

## Методика определения овариальной ароматазной активности у женщин репродуктивного возраста

Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

**Резюме.** Ароматаза  $P_{450}$  является ферментом, конвертирующим андрогены в эстрогены в яичниках, надпочечниках и ряде других тканей и органов. Определение овариальной ароматазы может помочь в изучении существенных звеньев патогенеза эстроген-зависимых заболеваний и отдельных форм овариальной недостаточности. Иммуногистохимическая методика определения ароматазы инвазивна и требует получения биоптатов яичников хирургическим способом. Обследовано 30 женщин репродуктивного возраста: 15 здоровых женщин, 5 больных с гипергонадотропной аменореей и 10 больных с наружным генитальным эндометриозом на фоне применения агониста гонадотропин-рилизинг гормона – диферелина. В сыворотке крови женщин, используя иммуноферментную методику определяли содержание эстрадиола, эстрона, тестостерона, свободного тестостерона, андростендиона, пролактина, фолликулостимулирующего, лютеинизирующего и антимюллерова гормонов. Повторное определение эстрогенов, андрогенов и гонадотропинов проводилось через 48 ч после приема ингибитора ароматазы летрозолола. У здоровых женщин летрозолол вызывал закономерное снижение эстрадиола и эстрона в сыворотке крови. У больных с гипергонадотропной аменореей и эндометриозом на фоне применения диферелина реакция практически отсутствовала, что указывает на овариальное происхождение определяемой ароматазной активности. Показано, что антимюллеров гормон в крови здоровых женщин соответствует числу антральных фолликулов. Разработанный способ определения ароматазной активности антральных фолликулов яичников, основан на оценке двух параметров: снижение эстрадиола в ответ на прием ингибитора ароматазы летрозолола и уровня антимюллерова гормона в сыворотке крови. Предложен вариант определения активности ароматазы путем вычисления снижения уровня эстрадиола в сыворотке крови через 48 ч после приема 10 мг ингибитора ароматазы летрозолола.

**Ключевые слова:** половые стероиды, яичники, ароматазная активность, овариальная ароматаза, ингибитор ароматазы, методика определения ароматазной активности.

**Введение.** Ароматаза является ферментным комплексом микросом, членом суперсемейства  $P_{450}$ , необходимым в организме для завершения синтеза эстрогенов путем уникальной реакции ароматизации С19-стероидов, а именно биосинтеза эстрона из андростендиона, эстрадиола из тестостерона. Ароматазная активность выявлена в гонадах, жировой ткани, фибробластах кожи, строме и паренхиме молочных желез, эндометрии, плаценте, мышечной и костной тканях, головном мозге, печени, кровеносных сосудах, надпочечниках [6, 7, 13, 15, 16]. Ферментный комплекс ароматазы представлен монооксигеназной системой, которая состоит из двух компонентов, локализованных на внутренней митохондриальной мембране на границе с матриксом: флавопротеина, входящего в состав  $P_{450}$  оксидоредуктазы, который переносит электроны от никотинамидадениндинуклеотидфосфата к конечному ферменту, и гемопро-теина, входящего в состав цитохрома  $P_{450}$ , известного как ароматазный цитохром  $P_{450}$  [3]. Определено, что цитохром  $P_{450}$  кодируется геном CYP 19.

По данным литературы [8, 11, 12], активность ароматазы в различных тканях определяют радиометрически, оценивая превращение меченного три-тием андростендиона в «тяжелую воду» ( $3H-H_2O$ ) [1, 17] и меченный тритием эстрон. Существует также косвенная методика определения активности ароматазы по соотношению эстрогенов к андрогенам в

сыворотке крови [2]. В настоящее время разработана неинвазивная методика определения ароматазной активности с помощью ингибитора ароматазы летрозолола [5]. Экспрессию ароматазы в тканях можно определить с помощью иммуногистохимического анализа [4]. Мутации гена CYP19 определяют, используя полимеразную цепную реакцию с последующим секвенированием [10].

Биологическое значение ароматазы заключается не только в синтезе эстрогенов, но и в потенциальном влиянии на баланс соотношения андрогенов и эстрогенов в различных тканях. При дефиците ароматазы в фетоплацентарном комплексе у беременной женщины признаки вирилизации проявляются со второго триместра беременности. Известно, что у новорожденной девочки при почти полном дефиците ароматазы выявляются отклонения в развитии наружных половых органов, близкие по клиническим проявлениям к врожденной вирилизующей гиперплазии коры надпочечников, наличие кист яичников, а в пубертатном возрасте наблюдается гипоплазия молочных желез, первичная аменорея, выраженная маскулинизация, снижение минеральной плотности костной ткани [14]. Содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ) и андрогенов (тестостерона и андростендиона) в сыворотке крови при полном дефиците ароматазной активности повышено, в то время как уровень эстра-

диола снижен. Вопрос о частичном дефиците ароматазной активности или, наоборот, о ее повышении и их клинических проявлениях является недостаточно изученным. Поиск неинвазивных методик диагностики ароматазной активности остается одним из перспективных направлений эндокринологии репродукции и клинической лабораторной диагностики.

**Цель исследования.** Разработать методику определения ароматазной активности путем оценки реакции половых стероидных гормонов в сыворотке крови на ингибитор ароматазы летрозол.

**Материалы и методы.** Обследовано 15 здоровых женщин в возрасте от 23 лет до 31 года (средний возраст составил  $27,0 \pm 2,7$  года) с полноценным овуляторным менструальным циклом (средний уровень прогестерона на 22 день менструального цикла составил  $44,3 \pm 6,0$  нмоль/л). Индекс массы тела в среднем составил  $19,7 \pm 1,3$  кг/м<sup>2</sup>, гирсутизм и угревая болезнь отсутствовали. Также были обследованы 5 женщин с первичной овариальной недостаточностью и 10 женщин с верифицированным лапароскопически наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) на фоне применения агониста гонадотропин-рилизинг гормона (аГРГ) – диферелина. Диагноз НГЭ установлен интраоперационно и подтвержден результатами гистологического исследования. Диагноз первичной овариальной недостаточности – по наличию гипергонадотропной аменореи и данных анамнеза (овариоэктомия в прошлом).

Для определения гормонов в сыворотке крови использовали иммуноферментную методику. Уровень ФСГ, ЛГ, пролактина, общего тестостерона и 17-гидроксипрогестерона определяли с помощью наборов фирмы «Алкор Био» (Россия). Содержание андростендиона, свободного тестостерона, эстрадиола и эстрона определяли с помощью наборов фирмы «DRG Diagnostics» (Германия). Уровень антимюллерова гормона (АМГ) в крови определяли с помощью наборов фирмы «Beckman coulter» (Соединенные Штаты Америки).

Пробу с летрозолом проводили на второй день менструального цикла. До и через 48 ч после перорального приёма 10 мг ингибитора ароматазы летрозола в сыворотке крови определяли содержание эстрадиола (Э2), эстрона (Э1), АМГ, ФСГ, ЛГ, пролактина, общего и свободного тестостерона, андростендиона, 17-гидроксипрогестерона, рассчитывали индекс свободных андрогенов (ИСА).

Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили на аппарате «SonoAce X4» (Южная Корея) с использованием вагинального датчика с частотой 5,0 МГц. Оценивали объем яичников, количество, размеры и расположение антральных фолликулов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 7.0, Microsoft Excel). Выявленные отклонения от нормального распределения обусловили необходимость использования непараметрических методов статистики. Для определения различий в группе использовали ранговый критерий Уилкоксона. При сравнении нескольких групп проводилось сравнение средних рангов для всех групп. Анализ зависимости между признаками проводили с помощью rs-критерия Спирмена. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что до приема летрозола уровень эстрадиола в сыворотке крови у здоровых женщин в среднем составлял  $144,9 \pm 7,9$  пмоль/л, после приема препарата через 48 ч произошло снижение ( $p < 0,05$ ) до  $99,5 \pm 4,0$  пмоль/л (табл. 1). В среднем уровень эстрадиола снизился на  $29,5 \pm 3,7\%$ . Уровень эстрона достоверно ( $p < 0,05$ ) снизился с  $244,5 \pm 22,1$  до  $209,7 \pm 20,9$  пмоль/л.

Коэффициент корреляции между уровнем эстрадиола до приема ингибитора ароматазы летрозола и через 48 ч после приема составил  $rs = 0,5$  (рис. 1). Аналогичный показатель для эстрона составил  $rs = 0,9$ . Эти данные указывают на то, что базальный уровень эстрогенов в сыворотке крови здоровых женщин в

Таблица 1

Содержание гормонов в сыворотке крови здоровых женщин до и после приема летрозола, М±m

Показатель	До приема летрозола	После приема летрозола
Эстрадиол, пмоль/л	$144,9 \pm 7,9$	$99,5 \pm 4,0^*$
Эстрон, пмоль/л	$244,5 \pm 22,1$	$209,7 \pm 20,9^*$
Тестостерон, нмоль/л	$1,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$
Свободный тестостерон, пмоль/л	$6,3 \pm 1,1$	$6,9 \pm 1,3$
Андростендион, нмоль/л	$7,1 \pm 0,8$	$8,4 \pm 0,9$
17-гидроксипрогестерон, нмоль/л	$1,8 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2^*$
ИСА	$2,6 \pm 0,6$	$4,6 \pm 1,5^*$
Пролактин, мМЕ/л	$365,1 \pm 36,8$	$336,4 \pm 46,2$
ФСГ, МЕ/л	$5,9 \pm 0,3$	$10,2 \pm 0,5^*$
ЛГ, МЕ/л	$3,4 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,5^*$

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

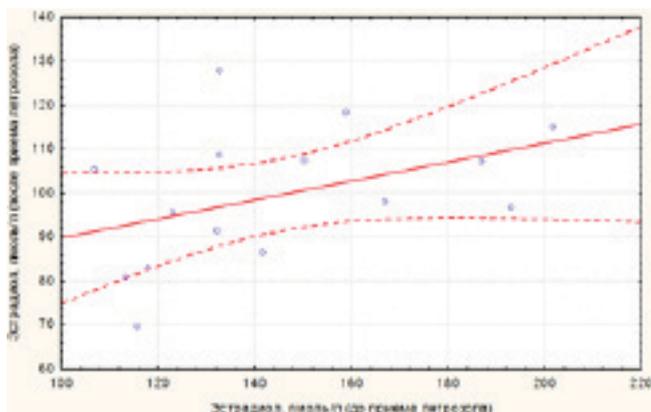


Рис. 1. Взаимосвязь уровня эстрадиола в сыворотке крови до и через 48 ч после приема летрозола,  $p > 0,05$

начале менструального цикла (до инициации доминантного фолликула) находится в прямой зависимости от ароматазной активности яичников.

Повышение андрогенов в сыворотке крови здоровых женщин в ответ на прием летрозола не было статистически достоверным (см. табл. 1). Уровень 17-гидроксипрогестерона в сыворотке крови здоровых женщин до приема летрозола составлял  $1,8 \pm 0,1$  нмоль/л. После приема летрозола содержался 17-гидроксипрогестерона достоверно ( $p < 0,05$ ) повысилось до  $2,4 \pm 0,2$  нмоль/л (см. табл. 1). Содержание пролактина в сыворотке крови на фоне приема летрозола достоверно не изменялось. Его исходный уровень составлял  $365,1 \pm 36,8$  мМЕ/л, через 48 ч  $336,4 \pm 46,2$  мМЕ/л ( $p > 0,05$ ). Выявлены достоверные отличия при сравнении уровня гонадотропинов в сыворотке крови здоровых женщин до приема летрозола и через 48 ч. Уровень ФСГ после приема ингибитора ароматазы летрозола повысился до  $10,2 \pm 0,5$  МЕ/л и достоверно ( $p < 0,05$ ) отличался от исходного ( $5,9 \pm 0,3$  МЕ/л). Содержание ЛГ в сыворотке крови до приема препарата составляло  $3,4 \pm 0,5$  МЕ/л и через 48 ч достоверно ( $p < 0,05$ ) повысилось до  $7,1 \pm 0,5$  МЕ/л (см. табл. 1).

У больных НГЭ на фоне применения аГРГ и больных с первичной овариальной недостаточностью достовер-

ных различий между содержанием половых стероидных гормонов и гонадотропинов до и через 48 ч после приема 10 мг летрозола не отмечено (табл. 2).

Снижение эстрадиола в сыворотке крови через 48 ч после приема летрозола ( $\Delta E2$ ) в группе здоровых женщин ( $45,4 \pm 7,2$  пмоль/л) было значительно выше ( $p = 0,001$ ), чем в группах женщин с НГЭ на фоне применения аГРГ ( $3,9 \pm 2,4$  пмоль/л) и женщин с первичной овариальной недостаточностью ( $8,9 \pm 2,8$  пмоль/л) (рис. 2). Отсутствие или резкое снижение ароматазной активности как в группе больных НГЭ на фоне применения аГРГ, так и в группе женщин с первичной овариальной недостаточностью говорит о том, что реакция на летрозол отражает именно овариальную ароматазную активность. Снижение эстрадиола в сыворотке крови здоровых женщин под влиянием летрозола отражает суммарную ароматазную активность яичников.

Между уровнем АМГ и числом антральных фолликулов в яичниках здоровых женщин имелась достоверная ( $p < 0,05$ ) корреляция ( $r_s = 0,7$ ), рисунок 3.

Эта закономерность была ранее обнаружена другими авторами [9, 18]. Тесная связь между числом антральных фолликулов и АМГ позволяет предложить следующий коэффициент для оценки ароматазной активности отдельных фолликулов:

$$\text{ароматазная активность фолликула} = \Delta E2 / \text{АМГ},$$

где  $\Delta E2$  – снижение эстрадиола в пмоль/л в сыворотке крови через 48 ч после приема 10 мг летрозола, АМГ – содержание в крови антимюллера гормона в нг/мл.

Ароматазная активность антральных фолликулов у здоровых женщин в среднем составляет  $19,0 \pm 4,0$ . Границы доверительного интервала коэффициента  $\Delta E2 / \text{АМГ}$  при  $p = 0,05$  составляют: нижний предел – 10,4, верхний – 27,7.

Таким образом проба с летрозолом позволяет определять как суммарную овариальную ароматазную активность по снижению эстрадиола в сыворотке крови ( $\Delta E2$ ) так и ароматазную активность антральных фолликулов с использованием коэффициента  $\Delta E2 / \text{АМГ}$ .

Таблица 2

**Содержание гормонов в сыворотке крови больных НГЭ на фоне применения аГРГ и женщин с первичной овариальной недостаточностью до и после приема летрозола,  $M \pm m$**

Гормон	Больные НГЭ на фоне применения аГРГ		Женщины с первичной овариальной недостаточностью	
	до приема летрозола	после приема летрозола	до приема летрозола	после приема летрозола
Эстрадиол, пмоль/л	$98,4 \pm 5,5$	$94,5 \pm 3,9$	$79,9 \pm 17,6$	$70,9 \pm 6,4$
Эстрон, пмоль/л	$295,3 \pm 33,7$	$281,8 \pm 30,7$	$199,0 \pm 73,1$	$162,2 \pm 42,6$
Свободный тестостерон, пмоль/л	$4,9 \pm 1,6$	$5,1 \pm 1,7$	$6,3 \pm 2,4$	$5,3 \pm 1,8$
Андростендион, нмоль/л	$5,2 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,8$	$6,8 \pm 0,8$	$6,8 \pm 1,4$
ФСГ, МЕ/л	$4,3 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,8$	$105,5 \pm 29,6$	$104,4 \pm 27,0$
ЛГ, МЕ/л	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$33,4 \pm 8,1$	$33,0 \pm 8,0$

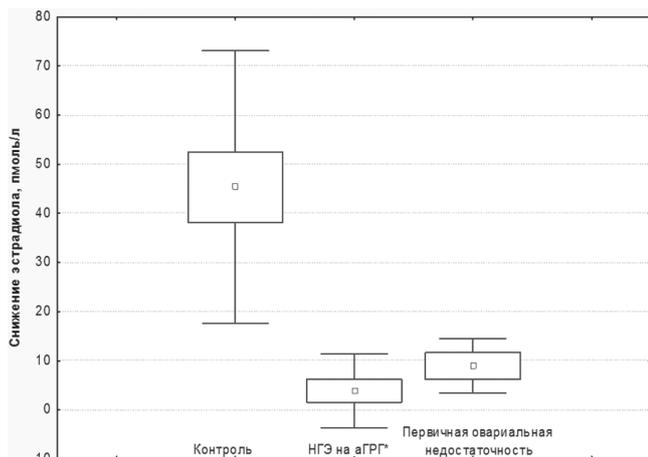


Рис. 2. Снижение уровня эстрадиола в крови здоровых женщин, у больных НГЭ на фоне применения аГРГ и в группе женщин с первичной овариальной недостаточностью

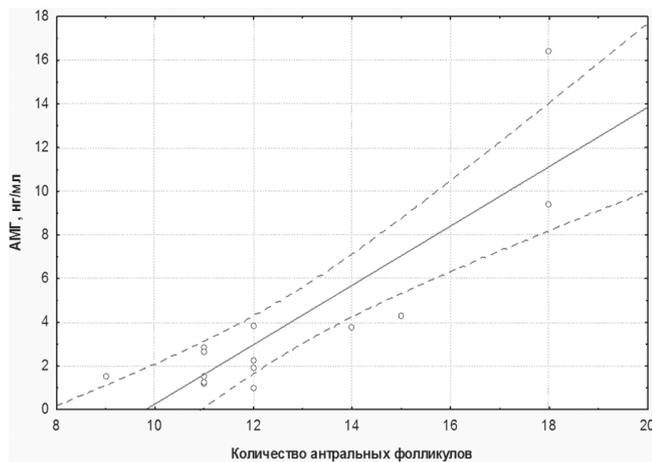


Рис. 3. Зависимость количества антральных фолликулов от уровня АМГ в сыворотке крови здоровых женщин ( $p < 0,05$ )

### Выводы

1. Пероральный прием 10 мг ингибитора ароматазы летрозолола вызывает у здоровых женщин закономерное снижение эстрадиола (в среднем на  $45,4 \pm 7,2$  пмоль/л) и эстрона (в среднем на  $34,7 \pm 10,0$  пмоль/л) и адекватное повышение гонадотропинов в сыворотке крови.

2. Реакция эстрадиола на ингибитор ароматазы летрозол отражает активность именно овариальной ароматазы, так как снижение эстрадиола в группе больных НГЭ на фоне применения аГРГ ( $3,9 \pm 2,4$  пмоль/л) и в группе женщин с первичной овариальной недостаточностью ( $8,9 \pm 2,8$  пмоль/л) резко снижено по сравнению с показателем у здоровых женщин ( $45,4 \pm 7,2$  пмоль/л).

3. Коэффициент  $\Delta E2/AMG$  позволяет оценить ароматазную активность антральных фолликулов. У здоровых женщин коэффициент  $\Delta E2/AMG$  в среднем составляет  $19,0 \pm 4,0$  с границами доверительного интервала при  $p = 0,05$  от 10,4 до 27,7.

### Литература

1. Ларионов, А.А. Конверсия андростендиона в опухолевой и экстрагонадных тканях и ее связь с гормонально-метаболическими факторами у больных раком молочной железы: автореф. дис. канд. ... мед. наук / А.А. Ларионов. – СПб., 1997. – 10 с.
2. Мишарина, Е.В. Содержание эстрона, андростендиона и  $\beta$ -эндорфина в крови женщин с ожирением и нарушением репродуктивной функции: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.В. Мишарина. – СПб., 1993. – 21 с.
3. Новикова, Л.А. От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидо к новым генно-инженерным технологиям / Л.А. Новикова [и др.] // Успехи биологической химии. – 2009. – № 49. – С. 159–210.
4. Савина, В.А. Роль ароматазы P450 в патогенезе синдрома поликистозных яичников: автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.А. Савина. – СПб., 2012. – 9 с.
5. Пат. № 2481587 Российская Федерация, МПК G01N33/74. Способ оценки ароматазной активности / В.В. Потин, М.И. Ярмолинская, В.А. Савина и др.; опубл. 07.05.2013.
6. Belgorosky, A. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence / A. Belgorosky [et al.] // Horm. res. – 2009. – Vol. 72. – P. 321–330.
7. François, M. Aromatase expression in the normal human adult adrenal and in adrenocortical tumors: biochemical, immunohistochemical, and molecular studies / M. François [et al.] // European journal of endocrinology. – 2009. – Vol. 60. – P. 93–99.
8. Hemsell, D.L. Plasma precursors of estrogen II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age / D.L. Hemsell [et al.] // J. clin. endocrinol. metab. – 1974. – Vol. 38. – P. 476–479.
9. Houten, E.L. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function / E.L. Houten, A.P. Themmen, J.A. Visser // Ann. endocrinol. – 2010. – Vol. 71, № 3. – P. 191–197.
10. Lin, L. Variable phenotypes associated with aromatase (CYP19) insufficiency in humans / L. Lin [et al.] // J. clin. endocrinol. metab. – 2007. – Vol. 92. – P. 982–990.
11. Longcope, C. Methods and results of aromatization studies in vivo / C. Longcope // Cancer res. – 1982. – Vol. 42. – P. 3307–3311.
12. MacDonald, P.C. Plasma precursors of estrogen. I. Extent of conversion of plasma  $\delta$ -4-androstenedione to estrone in normal males and nonpregnant normal, castrate and adrenalectomized females / P.C. MacDonald, R.P. Rombaut, P.K. Siiteri // J. clin. endocrinol. metab. – 1967. – Vol. 27. – P. 1103–1111.
13. Merlotti, D. Aromatase activity and bone loss in men / D. Merlotti // J. osteoporosis – 2011. – Vol. 2011. – P. 11.
14. Morishima, A. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens / A. Morishima // J. clin. endocrinol. metab. – 1995. – Vol. 80. – P. 3689–3698.
15. Takahashi, Y. The regulation system of brain aromatase activity; distribution and changes with age of the aromatase activity of the rat brain / Y. Takahashi, H. Yamanaka, S. Honma // Department of urology, school of medicine, gunma university, maebashi, Japan 1987. – Vol. 63, № 7. – P. 862–869.
16. Thompson, E.A. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione / E.A. Thompson, P.K. Siiteri // J. biol. chem. – 1974. – Vol. 249 – P. 5364–5372.

17. Tilson-Mallett, N. Biological significance of aromatase activity in human breast tumors/ N. Tilson-Mallett [et al.] // J. clin. endocrinol. metab. – 1983. – Vol. 57 – P. 1125–1128.
18. Visser, J.A. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency / J.A. Visser [et al.] // Nat. rev. endocrinol. – 2012. – Vol. 8. – P. 331–341.

---

E.M. Timofeeva, V.V. Potin, M.I. Yarmolinskaya

### The method of determination of ovarian aromatase activity in women of reproductive age

**Abstract.** Aromatase  $P_{450}$  is an enzyme that converts androgens to estrogens in the ovaries, adrenal glands and some other tissues and organs. Determination of ovarian aromatase can help in the study of the pathogenesis of significant estrogen-dependent diseases and certain forms of ovarian failure. Immunohistochemical method for the determination of aromatase is invasive and requires surgical obtaining biopsies of ovaries. We examined 30 women of reproductive age: 15 healthy women, 5 patients with hypergonadotrophic amenorrhea and 10 patients with external genital endometriosis during treatment with gonadotropin-releasing hormone – diferelin. In the blood serum there were determined by enzyme immunoassay women estradiol, estrone, testosterone, free testosterone, androstenedione, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and antimüllerian hormone. Re-determination of estrogen, androgen and gonadotropins was performed 48 hours after receiving the aromatase inhibitor letrozole. As for the group of healthy patients, letrozole caused a regular decrease in estradiol and estrone in blood serum. In the group of patients with amenorrhea and endometriosis hypergonadotrophic against application diferelin reaction is almost absent, indicating the ovarian origin of determined aromatase activity. It is shown that antimüllerian hormone in the blood of healthy women corresponds to the number of antral follicles. The developed method of determining aromatase activity of ovarian antral follicles, based on the evaluation of two parameters: reduction of estradiol in response to receiving the aromatase inhibitor letrozole and antimüllerian hormone level in serum. In this work we propose a variant of aromatase activity determination by calculating reduction of estradiol in serum at 48 hours after ingestion of 10 mg of the aromatase inhibitor letrozole.

**Key words:** sex steroids, ovaries, aromatase activity, ovarian aromatase, aromatase inhibitor, methodology of determination of aromatase activity.

Контактный телефон: 8-911-252-60-64; e-mail: Katisun@rambler.ru