

© G.S. Chetrite<sup>1</sup>,  
H.H. Thole<sup>2</sup>,  
J.-C. Philippe<sup>1</sup>,  
J.R. Pasqualini<sup>1</sup>

Hormones & Cancer Research Unit,  
Institut de Puericulture, Париж,  
Франция<sup>1</sup>;  
Солвей Фармасьютикалс ГмбХ,  
Ганновер, Германия<sup>2</sup>

## ДИДРОГЕСТЕРОН (ДЮФАСТОН) И ЕГО 20-ДИГИДРО-МЕТАБОЛИТ КАК СЕЛЕКТИВНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ ЭСТРОГЕННЫХ ЭНЗИМОВ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЧЕЛОВЕКА.

### ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТАЗЫ И 17 $\beta$ -ГИДРОСТЕРОИД-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ\*

■ Представленные данные открывают интересные перспективы для изучения биологических ответов прогестагенов в клинических испытаниях у больных раком молочной железы. Эстрадиол является одним из основных факторов, контролирующих рост и развитие рака молочной железы. Поэтому важной целью исследований последних лет является блокирование образования эстрадиола внутри раковых клеток. В опухолевых клетках молочной железы есть все ферментативные системы, участвующие в превращении предшественников эстрогенов в эстрадиол (например, сульфатаза, ароматаза, 17 $\beta$ -гидростероид-дегидрогеназа). В этих клетках присутствует также сульфотрансфераза, превращающая эстроген в его сульфат. В представленном исследовании мы изучали влияние дюфастона и его 20-дигидро-метаболита на активность сульфатазы и 17 $\beta$ -гидростероид-дегидрогеназы в клетках MCF-7 и T-47D рака молочной железы.

■ **Ключевые слова:** дидрогестерон; прогестагены; клетки рака молочной железы; сульфатаза; 17 $\beta$ -гидростероид-дегидрогеназа

Доказано, что ткань рака молочной железы содержит все ферменты, ответственные за локальный биосинтез эстрадиола (E<sub>2</sub>) из циркулирующих предшественников. Последние этапы образования эстрадиола в опухолевых тканях молочной железы проходят двумя основными путями: «ароматазным», трансформирующим андрогены в эстрогены [1, 2], и «сульфатазным», который превращает сульфат эстрона (E<sub>1</sub>S) в эстрон (E<sub>1</sub>) при помощи эстрон-сульфатазы [3–5]. Последний этап стероидогенеза — это преобразование более слабого эстрона в мощный биологически активный эстрадиол за счет редуктазной активности 17 $\beta$ -гидростероид-дегидрогеназы I типа (17 $\beta$ -ГСД-I) [6–8].

Количественная оценка показывает, что в опухолевых тканях молочной железы предшественником эстрадиола скорее всего является сульфат эстрона, а не андростендион, таким образом, синтез эстрадиола происходит преимущественно «сульфатазным» путем. [9–11].

Также было установлено, что в тканях рака молочной железы присутствуют стероидные сульфотрансферазы, превращающие эстрогены в их сульфаты [12–14]. Вся эта информация расширяет понятие «интракринологии», согласно которому гормон действует в том же самом органе, в котором он образуется.

В данном исследовании мы изучали влияние дидрогестерона (дюфастона) и его 20-дигидро-метаболита на эстрон-сульфатазу в линиях MCF-7 и T-47D клеток рака молочной железы, а также на редуктазную активность 17 $\beta$ -гидростероид-дегидрогеназы I типа в клетках T-47D.

## Материалы и методы

### Химические препараты

[6,7-<sup>3</sup>H(N)]-эстрона сульфат (<sup>3</sup>H-E<sub>1</sub>S); соль аммония (сп. акт. 53 Ci/mmol); [6,7-<sup>3</sup>H(N)]-эстрон (<sup>3</sup>H-E<sub>1</sub>) (сп. акт. 49 Ci/mmol); [4-<sup>14</sup>C]-эстрадиол (<sup>14</sup>C-E<sub>2</sub>) (сп. акт. 57 mCi/mmol) были приобретены в New England Nuclear Division (PerkinElmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). Чистота радиоизотопов определялась перед применением при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ) в соответствующей системе. Эстрона сульфат, соль аммония, немеченые эстрон и эстрадиол (аналитического уровня) были получены от Sigma-Aldrich Chimie (St. Quentin Fallavier, France). Дидрогестерон (дюфастон: (9 $\beta$ ,10 $\alpha$ )-прегна-4,6-диен-3,20-дион) и его метаболит — 20-дигидро-дидрогестерон — были предоставлены Solvay Pharmaceuticals GmbH (Hannover, Germany). Все другие

\* Оригинальная публикация статьи: © Anticancer Research. — 2004. — N 24. — P. 1433–1438.

\*\* © В. Прохорова. Редактор перевода на русский язык. НИИ АГ им. Д.О. Отта РАМН

химические препараты высшего качества приобретались коммерческим путем.

#### *Клеточная культура*

Гормонозависимые MCF-7 и T-47D линии клеток рака молочной железы человека были любезно предоставлены д-ром R.C. Clarke (Georgetown University, Washington, USA). Клетки выращивались в минимальной эссенциальной среде Иглы (МЭС), в буфере с 10 ммоль/л HEPES (органический химический буфер, pH 7,6), с добавлением 2 ммоль/л L-глутамина, 100 Е\мл пенициллин-стрептомицина и 5 % сыворотки плода теленка (СПТ) (A.T.G.C., Marne-la-Vallee, France) для T-47D, или 10 % СПТ для клеток MCF-7 и инкубировались при 37 °С в увлажненной атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Среды менялись два раза в неделю. Клетки высевались каждые 10–12 дней и переносились в чаши площадью 75 см<sup>2</sup> (A.T.G.C.) — 3 × 10<sup>6</sup> клеток на чашу. За четыре дня до эксперимента клетки переносились в МЭС, содержащую 5 % СПТ, лишенную стероидов специальной обработкой. Для удаления эндогенных стероидов эта СПТ обрабатывалась древесным углем, покрытым декстраном (УПД) (0,1–1 % вес\об, УПД–СПТ), в течение ночи при 4 °С.

*Выделение и количественное определение [<sup>3</sup>H]-эстрадиола из клеток рака молочной железы человека, инкубированных с [<sup>3</sup>H]-эстроном сульфатом*

Прекофлюэнтные<sup>1</sup> клетки культивировали в среде МЭС–УПД–СПТ с добавлением 5 × 10<sup>-9</sup> моль/л [<sup>3</sup>H]-эстроном сульфата отдельно (контрольные клетки) или в сочетании с различными составами: дигидрогестерон или его метаболит 20-дигидро-дигидрогестерон, растворенный в этаноле (конечная концентрация <0,3 %), при диапазоне концентраций 5 × 10<sup>-5</sup>–5 × 10<sup>-7</sup>–5 × 10<sup>-9</sup> моль/л.

Контрольные клетки растворялись только в этаноле. Через 24 часа среда удалялась, клетки дважды промывались ледяным буферным солевым раствором Хэнка (БСРХ, свободным от кальция и магния) (A.T.G.C.) и собирались путем соскабливания.

После центрифугирования соскоб обрабатывался 80 % этанолом и подвергался радиоактивной обработке минимум 24 часа при температуре –20 °С. Поглощение радиоактивности клетками определялось в супернатанте этанола, содержание ДНК в остальном соскобе оценивалось по Бартону [15]. Для контроля аналитических потерь добавлялся [<sup>14</sup>C]-эстрадиол (5,000 dpm), а немеченые эстрон и эстрадиол (50 мкг) приме-

нялись в качестве носителей и эталонных индикаторов. В совокупных этаноловых экстрактах эстрадиол изолировался при помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле 60F254 (Merck, Darmstadt, Germany), оснащенным хлороформ-этилацетатной системой (4:1, об\об). После визуализации эстрогенов в ультрафиолетовом свете при 254 нм, соответствующие участки разрезались на мелкие фрагменты, помещались в пробирки для сцинтилляции жидкостей с этанолом (0,5 мл) и подвергались экстракции в течение 30 минут. Содержание <sup>3</sup>H и <sup>14</sup>C анализировалось после добавления 3 мл опти-фтора (Packard, PerkinElmer Life Sciences), с холодной коррекцией для стандартизации. Количественно содержание эстрадиола определялось как процент от общей радиоактивности, связанной с клетками и затем выражалось в фмоль образовавшегося Е<sub>2</sub>/мг ДНК.

*Выделение и количественное определение [<sup>3</sup>H]-эстрадиола из T-47D клеток рака молочной железы человека, инкубированных с [<sup>3</sup>H]-эстроном*

Прекофлюэнтные клетки T-47D инкубировались в течение 24 часов при 37 °С в МЭС, содержащей 5 × 10<sup>-9</sup> моль/л [<sup>3</sup>H]-эстроном в отсутствии или присутствии дигидрогестерона (дюфастона) или его метаболита 20-дигидро-дигидрогестерона (5 × 10<sup>-5</sup>–5 × 10<sup>-7</sup>–5 × 10<sup>-9</sup> моль/л). В конце инкубации среду удаляли, клетки промывали, собирали, центрифугировали и анализировали, как ранее описано в экспериментальном разделе о конверсии [<sup>3</sup>H]-сульфата эстроном в [<sup>3</sup>H]-эстрадиол.

Качественный анализ и количественная оценка эстроном и эстрадиола проводились после изоляции при помощи ТСХ на пластинах силикагеля 60F254, снабженных системой хлороформ-этилацетат (4:1, об\об). Для контроля аналитических потерь добавлялся [<sup>14</sup>C]-эстрадиол (5,000 dpm), а в качестве носителей и эталонных индикаторов применялись немеченые эстрон и эстрадиол (50 мкг). После визуализации эстрогенов в ультрафиолетовом свете при 254 нм соответствующие участки разрезали на мелкие фрагменты, помещали в пробирки для сцинтилляции жидкостей с этанолом (0,5 мл) и оставляли для экстракции на 30 минут. Добавляли 3 мл опти-фтора (Packard, Rungis, France) и пробирки анализировались на содержание <sup>3</sup>H и <sup>14</sup>C с применением холодной коррекции для стандартизации. Количественная оценка трансформации [<sup>3</sup>H]-эстроном в [<sup>3</sup>H]-эстрадиол, соответствующая редуказной активности 17β-ГСД через 24 часа, производилась путем подсчета процента общей радиоактивности, связанной с клетками или средой и затем выражалась в фмоль Е<sub>2</sub>/мг ДНК.

<sup>1</sup> Конфлюэнтность — стадия развития клеточной культуры, когда клетки теряют способность к делению (Прим. ред.).

### Статистический анализ

Данные представлены как показатели средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средних значений (СОС). Для оценки достоверности применялся t-тест Стьюдента; показатели считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

*Влияние дидрогестерона (ДИД) и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона (ДГД) на активность эстрон-сульфатазы в гормонозависимых клеточных линиях MCF-7 и T-47D рака молочной железы человека*

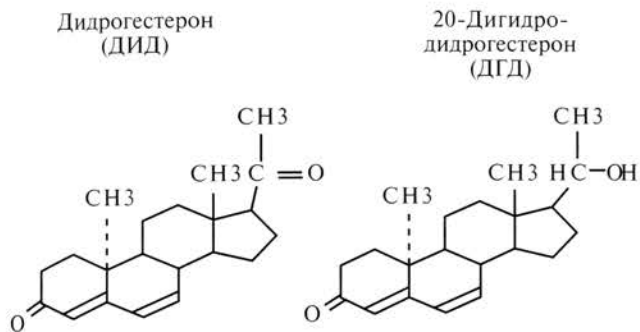


Рис. 1. Структура прогестагенов: дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона

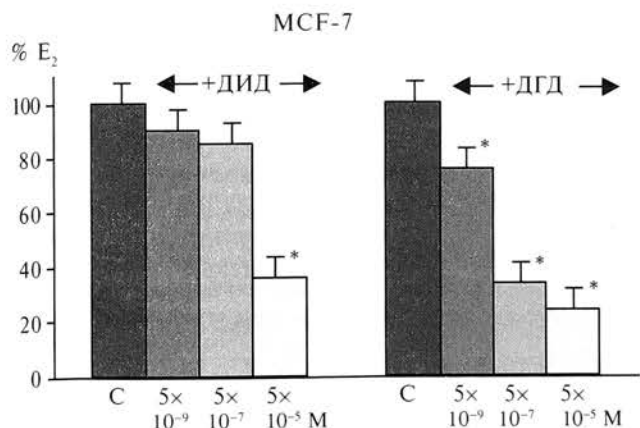


Рис. 2. Влияние дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона на конверсию эстрон-сульфата (E<sub>1</sub>S) в эстрадиол (E<sub>2</sub>) в гормонозависимых линиях MCF-7 клеток рака молочной железы человека:

Прекофлюэнтные клетки MCF-7 инкубировались в течение 24 часов при 37 °С только с эстрон-сульфатом в физиологической концентрации ([<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>S: 5×10<sup>-9</sup> моль/л) (в качестве контроля — необработанные клетки) или в присутствии дидрогестерона или его 20-дигидро-метаболита в концентрациях от 5×10<sup>-9</sup> до 5×10<sup>-5</sup> моль/л. Концентрация эстрадиола определялась после разделения гормонов, как указано в разделе «Материалы и методы». Процент влияния (в фмоль E<sub>2</sub>/мг ДНК, образовавшегося из E<sub>1</sub>S) был рассчитан посредством отношения: [(тест-контроль)/контроль]×100. Представлены средние значения данных  $\pm$  СОС в 2-х независимых дублирующих определениях. \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольными показателями

Поскольку сульфат эстрогена является наиболее важным предшественником эстрадиола в тканях рака молочной железы, особенно актуальным представляется поиск соединений, способных действовать как селективные модуляторы эстрогенных энзимов путем подавления активности эстрон-сульфатазы и 17 $\beta$ -гидростероид-дегидрогеназы или стимуляции активности сульфотрансферазы в клетках рака молочной железы. С этой целью мы протестировали способность дидрогестерона (дюфастона) и его 20-дигидро-метаболита (рис. 1) блокировать сульфатазный путь в клетках рака молочной железы.

Когда физиологические концентрации [<sup>3</sup>H]-эстрогена сульфата — 5×10<sup>-9</sup> М — инкубировались с гормонозависимыми клеточными линиями MCF-7 и T-47D рака молочной железы в течение 24 часов при 37 °С, внутриклеточная продукция эстрадиола в обеих линиях клеток была повышена (1975  $\pm$  211 и 1216  $\pm$  142 фмоль/мг ДНК для MCF-7 и T-47D клеток, соответственно) (табл. 1 и 2). Дидрогестерон существенно препятствовал активности эстрон-сульфатазы только при концентрации 5×10<sup>-5</sup> М (−63 и −48 % подавления в клетках MCF-7 и T-47D, соответственно). 20-дигидро-метаболит значительно снижал продукцию эстрадиола из суль-

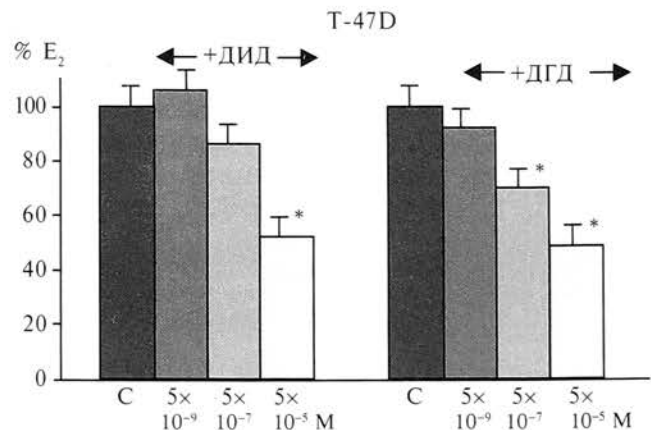


Рис. 3. Влияние дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона на конверсию эстрон-сульфата (E<sub>1</sub>S) в эстрадиол (E<sub>2</sub>) в гормонозависимых линиях T-47D клеток рака молочной железы человека:

Прекофлюэнтные клетки T-47D инкубировались в течение 24 часов при 37 °С только с эстрон сульфатом в физиологической концентрации ([<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>S: 5×10<sup>-9</sup> моль/л) (контроль — необработанные клетки) или в присутствии дидрогестерона или его 20-дигидро-метаболита в диапазоне концентраций от 5×10<sup>-9</sup> до 5×10<sup>-5</sup> моль/л. Концентрация эстрадиола определялась после разделения гормонов, как показано в «Материалах и методах». Процент влияния (в фмоль E<sub>2</sub>/мг ДНК, образовавшегося из E<sub>1</sub>S) был рассчитан посредством отношения: [(тест-контроль)/контроль]×100. Представлены средние значения данных  $\pm$  СОС в 2-х независимых дублирующих определениях. \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольными данными

фата эстрогена в зависимости от дозы в обеих линиях клеток. Ингибирующий эффект был высоким при концентрации  $5 \times 10^{-5}$  М ( $-74$  и  $-51$  % в MCF-7 и T-47D клетках, соответственно). При более низких концентрациях ингибирующий эффект на клетки MCF-7 составил  $-65$  и  $-24$  % при  $5 \times 10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-9}$  М, соответственно. Для клеточных линий T-47D показатели составили  $-31$  и  $-9$  %, соответственно (рис. 2 и 3). Значения  $IC_{50}$ , соответствующие 50 % ингибированию конверсии эстрогена сульфата в эстрадиол, были  $9,8 \times 10^{-6}$  М для дидрогестерона и  $7,1 \times 10^{-8}$  М для 20-дигидро-метаболита в линии клеток MCF-7.

*Влияние дидрогестерона (ДИД) и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона (ДГД) на активность 17 $\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназы в гормонозависимой клеточной линии T-47D рака молочной железы человека*

Основным этапом «сульфатазного пути» при образовании биологически активного эстрогена — эстрадиола — является переход эстрогена в эстрадиол за счет редуктазной активности 17 $\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназы. Поэтому исследование влияния дидрогестерона и его 20-дигидро-метаболита на образование эстрадиола по этому метаболическому пути было особенно заманчивым.

В недавно проведенных исследованиях было показано, что в гормонозависимых клетках рака молочной железы преобладает это «редуктазное» направление (переход эстрогена в эстрадиол). Когда в клетках T-47D в качестве предшественника инкубировался только насыщенный тритием эстрон ( $[^3H]$ -E<sub>1</sub>) в физиологической концентрации ( $5 \times 10^{-9}$  М) без добавления каких-либо кофакторов в течение 24 часов при 37 °С, то продукция

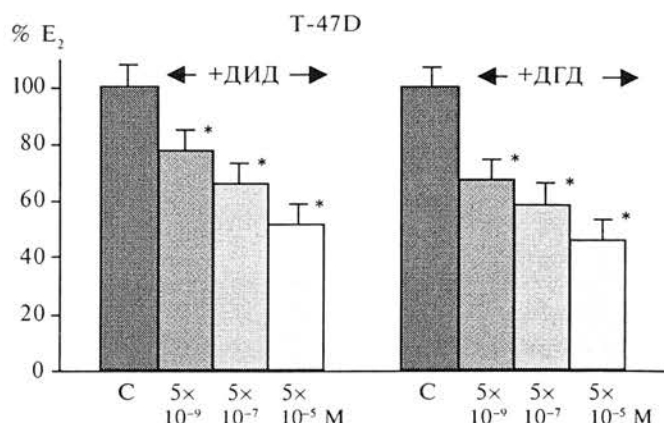


Рис. 4. Влияние дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона на конверсию эстрогена (E<sub>1</sub>) в эстрадиол (E<sub>2</sub>) в гормонозависимых линиях T-47D клеток рака молочной железы человека:

Прекофлюэнтные клетки T-47D инкубировались в течение 24 часов при 37 °С только с эстроном в физиологической концентрации ( $[^3H]$ -E<sub>1</sub>  $5 \times 10^{-9}$  моль/л (контроль — необработанные клетки) или в присутствии дидрогестерона или его 20-дигидро-метаболита в концентрации от  $5 \times 10^{-9}$  до  $5 \times 10^{-5}$  моль/л. Количество эстрогена и эстрадиола определялось после разделения гормонов, как описано в «Материалах и методах». Процент влияния (в фмоль образовавшегося E<sub>1</sub> или E<sub>2</sub> на мг ДНК) был рассчитан посредством отношения:  $[(\text{тест} - \text{контроль}) / \text{контроль}] \times 100$ . Представлены средние значения данных  $\pm$  СОС в 2-х независимых дублирующих определениях.

\* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольными величинами

$[^3H]$ -эстрадиола составляла  $2110 \pm 134$  фмоль/мг ДНК, а скорость превращения приблизительно 51 %, (табл. 3). Дидрогестерон очень эффективно снижал конверсию эстрогена в эстрадиол в зависимости от дозы, ингибирующий эффект на конверсию эстрогена в эстрадиол по сравнению с контрольными величинами, при концентрациях  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-9}$  М составил  $-48$ ,  $-34$  и

Таблица 1

Влияние дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона на превращение  $[^3H]$ -эстрогена сульфата в  $[^3H]$ -эстрадиол в гормонозависимой MCF-7 линии клеток рака молочной железы

Эстрогена сульфат, меченный тритием, $[^3H]$ -E <sub>1</sub> S ( $5 \times 10^{-9}$ моль/л)	Эстрадиол (E <sub>2</sub> ), фмоль E <sub>2</sub> /мг ДНК 1975 $\pm$ 211	
	+Дидрогестерон (ДИД)	+20-Дигидро-дидрогестерон (ДГД)
$5 \times 10^{-9}$	1791 $\pm$ 135	1520 $\pm$ 96*
$5 \times 10^{-7}$	1701 $\pm$ 104	688 $\pm$ 103*
$5 \times 10^{-5}$	727 $\pm$ 90*	510 $\pm$ 86*

Прекофлюэнтные MCF-7 инкубировали в течение 24 часов при 37 °С только с эстроном сульфатом ( $[^3H]$ -E<sub>1</sub>S:  $5 \times 10^{-9}$  моль/л) или в присутствии дидрогестерона или его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона в диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-9}$  до  $5 \times 10^{-5}$  моль/л. Эстрадиол в фмоль/мг ДНК анализировали и количественно определяли как показано в разделе «Материалы и методы». Значения выражались как среднее  $\pm$  S.D. 2-х независимых дублирующих определений.  
\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными показателями (только  $[^3H]$ -E<sub>1</sub>S).

Таблица 2

Влияние дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона на переход [<sup>3</sup>H]-эстрон-сульфата в [<sup>3</sup>H]-эстрадиол в гормонозависимой линии T-47D клеток рака молочной железы

Эстрона сульфат, меченный тритием, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>1</sub> S (5×10 <sup>-9</sup> моль/л)	Эстрадиол (E <sub>2</sub> ), фмоль E <sub>2</sub> /мг ДНК 1216 ± 142	
	+Дидрогестерон (ДИД)	+20-Дигидро-дидрогестерон (ДГД)
5×10 <sup>-9</sup>	1279 ± 170	1114 ± 137
5×10 <sup>-7</sup>	1040 ± 139	846 ± 100*
5×10 <sup>-5</sup>	643 ± 84*	591 ± 58*

Преконфлуэнтные клетки T-47D инкубировали в течение 24 часов при 37 °C только с эстрон-сульфатом (<sup>3</sup>H)-E<sub>1</sub>S: 5×10<sup>-9</sup> моль/л) или в присутствии дидрогестерона или его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона в диапазоне концентраций от 5×10<sup>-9</sup> до 5×10<sup>-5</sup> моль/л. Эстрадиол (в фмоль/мг ДНК) анализировали и количественно определяли как показано в разделе «Материалы и методы». Значения выражались как среднее ± S.D от двух независимых дублирующих определений.  
\* — p < 0,05 по сравнению с контрольными показателями (только [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>S).

Таблица 3

Влияние дидрогестерона и его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона на превращение [<sup>3</sup>H]-эстрона в [<sup>3</sup>H]-эстрадиол в гормонозависимой линии T-47D клеток рака молочной железы

Эстрона сульфат, меченный тритием, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>1</sub> S (5×10 <sup>-9</sup> моль/л)	Эстрон (E <sub>1</sub> ), фмоль/мг ДНК 2034 ± 151		Эстрадиол (E <sub>2</sub> ), фмоль/мг ДНК 2110 ± 134	
	+Дидрогестерон (ДИД)		+20-Дигидро-дидрогестерон (ДГД)	
	Эстрон (E <sub>1</sub> )	Эстрадиол (E <sub>2</sub> )	Эстрон (E <sub>1</sub> )	Эстрадиол (E <sub>2</sub> )
5×10 <sup>-9</sup>	2400 ± 128	1640 ± 105*	2110 ± 96	1428 ± 76*
5×10 <sup>-7</sup>	2860 ± 107	1400 ± 98*	2714 ± 125	1242 ± 104*
5×10 <sup>-5</sup>	2750 ± 146*	1102 ± 112*	2405 ± 82	975 ± 85*

Преконфлуэнтные клетки T-47D инкубировали в течение 24 часов при 37 °C только с эстроном (<sup>3</sup>H)-E<sub>1</sub>: 5×10<sup>-9</sup> моль/л) или в присутствии дидрогестерона или его метаболита 20-дигидро-дидрогестерона с диапазоном концентраций от 5×10<sup>-9</sup> до 5×10<sup>-5</sup> моль/л. Эстрон и эстрадиол (в фмоль/мг ДНК) анализировали и количественно определяли как показано в разделе «Материалы и методы». Значения выражались как среднее ± S.D от 2-х независимых дублирующих определений.  
\* — p < 0,05 по сравнению с контрольными данными (только [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>).

–23 %, соответственно. Значения для 20-дигидро-метаболита составили –54, –42 и –33 %, соответственно (рис. 4). Показатель IC<sub>50</sub>, соответствующий 50 % ингибирования конверсии E<sub>1</sub> в E<sub>2</sub>, для 20-дигидро-метаболита был равен 9 × 10<sup>-6</sup> М.

## Обсуждение

В течение многих лет гормонотерапия при раке молочной железы главным образом основывалась на использовании антиэстрогенов, блокирующих эстрогенные рецепторы. Лечение антиэстрогеном — тамоксифена цитратом — миллионов женщин, страдающих раком молочной железы, в 30–35 % случаев приводило к стой-

кой ремиссии и позволило снизить смертность на 20–25 %.

Совсем недавно изучался другой способ гормонотерапии — ингибирование тканевой продукции эстрадиола путем применения различных антиферментных агентов, участвующих в биосинтезе этого гормона. В настоящее время убедительно доказано позитивное влияние антиароматазных соединений при раке молочной железы [16, 17].

Известно, что «сульфатазный путь» особенно важен для внутритканевого образования эстрадиола в гормонозависимых карциномах молочной железы или в моделях рака молочной железы [9, 11]. Активность эстрон-сульфатазы

потенциально значима, так как является основным фактором, контролирующим продукцию неконъюгированных эстрогенов из высоких концентраций сульфоконъюгированных предшественников, преобладающих в опухолевых тканях молочной железы, особенно у женщин в постменопаузе [9].

Представленные данные показали, что синтетический прогестаген дидрогестерон и его 20-дигидро-метаболит могут уменьшать конверсию эстрогена сульфата в эстрадиол в гормонозависимых MCF-7 и T-47D клетках рака молочной железы, блокируя «сульфатазный путь». В клетках MCF-7 дигидро-дидрогестерон был существенно более активен, чем его предшественник дидрогестерон. Следует отметить, что ингибирование наблюдалось уже при очень низких концентрациях ( $5 \times 10^{-9}$  М) этого метаболита. Эти данные подтверждают, что и в исследованиях, и при лечении различными прогестагенами уместно исследовать биологическую активность их метаболитов. Влияние 20-дигидро-дидрогестерона на блокирование «сульфатазного пути» оказалось более выраженным, чем у дидрогестерона также и в клетках T-47D.

Активность 17 $\beta$ -ГСД в опухоли молочной железы (в исследованиях *in vivo* и *in vitro*) преимущественно проявляется при образовании эстрадиола из эстрогена. 17 $\beta$ -ГСД-1 локализуется в цитоплазме злокачественных эпителиальных клеток опухолей молочной железы [18]. Отмечалось, что ориентация активности ферментов (оксидазная или редуказная) при раке молочной железы также в большой степени зависит от локальных, метаболических или экспериментальных условий, включающих следующее: природу и концентрацию кофакторов (например, НАДФ или НАД) и субстрата, pH и субклеточную локализацию ферментов. Исследования *in vitro* с применением гомогенатов опухоли человека показали, что оксидазная активность 17 $\beta$ -ГСД преобладала над редуказной [7]. Однако исследования *in vivo* после инфузии эстрогенов, меченых изотопами, у пациенток в постменопаузе с раком молочной железы показали, что редуказная активность преобладает над оксидазной [19]. В гормонозависимых линиях клеток рака молочной железы (MCF-7, T-47D, R-27, ZR-75-1) преобладала редуказная изоформа 17 $\beta$ -ГСД-1, но также были обнаружены изоформы 2 и 4 типов с оксидазной активностью (образование эстрогена) [18, 20–22].

В представленном исследовании как дидрогестерон, так и его 20-дигидро-метаболит были способны блокировать редуказную активность 17 $\beta$ -ГСД в клетках T-47D рака молочной желе-

зы, значительный эффект наблюдался даже при низких концентрациях этих прогестагенов ( $5 \times 10^{-9}$  М– $5 \times 10^{-7}$  М).

Таким образом, мы полагаем, что дидрогестерон и его 20-дигидро-метаболит действуют как селективные модуляторы эстрогенных ферментов (СМЭЭ). Представленные данные подтверждают, что и в исследованиях, и при лечении с использованием различных прогестагенов имеет смысл исследовать биологическую активность их метаболитов. Так, в клетках T-47D влияние 20-дигидро-метаболита на блокирование «сульфатазного пути» было более выражено по сравнению с дидрогестероном.

В заключение отметим, что дидрогестерон и его 20-дигидро-метаболит являются мощными ингибиторами активности сульфатазы и 17 $\beta$ -ГСД в клетках рака молочной железы, что приводит к снижению тканевых концентраций эстрадиола. Эти данные открывают интересные перспективы изучения и использования этих прогестагенов в клинических испытаниях у пациенток с раком молочной железы.

#### Литература

1. Abdul-Hajj Y.J., Iverson R. and Kiang D.T. // Steroids 33: 205–222, 1978.
2. Perel E, Wilkins D. and Killinger D.W. // J. Steroid Biochem 13: 89–94, 1980.
3. Vignon F., Terqui M., Westley B. et al. // Endocrinology 106:1079–1086, 1980.
4. Pasqualini J.R., Gelly C. and Lecerf F. // Breast Cancer Res.Treat 8: 233–240, 1986.
5. MacIndoc J.R. with the technical assistance of Woods G., Jeffries L. and Hinkhouse M. // Endocrinology 123: 1281–1287, 1988.
6. Abdul-Hajj Y.J., Iverson R. and Kiang D.T. // Steroids 33: 477–484, 1979.
7. Bonney R.C., Reed M.J. Davidson K. et al. // Clin. Endocr. 19: 727–739, 1983.
8. McNeil J.M., Reed M.J., Beranek P.A. et al. // Int. J. Cancer 38: 193–196, 1986.
9. Pasqualini J.R., Chetrite G., Blacker C. et al. // J. Clin. Endocr. Metab. 81: 1460–1464, 1996.
10. Chetrite G., Cortes-Prieto J., Philippe J-C. et al. // J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 72: 23–27, 2000.
11. Santner S.J., Feil P.D. and Santen R.J. // J. Clin. Endocr. Metab. 59: 29–33, 1984.
12. Dao T.L., Libby P.R. // J. Clin. Endocr. 28: 1431–1439, 1968.
13. Tseng L., Mazella J., Lee L.Y. and Stone M.L. // J. Steroid. Biochem. 19: 1413–1417, 1983.
14. Pasqualini J.R. // Eur. J. Cancer 28A: 758–762, 1992.
15. Burton K. // Biochem. J. 62: 315–323, 1956.
16. Brodie A.M.H., et al. // J. Steroid. Biochem. 24: 91–97, 1986.
17. de Jong P.C., et al. // Cancer Res. 57: 2109–2111, 1997.
18. Poutanen M., Monchamont B. and Vihko R. // Cancer Res. 52: 290–294, 1992.
19. McNeil J.M., Reed M.J., Beranek P.A. et al. // Int. J. Cancer 38: 193–196, 1986.
20. Couture P., Thériault C., Simard J. and Labrie F. // Endocrinology 132: 179–185, 1993.
21. Nguyen B-L., Chetrite G. and Pasqualini J.R. // Breast Cancer Res. Treat 34: 139–146, 1995.
22. Peltoketo H., et al. // J. Endocr. 150: S21–S30, 1996.