалась (рис. 4 и 5). В случае обратимого конкурентного ингибирования невозможно зарегистрировать его, проведя кинетический анализ реакции в гомогенатах органов, так как насыщение реакционной системы субстратом приводит к полному вытеснению присутствующего в гомогенате ингибитора из активного центра фермента. Из полученных данных можно сделать вывод, что конкурентное ингибирование, так же как и в случае с форместаном, экземестаном и некоторыми другими фармакологически активными веществами – ингибиторами ароматазы, носит необратимый характер.

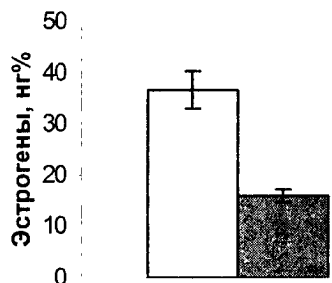


Рис. 3. Содержание эстрогенов в плазме крови контрольных (белый цвет) и получавших кверцетин (серый цвет) крыс.

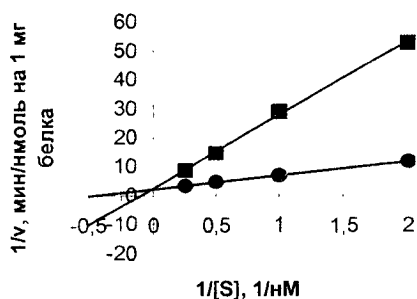


Рис.4. Зависимость скорости ароматазной реакции от концентрации субстрата в яичниках контрольных (●) и получавших кверцетин (■) крыс

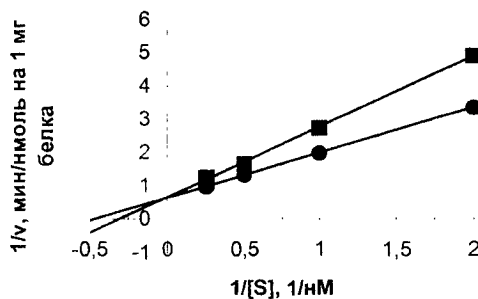


Рис.5. Зависимость скорости ароматазной реакции от концентрации субстрата в матке контрольных (●) и получавших кверцетин (■) крыс

Таким образом, кверцетин является необратимым конкурентным ингибитором ароматазы, обладающим высоким сродством к ее активному центру. Кроме того, он является природным фармакологическим агентом в отличие от форместана, экземестана и других синтетических ингибиторов. Полученные результаты позволяют рекомендовать его к исследованиям в качестве фармакологического агента, способного уменьшать активность ароматазы и тормозить биосинтез эстрогенов в целостном организме.

### Список литературы

1. Korzekwa K. R., Trager W. F., Smith S. J. et al. Theoretical studies on the mechanism of conversion of androgens to estrogens by aromatase // *Biochemistry*. – 1991. – 30. – P. 6155-6162.
2. Njar V. C. O., Brodie A. M. H. Comprehensive pharmacology and clinical efficacy of aromatase inhibitors // *Drugs*. – 1999. – 58. – P. 233-255.
3. Ларионов А. А., Упоров А. В., Семиглазов В. Ф., Берштейн Л. М. Связь активности ароматазы в опухолевой ткани с характеристикой заболевания и показателями репродуктивного статуса у больных раком молочной железы // *Вопросы онкологии*. – 1998. – 44, № 1. – С. 37-42.
4. Ясинская И. М., Розанов А. Я. Влияние нестероидных эстрогенов на активность ароматазы // *Укр. биохим. журн.* – 2001. – 73, № 3 (в печати).
5. Yasinska I. M., Sumbayev, V. V. The regulation of the aromatase activity by the reductors – antioxidants, glucocorticoids and unsteroid estrogens. // 18-th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in Birmingham, UK. July 2000. – Abstract Book. – P. 322.
6. Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. – М.: Мир, 1965. – 481 с.
7. Yasinska I. M. Aspartate and glutamate as spacers for aromatase purification by affinity precipitation. // *Amino Acids*. – 1999. – 17. – P. 66-67.
8. Ясинская И. М. Влияние восстановителей – антиоксидантов на активность ароматазы матки крыс *in vitro* // *Укр. биохим. журн.* – 2000. – 72, № 2. – С. 47–50.
9. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. – М.: Наука, 1965. – 545 с.
10. Диксон Р., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. – М.: Мир, 1961. – 728 с.