

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**КРАСНОЩОК ЕКАТЕРИНА ВАДИМОВНА**

МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕНОПАУЗАЛЬНОЙ  
ГОРМОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК С ОСТЕОПЕНИЧЕСКИМ  
СИНДРОМОМ

**3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Карева Елена Николаевна

**Москва 2023**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. ....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ «ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕНОПАУЗАЛЬНОЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК С ОСТЕОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ» .....	12
1.1. Остеопенический синдром.....	12
1.1.1. Эпидемиология и этиология нарушений костно-минерального обмена у пациенток после хирургической менопаузы.....	12
1.1.2.Классификация остеопороза.....	16
1.1.3. Остеопенический синдром и хирургическая менопауза.....	16
1.1.4. Патогенез развития остеопенического синдрома.....	17
1.1.5. Метаболизм костей в развитии остеопенического синдрома.....	20
1.1.6. Профилактики и лечения остеопенического синдрома.....	22
1.2. Молекулярные механизмы действия препаратов для лечения остеопенического синдрома. ....	23
1.2.1. Витамин D.....	23
1.2.1.1. Метаболизм витамина D.....	23
1.2.1.2. Механизм действия витамина D.....	26
1.2.1.3. Физиологические эффекты витамина D.....	28
1.2.1.4. Витамин D и гомеостаз кальция.....	29
1.2.1.5. Дефицит витамина D.....	30
1.2.2. Менопаузальная гормональная терапия (МГТ).....	32
1.2.2.1. Классификация ядерных рецепторов.....	33

1.2.2.2. рецепторы эстрогенов.....	36
1.2.2.2.1. Механизм действия эстрогенов .....	36
1.2.2.2.2. Активация рецепторов .....	38
1.2.2.2.3. Транспорт рецептор-лагандрного комплекса в ядро .....	39
1.2.2.2.4. Димеризация .....	40
1.2.2.2.5. Трансактивация.....	40
1.2.2.2.6. Трансрпрессия.....	40
1.2.2.2.7.Терминация рецепторного цикла.....	41
1.2.2.2.8. Подтипы ядерных рецепторов эстрадиола (альфа и бета).....	42
1.2.2.2.9. Мембранно-связанный рецептор эстрадиола-17 бета (GPER1).....	44
1.2.2.2.10. Физиологические эффекты эстрадиола.....	45
1.2.2.3. РЕЦЕПТОРЫ ПРОГЕСТЕРОНА.....	49
1.2.2.3.1. Особенности химического строения прогестинов.....	49
1.2.2.3.2. Фармакодинамика гестагенов .....	50
1.2.2.3.3. Мембранные рецепторы прогестерона.....	51
1.2.2.3.4. Мембранно-связанный рецептор прогестерона (PGRmC1) .....	52
1.2.2.3.5. Основные свойства PGRMC1 .....	53
1.2.2.3.6. PGRMC1 – плазма-мембранный рецептор прогестерона.....	53
1.2.2.3.7. Синтез, распределение, метаболизм гестагенов .....	55
1.2.2.3.8. Основные свойства прогестерона.....	56
1.2.2.3.9. Показания к применению гестагенов .....	56
1.2.2.3.10. Классификация используемых в клинике гестагенов.....	57
1.3. Синтетические гестагены (пентараны).....	59
Заключение .....	63

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	64
2.1. Объекты и материал исследования .....	64
2.1.1. Характеристика пациенток, включенных в исследование .....	64
2.1.2. Синтетические лиганды рецепторов прогестерона .....	65
2.2. Необходимое лабораторное оборудование и реактивы .....	66
2.3. Методы исследования .....	67
2.3.1. Выделение МНФК из периферической крови. ....	67
2.3.2. РТ ПЦР .....	68
2.3.2.1. Выделение мРНК из МНФК. ....	68
2.3.2.2. Реакция «обратной транскрипции» (синтез кДНК). ....	69
2.3.2.3. ПЦР-РВ .....	69
2.3.2.4. Реакция плавления (Melt Curve) .....	71
2.3.3. Анализ специфического связывания новых стероидных молекул со специфическими участками связывания МНФК .....	72
2.3.4. Влияние новых синтетических гестагенов на транскрипционную активность мононуклеаров периферической крови человека .....	74
2.3.5. Статистический анализ результатов исследования .....	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	78
3.1. Определение уровня мРНК генов рецепторов эстрадиола (mER, ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) и прогестерона (PGRmC1, mPR, PR-A, PR-B), витамина D (VDR) в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой методом РТ-ПЦР до старта МГТ. ...	78

3.2. Эффективность менопаузальной гормональной терапии в отношении костно – минерального и липидного обмена у пациенток с хирургической менопаузой.....	85
3.2.1. МПКТ.....	85
3.2.2. Липидный обмен .....	88
3.3. Оценка стероидно-рецепторного транскриптома и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на костно – минеральный и липидный обмен.....	89
3.4. Оценка параметров качества потенциальных маркеров прогноза эффективности применения МГТ (МПКТ, липидный обмен) у пациенток с хирургической менопаузой.....	100
3.5. Проанализировать возможное влияние функционального состояния почек (креатинин, мочевины, белок) пациенток на эффективность МГТ.....	102
3.6. Определение относительной связывающей активности синтетических гестагенов (пентаранов) с прогестеронсвязывающими участками клеток МНФК.....	103
3.7. Влияние пентаранов на уровень мРНК генов стероидных рецепторов (mER, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , mPR, PGRmC1, PR-A, PR-B) и вит. D (VDR). .....	105
Заключение.....	108
Выводы .....	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
Список литературы .....	116
Список иллюстративного материала .....	130

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Остеопенический синдром, характеризующийся прогрессирующим уменьшением массы костной ткани и снижением ее прочности вследствие нарушения микроархитектоники, относится к категории наиболее значимых медико – социальных заболеваний. Самой частой причиной данной патологии является менопауза – обусловленная возрастным снижением уровня гормонов и «выключением» репродуктивной функции яичников – прекращение менструаций. Постменопаузальный остеопороз диагностируется практически у половины женщин в постменопаузальном периоде.

Выделяют следующие виды менопаузы: естественная и хирургическая, которая наступает в результате двухсторонней овариоэктомии. В течение первых месяцев после овариоэктомии появляются первые признаки менопаузы (психоэмоциональные и вазомоторные симптомы), связанные с дефицитом эстрогенов, прогестерона и тестостерона. Более поздние проявления (сердечно-сосудистые, урогенитальные, метаболические нарушения, остеопороз) характеризуются наиболее тяжёлыми течениями и представляют значимую проблему здоровья женщины (или женского здоровья).

Патогенез остеопороза включает дефицит витамина D. Кроме этого, дефицит витамина D связан с высоким риском общей смертности, развитием онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, и патологий костной системы (рахит, остеопороз) [112].

Выбор фармакологической стратегии лечения основан на учете противопоказаний предполагаемой терапии. При отсутствии противопоказаний к гормональной терапии (семейный анамнез, тромбофилия, тяжёлые сердечно-сосудистые заболевания) менопаузальная гормональная терапия остается самой эффективной и безопасной для пациентки. Первой линией терапии остеопенического синдрома (ОС) является МГТ согласно Всемирной Ассоциации по менопаузе. МГТ в большей степени имеет профилактическое значение, чем

лечебное. Доказана целая цепь эндокринных и метаболических последствий дефицита эстрогенов. Цель МГТ – не допустить появления и развития последствий утраты функции яичников, в том числе остеопении.

Эффективность МГТ заключается в предотвращении потери костной массы и снижении риска перелома в популяции постменопаузальных женщин с остеопенией. Но, к сожалению, эффективность МГТ не всегда удовлетворяет потребности пациенток. Положительный эффект на костно-минеральный обмен (по показателям минеральной плотности костной ткани – МПКТ) отмечен только у 70–80% пользователей. Так как эффективность оценивают через 0,5–1 год после начала терапии, то при отсутствии эффекта пациентка оказывается в ситуации упущения времени для старта фармакотерапии. Поэтому поиск маркеров прогноза эффективности МГТ у пациенток с остеопеническим синдромом является актуальным. Известно, что предшественниками остеокластов являются клетки мононуклеарной фракции крови (МНФК), поэтому о чувствительности костной ткани к гормональной терапии можно судить по экспрессии рецепторов для компонентов МГТ и витамина D в МНФК.

Потенциальными маркерами прогноза эффективности гормональной терапии являются некоторые параметры стероидно-рецепторного транскриптома клеток МНФК: количество мРНК генов рецепторов эстрогенов ( $mER$ ,  $ER_{\alpha}$ ,  $ER_{\beta}$ ), гестагенов ( $mPR$ ,  $PGRmC1$ ,  $PR-A$ ,  $PR-B$ ) и витамина D ( $VDR$ ). Это связано с тем, что регуляция костно – минерального обмена находится под контролем половых стероидов и витамина D.

К любой гормональной терапии в течение 3–5 лет развивается резистентность. Это связано с тем, что наиболее частые применяемые гестагены снижают чувствительность клеток-мишеней к гормонам. Поиск новых синтетических гестагенов, не снижающих чувствительность к гестагенам, является актуальным.

Актуальной фармакологической задачей является поиск маркера прогноза эффективности менопаузальной гормональной терапии у пациенток с остеопеническим синдромом.

**Цель:** поиск маркеров прогноза эффективности МГТ у женщин с хирургической менопаузой при остеопеническом синдроме, а также скрининг синтетических гестагенов по влиянию на экспрессию молекул-мишеней МГТ.

**Задачи исследования:**

1. Определить уровень мРНК генов рецепторов эстрадиола ( $mER$ ,  $ER_{\alpha}$ ,  $ER_{\beta}$ ) и прогестерона ( $PGRmC1$ ,  $mPR$ ,  $PR-A$ ,  $PR-B$ ), витамина D ( $VDR$ ) в мононуклеарах крови у пациенток с хирургической менопаузой методом РТ-ПЦР до начала лечения в зависимости от выраженности остеопенического синдрома.
2. Оценить эффективность менопаузальной гормональной терапии в отношении костно-минерального и липидного обмена у пациенток с хирургической менопаузой.
3. Провести сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на липидный и костно-минеральный обмен.
4. Оценить параметры качества потенциальных маркеров прогноза эффективности применения МГТ (МПКТ, липидный обмен) у пациенток с хирургической менопаузой.
5. Проанализировать возможное влияние функционального состояния почек (креатинин, мочевины, белок) пациенток на эффективность МГТ.
6. Определить относительно связывающую активность (RBA) синтетических гестагенов (пентаранов) с прогестеронсвязывающими участками клеток МНФК.
7. Изучить влияние пентаранов ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$ М) на уровень мРНК генов эстрогеновых рецепторов ( $mER$ ,  $ER_{\alpha}$ ,  $ER_{\beta}$ ), прогестероновых рецепторов ( $mPR$ ,  $PGRmC1$ ,  $PR-A$ ,  $PR-B$ ) и витамина D ( $VDR$ ) в МНФК.



## Научная новизна исследования

Впервые проведен сравнительный анализ экспрессии генов половых стероидных гормонов и витамина D в клетках МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от эффекта МГТ на МПКТ и липидный обмен.

Выявлены маркеры прогноза эффективности МГТ на костно-минеральный (уровень мРНК гена *VDR*) и липидный обмен (уровень мРНК гена *Er $\beta$* ) у пациенток с нарушением костно-минерального обмена после хирургической менопаузы.

## Практическая значимость

В качестве маркера прогноза эффективности лечения остеопенического синдрома предложен уровень мРНК гена *VDR*.

Впервые выявлен, охарактеризован и предложен для создания алгоритма персонализированного подхода к назначению менопаузальной гормональной терапии маркеры прогноза эффективности (уровень мРНК гена *VDR* в МНФК – для пациенток с отягощенным анамнезом костно-минерального обмена и уровень мРНК гена *Er $\beta$*  в МНФК – для пациенток с отягощенным анамнезом липидного обмена). Алгоритм персонализированного подхода к назначению МГТ поможет своевременно и правильно подобрать медикаментозную терапию для пациенток с хирургической менопаузой.

## Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. У пациенток с остеопорозом выявлено снижение уровня экспрессии ядерных рецепторов витамина D (*VDR*), эстрадиола (*ER $\alpha$* ) и прогестерона (*PR-A*) в МНФК в 7–30 раз ( $p \leq 0,05$ ) соответственно по сравнению с группой здоровые.
2. Эффективность лечения остеопении у пациенток с хирургической менопаузой тесно связана с экспрессией гена витамина D в мононуклеарах периферической крови. У пациенток с положительным эффектом МГТ на параметры костно-минерального обмена уровень мРНК рецептора витамина D в 2 раза выше по сравнению с пациентками без эффекта терапии ( $p = 0,02$ ).

3. Положительное влияние МГТ на липидный обмен у пациенток с хирургической менопаузой зависит от уровня мРНК  $ER_{\beta}$  в мононуклеарах периферической крови. У пациенток с положительным эффектом МГТ на липидный обмен уровень мРНК  $ER_{\beta}$  в МНФК в 3 раза выше по сравнению с пациентками, не ответившими на терапию ( $p=0,01$ ).
4. Прегна-D<sup>3</sup>-пентаран - *6(E)-гидрокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3 $\beta$ -ол-20-он* (К-1044) обладает высоким уровнем связывания с прогестероновыми рецепторами RBA = 95,1%, повышает экспрессию рецепторов витамина D и не влияет на рецепторы эстрадиола  $ER_{\beta}$  в МНФК и потому является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения и внедрения в клиническую практику в качестве гестагенного компонента МГТ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Публикации статей в научно-медицинских журналах.
2. Результаты исследования эффективности менопаузальной гормональной терапии у пациенток с остеопеническим синдромом внедрены в курс лекций для студентов 5 курса ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И.Пирогова МЗ РФ ГKB №31 (кафедра акушерства и гинекологии им. академика Г.М.Савельевой, педиатрический факультет).
3. Разработаны методики для лабораторной работы по молекулярной фармакологии для студентов 3–4 отделения медицинской биохимии и медицинской биофизики (кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени акад. П. В. Сергеева, МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова МЗ РФ).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Первичная документация по диссертационной работе Краснощок Екатерины Вадимовны на тему «Маркеры прогноза эффективности менопаузальной

гормональной терапии у пациенток с остеопеническим синдромом» оформлена четко, в соответствии с фактическими данными. Все исследования зарегистрированы в установленном порядке. Достоверность выполненных исследований подтверждается точностью регистрации первичной документации, в которой полно отражен объем лабораторных исследований, статистическая обработка данных, источники литературы. В результате проверки комиссия подтверждает достоверность первичных материалов, положенных в основу диссертационной работы и личный вклад Краснощок Е.В. в выполнение работы. (акт проверки первичной документации от 02.03.2023).

Апробация диссертации «Маркеры прогноза эффективности менопаузальной гормональной терапии у пациенток с остеопеническим синдромом» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук состоялась на заседании сотрудников кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии имени акад. П. В. Сергеева и сотрудников научно-исследовательской лаборатории молекулярной фармакологии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова МЗ РФ (протокол № 3 от 21.02.2023).

### **Публикации**

Основные положения диссертационной работы отражены в 5 печатных работах, из них 3 в журналах, входящих в перечень ВАК (2 - по специальности и 1 - в журнале, включенном в международную базу данных Scopus). Кроме того, результаты работы представлены на VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE» (Нижний-Новгород, 2021), на XVIII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2023).

## ГЛАВА 1.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### «ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕНОПАУЗАЛЬНОЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК С ОСТЕОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ»

##### 1.1. Остеопенический синдром.

###### 1.1.1. Эпидемиология и этиология нарушений костно-минерального обмена у пациенток после хирургической менопаузы.

В 1820-х годах во Франции патологоанатом Жан Лобштейн впервые употребил термин "остеопороз" во время описания заболевания кости. Его происхождение связывается с использованием греческих слов "osteon" и "poros", которые означают соответственно "кость" и "маленькая дырка". Этот термин быстро приобрел популярность и в 1855 году отделен от термина "остеомалация" [1,9, 121]. Немецкий патологоанатом Фридрих Даниель фон Реклингхаузен в 1891 году описал поражения скелета при двух эндокринных заболеваниях: фиброзный остеит при повышенной функции щитовидной железы и множественные переломы у женщины при длительно недиагностированном тиреотоксикозе [9,115]. В 1932 году нейрохирург Харви Кушинг сообщил данные о 8 пациентах с аналогичными симптомами центрального ожирения и нарушениями обмена веществ [9, 70].

В 1941 году эндокринолог Фуллер Олбрайт описал классический постменопаузальный остеопороз, затронувший множество женщин. Он обратил внимание общества на это состояние, считая его связанным с дефицитом эстрогенов, который также сопровождался центральным ожирением, нарушением углеводного обмена, аменореей, эмоциональной нестабильностью, гипертензией и остеопорозом [9,121].

Остеопороз (ОП) – серьезная проблема не только для здравоохранения, но и для социальной сферы. Последствия этого заболевания могут быть крайне неприятными, например, переломы костей периферического скелета и позвонков, которые зачастую приводят к высокому уровню нетрудоспособности,

инвалидности и даже смерти [9,17,26]. ОП – является одним из наиболее распространенных заболеваний, которое наряду с инфарктом миокарда, онкологических заболеваний и внезапной смертью занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности населения.

Остеопенический синдром (ОС) - системное метаболическое заболевание скелета, при котором нарушается костно-минеральный обмен. Как следствие, кости становятся менее крепкими, и риск переломов становится выше [9,17,18,26].

Согласно исследованиям, здоровье костей связано с генетической предрасположенностью, которая может меняться в зависимости от образа жизни, диеты, физической активности, применения лекарств и вредных привычек [17,24]. Каждая третья женщина старше 50 лет страдает от остеопороза, который является серьезной проблемой. Прогнозируется увеличение числа случаев этого заболевания с 590 до 730 тысяч за год к 2035 году [2,17,59].

В детском и юношеском возрасте идет накопление костной массы, достигающее пика к 20–30 годам. Начиная с 35–40 лет происходит медленное уменьшение костной массы, потеря до 3% за каждые 10 лет. В возрасте 65–70 лет, потеря костной массы составляет 0,3–0,5% в год [16].

В постменопаузальном периоде пиковая костная масса - определяющий фактор состояния костной ткани, однако на ее уровень оказывают влияние как внутренние, так и внешние факторы. У женщин происходит быстрое снижение МПКТ в связи с возникновением гипоэстрогении при различных состояниях, таких как аменорея, пери- и постменопауза [26]. Костная ткань находится в постоянной динамике, а ее плотность является основным показателем ее здоровья [38].

Первичный тип остеопороза (ПМО) характеризуется поражением трабекулярной костной ткани, которая наиболее уязвима в позвоночнике (95%) и лучевой кости. Известны сенильный остеопороз, ювенильный и идиопатический типы. Остеопороз вторичного типа возникает из-за различных заболеваний желудочно-кишечного тракта, почек, эндокринной системы, генетических

нарушений, ревматическими заболеваниями, патологиями системы крови или в результате приема определенных препаратов, относится к 5% случаев. [16,26,41].

Сегодня остеопороз является группой риска для 34 миллионов россиян. Около 14 миллионов людей уже страдают от этого заболевания, в то время как у 20 миллионов населения России есть остеопения, которая сопровождается высокой вероятностью перелома кости. Высокая частота ОП наблюдается у 34% женщин 50 лет и старше [16].

Согласно эпидемиологическому исследованию, проведенному в России, каждая четвертая женщина старше 50 лет имела хотя бы один малотравматичный перелом, что свидетельствует о высокой распространенности данной проблемы [8]. Низкотравматические переломы в основном касаются позвоночника (10% у мужчин и 12,7% у женщин) [8].

Наличие переломов, даже малотравматических, может привести к серьезным последствиям, например, костные смещения могут привести к сильным болям и нарушению подвижности конечностей. Это в свою очередь может привести к нарушению качества жизни и социальной адаптации [24].

Поэтому крайне важно обращать внимание на профилактику данного заболевания, особенно у людей старшей возрастной группы. Важно проводить профилактические мероприятия, направленные на укрепление костной ткани и поддержание подвижности и координации движений. Таким образом, уменьшится количество переломов, а, следовательно, затраты на лечение данного заболевания.

В настоящее время очень много людей сталкиваются с различными травмами. Перелом шейки бедра - самый распространенный перелом. Статистика показала, что подобных случаев приходится на 239 на 100 000 населения [19]. Но что бывает после перелома? Какие последствия для здоровья и качества жизни пациентов?

Один из главных показателей - смертность после перелома бедра в течение 1 года. Увы, числа неутешительные - смертность может достигать от 12 до 40%, что связано с возрастными и социальными факторами, а также сопутствующими заболеваниями [16,17,18]. Кроме того, первые 6 месяцев после травмы

характеризуются высокой летальностью, что требует особого внимания со стороны медиков [19,24].

После перелома жизнь пациентов кардинально меняется. Не только физические ограничения, но и психологическое состояние страдает. У тех, кто перенес низкотравматические переломы, качество жизни значительно снижается. К счастью, восстановление происходит через 1–2 года после перелома, но все зависит от сложности операции и характера осложнений [24].

Итак, переломы бедра могут привести к серьезным последствиям для здоровья и качества жизни. Большое значение имеет профессиональный подход при оказании помощи в период реабилитации после операции и поддержка со стороны близких.

В России среди различных заболеваний на первом месте по распространенности находится первый дистальный отдел предплечья. Частота его встречаемости в населении составляет 426 на 100000 человек, что превышает частоту встречаемости бедренного перелома в 4–8 раз у женщин и в 3 раза у мужчин [16,17].

Как показывают данные эпидемиологического исследования, первый дистальный отдел предплечья является очень серьезной и распространенной проблемой в нашей стране. Большинство случаев обследования и лечения связано с необходимостью восстановления функций кисти, что очень трудно и длительно.

Учитывая трудность лечения и реабилитации при этом заболевании, стоимость года лечения ОП, составляет ошеломляющую сумму в 61151 рублей [17].

Понимая опасность данного заболевания и «необходимость поддержки страдающих пациентов, ВОЗ установил торжество международного уровня – всемирный день борьбы с остеопорозом» [5] (20 октября). Основная направленность мероприятия – просветительская, так как большинство россиян «не знают о существовании данного заболевания и не способны противостоять ему в одиночку. Повышенное внимание уделяют профилактике, которая заключается в

привитии здорового образа жизни для укрепления костной системы, переходу к оптимальному рациону питания и отказе от пагубных привычек» [5].

### **1.1.2. Классификация остеопороза**

Наиболее распространенная классификация ОП по патогенетическому принципу.

#### *Первичный остеопороз.*

1. Постменопаузальный - около 95% женщин в постменопаузе и 80% мужчин после 50 лет подвержены риску развития остеопороза.
2. Идиопатический - встречается у женщин до 45–52 лет и у мужчин до 50 лет.
3. И другие - ювенильный, сенильный.

В патогенезе вторичного остеопороза участвует ряд соматических и эндокринных заболеваний - эндокринных, ревматических, заболеваний органов пищеварения, почек, крови и других. У женщин вторичный остеопороз составляет только 5%, в то время как у мужчин этот показатель достигает 20%.

### **1.1.3. Остеопенический синдром и хирургическая менопауза**

Одна из распространенных гинекологических операций - двусторонняя овариэктомия. Операцию проводят с четкой целью лечения, так как нет другого решения. Вопрос, который стоит перед гинекологами - как лечить последствия успешной операции? Вследствие недостатка половых гормонов (эстрогенов, прогестерона, андрогенов) очень быстро развиваются первые проявления. Часто встречаются различные психоэмоциональные расстройства (фобия, депрессия, астения), метаболические расстройства, кардиоваскулярные расстройства, вазомоторные симптомы (повышенная потливость, озноб, расстройства дыхания, приливы) [104]. Половые стероидные гормоны оказывают прямое и опосредованное воздействие на состояние костно-минерального обмена, и резкое их снижение вызывает значительные изменения [114]. При хирургической менопаузе в первые 2–3 года происходит потеря минеральной плотности костной ткани, которая составляет 10% в год. В результате возрастает риск переломов,



инвалидности и смертности. При естественной менопаузе в год происходит потеря костной ткани не более 3–5%. Большинство клеток костной ткани, таких как остециты, остеобласты и остеокласты, обладают рецепторами, которые связаны со стероидными гормонами.

Со снижением уровня эстрогенов уровень сывороточного кальция повышается, что приводит к обратному эффекту - снижению уровня его в костях. Кроме того, эстрогены напрямую влияют на 1,25(OH)D, который отвечает за реабсорбцию кальция в почках и его абсорбцию из кишечника. Стероидные половые гормоны снижают резорбцию остеокластов и участвуют в процессе ремоделирования остеогенеза. Лечение остеопатического синдрома (ОС) рекомендуется начинать с менопаузальной гормонотерапии (МГТ), которая согласно Всемирной Ассоциации по менопаузе, является первой линией терапии для борьбы с этим заболеванием. МГТ также влияет на МПКТ, обладая резорбтивной активностью костной ткани. Применение МГТ существенно снижает риск переломов [16].

Витамин D и кальций - обязательные помощники терапии остеопороза и оказывают профилактическое действие. Повторные переломы часто происходят при развитии остеопенического синдрома, который может появиться после первого перелома и быстро прогрессировать. Остеопенический синдром обычно развивается медленно, но это не исключает возможность его быстрого прогрессирования [63]. Во Всемирный день менопаузы 18 октября 2021 года Руководство Международного общества менопаузы (IMS) решило сосредоточить внимание на проблемах остеопороза. Для успешного преодоления проблемы остеопороза необходимо акцентировать внимание на повышении информированности населения о средствах диагностики, лечения и профилактики данного расстройства.

#### **1.1.4. Патогенез развития остеопенического синдрома**

Патогенез постменопаузального остеопороза (ПМО) зависит от многих различных факторов, таких как уровень половых гормонов, генетических особенностей и образа жизни человека. ПМО - заболевание, характеризующееся

нарушением баланса между резорбцией и остеогенезом, а именно преобладание резорбции над остеогенезом [29].

Процесс формирования костной ткани происходит в течение всей жизни человека и зависит от многих факторов, таких как потребление кальция, витамина D, гормональное воздействие и влияние биологически активных веществ. Важную роль в этом процессе играют половые гормоны [42].

Одним из наиболее важных гормонов являются эстрогены. Они не только обеспечивают поддержание костного баланса и минерального гомеостаза, но и имеют ключевое значение в формировании пика костной массы. Кроме того, у женщин в менопаузе выявлена прямая корреляционная зависимость состояния МПКТ и длительности эстрогенового дефицита [41, 42]. В 1988 году группа ученых обнаружила присутствие эстрогеновых рецепторов (ER) в остеобластоподобных клетках, а затем - в остеокластах и остеоцитах. Эстрогены, связываясь с ER на остеобластах, стимулируют их пролиферацию и тормозят дифференцировку остеокластов. Кроме того, под влиянием эстрогенов затрудняется минерализация матрикса через ER $\alpha$ . Роль эстрогеновых рецепторов (ER $\alpha$  и ER $\beta$ ) заключается в определении степени дифференцировки остеобластов и их функции, которые могут изменяться под влиянием эстрогенов путем изменения экспрессии генов [41, 42, 71,80].

Остеокласты подвергаются непрямому воздействию эстрогенов. Эстроген через собственные рецепторы в остеобластах модулирует экспрессию цитокинов, которые в свою очередь влияют на созревание остеокластах [57].

Циркулирующие моноциты поступают в костную ткань, где дифференцируются в остеокласты (резидентные макрофаги) в течение 1–3 дней [79]. Среди молекул-кандидатов, заинтересованных в патогенезе ПМО выделяют ряд внутриклеточных посредников [120, 125]. Периферический моноцит перемещается в направлении остеокласта в три этапа: хемотаксис в сторону места образования остеокластов, адгезию к клеткам и трансэндотелиальная миграция в саму костную среду.

Существование RANKL (рецептор-активатора NFκB) и колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) является необходимым для дифференцировки жизнеспособности остеокластов [108]. Рецептор RANK способен стимулировать хемотаксис моноцитов при помощи RANKL [106].

Из-за большого количества растворимого RANKL происходит миграция моноцитов в ткань кости. MCP-1 — это мощный фактор рекрутирования моноцитов. Он выделяется остеобластами под воздействием RANKL и паратиреоидного гормона [134]. Хемоаттрактант моноцитов CCR2 также обеспечивает мобилизацию моноциты в кость через хемокиновый рецептор 2 типа [101]. Рецептор моноцитов CXCR4 связывает фактор-1 эндотелиальных клеток сосудов кости [135].

Дополнительным регуляторным механизмом хемотаксиса моноцитов из крови в костную ткань явился сфингозина-1-фосфат (S1P) и оба его рецептора (S1PR1 и S1PR2) [87]. Витамин D оказывает защитное действие на кость в условиях *in vivo* [94]. Витамин D3 тормозит транскрипцию генов S1PR2. Транспорт моноцитов в кость сопровождается активацию остеокластов генеза и зависят от целого ряда регуляторных молекул. До настоящего времени полностью состав регуляторных молекул не изучен. В зависимости от плотности костной ткани находится экспрессия целого ряда молекул, вовлеченных в процессы регуляции костного метаболизма [72].

Для скрининга и оценки выраженности течения остеопороза в эксперименте на животных предложено использовать моноциты [118]. Доказали участие в регуляции костно-минерального обмена, такие молекулярные маркеров моноцитов как: RSU1, ANXA2, GSN, miR133a и miR422a STAT1, GBP1, ANXA2. Среди них отсутствуют гены рецепторов и ферментов метаболизма стероидных гормонов, несмотря на то что уровень данных маркеров различается у женщин с и без остеопороза [72,135].

### 1.1.5. Метаболизм костей в развитии остеопенического синдрома

Питание является источником организма для получения ежедневной потребности в кальции в диапазоне от 800–1500 мг. Тем не менее, соотношение кальция с другими элементами в пище и низкая кислотность кишечника могут привести к ухудшению его усвоения. В организме кальций распределен неравномерно: 99% находится в костной ткани, а оставшиеся 1% распределяются внутри мягких тканей и внеклеточной жидкости. Кальцитонин, витамин D и щитовидные железы контролируют метаболизм кальция.

Основу костной и зубной ткани составляют соли фосфорной кислоты, которые плохо растворимы в воде и содержат кальций. Оптимальное соотношение кальция и фосфора в организме должно составлять 2:1 для эффективного взаимодействия фосфора с кальцием и витамином D. Уровень активности фосфора может быть снижены железом, алюминием и магнием. Если уровень фосфора в организме снижается, может возникнуть гипофосфатемия, которая тормозит образование макроэргических соединений, нарушает образование РНК и ДНК, замедляет минерализацию костей и также может вызвать другие нарушения в организме. Развитие рахита, остеомалации и остеопороза ускоряется благодаря данному фактору. Паратиреоидный гормон (ПТГ), белок, состоящий из 84 аминокислот, является ключевым регулятором гомеостаза кальция в организме и обладает гиперкальциемическим эффектом [37].

Паратгормон активирует резорбцию костной ткани, что приводит к высвобождению кальция в кровоток и тормозит обратную реабсорбцию фосфора в почечных канальцах, вызывая гиперкальциемию и гипофосфатемию. Гормон кальцитонин, который вырабатывается щитовидной железой, обладает гипокальциемическим эффектом. Кальцитонин снижает концентрацию кальция в крови за счет активации его выведения почками, торможения оттока из костной ткани. В результате чего возникает гипокальциемия, которая является одной из возможных причин развития остеопороза и других болезней [37].

Не коллагеновый белок, зависимый от витамина К и полученный из остеобластов, представляет собой маркер ремоделирования костной ткани и

называется остеокальцином (ОС) [98]. Он состоит из 49 аминокислот, включая три остатка  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты (-Gla). Новая кость формируется из матрикса белка, который располагается вне клетки костной ткани и, в свою очередь, минерализуется. Тем временем, малая часть матрикса поступает в кровоток. Когда происходит резорбция костной ткани, остеокальцин высвобождается и превращается в неиммунные фрагменты, которые попадают в кровь. Избыток этих фрагментов выводится метаболитами  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты (Gla) через почки [51].

Высокие концентрации ПТГ могут оказывать негативное влияние на активность остеобластов, которые синтезируют остеокальцин. Это приводит к снижению уровня остеокальцина в крови и костях. Однако, на стимуляцию производства остеокальцина в остеобластах и повышение его концентрации в крови может влиять витамин D3. Метаболизм костной ткани можно определить через уровень остеокальцина в крови, поскольку это маркер костного ремоделирования, особенно у женщин после менопаузы. Если выявить уровень остеокальцина в крови, можно определить, находится ли пациентка в группе риска развития остеопороза [51].

Костная щелочная фосфатаза (ALP) представляет собой эктоэнзим, прикрепленный к внешней поверхности клеточной мембраны остеобластов гликозилфосфатидилинозитолом. Он частично высвобождается в кровоток. Костный ALP и печеночный ALP составляют около 95% от общей активности ALP в сыворотке крови человека. При дефиците гормонов, кальция и фосфора в организме уровень этого фермента возрастает. Остеобласты, ответственные за формирование кости, играют здесь ключевую роль [64].

Для оценки резорбции костной ткани используется определение наличия в моче дезоксипиридинолина (ДПИД) – соединения, способствующего соединению нитей белка-коллагена, который является основным структурным компонентом кости. ДПИД обладает пиридиновой связью, характерной для зрелого коллагена, и не подвергается метаболическим превращениям. Его вывод из кости в кровь производится при резорбции ее остеокластами. Известно, что повышенная

экскреция ДПИД связана с развитием остеопороза. Снижение уровня ДПИД при лечении свидетельствует о действенности проведенной терапии.

### **1.1.6. Профилактики и лечения остеопенического синдрома.**

#### **Современные методы**

Повышение продолжительности и качества жизни женщин – задача, которая требует множества условий. Среди них – сбалансированное питание, физическая активность и прием витаминов. Это важно не только для общего здоровья, но и для профилактики нарушений, возникающих на фоне менопаузы.

Одним из способов защитить себя от перспективы прогрессирующего снижения минеральной плотности костной ткани является МГТ. Исследования доказали его эффективность в профилактике и лечении ОС, увеличении мышечной силы и предотвращении падений [2,16,42,80].

На фоне приема половых стероидных гормонов наблюдается снижение риска переломов бедренной кости и позвоночника, как и общей частоты переломов. Это означает, что МГТ может оказаться очень эффективным средством для профилактики таких серьезных заболеваний [42,93].

Кроме того, МГТ показало свою способность выравнивать менопаузальные симптомы и уменьшать риск сердечно-сосудистых заболеваний. Использование данной терапии в течение не менее 5 лет может привести к положительному результату, и очень желательно продолжать ее еще дольше, поскольку клинический эффект может прекратиться в течение 1–2 лет после прекращения лечения [37].

Если рассмотреть более подробно, то МГТ содержит гормоны, которые компенсируют естественный уровень эстрогенов и гестагенов в женском организме. Это позволяет избежать или ослабить многие негативные последствия менопаузы, такие как головная боль, нарушения памяти, внимания, настроения, потливость, повышенную резкость тонуса сосудов или остеопороз.

Вопрос лечения остеопороза является актуальным для многих людей, особенно для женщин, которые находятся в постменопаузальном периоде.

Использование определенных препаратов может помочь в профилактике и лечении данного заболевания. Среди таких препаратов можно назвать Ралоксифен (селективный модулятор рецепторов эстрадиола), дронаты (бисфосфонаты), кальцитонин, парагормон, витамин D и стронций ранелат [2,7].

В 2016 году в Москве провели исследование, которое выявило, что процент женщин, страдающих ПМО и принимающих препараты от остеопороза, спустя год после рекомендаций, составляет 38%. Однако через три года этот показатель снижается до 16% [10,17], что свидетельствует о необходимости постоянного контроля и поддержки в лечении данного заболевания.

В связи с этим, необходимо развивать и предоставлять возможности координации работы врачей разных специальностей, чтобы успешно решать проблемы вопросов лечения остеопороза. К сожалению, для многих пациентов остеопороз может привести к серьезным последствиям, таким как переломы и ухудшение качества жизни. Однако, при правильном лечении и заботе, эти последствия можно избежать или уменьшить. Таким образом, важно не только назначать правильные препараты, но и следить за их приемом, чтобы полностью преодолеть проблему остеопороза.

## **1.2. Молекулярные механизмы действия препаратов для лечения остеопенического синдрома**

### **1.2.1. Витамин D**

#### **1.2.1.1. Метаболизм витамина D**

Витамин D – жирорастворимый витамин, получаемый человеком из его рациона питания, также он является секостероидным прогормоном, который вырабатывается в коже под действием ультрафиолета В (290–320 нм) от солнечного света.

Адольф Отто Рейнольд Виндаус (немецкий биохимик) – Нобелевский лауреат по химии в 1928 году за свои работы по изучению структуры стероидов и их связи с витаминной группой. Одно из его открытий - 7-дегидрохолестерол - является

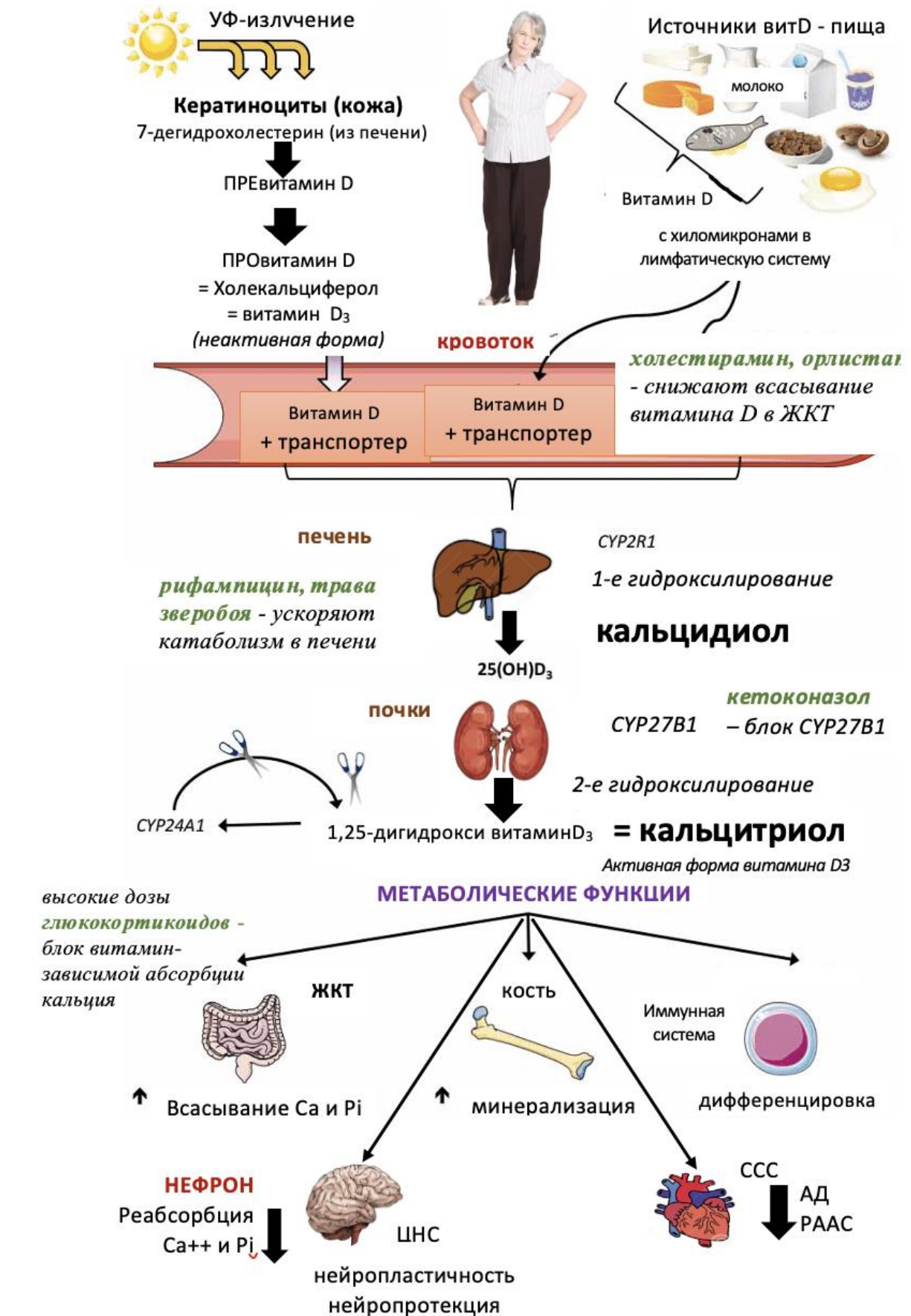
предшественником витамина D. Под действием УФ – облучения 7 – дегидрохолестерол превращается в антирахитический агент в коже и продуктах животного происхождения. Этот агент получил название витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол). На рис.1.1. представлен синтез витамина D.

Существует две основные изоформы витамина D: эргокальциферол (витамин D<sub>2</sub>) и холекальциферол (витамин D<sub>3</sub>) [21].

Холекальциферол синтезируется из 7 – дегидрохолестерина в коже под действием УФ-излучения в эпидермисе кожи, «связывается со специфическим витамин D - связывающим белком, с помощью которого транспортируется к местам дальнейшего метаболизма. Небольшая часть витамина D» [46] «транспортируется в жировую и мышечную ткани, где он фиксируется и образует резервную форму. Основное его количество переносится в печень, где происходит первый этап трансформации – гидроксирование с образованием» [46] 25 – гидроксивитамин D [25(OH)D] – кальцидол. Образование кальцидола катализирует 25-гидроксилазой (CYP2R1 и CYP27A1), содержащейся на внутренней мембране митохондрий печени [21]. 25(OH) D дополнительно метаболизируется 25(OH) D 1α-гидроксилазой (CYP27B1) главным образом в проксимальном канальце почки до 1α,25-дигидроксивитамина D [1α,25(OH)<sub>2</sub>D, кальцитриол], который является наиболее биологически активной формой витамина [28].



Рисунок 1.1. Синтез витамина D



### 1.2.1.2. Механизм действия витамина D

Кальцитриол оказывает свое действие через геномные механизмы, модулируемые комплексом ядерного рецептора витамина D (VDR)/рецептора ретиноида X (RXR), для связывания с элементами ответа витамина D (VDRE) в генах-мишенях клеток (толстая кишка, остеобласты, мозг, сердце, кожа, простата, молочные железы и различные иммунные клетки).

Взаимодействие кальцитриола с цитозольным VDR в геномном пути приводит к фосфорилированию VDR, его гетеродимеризации с рецептором ретиноид-X (RXR) и дальнейшей ядерной транслокации комплекса [99]. Комплекс кальцитриол-VDR-RXR связывается с элементом ответа витамина D (VDRE) в промоторной области генов-мишеней и привлекает транскрипционные коактиваторы или корепрессоры для регуляции экспрессии мРНК генов-мишеней и контроля их различных функций, включая метаболизм кальция и фосфатов. Кальцитриол оказывает не только геномный, но и негеномное действие [8,21,28]

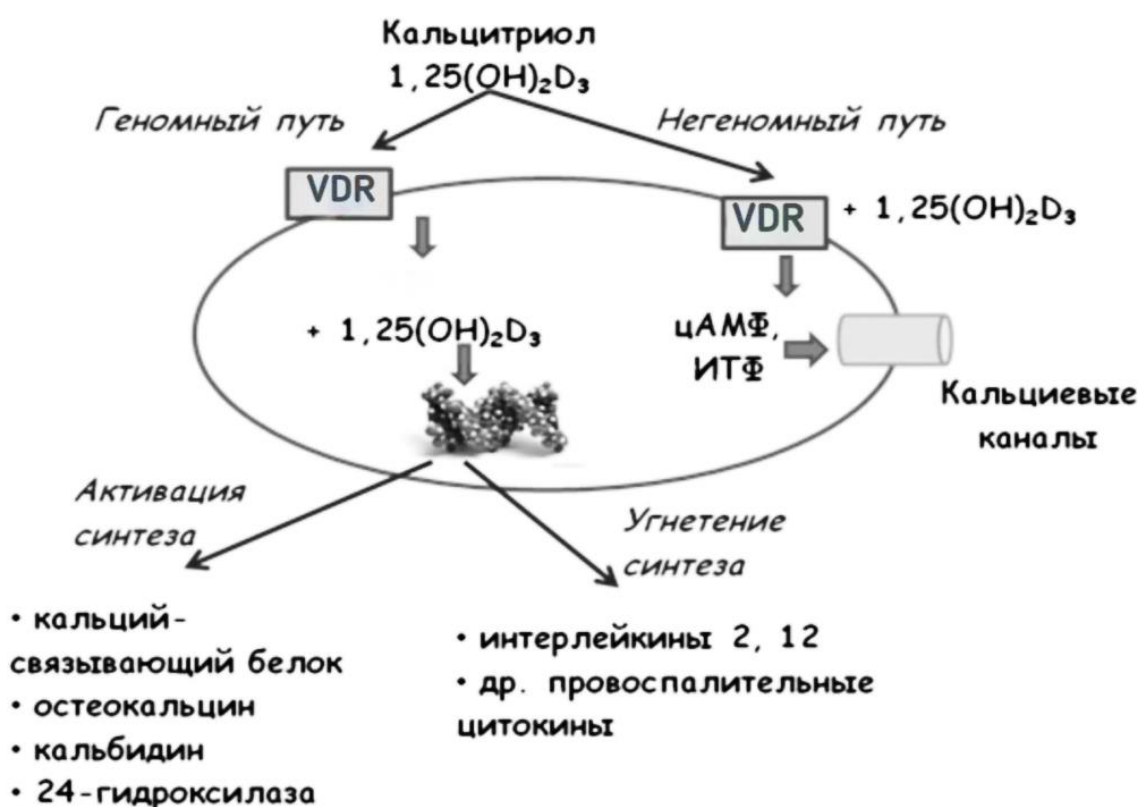
Мембранные рецепторы подвергаются воздействию негеномного действия. Кальцитриол взаимодействует с мембранно-связанным VDR - 1,25D-мембранно-ассоциированным быстро отвечающим стероид-связывающим белком (1,25D-MARRS). В результате этого быстрые изменения происходят в клеточных сигнальных путях, включая передачу сигналов кальция и митоген-активированной протеинкиназы (МАРК), за счет прямого взаимодействия белков с внутриклеточными сигнальными молекулами.

Внутриклеточные депо высвобождает кальций, а тонкий кишечник успешно транспортирует кальций и фосфор в кровоток. Паратиреоидный гормон (ПТГ) оказывает еще большее резорбтивное действие на костную ткань, благодаря действию предшественников остеокластов и цитокинов, которые выделяются остеобластами. Активация mVDR отвечает за быструю гормональную стимуляцию всасывания кальция; секрецию инсулина В-клетками островков Лангерганса; миграцию гладкомышечных клеток сосудов в клеточной культуре; открытие потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  и Cl<sup>-</sup> каналов в клетках Сертоли [53].

Растворимый VDR рассматривают как возможный маркер клеточного повреждения. Существует гипотеза, что присутствие sVDR в плазме крови может быть индикатором повреждения клеток или апоптоза, характерного для аутоиммунных заболеваний [105]. На рис.1.2. представлены геномные и негеномные эффекты кальцитриола.

Рисунок 1.2.

## Геномные и негеномные эффекты кальцитриола [82]



Неклассические и классические эффекты D-гормона описаны в научных исследованиях. Биологические эффекты включают в себя следующие процессы: изменение ангиогенеза и клеточной пролиферации, продукции инсулина и противовоспалительных, антибактериальных и других эффектов [54,97]. Данные экспериментов и эпидемиологических исследований указывают на то, что низкий уровень витамина D связан с высоким риском метаболического синдрома, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний и смертности.

В результате исследования, проведенного в Швеции, было подтверждено, что увеличение потребления витамина D с пищей связано с высоким уровнем

кальцитриола как в сыворотке, так и в плазме крови. Высокие дозы витамина D были скопированы с повышенным МПКТ [31]. Кроме того, последние исследования определяют взаимосвязь атеросклероза и остеопороза, что указывает на параллельность в прогрессировании этих заболеваний [55].

Существует научное обоснование связи между сердечно-сосудистыми заболеваниями и гиповитаминозом D, которое было установлено при проведении исследований. Недостаток данного витамина изменяет сосудистые клетки, что ведет к увеличению окисления липидов и воспалительным процессам. Активация VDR может привести к снижению уровня триглицеридов и холестерина [33].

### **1.2.1.3. Физиологические эффекты витамина D**

Основная функция кальцитриола заключается в регуляции гомеостаза кальция. Он также играет значимую роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. Имеются данные о том, что витамин в высоких дозах снижает риск развития резистентности к инсулину, ожирения и метаболического синдрома, а также различных видов рака. Так, кальцитриол участвует в секреции инсулина, синтезе и секреции паратгормонов и гормонов щитовидной железы, ингибировании продукции интерлейкина активированными T-лимфоцитами и иммуноглобулина активированными B-лимфоцитами, дифференцировке клеток-предшественников моноцитов и модулировании клеточной пролиферации. Витамин D оказывает комплексное (прямое и косвенное) противовоспалительное действие [78,89].

Витамин D способствует увеличению секреции инсулина и всасыванию глюкозы; имеет антигипертензивный эффект, действуя на сосудистую стенку, сердечную мышцу, на ренин-ангиотензиновую систему; в коже- способствует дифференцировке кератиноцитов и заживлению ран, а в центральной нервной системе способствует нейропластичности и нейропротекции [56].

Кроме того, витамин D оказывает антипролиферативное действие на опухолевые клетки [48]. В жировой ткани кальцитриол ингибирует адипогенез [100].

Витамин D играет ключевую роль в регуляция развития организма в детском возрасте и деятельности мозга у взрослых [50].

#### **1.2.1.4. Витамин D и гомеостаз кальция**

Наиболее изученная функция витамина D - поддержание концентрации кальция в плазме крови. Когда кальциевые рецепторы клеток паращитовидной железы обнаруживают снижение уровня ионизированного кальция в плазме, секретируется ПТГ, который активирует выработку кальцитриола из кальцидиола в почках (стимулируя 1-гидроксилазу).

Кальцитриол через  $\text{pVDR}$  пассивно способствует минерализации костей за счет увеличения всасывания фосфатов в кишечнике до 80% и увеличения всасывание кальция в тонком кишечнике на 30–40%. Это происходит за счет усиления экспрессии эпителиального кальциевого канала (TRPV6) и кальбиндина 9К, кальций-связывающего белка (CaBP) в энтероцитах. Кроме этого, кальцитриол стимулирует реабсорбцию кальция из первичной мочи в почечных канальцах. В кости кальцитриол вызывает экспрессию остеокальцина. В остеобластах посредством  $\text{pVDR}$  увеличивает экспрессию лиганда рецептора активатора ядерного фактора-В (RANKL), который связывается с RANK на преостеокластах, и это побуждает преостеокласты становиться зрелыми остеокластами. Зрелые остеокласты удаляют кальций и фосфор из кости для поддержания адекватных уровней кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и фосфора ( $\text{HPO}_4$ ) в крови и способствуют минерализации кости [83].

Суммарно, витамин D усиливает резорбцию и образование костей, увеличивает абсорбцию  $\text{Ca}^{2+}$  с пищей, способствует реабсорбции  $\text{Ca}^{2+}$  в почках и снижает синтез ПТГ паращитовидными железами [62]. Общий эффект витамина D заключается в повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в плазме. Дополнительный уровень

контроля гомеостаза кальция – сам кальцитриол тормозит собственный синтез, индуцируя 24-гидроксилазу и подавляя 1-гидроксилазу в почках. Другим ингибитором 1-гидроксилазы является FGF23, продуцируемый преимущественно остеобластами и остеоцитами, который уменьшает синтез кальцитриола и вызывает интернализацию натрий-фосфатного котранспортера в клетках почек и тонкого кишечника. Данная петля обратной связи, аналогичная петле контроля секреции ПТГ, поддерживает баланс уровней этих важнейших гормонов [53].

#### **1.2.1.5. Дефицит витамина D**

Дефицит витамина D рекомендуется определять, как концентрацию 25(OH)D <20 нг/мл (50 нмоль/л), недостаточность – концентрацию 25(OH)D от 20 - 30 нг/мл (от 50 до 75 нмоль/л), нормальные уровни – как 30–100 нг/мл (75–250 нмоль/л).

#### *Последствия дефицита витамина D*

В первую очередь дефицит витамина отражается на костно-минеральном гомеостазе. Дефицит витамина D сопровождается слабостью, искривлением опорных костей, дефектами зубов и гипокальциемией. При авитаминозном рахите кости детей недоминерализованы в результате плохого усвоения кальция. Аналогичные проблемы возникают в результате дефицита витамина во время скачка роста в подростковом возрасте. Остеомаляция у взрослых возникает в результате деминерализации костей, особенно у женщин, мало подвергающихся воздействию солнечного света, обычно после нескольких беременностей. Хотя витамин D необходим для профилактики и лечения остеомаляции у пожилых людей, доказательств того, что он полезен при лечении остеопороза, меньше.

Кроме того, дефицит витамина D, и это стало известно позже, чем его влияние на костный метаболизм, связан с повышением риска возникновения и тяжестью многих заболеваний, таких как кожные заболевания (эпидермолитический ихтиоз), респираторные инфекции, сепсис, артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, диабет 2 типа, нервно-психические расстройства (шизофрения, большие депрессивные и нейродегенеративные расстройства - болезни

Альцгеймера и Паркинсона) [55], аллергические заболевания (астма, свистящие хрипы, крапивница и атопический дерматит), рак (молочной железы, толстой кишки и предстательной железы), аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, диабет 1 типа, рассеянный склероз, витилиго, псориаз и псориатический артрит). Младенцы и подростки являются потенциальными группами населения, подверженными риску низкого уровня кальцидиола в сыворотке крови из-за быстрого роста скелета после рождения и полового созревания [67].

Появляется все больше доказательств того, что более высокий статус витамина D защищает от различных видов рака, включая рак предстательной железы и колоректальный рак, а также от преддиабета и метаболического синдрома. Желаемый уровень потребления для достижения этих целей выше текущих эталонных значений и может быть достигнут только за счет витаминных добавок.

#### *Причины дефицита витамина D*

Факторы, которые могут способствовать дефициту витамина D, включают использование солнцезащитного крема, особенно у пожилых людей; отсутствие солнечного света с ноября по март в определенных широтах (выше 40° с.ш. и ниже 40° ю.ш.); использование одежды, закрывающей большую часть кожи. Реже у людей может быть мутация 1 $\alpha$  гидроксилазы, фермента, который катализирует второй этап активации витамина D, или резистентность к действию витамина D в тканях, вызванная мутациями рецептора витамина D [66].

Люди с вегетарианской диетой или ограничительными расстройствами пищевого поведения с большей вероятностью будут иметь дефицит витамина D из-за несбалансированного питания.

Отмечен низкий статус витамина D у пожилых людей, что может быть связано со многими факторами. В частности, с возрастом способность кожи производить витамин D уменьшается, после 65 лет она может снижаться более, чем в 4 раза [83].

Дефицит витамина D у взрослых может быть связан со вторичным гиперпаратиреозом, остеомалацией или остеопорозом, слабостью проксимальных мышц конечностей, атаксией и повышенным риском падений, повышенным

риском переломов или недостаточным действием препаратов, применяемых при остеопорозе [65].

Некоторые заболевания или состояния, нарушающие всасывание жиров, такие как механическая желтуха, недостаточность поджелудочной железы, муковисцидоз, глютеновая болезнь, хирургическое шунтирование желудка, воспалительные заболевания кишечника, а также нефротический синдром, печеночная и почечная недостаточность, могут способствовать снижению всасывания или синтеза витамина D [20].

Более высокий индекс массы тела был связан с более низким уровнем кальцидиола в сыворотке крови [45]. Субъекты с ожирением имеют более низкие уровни витамина D в сыворотке, потому что витамин D может откладываться в жировой ткани.

### **1.2.2. Менопаузальная гормональная терапия (МГТ)**

Стероидные гормоны относятся к производным циклопентанпергидрофенантренам. Он содержит четыре кольца (А, В, С и D), которые составляют основу стероидной молекулы. В зависимости от числа углеродных атомов стероидные гормоны делят на 4 основные группы:

1. С18-стероиды - эстрогены (эстрадиол, эстрон, эстриол, эстетрол).
2. С19-стероиды – андрогены (тестостерон, дигидротестостерон).
3. С21-стероиды – прогестины (прогестерон).
4. С21-стероиды-кортикостероиды, основные представители— кортизол, кортикостерон и альдостерон.

В зависимости от оптической, геометрической и конформационной изомерии стероидные гормоны проявляют стереоспецифичность [14].

Для каждого из перечисленных стероидных гормонов в чувствительных клетках представлены специфические рецепторы. Эти рецепторы в научной литературе принято называть стероидными, хотя такой термин имеет функциональное, а не химическое значение. Надо отметить, что в зависимости от



клеточного, тканевого и эндокринного контекста половые стероиды выступают в качестве агонистов, частичных агонистов и антагонистов лигандов стероидных рецепторов. В частности, прогестерон проявляет антиглюко-и антиминералокортикоидные свойства в конце менструального цикла у женщин (отеки, депрессия). Стероидные рецепторы являются лиганд-активированными транскрипционными факторами (ядерными рецепторами).

### 1.2.2.1. Классификация ядерных рецепторов

Ядерные рецепторы (NR) включают 48 транскрипционных факторов, которая включает рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов, липофильных витаминов и метаболитов холестерина (табл.1.1).

**Таблица 1.1.**

#### **Классификация ядерных рецепторов человека**

Подсемейство	Обозначение	Эндогенный лиганд
Субсемейство 1		
NR1A1	TRa	тироксин
NR1A2	TRb	
NR1B1	RARa RARb RARg	ретиноевая кислота
NR1B2		
NR1B3		
NR1C1		
NR1C2		
NR1C3		
NR1D1		
NR1D2		

NR1F1		
NR1F2		
NR1F3		
NR1H2		
NR1H3		
NR1H4		
NR1I1		
NR1I2		
NR1I3		
	PPARa PPARd PPARg	жирные кислоты
	REV- ERBa REV- ERBb	гем
	RORa RORb RORg LXRb LXRa	оксистеролы
	FXR	желчные кислоты

	VDR	витамин D
	PXR CAR	ксенобиотики
Субсемейство 2		
NR2A1	HNF4a	*
NR2A2	HNF4g	
NR2B1	RXRa	9-Cis-ретиноевая кислота
NR2B2	RXRb	
NR2B3	RXRg	*
NR2C1	TR2	
NR2C2	TR4	
NR2E1	TLX	
NR2E3	COUPTF1	
NR2F1	COUPTF2	
NR2F6	EAR2	
Субсемейство 3		
NR3A1	ERa	эстрадиол
NR3A2	ERb	
NR3B1	ERRa	*
NR3B2	ERRb	
NR3B3	ERRg	
NR3C1	GR	глюкокортикоиды

NR3C2	MR	минералокортикоиды
NR3C3	PR	прогестины
NR3C4	AR	андрогены
Субсемейство 4		
NR4A1	NGFIB	
NR4A2	NURR1	*
NR4A3	NOR1	
Субсемейство 5		
NR5A1	SF-1	*
NR5A2	LRH-1	
Субсемейство 6		
NR6A1	GCNF	*
Субсемейство 0		
NR0B1	DAX1	*
NR0B2	SHP	

Стероидные гормоны влияют на транскрипцию чрезвычайно большого количества генов и таким образом регулируют физиологические и биохимические процессы в организме.

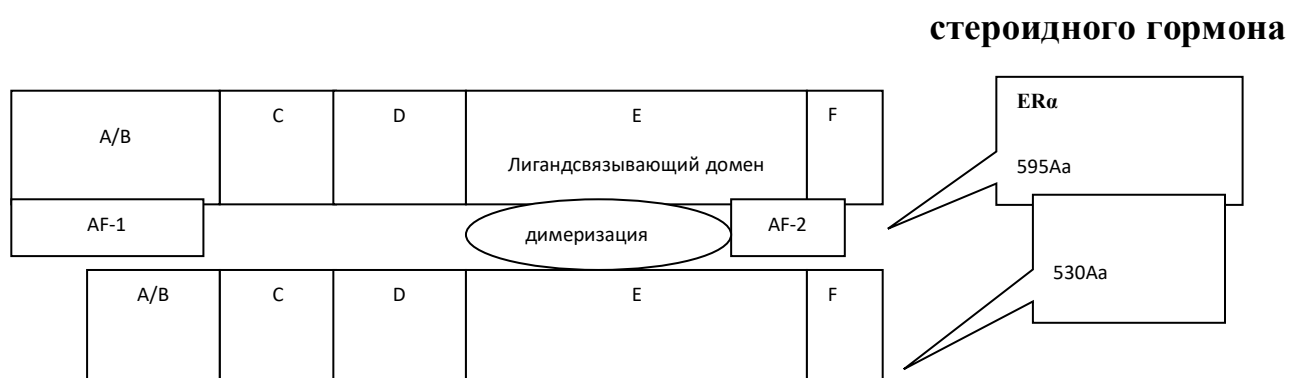
### **1.2.2.2. РЕЦЕПТОРЫ ЭСТРОГЕНОВ**

#### **1.2.2.2.1. Механизм действия эстрогенов**

Рецепторы стероидных гормонов имеют унифицированное строение, они представлены единственной негликозилированной белковой молекулой, в состав которой входят от 350–930 Аа. Структурно-функциональное строение рецепторной

молекулы едины для всех стероидных гормонов, и включает 4 фрагмента (домена): A/B, C, D, E (схема 1.1.). У некоторых рецепторов имеется дополнительный домен 5-й фрагмент — домен F. Каждый из указанных доменов несет функциональную нагрузку [32].

### Схема 1.1. Первичная доменная структура рецептора



**Участок «Е»** - гормонсвязывающий фрагмент, отличающийся высокой лигандной специфичностью и уникальной аминокислотной консервативностью у живых организмов.

**ДНК-связывающий эффекторный фрагмент** представляет собой двухпальцевую (цинковые пальцы) структуру, которая выполняет две функции. Первая – димеризация гормон-рецепторных комплексов, обеспечивающая кооперативное действие гормона. Вторая – интеркаляция димера в малую бороздку ДНК и инициацию организации большой транскрипционной машины.

**Домен A/B** играет значительную, но лишь вспомогательную регуляторную роль.

В отличие от ПР, у ER имеется ещё один домен – F. Он содержит 42 аминокислотных остатка и локализуется в C-терминали. Роль домена сводится к модуляции силы транскрипционного эффекта эстрогенов и антиэстрогенов.

Взаимодействие лиганда с рецептором вызывает конформационную перестройку рецепторной молекулы с последующей инициацией ряда биохимических реакций. В зависимости от типа рецепторов находятся скорость

проявления эффектов. Если активация стероидного рецептора (ядерного) влечет за собой изменение транскрипции зависимых генов и это требует от 12 до 24 часов, то эффекты через мембранно-связанные рецепторы следует ожидать в течение нескольких минут.

#### **1.2.2.2.2. Активация рецепторов**

В отсутствие специфического лиганда стероидный рецептор неактивен. Добавление гормона к клетке или гормонодефицитному животному ведёт к быстрой трансформации неактивного рецептора в активную форму. При отсутствии гормона в клетке рецепторная молекула оккупирована рядом вспомогательных белков. Наиболее часто встречающийся компонент этого комплекса - белок теплового шока с молекулярной массой 90 Да. Белки с меньшей молекулярной массой (70, 60 и 23 Да), несколько крупных иммунофилинов, а также белок Сур40 входят в состав данного комплекса.

Процесс образования комплекса (в отсутствие гормона) начинается с присоединения hsp70 к свободной молекуле рецептора прогестерона, затем быстро ассоциируются hsp90, p60 и p23. p48 является дополнительным фактором на ранних стадиях активации рецептора. Получившийся комплекс очень стабилен. Вспомогательные белки кроме всего прочего (шаперонная функция) защищают функциональные домены рецепторной молекулы от преждевременной активации. Единственный открытый и доступный для активации участок молекулы – лиганд-связывающий домен, который представляет собой гидрофобный карман (практически все лиганды стероидных рецепторов обладают гидрофобными свойствами). Таким образом, рецептор находится в неактивном состоянии.

Взаимодействие гормона с гормон-рецепторным гидрофобным карманом вызывает конформационную перестройку молекулы с последующим открытием функциональных доменов молекулы. Важнейшими для регуляции транскрипции участками рецепторной молекулы являются так называемые активационные функции (AF). Это те самые участки, которые предназначены для связывания ко-регуляторов транскрипции. Ко-регуляторную функцию могут выполнять как

активаторы, так и репрессоры транскрипции. Все коактиваторы объединены в группу SRC (Steroid Receptor Coactivator — коактиваторы стероидных рецепторов). Указанные белки различаются в путях передачи сигнала разных стероидов: SRC-1 – в сигналинге прогестерона, SRC-2 – глюкокортикоидов, SRC-3 – эстрогенов и тестостерона. Интересно, что кроме стероидных гормонов проводить собственный транскрипционный сигнал через SRC-3 могут и цитокины.

Взаимодействие стероида с рецептором, вернее индуцированная лигандом конформация молекулы рецептора, открывает не только участки связывания для корегуляторов транскрипции, но и вызывает димеризацию последнего (тем самым на 2 порядка увеличивая транскрипционный эффект). Для реализации транскрипторного действия стероидный рецептор обязан попасть в ядро. ER и PR синтезируются в цитоплазме и демонстрируют челночные перемещения из цитоплазмы в ядро.

#### **1.2.2.2.3. Транспорт рецептор-лигандного комплекса в ядро**

Ядерный экспорт и импорт рецепторов осуществляются через поры ядерной мембраны. Направленный транспорт гормон-рецепторных комплексов в ядро осуществляется за счет демаскированной (в результате конформационной перестройки молекулы рецепторы) ядерной локализационной последовательности (NLS). Данная последовательность узнаётся и связывается со специфическими NLS-связывающими белками, расположенными в области ядерных пор, которые опосредуют транспорт стероидрецепторного комплекса в ядро. Существуют два типа NLS—NLS1 (гормон независимые, конституитивные) и NLS2 (гормонозависимые). NLS1 локализуется в молекуле рецептора прогестерона в области шарнира (около 638–642 Aa) и действует в отсутствие гормона. NLS2 находится в районе второго цинкового пальца рецепторной молекулы. NLS1 более эффективна по сравнению с NLS2.

Интеграция обоих сигналов необходима для входа в ядро цитоплазматических белков (рецепторов и, например,  $\beta$ -галактозидазы). Рецепторы эстрадиола и прогестерона не заперты в ядре. Они способны к двунаправленному транспорту

через ядерную мембрану. NLS модулируют и вход и выход рецепторов. Т. е. стероидные рецепторы постоянно диффундируют из ядра и активно реимпортируются. При этом импорт в ядро зависит от энергии, тогда как экспорт — нет.

#### **1.2.2.2.4. Димеризация**

Гормон-рецепторное взаимодействие приводит к открытию ДНК-связывающего домена, представляющего собой два цинковых пальца. Один из пальцев отвечает за связывание комплекса с промоторной областью гормонзависимого гена. Второй палец абсолютно необходим для димеризации гормон-рецепторной молекулы и этот процесс происходит в цитозоле до транспортировки в ядро. Димеризация является универсальным механизмом координации и мультипликации гормонального сигнала в организме.

Гормон-рецепторный комплекс связывается с гормон-чувствительным элементом промоторной зоны зависимого гена.

#### **1.2.2.2.5. Трансактивация**

Этот процесс определяется преимущественно взаимодействием гомодимерного рецепторного комплекса со специфическими последовательностями нуклеотидов в промоторной или энхансерной областях чувствительных генов. Димеризация при этом является необходимым компонентом. Введение точечной мутации в молекулу рецептора (область цинкового пальца), которая предотвращает димеризацию, блокирует проявление трансактивационной активности рецептора в отношении многих ферментов.

#### **1.2.2.2.6. Трансрепрессия**

Отрицательная регуляция гормонами транскрипции зависимых генов осуществляется несколькими путями. Хорошо изучен механизм, в котором рецептор ингибирует активность других транскрипционных факторов, связывая их кофакторы. Этот механизм не зависит от процесса димеризации рецептора. Транскрипционные факторы, активность которых ингибируется стероидным



рецептором - активационный протеин — 1 (AP-1), ядерный фактор κВ (NF-κВ) и интерферонрегуляторный фактор-3 (IRF-3). Прямое следствие торможения AP-1 — ингибирование синтеза цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ФНОα), их рецепторов (ИЛ2-R) и протеиназ (коллагеназа, стромелизин).

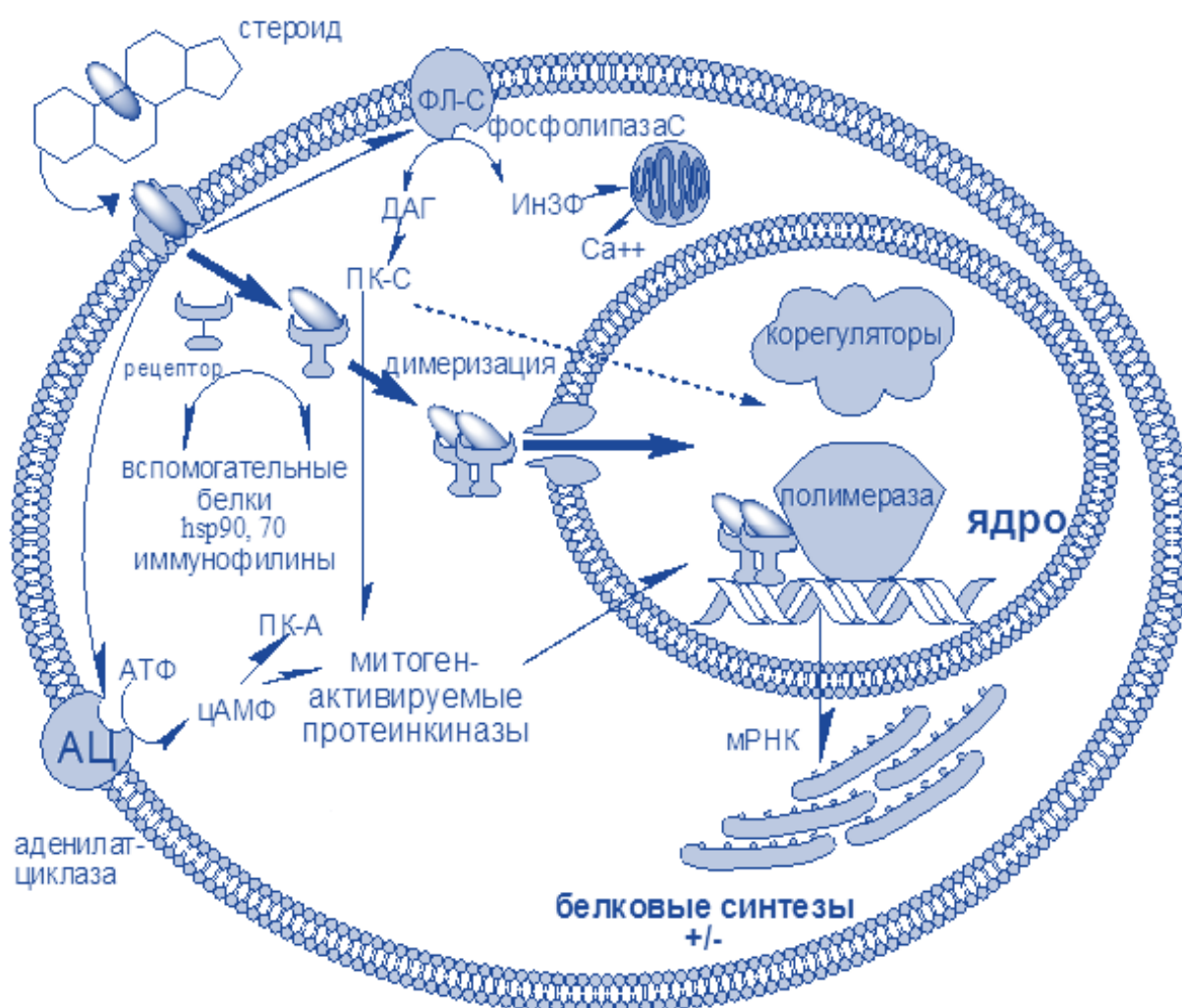
#### **1.2.2.2.7. Терминация рецепторного цикла**

Один из возможных механизмов – это обратимая инактивация рецепторной молекулы (убиквитинирование) с возможностью рециклинга. Дополнительным способом прекращения активационного цикла является реакция дефосфорилирования. Известно, что действие киназ (фосфолирование белка) способствует быстрому восстановлению функциональной активности рецепторной молекулы. В случае необратимой инактивации рецептора для восстановления гормональной чувствительности клетки требуется синтез новых молекул *de nova*. Разрушению может подвергнуться и сама молекула стероидного гормона (цит Р-450) как в клетке-мишени, так и в гепатоците. Эта инактивация может служить механизмом терминации рецепторного цикла.

Мембранные эффекты стероидных гормонов в последнее время подвергаются все более тщательному анализу. К ним можно отнести активацию системы вторых посредников (кальций, цАМФ), открытие ионных каналов и изменение уровня фосфорилирования белков – мишеней. Описана стимуляция эстрадиолом NO-синтазы эндотелиальных клеток, с последующей диффузией NO в подлежащий мышечный слой. В культуре остеобластов крыс плазмамембранный EP сопряжён через G-белок с фосфолипазой C и активирует фосфатидинозитольный цикл.

### Внутриклеточный механизм действия стероидных гормонов

[34]



*Примечание:* ДАГ – диацил-глицерол, ПК-С – протеинкиназа С, ПК-А – протеинкиназа А, Ин3Ф – инозитол-3 фосфат, цАМФ – циклический аденозинмонофосфат.

#### 1.2.2.2.8. Подтипы ядерных рецепторов эстрадиола (альфа и бета)

Существуют два основных типа рецепторов эстрадиола (ER) —  $\alpha$  и  $\beta$ . ER $\alpha$  — классический рецептор эстрадиола.

ER $\alpha$  по международной номенклатуре—NR3A1, встречается под названиями ER $\alpha$ , ER1, Esr1. Содержит 595аа, ген у человека локализован в хромосоме 6q251. В виде гомодимера связывается с ГЧЭ (GGTCAnnnTGACСпалиндром).

Функционально и физически связан в клетке с протеинами —HSP90, AP1, SP1. Агонисты —диэтилстильбэстрол (0,04 nM), 4-гидрокситамоксифен (0,14 nM), 17 $\beta$ -эстрадиол (0,15 nM), пропилпиразола триол (0,23 nM), ралоксифен (0,31 nM), эстриол (2,2 nM), эстрон (3,2 nM), (R, R)-THC (4,2 nM), тамоксифен (15 nM) [Ki]. Антагонисты —гексэстрол (0,05 nM), 4-ОН-тамоксифен (0,14 nM), ралоксифен (0,31 nM), ICI182780(0,24 nM), тамоксифен (15 nM) [Ki]. Коактиваторы —NCOA1, NCOA2, NCOA3, CREBВР, PPARВР, P68, SRA. Корепрессоры —NCOR1, NRIP1. Тканевое распределение — эндометрий, печень, белая жировая ткань, молочные железы, кости, центральная и периферическая нервная системы, яичники, сердечно-сосудистая система, тестикулы, простата, эпидидимис. Основные гены-мишени активации —pS2, progesteronereceptor, cathepsinD.

ER $\beta$  по международной классификации—NR3A2, встречается под названиями ER $\beta$ , ER2, Esr2. Состоит из 530аа, ген локализовану человека в хромосоме 14q231. В виде гомодимера связывается с ГЧЭ (GGTCAnnnTGACСспалиндром). Физически и функционально связан с HSP90, AP1, SP1. Агонисты —диэтилстильбэстрол (0,17 nM), 17 $\beta$ -эстрадиол (0,46 nM), диарилпропионитрил (2,5 nM), эстриол (4,0 nM), гинестеин (6,2 nM), эстрон (11,5 nM), тамоксифен (68 nM) [Ki]. Антагонисты —4-ОН-тамоксифен (0,023 nM), (R, R)-THC (1,45 nM), ICI18780 (1,83 nM), ралоксифен (13,3 nM), антагонистНРТЕ (23 nM), тамоксифен (68 nM) [Ki]. Коактиваторы —NCOA1, NCOA2, NCOA3, CREBВР, PPARВР, P68, SRA. Корепрессоры —NCOR1, NRIP1. Биологически важен у человека ER $\beta$ СХ (сплайсинг-вариант последнего экзона). Тканевое распределение — простата, яичники, лёгкие, молочные железы, кости, матка, эпидидимис, почки, клетки крови, центральная и периферическая нервные системы. Основные гены-мишени активации—pS2, рецептор прогестерона, катепсин D.

Клоны ER $\beta$  (NR3A2) впервые были идентифицированы в простате крыс и яичках человека. Обе изоформы имеют сходный аффинитет к эстрадиолу. Однако многие новые соединения характеризуются преимущественным действием на отдельные типы ER. Так, фитоэстрогены связываются преимущественно с ER $\beta$ .

Гинестеин—селективный лиганд  $\beta$ -рецепторов, что может быть с успехом использовано для их количественного анализа.  $ER_{\beta}$  участвуют в реализации эффектов эстрогенов во многих тканях, включая ЦНС, сердечно-сосудистую систему, иммунную систему, урогенитальный тракт, ЖКТ, почки и лёгкие.  $ER_{\alpha}$  остаётся преобладающим субтипом в тканях матки и гипофиза. ДНК-связывающие домены  $ER_{\alpha}$  и  $ER_{\beta}$  различаются по трём аминокислотным остаткам, в то время как лигандсвязывающий домен имеет лишь 59% гомологии, что наводит на мысль о различной транскрипционной активности субтипов ER ( $ER_{\beta}$  может быть слабым трансактиватором). Указанные различия открывают возможность синтеза селективных лигандов для каждого типа ER.

#### **1.2.2.2.9. Мембранно-связанный рецептор эстрадиола-17 бета (GPER1)**

Данный рецептор является метаботропным, т. е. рецептором, связанным с G-белком и семь раз пронизывающим мембрану (7TM-GPCR1) [73]. В комплект G-белка входит субъединица альфа - стимулирующая (Gs). Ранее, независимыми авторами выделен и описан данный рецептор под именами – CMKRL2, GPR30 [64]. В современной номенклатуре данный рецептор именуется как – GPER1 (Gprotein-coupled estrogen receptor 1). Взаимодействие эстрогена с этим рецептором повышает уровень внутриклеточного кальция, активирует синтез фосфатидилинозитолтрифосфата (активация Akt), повышает уровень цАМФ (активация ПК-A) и активирует Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinases). Так как GPER1 является G-белок, зависимый рецептором, то в сигналинге стероидного гормона принимают участие  $\beta\gamma$  и  $\alpha s$  субъединицы. В результате этого происходит активация SRC - тирозинкиназы, активацию металлопротеиназ, фосфорилирование ряда регуляторных белков и выделение гепарин-связанного эпидермального фактора роста (ГС-ЭФР) [113].

Эстрадиол, подобно целому ряду фито- и ксеноэстрогены, через мембранный рецептор и Gs активирует аденилатциклазу с последующим повышением концентрации цАМФ, а также дальнейшая активация цАМФ-зависимой протеинкиназы-A, которая фосфорилирует и тем самым блокирует RAF1 (прото-

онкоген серин/ треонин-протеинкиназы). Данный прото-онкоген способен повышать активность митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). Блокада прото-онкогена снижает активность МАРК. Таким образом, «активность МАРК является результатом баланса стимулирующих и тормозных путей и зависит от клеточного и тканевого контекста. Найденные и успехом используемые для экспериментальной фармакологии специфические лиганды GPER1. Антагонистом является соединение G-15, а агонистом – G-1, которые используются для функциональной характеристики этой молекулы» [15].

«Мембранный эстрогеновый рецептор опосредует не только быстрые, но и длинные транскрипционные эффекты гормона. В данный эффект вовлечены частично такие посредники цАМФ. В частности, активация аденилатциклазы стимулирует трансляцию C-fos в макрофагах и активацию транскрипционного фактора CREB в кератиноцитах. Такие эффекты эстрогенов, как активация экспрессии генов фактора роста нервов (макрофаги), циклина D2 и Bcl2 (кератиноциты)» [15], блокируются в условиях инкубации с антагонистом мембранных рецепторов, что очевидно свидетельствует о вовлеченности данного рецептора в указанный процесс. Имеется еще одно доказательство непосредственного участия GPER1 в протекторном действии эстрадиола (и G-1) на нейроны при аутоиммунном энцефаломиелите [130].

#### **1.2.2.2.10. Физиологические эффекты эстрадиола**

«Эстрогенам присущи многочисленные физиологические функции, которые условно можно разделить на репродуктивные и системные. Более подробно изучена роль эстрогенов в процессах регуляции репродуктивной системы. В матке эстрогены стимулируют рост железистого эпителия эндометрия, являются гормонами роста для гладкой мускулатуры урогенитального тракта. Эпителий влагалища настолько чувствителен к действию эстрогенов, что биологическое определение этих гормонов основано на исследовании вагинальных мазков. В комплексе с прогестероном и гонадотропными гормонами эстрогены регулируют процессы оплодотворения, вынашивания беременности, лактацию и

менструальный цикл. Эстрогены являются принципиальными гормонами в регуляции и мужской репродуктивной системы, в частности эстрадиол необходим для сперматогенеза. Влияние эстрогенов на молочные железы отчётливее всего проявляется при беременности, когда железистые элементы этих органов подвергаются совместному действию эстрогенов и прогестерона. Первые стимулируют рост системы протоков, тогда как второй стимулирует рост самих желёз» [34].

Среди нерепродуктивных эффектов эстрадиола особое место влияние этого гормона липидный, углеводный и костно-минеральный обмен [49,119]. Кроме того, эстрогены проявляют выраженное иммуностропное действие [14].

Все эстрогены делят на высоко-, средне- и низкоэффективные. Эффект конкретного эстрогена определяется типом рецептора (ядерные альфа и бета, мембранные), их количеством, тканью и эндокринным контекстом. Параметры взаимодействия разных эстрогенов с эстрогенными рецепторами представлены в таблице 1.2.

**Таблица 1.2.**

**Относительная активность связывания эстрогенов с рецепторами эстрадиола [36]**

Эстроген	Относительная активность связывания	Сродство	Время удержания в ядре, ч
Эстрадиол	100	$10^{10} \text{ M}^{-1}$	6–8
Эстрон	11	$10^9 \text{ M}^{-1}$	6–8
Эстриол	10	$10^9 \text{ M}^{-1}$	1–4
Эстрадиолавалерат	2	–	–
Этинилэстрадиол	100	$2\text{--}5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	24

Примечание: относительная активность связывания - за 100% принимается активность эстрадиола 17 бета).

Действие эстрогенов зависит от аффинитета с эстрогеновыми рецепторами и длительностью жизни гормоно-рецепторного комплекса.

Таблица 1.3.

**Физиологическое действие эстрогенов [24, 34, 35, 36, 37, 43, 44]**

Органы и системы, обмен веществ	Действие
Женская репродуктивная система	Матка - стимуляция деления клеток эндометрия, пролиферации и сократительности миометрия, синтеза рецепторов прогестерона. Шейка матки - индукция секреции цервикальной жидкости. Влагалище - пролиферация влагалищного эпителия, увеличение синтеза гликогена, восстановление популяции лактобацилл во влагалищном биоценозе, а также восстановление кислого pH влагалищного содержимого. Улучшение кровоснабжения влагалищной стенки, восстановление трансудации и её эластичности, что приводит к исчезновению сухости, диспареунии, повышению сексуальной активности [24]. Стимуляция развития фаллопиевых труб и вторичных половых признаков, распределение жира в организме по женскому типу (в области бёдер, молочных желёз). Регуляция менструального цикла, повышение чувствительности матки к окситоцину [37].
Урогенитальный тракт	Улучшение кровоснабжения всех слоёв уретры, восстановление её мышечного тонуса, качества коллагеновых структур, пролиферация уротелия, увеличение количества слизи. Опосредованный эффект эстрогенов проявляется увеличением внутриуретрального давления и уменьшением симптомов истинного недержания мочи при напряжении [37]. Нормализация сократительной активности детрузора путем улучшения трофики и экспрессии аднерорецепторов, что повышает способность мочевого пузыря отвечать на эндогенно-адренергическую стимуляцию. Обладая свойствами ингибиторов кальциевых каналов, эстрогены способствуют снижению симптомов гиперактивности мочевого пузыря. Улучшение кровообращения, трофики и сократительной активности мышц тазового дна, коллагеновых структур, входящих в состав связочного аппарата малого таза, что также способствует удержанию мочи и препятствует опущению стенок влагалища и развитию цистоцеле. Эстрогены влияют на активность эффективных компонентов Т-клеточного звена локального иммунитета, что может препятствовать развитию восходящей урологической инфекции [37].
Молочные железы	Рост и пролиферация эпителиальных клеток молочных протоков.
Костная ткань	Стимуляция развития скелета (особенно в сочетании с малыми дозами тестостерона), ускорение фазы роста и закрытия эпифизов длинных трубчатых костей в пубертатном возрасте. Уменьшение резорбции костной ткани (антагонизм по отношению к паратиреоидному гормону), предотвращение остеопороза, однако образование костной ткани или её регенерацию эстрогены не стимулируют [24]. Эстрогены различными путями подавляют активность остеокластов и стимулируют пролиферацию остеобластоподобных клеток
Кожа	Пигментация кожи (особенно половой), хлоазмы.
Печень	Стимуляция синтеза $\alpha_2$ -глобулинов, ответственных за транспорт тироксина, эстрогенов, тестостерона, железа, меди, транскортина. Стимуляция синтеза многих энзимов [35]. 17 $\beta$ -эстрадиол и этинилэстрадиол вызывают увеличение уровня ангиотензиногена в 3,5 раза в печени в течение нескольких дней

Кровь	Эстрадиол влияет на свёртывающую систему крови – уменьшает уровень фибриногена (прокоагулянт), антитромбина III и протейна S (антикоагулянтные факторы). В целом, значимых сдвигов не происходит. Синтетические эстрогены более агрессивны — повышение свёртываемости крови (с риском тромбообразования!) из-за стимуляции синтеза факторов свёртывания II, VII, IX, X, плазминогена и уменьшения количества антитромбина III в крови. Уменьшение ХсЛПНП и увеличение количества ХсЛПВП и триглицеридов в крови. Прямая вазодилатация. Суммарно: антиатерогенное действие [34].
Иммунная система	Снижение продукции ИЛ-6. Ингибирование В-лимфоцитов. Противовоспалительное действие
Стволовые клетки	Мезенхимальные стволовые клетки: 1) стимуляция дифференцировки остеобластов (синтез остеокальцина, коллагена I), запасание Ca <sup>++</sup> ; 2) стимуляция дифференцировки адипоцитов. Эндотелиальные клетки-предшественники: 1) активация пролиферации, активности теломеразы, ингибирование апоптоза (каспазы 8); 2) стимуляция миграции в пограничную зону ишемии, повышение экспрессии эндотелиального фактора роста сосудов. Кардиальные фибробласты: 1) геномные эффекты — снижение синтеза коллагенов, $\beta 1$ —интегринов; повышение экспрессии фибронектина; 2) негеномные — быстрая стимуляция активности клеток, повышение проводимости Ca <sup>++</sup> -зависимых K <sup>+</sup> -каналов. Нейрональные стволовые клетки: активация пролиферации по нейрональному типу. В комбинации с поли-L-орнитин/фибронектином ускоряет дифференцировку и созревание нейронов (используется в терапии эмбриональными стволовыми клетками болезни Паркинсона)
ССС	Геномные эффекты: 1) стимуляция роста эндотелиальных клеток, ингибирование пролиферации гладкомышечных клеток; 2) ингибирование ангиотензин-II-стимулированной продукции эндотелина-1 эндотелиальными клетками; 3) стимуляция миграции эндотелиальных клеток (активация ерзин/радиксин/моезиновой системы — семейство актин-связывающих протеинов). Негеномные эффекты: релаксация мышц сосудистой стенки (NO-цГМФ, простаглицлин-цАМФ, гиперполяризация мембраны), ингибирование эндотелий-независимого сокращения гладких мышц
Кишечник	Ослабление перистальтики и абсорбции веществ в кишечнике [34,35].
Углеводный обмен	Понижение толерантности организма к глюкозе [37].
Водно-электролитный обмен	Ускорение перехода жидкости из сосудов в межклеточное пространство, уменьшение объёма плазмы с компенсаторной задержкой в организме натрия и воды (в больших дозах эстрогены могут вызывать отёки и поэтому с осторожностью должны назначаться при болезнях сердца, почек, при эпилепсии, мигрени) [34].



### 1.2.2.3. РЕЦЕПТОРЫ ПРОГЕСТЕРОНА

Само название «прогестерон» отражает основное предназначение в организме: буквально *pro gestatio*— для беременности.

#### 1.2.2.3.1. Особенности химического строения прогестинов

Различают две основные группы гестагенов — прогестерон и его аналоги (дидрогестерон, ципротерона ацетат, гидроксипрогестерон и др.) и аналоги тестостерона — норэтистерон, норгестрел. В последнее время разработаны новые прогестагены — гестоден, дезогестрел, норгестимат, диеногест на основе норгестрела. Левоноргестрел — активный изомер норгестрела (его активность в 2 раза выше, чем у норгестрела). Прогестерон и его аналоги обладают меньшей андрогенной активностью, чем производные тестостерона (исключением является гибридный гестаген диеногест, обладающий антиандрогенной активностью).

В отличие от остальных гестагенов, дроспиренон является производным спиронолактона. И проявляет эффект в отношении минералкортикоидных рецепторов [35].

Диеногест, аналогично 19-норстероидам, вызывает трансформацию эндометрия, отлично всасывается в кровь и не накапливается в организме женщины. В отличие от гестагенов, содержащих этинильный радикал, диеногест не влияет на цитохромзависимые ферменты печени и не нарушает окислительный метаболизм [107]. Важнейшее преимущество диеногеста — отсутствие андрогенных свойств, благодаря чему он является метаболически нейтральным.

Более того, диеногест проявляет антиандрогенное действие (около 40% активности ципротерона ацетата), а также, что особенно важно, антиминокортикоидную активность.

По гестагенной активности (влияние на эндометрий неполовозрелых кроликов) дроспиренон сильнее прогестерона примерно в 2–4 раза. В связи с этим он обеспечивает надёжный контроль цикла при использовании его в комбинации с этинилэстрадиолом в комбинированных пероральных контрацептивах и

отсутствие мажущих кровотечений на фоне комбинации его с эстрадиолом для лечения менопаузальных расстройств [37]. Дроспиренон, снижая влияние альдостерона, повышает выделение натрия и воды, что может приводить к снижению массы тела и АД. «Антиминералокортикоидная активность дроспиренона (измерение по отношению экскреции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) была в 8 раз выше аналогичной активности спиронолактона, а антиандрогенная активность дроспиренона оказалась в 5–10 раз выше аналогичной активности прогестерона, но ниже таковой ципротерона ацетата. Кроме того, дроспиренон» [30] купирует симптомы предменструального синдрома (ПМС).

### 1.2.2.3.2. Фармакодинамика гестагенов

#### *Ядерные прогестиновые рецепторы*

Рецепторы прогестерона являются лиганд-активируемыми транскрипционными факторами и содержат 933 аминокислотных остатка, закодированы в хромосоме 11q22 [34]. В виде гомодимера связывается с ГЧЭ (GGTACANNNTGTTCT-палиндром). Физически и функционально связан с HSP90, HMGB, Srcfamilykinases (активация быстрого каскада, независимо от ДНК связывания). Полные агонисты рецепторы — классические гестагены (левоноргестрел, медроксипрогестерона ацетат), частичные агонисты (мифепристон (RU486)), антагонисты — RTI 3021–012 и RTI 3021–022 [34]. Коактиваторы транскрипции—NCOA1, NCOA3, CREBBP, SRA1, JDP2. Корепрессор —NCOR2. Биологически важной у человека является изоформа ПР-А. Тканевое распределение — молочные железы, матка, мозг, мышцы, тестикулы, яичники. Основные гены-мишени активации —FSH $\beta$ , multidrugresistance 1B, Stat5A, 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа [75].

В настоящее время известно о значительной гетерогенности ПР. Различают ПР-А и ПР-В. ПР-В (ММ = 110—120 кДа (доп.164 Аа в N-терминали), ПР-А — ММ=72—86 кДа. Эти рецепторы являются результатом сплайс вариантной транскрипции одного гена [34]. «Функциональные свойства изоформ рецептора прогестерона достаточно хорошо изучены в транскрипционных системах *in vitro*.

Несмотря на схожий аффинитет различных агонистов и антагонистов к изоформам ПР, они реализуют различные функции: ПР-В действует как транскрипционный активатор генов (например, вируса ОМЖ, гена тирозинаминотрансферазы и тимидинкиназы) в различных клетках; ПР-А – не активирует транскрипцию, а чаще действует как строгий репрессор транскрипционной активности, моделируемой через ПР-В и другие стероидные рецепторы (эстрогенов, глюкокортикоидов, минералокортикоидов и андрогенов)» [34].

Большинство гестагенов и их метаболитов (аллопрегненолона) проявляют аллостерическое агонистическое влияние на рецепторы ГАМК-А. Механизм, за счёт которого действуют нейроактивные стероиды, объясняется структурой рецептора ГАМК, субъединицы которого формируют ионный канал, окружённый пятикратными гидрофобными областями. Эти области и служат местами связывания стероидов, барбитуратов, бензодиазепинов и других модуляторов. Первым стероидом, способным модулировать нейрональную возбудимость через взаимодействие с рецепторами ГАМК-А, стал 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -тетрагидропрогестерон. Этот стероид оказался сильным барбитурато-подобным лигандом ГАМК-А-комплекса. В отличие от бензодиазепинов, активность которых зависит от  $\gamma$ 2-субъединицы и варьирует при замещении  $\alpha$ -субъединицы, действие стероида не зависит от перестановок субъединиц. Критичным для проявления положительного аллостерического действия на рецептор ГАМК-А является наличие у стероида 3 $\alpha$ -ОН-группы в А-кольце. 3 $\alpha$ -редуцированные стероиды — дигидроэпиандростерон и прегненолон — оказывают отрицательное аллостерическое действие на ГАМК-А, аллопрегненолон — положительное.

### **1.2.2.3.3. Мембранные рецепторы прогестерона**

Быстрые эффекты прогестерона и синтетических гестагенов опосредованы взаимодействием гормона с мембранными рецепторами [91, 131, 132].

«Наличие плазмамембранных рецепторов для стероидных гормонов было предсказано и затем доказано отечественным ученым академиком П. В. Сергеевым еще в 70-х годах прошлого столетия (1971). И только в 2001 году состоялся Первый

всемирный съезд стероидологов, на котором была принята новая классификация стероидных рецепторов и официально признано существование мембраносвязанных рецепторов стероидных гормонов, обеспечивающих их быстрые негеномные эффекты. Действительно, многие эффекты прогестерона являются слишком быстрыми, чтобы их можно было объяснить классическим геномным механизмом действия стероидов, включающим активацию внутриклеточных факторов транскрипции - рецепторов прогестерона PR-A и PR-B, так как это обычно занимает несколько часов/суток. С другой стороны, у PR-нулевых животных [76, 101] и в клетках и тканях, не имеющих PR, зарегистрированы очевидные реакции на прогестерон, что говорит о наличии альтернативных ядерным рецепторов прогестерона. Локализация данных рецепторов» [13] уже не только внутриклеточная, но и на поверхности плазматической мембраны, так как именно такая локализация запускает быстрые реакции клетки [122].

#### **1.2.2.3.4. Мембранно-связанный рецептор прогестерона (PGRmC1)**

В отличие от метаболитного рецептора прогестерона, PGRmC1 проявляет среднюю аффинность к прогестерону [129]. Имеются два типа PGRmC – 1 и 2. «Лучше изучен PGRmC1, хотя и по второму типу рецептора накапливается информация. В частности, PGRmC2 экспрессирован» [13, 103, 92, 133, 136] практически во всех исследованных тканях, но в максимальных количествах - в плаценте. Этот рецептор ингибирует миграцию клеток рака яичника SKOV-3, но не влияет на выживание этих клеток [47, 60]. PGRmC2 был идентифицирован как один из белков, связанных с фолликулярным резервом яичников у молодых женщин. Также сообщается, что PGRmC2 участвует в патогенезе распространенного эндометриоза. Уровень PGRmC2 заметно повышается во время секреторной фазы эндометрия, и резко снижен в эндометриоидной ткани. Одна из доказанных функций PGRmC2 – активность в качестве внутриклеточного шаперона гема в бурых адипоцитах. PGRmC2 перехватывает молекулу гема от PGRmC1, который образует комплекс с FECH, последним ферментом синтеза гема,

после этого PGRMC2, расположенный в эндоплазматической сети и в ядерной оболочке [81, 92].

PGRMC1 кроме связывания собственного лиганда (прогестерона) способен взаимодействовать с цит. Р-450, и т. п. [116]. Вероятно, роль PGRMC1 не ограничивается рецепцией прогестерона, а распространяется на более общие функции.

«Одна из самых ранних доказанных функций PGRMC1 - связывание гема, которое происходит в домене cytb5 молекулы рецептора, расположенного на цитоплазматической стороне мембраны эндоплазматического ретикулума» [13]. Считается, что связывание гема характерно для всех членов семейства MAPR [92].

Хотя механизм действия PGRMC остается до конца неясным, из растительного сырья выделен низкомолекулярный ингибитор PGRMC1 под названием AG-205 (RIKEN, Япония) [136]. О свойствах и функциональной нагрузке PGRMC2 известно еще меньше. Современные представления о молекулярно-клеточном механизме действия прогестерона представлены на рисунке 1.4.

#### **1.2.2.3.5. Основные свойства PGRMC1**

В целом PGRMC1 «представляет собой многофункциональный белок с гем-связывающим сайтом, который выполняет роль партнера других белков – рецепторов эстрадиола, прогестерона и факторов роста, а также цитохромов, факторов транскрипции и т. д. Чаще всего партнерская роль PGRMC заключается в потенцировании» [13, 90, 127] эффекта основного игрока. Следовательно, PGRMC1 проявляет свойства белка-интегратора сигналов первого порядка.

#### **1.2.2.3.6. PGRMC1 – плазма-мембранный рецептор прогестерона**

Очевидно, что PGRMC1 участвует в ответах на P4 различных клеточных систем. PGRMC1 опосредует следующие эффекты прогестерона:

1. Снижение экспрессии рецепторов эстрогена в нейронах [50];
2. Влияние на апоптоз в бессмертных клетках гранулезы (SIGC);

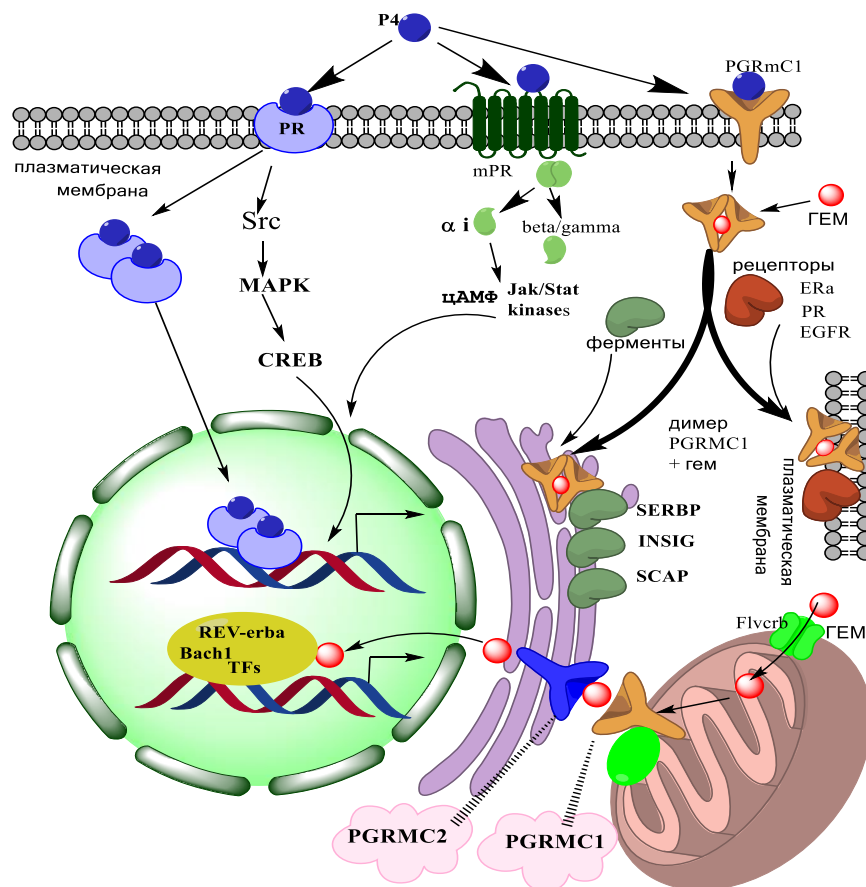
3. Защита от цитотоксического действия противоопухолевых средств в культурах опухолевых клеток [110,116].

В клетках Пуркиньи ЦНС PGRMC1 (под именем 25-DX) опосредует эффект P4 на нейростероидогенез P4 от холестерина [117]. В яичниках уровень экспрессии PGRMC1 коррелирует с преждевременной недостаточностью яичников, синдромом поликистозных яичников и бесплодием [74].

Действие PGRMC1 задокументировано в культуре клеток слюнной железы [109], в сетчатке [88], в гепатоцитах [95], в культуре клеток РМЖ - MDA-MB-231 [68]. Во всех случаях данный рецептор опосредует защитные эффекты гестагенов, будь то сам прогестерон или его синтетические аналоги.

**Рисунок 1.4.**

**Клеточные механизмы действия прогестерона [13]**



**Фармакокинетика гестагенов**

### 1.2.2.3.7. Синтез, распределение, метаболизм гестагенов

Синтез прогестерона осуществляется во всех стероидпродуцирующих тканях, так как он предшественник большинства из них. Наибольшие количества гормона синтезируются в яичниках (жёлтое тело за сутки секретирует до 25 мг прогестерона), семенниках и надпочечниках. Известен и так называемый «неэндокринный» синтез прогестерона в нейронах ЦНС. Предшественником синтеза является холестерин, который через стадию прегненолона превращается в прогестерон. Секреция прогестерона зависит от стадии полового цикла: ЛГ стимулирует его выброс сразу после овуляции и продолжается всю вторую половину цикла. Снижение уровня прогестерона в конце цикла играет роль в механизме менструации. В случае имплантации трофобласт способствует секреции ХГЧ, который в свою очередь активизирует синтез прогестерона. Дополнительным местом синтеза прогестерона являются надпочечники.

В плазме крови прогестерон связан с альбумином или транскортином, который несет на своей поверхности и глюкокортикостероиды. Время полужизни прогестерона составляет около 30 мин. В фолликулярную фазу цикла уровень прогестерона в плазме женщин низок и сопоставим с таковым у мужчин, но растёт значительно в лютеиновую фазу. Метаболизируется преимущественно в печени, где проходит стадии прегнандиона, прегненолона и прегнандиола. Затем связывается с остатками глюкуроновой или серной кислоты и выводится с мочой. В стероидогенных тканях прогестерон служит субстратом синтеза всех стероидных гормонов. Интенсивность разрушения стероидных гормонов тесно и отрицательно коррелирует с аффинитетом стероидов со специфическими транспортными белками плазмы крови (СССГ – секс – стероидсвязывающий гормон). Эстрадиол и дигидротестостерон проявляют разное сродство к СССР, а также дифференциально влияют на уровень его экспрессии в гепатоцитах. Таким образом, осуществляется еще один дополнительный уровень ауто – и гетеро- регуляции половыми стероидами гомеостаза организма женщины.

### **1.2.2.3.8. Основные свойства прогестерона**

Хорошо изученным свойством прогестерона, которое дало название гормону, является гравидопротекция – сохранение беременности. Поэтому, для поддержания лютеиновой фазы беременности используются гестагены (прогестерон, дидрогестерон). В комбинации с эстрадиолом прогестерон обеспечивает функционирование репродуктивного тракта женщины, - с тестостероном – мужчины. Кроме очевидного влияния на репродукцию, прогестерон осуществляет целый ряд жизненно важных функций. В частности, более 30% генов в геноме человека имеют в своей промоторной области участок связывания для прогестерон-рецепторного комплекса. Практически нет ни одной клетки в организме человека, в которой не было бы представлено рецепторов для прогестерона.

В последнее время особое внимание исследователей занимает вопрос о иммуотропной активности прогестерона [84,85]. Накопилась большая доказательная база об изменении иммунного статуса пациентов при эндокринных флюктуациях – частота аутоиммунных заболеваний, активность клеточного и врожденного звеньев иммунитета женщины во многом определяется эндокринным статусом (гестация, стадия менструального цикла, постменопаузальный период) [96, 124].

В качестве компонента МГТ гестагены с успехом используются для коррекции метаболических нарушений у пациенток старшей возрастной группы (после прекращения функционирования яичников – постменопаузы).

### **1.2.2.3.9. Показания к применению гестагенов**

В настоящее время гестагены используются по трем направлениям:

1. антипролиферативная терапия эстрогензависимых процессов (при эндометриозе, миоме матки, гиперплазии эндометрия и др.);
2. заместительная гормонотерапия (при нарушениях функции яичников, связанных с недостаточностью жёлтого тела, при аменорее,



ановуляторных маточных кровотечениях, бесплодии, невынашивании беременности, ЗГТ);

3. контрацепция.

#### **1.2.2.3.10. Классификация используемых в клинике гестагенов**

Классификация гестагенов:

I. Природные: прогестерон;

II. Полусинтетические:

а) аналоги прогестерона:

- прегнановые:
  - ацетилированные;
  - неацетилированные;
- непрегановые;

б) аналоги тестостерона:

- этинилированные:
  - эстрановые;
  - гонановые;
- неэтинилированные;

с) производные спиронолактона.

Мера селективности прогестагена — это способность молекулы связываться со стероидными рецепторами подсемейства С-4 (гестагеновые, андрогеновые, глюкокортикоидные, минералкортикоидные). Наличие дополнительной к гестагенной активности стероида свидетельствует о низкой селективности молекулы к только одному классу рецепторов (гестагенным). Дополнительная эндокринная активность лиганда (независимо от направления эффекта — а/антагонистического) сопровождается проявлением целого ряда

внерепродуктивных эффектов гормонов. Данные эффекты могут быть полезными и отрицательными в зависимости от соматического состояния организма женщины.

К сожалению, приведённые данные по относительной связывающей активности препаратов получены в опытах с использованием линий опухолевых клеток или, чаще, тканей матки экспериментальных животных. На кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии РГМУ им. Н.И.Пирогова в многочисленных сериях экспериментов с использованием клинического материала было показано, что не только синтетические гестагены (известные и новые), но и сам прогестерон демонстрируют различные параметры специфического связывания в зависимости от того, здоровая (гистологически неизменённая) или патологически преобразованная (аденокарциномы разной степени дифференцировки, гиперплазии и полипы эндометрия, миомы) ткань используются в эксперименте. Эти ткани различаются не только по количеству рецепторов женских половых стероидов, но и по их аффинитету. Более того, один и тот же гестаген (например, дидрогестерон) практически не связываясь с ПР из биоптата аденокарциномы, проявляет высокий аффинитет по отношению к ПР здоровой ткани. Другие лиганды гестагенных рецепторов (пентараны) демонстрируют противоположную картину – не взаимодействуют (или слабо связываются) с РП нормальной ткани и активно связываются с ПР аденокарциномы эндометрия.

Не только в патологически изменённой ткани можно столкнуться с изменением параметров рецепции стероида. Ещё одна немаловажная проблема встает перед практическими врачами, которая может внести свои коррективы в соответствие ожидаемых и реально получаемых результатов лечения (при всех прочих равных условиях). Это так называемая «групповая» чувствительность к гормонам. Под этим термином понимают известное явление полиморфизма генов, т. е. «равнозначной» замены одной или нескольких аминокислот в лиганд-связывающем домене, которая вполне физиологична, т. е. не препятствует реализации биологической активности природного гормона. Однако такая замена может фатально отразиться на связывании синтетического гестагена. В таком

случае мы получаем группу пациентов, «нечувствительных» к тому или иному препарату. Примером тому могут служить 1,5–3,0% женщин нечувствительных к мифепристону. Оптимальное решение в выборе гормональной терапии — индивидуальный анализ рецепторной чувствительности к гестагенам, который доступен лишь в нескольких научных центрах.

### 1.3. Синтетические гестагены (пентараны)

Было синтезировано множество производных прогестерона, изучены их воздействия на ткани-мишени, такие как матку, яичники, молочные железы, костную ткань и сосуды [35].

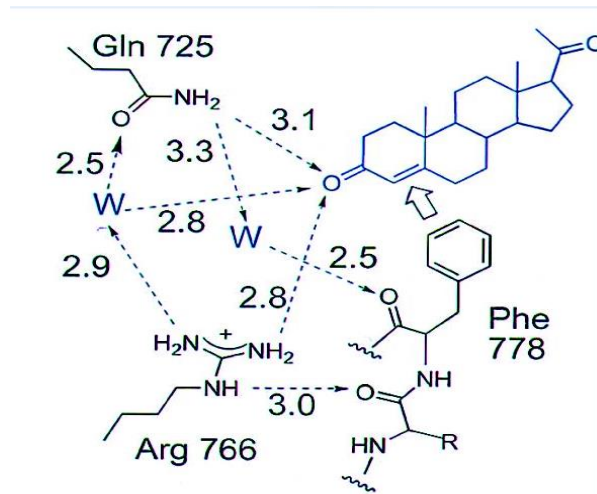
Химическая структура гестагенов определяет их биологическую активность, так как свойства этих стероидов диктуются взаимодействием с лиганд-связывающим доменом (LBD) прогестинового рецептора [126]. Рисунок 1.5 иллюстрирует данную зависимость.

Остатки Аргинина 766 и Глутамина 725 в лиганд-связывающем кармане играют принципиально важную роль. Для верной ориентации молекулы прогестерона за счет водородных связей с остатком Глутамина 725, необходимо присутствие остатка Аргинина 766. Фенилаланин 778 фиксирует А-кольцо стероида в кармане с помощью Ван-дер-Ваальсовой связи [115]. Интересно, что синтетический лиганд может проявлять агонистическую или антагонистическую активность за счет взаимодействия с другими остатками аминокислот гидрофобного кармана [102].

Согласно исследованию [123], гестагенная активность у молекулы стероида зависит от наличия гидроксильной группы в 17-м положении стероидного скелета. Ацетилирование С-17 и добавление СН<sub>3</sub> в С-6 приводит к увеличению гестагенной активности соединения.

Для повышения прогестагенной активности молекулы медроксипрогестерона ацетата осуществлена следующая модификация: замещение метильной группы у С-6, добавление метиленовой группы к С-1 и С-2, а также введение двойной связи между С-6 и С-7 [123].

**Взаимодействие прогестерона с аминокислотными остатками лиганд-связывающего домена рецептора**



**Примечание:** *Gln* – глутамин, *Arg* – аргинин, *Phe* – фенилаланин, *W* – Ван-дер-Ваальсово взаимодействие между молекулами, измеряется – в Ангстремах ( $10^{-10}$  м).

В литературных источниках есть информация об эффекте различных заместителей в молекуле прогестерона на его прогестагенную и андрогенную активность в литературе. Например, перемещение метильной группы с  $\beta$  на  $\alpha$ -положение у C-10 прогестерона приводит к изменению температуры тела и возвращению овуляторного менструального цикла. Введение этинильной группы в 17  $\alpha$ -положение молекулы тестостерона снижает его андрогенную активность, а удаление метильной группы в C-10 увеличивает его прогестагенные свойства и уменьшает - андрогенные [123].

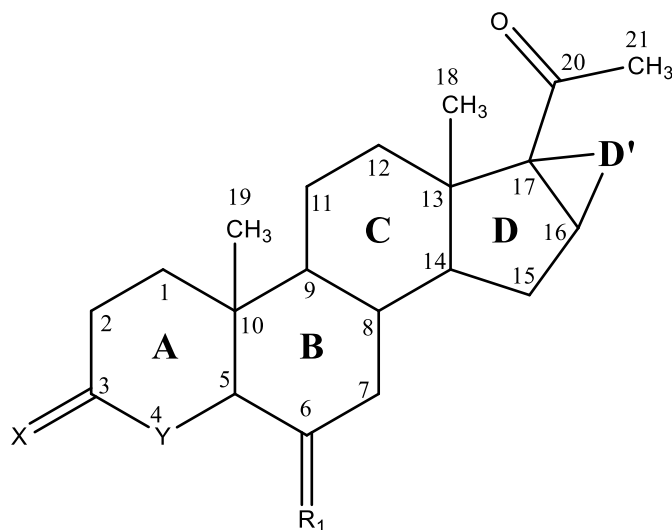
Создание новых классов соединений при дальнейшем изменении молекул прогестерона позволит получить вещества с другими свойствами. Такое создание классов глубже поможет изучить связи между структурой и функцией в ряде производных прогестерона.

В лаборатории химии стероидов и оксипинолов N 22 ИОХ им. Зелинского (зав. д.х.н. И.В. Заварзин) был создан новый класс синтетических прогестинов - прегна-D'-пентаранов (16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклоалканопрогестероны), результат химической модификации молекулы прогестерона. Пентараны получены путем введения

дополнительного карбоцикла в молекулу прогестерона в положении  $16\alpha, 17\alpha$ . (рис. 1.6) [12].

**Рисунок 1.6.**

**Структура прегна-D'-пентаранов**



**Примечание:** X, Y, R<sub>1</sub> – расположение введенных радикалов.

Стероиды с различными заместителями в стероидном скелете проявляют разные биологические свойства в зависимости от радикала и особенностей структуры стероидного скелета [86].

Существует класс соединений, известных как прегна-Д'-пентараны. Они содержат дополнительный карбоцикл с  $16\alpha, 17\alpha$ -положениями, и численное обозначение n указывает количество атомов углерода в этом карбоцикле Д', которое варьируется от трех до семи. Данные соединения обладают прогестагенной или антипрогестагенной активностью.

Благодаря своей изогнутой структуре прогестерон может подвергаться многочисленным стереохимическим превращениям, поскольку он содержит две полярные группы без хиральности - 3- и 20-карбонильные. Это открывает больше возможностей для химических превращений, как показывают исследования [11].

Выделяют две группы Прегна-D'-пентаранов, различающиеся по направлению лиганд-рецепторного взаимодействия:

1. Полные агонисты рецепторов прогестерона (full agonist);

2. Агонисты-антагонисты – направление эффекта которых (а/анта) определяется от эндокринного контекста.

16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон и его аналоги проявляют свойства полных агонистов рецепторов прогестерона. Количество и локализация включенных в стероидную молекулу дополнительных радикалов и кольца D связано с усилением/ослаблением дифференциальных эффектов стероидов [11].

Соединения, обладающие дополнительным шестичленным карбоциклом с двойной связью, демонстрируют незначительное повышение прогестагенной активности. Однако соединения, содержащие дополнительный D-цикл из трех-пятичленных элементов, отличаются снижением гестагенной активности [11].

В зависимости от модификаций молекулы прегна-D'-пентараны могут иметь разделенные биологические функции, что делает их перспективными объектами для дальнейшего изучения и поиска с соединений с активными гестагенами, применяемыми в клинике.

Соединения прогестерона и его производные (в том числе с дополнительным карбоциклом) могут изменять транскрипцию генов-мишеней и запускать сигнальные каскады мембранных рецепторов [39].

Мембранные рецепторы не используются в создании новых препаратов на данный момент. Ядерные рецепторы используют для отбора селективных лигандов рецепторов прогестерона. Изучение участия альтернативных рецепторов в патогенезе иммунной, сердечно-сосудистой систем, а также изучение их роли в гормон-зависимых патологиях является актуальным направлением в медицине.

### **Заключение**

Все вышесказанное позволяет сделать вывод, что проблема развития остеопенического синдрома остается социально значимой по сегодняшний день. Несмотря на определенный прогресс в лечении данного заболевания, остается значительная часть пациенток, которым не подходят существующие схемы лечения. Поэтому поиск маркеров прогнозов эффективности менопаузальной гормональной терапии является актуальным для дальнейшего персонализированного лечения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты и материалл исследования

#### 2.1.1. Характеристика пациенток, включенных в исследование

110 пациенток в возрасте 40–55 лет после операции овариоэктомии (хирургической постменопаузой от 12 месяцев до 6 лет) получали диагностику и лечение в отделении гинекологической эндокринологии ГБУЗ МО МОНИИАГ (главный врач – М.В.Капустина). Кинический материал (кровь) был любезно предоставлен научным сотрудником МОНИИАГ, к. м. н. Е.В.Кручининой.

В работе использованы данные параметров костно-минерального обмена - минеральную плотность костной ткани в 3-х критических точках бедренной кости: шейка, трохантер, область Варда, а также в области позвонков (L1-L4). Для этого использован метод денситометрии («Hologic», США).

По полученным результатам ДРА пациентки (n=110) были разбиты на 2 группы. 1 группа (основная): остеопенический синдром - 68 пациенток, остеопения – 49 женщин и остеопороз – 19 женщин; 2 группа (контрольная) – 42 пациентки с нормальными показателями МПКТ.

Данные по ДРА были также предоставлены научным сотрудником МОНИИАГ, к. м. н. Е.В.Кручининой.

У всех пациенток было получено информированное согласие на участие в обследовании. Главными условиями включения пациенток в исследование явились следующие: наличие хирургической менопаузы, возраст от 39 до 54 лет, сроки оперативного вмешательства не менее 1 года и не более 6 лет, отсутствие хронических эндокринных заболеваний и тяжелой соматической патологии в стадии обострения, использование препаратов менопаузальной гормональной терапии и отсутствие противопоказаний к ним.

Указанные женщины прошли обследование: измерение роста, массы тела, с последующим расчетом ИМТ, биохимический анализ крови (Хс, ЛПНП, ЛПВП), определение уровня витамина D в крови.



Для изучения влияния синтетических гестагенов на экспрессию стероидных рецепторов в МНФК использовали кровь женщин – доноров (n=10, гинекологически здоровых пациенток репродуктивного возраста в 20–23 дни менструального цикла).

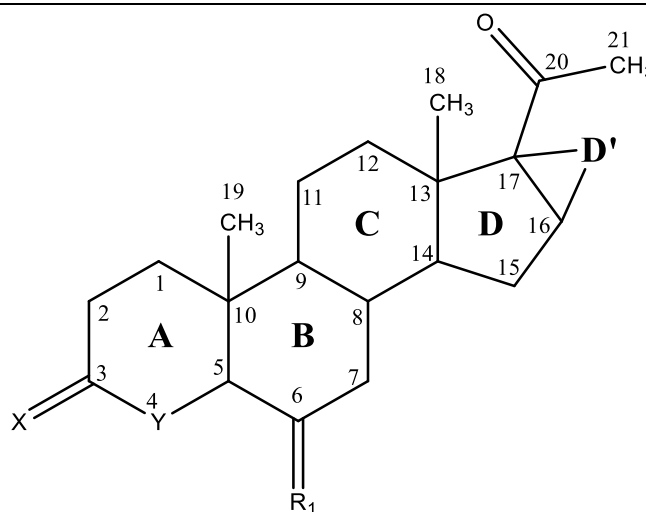
### 2.1.2. Синтетические лиганды рецепторов прогестерона

Прегна-D'-пентараны синтезированы, очищены и в лиофилизированном виде переданы сотрудниками Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (лаборатория химии стероидов и оксипиринов - заведующий д.х.н. И.В. Заварзин) - д.х.н., профессором Инной Саломовной Левиной и д.х.н., профессором Алексеем Владимировичем Камерницким. Структура исследуемых прегна- D'-пентаранов представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Структура исследуемых прегна- D'-пентаранов

№	Стероид	D' (16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ )	X	Y	R <sub>1</sub>
<b>К-338</b>	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопропано-прегн-4-ен-3,20-дион	-CH <sub>2</sub> -	O	C	H <sub>2</sub>
<b>К-993</b>	3-оксим-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прогестерона	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	(E) NOH	C	H <sub>2</sub>



<b>К-1030</b>	3'-фенил[16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ]- циклопропанопрегн-4-ен- 3,20-дион	-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	О	С	H <sub>2</sub>
<b>К-1036</b>	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-4- оксапрегн-5-ен-3,20-дион	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	О	О	H <sub>2</sub>
<b>К-1044</b>	б(е)-гидрокси-имино- 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн- 4-ен-3 $\beta$ -ол-20-он	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	Н, ОН	С	(Е) НОН
<b>К-1045</b>	б(е)-гидроксиимино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ - циклогексано-прегн-4-ен- 3,20-дион	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	О	С	(Е) НОН
<b>К-1046</b>	б(е)-метокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ - циклогексано-прегн-4-ен-3 $\beta$ - ол-20-он	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	Н, ОН	С	(Е) НОСН <sub>3</sub>
<b>К-1047</b>	б(е)-метокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ - циклогексано-прегн-4-ен- 3,20-дион	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	О	С	(Е) НОСН <sub>3</sub>

## 2.2 Необходимое лабораторное оборудование и реактивы

### 2.2.1. Лабораторное оборудование:

- ✓ Жидкостной сцинтилляционный альфа-бета радиометр «Tri-carb 3110» («PerkinElmer», США).
- ✓ Сцинтилляционные флаконы («PerkinElmer», США);
- ✓ Вортекс microspin FV-2400 (BioSan, Латвия)
- ✓ Настольная центрифуга Eppendorf mini spin («Eppendorf», Германия)
- ✓ Настольный термостат («ДНК-Технология», РФ)
- ✓ Амплификатор «iCycler iQ5 real-time PCR» (BioRad, Германия)
- ✓ Термостат Thermo fisher scientific midi 40 (Thermo fisher scientific, США)

### 2.2.2. Реактивы:

- ✓  $^3\text{H}$ -P<sub>4</sub> («Amersham», Англия);
- ✓ Фиколл ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>, «ПанЭко», Россия);
- ✓ Среда DMEM с глутамином и гентамицином («ПанЭко», Россия);
- ✓ Эмбриональная телячья сыворотка («ПанЭко», Россия);
- ✓ Комплект реагентов «РИБО-преп» («AmpliSens», Россия);
- ✓ Комплект реагентов «ОТ» («Синтол», Россия);
- ✓ Набор готовых реактивов для амплификации «SYBR Green I» («Синтол», Россия);
- ✓ Праймеры: *Gapdh up, low; VDR up, low; mER up, low; ER $\alpha$  up, low; ER $\beta$  up, low; mPR up, low; PGRmC1 up, low; PR-A up, low; PR-B up, low* («Синтол», Россия).

## 2.3 Методы исследования

Известно, что предшественниками остеокластов являются клетки мононуклеарной фракции крови, поэтому о чувствительности костной ткани к гормональной терапии можно судить по экспрессии рецепторов для компонентов МГТ и витамина D в МНФК.

Перед началом исследования у пациенток забирали кровь из кубитальной вены в объеме 5 мл.

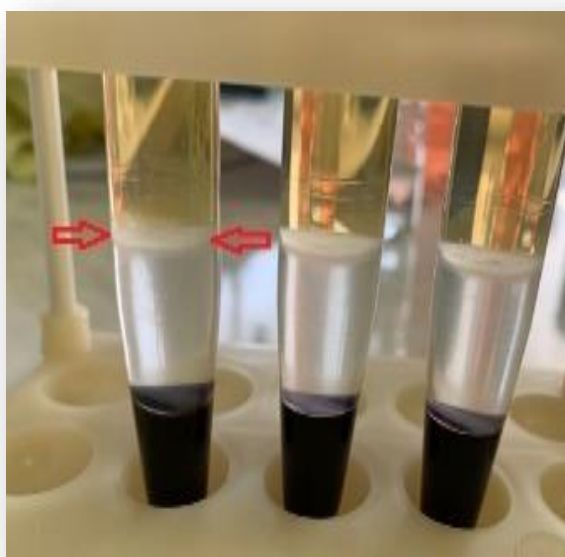
### 2.3.1. Выделение МНФК из периферической крови.

Из периферической крови пациенток выделяли мононуклеарную фракцию клеток (МНФК) методом Воуит А. [58], с использованием седиментации в градиенте плотности фиколла. Для этого кровь пациенток, полученную из кубитальной вены в объеме 5 мл, помещали в гепаринизированную центрифужную пробирку, добавляли 10 мл раствора NaCl (0,9%). Полученный раствор наслаивали на фиколл ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>, 3 мл) комнатной температуры. Пробирки центрифугировали при 1600 оборотов/мин в течение 45 минут. После центрифугирования отбирали кольцо МНФК (отмечено стрелками на рис.2.1.) автоматическим дозатором в пластиковую пробирку и полученную фракцию

поднимали раствором (NaCl 0,9%) до 7 мл и снова центрифугировали в тех же условиях 15 минут (отмывку повторяли 2 раза). В камере Горяева под микроскопом в присутствии красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия) производили подсчет мононуклеарных клеток. Далее осадок разводили в 1 мл физ. раствора, пипетировали и переносили МНФК в эппендорф 1,5 мл. На рис. 3 представлено дифференциальное центрифугирование.

**Рисунок 2.1.**

### **Дифференциальное центрифугирование**



*Примечание: красными стрелками на рисунке отмечено кольцо МНФК.*

### **2.3.2. РТ ПЦР.**

#### **2.3.2.1. Выделение мРНК из МНФК.**

Согласно инструкции производителя («AmpliSens», Россия) осуществляли выделение фракции мРНК из подготовленной МНФК с помощью набора «РИБО – преп».

Для растворения кристаллов прогревали «раствор для лизиса» до 65<sup>0</sup>С. Далее 100 мкл подготовленной фракции мононуклеаров вносили в пробирку эппендорф (1,5 мл) с 300 мкл «раствора для лизиса», после чего тщательно перемешивали на «вортекс» в течение 3–5 секунд. Термостатирование образцов при 65<sup>0</sup>С

осуществляли в течение 5 минут, после чего в каждую пробирку вносили по 400 мкл «раствора для преципитации» с последующим перемешиванием на «вортекс». Эппендорфы центрифугировали при 13000 оборотов/мин (5 минут) и устраняли надосадочную жидкость. В эппендорфы с осадком вносили по 500 мкл «раствора для отмывки №3» и центрифугировали 2 минуты при 13000 оборотов/мин. На следующем этапе выделения забирали надосадочную жидкость автоматическим дозатором и подвергали осадок еще одной отмывке с помощью «раствора для отмывки №4» (200 мкл) в аналогичных условиях центрифугирования. После удаления надосадочной жидкости эппендорфы для подсушивания окончательно отмытого осадка отправляли в термостат на 5 мин (65<sup>0</sup>С). Высушенный осадок в пробирке поднимали 50 мкл «РНК-буфера», перемешивали и термостатировали при 65<sup>0</sup>С 5 минут. На следующем этапе жидкость, содержащую РНК (супернатант в результате центрифугирования при 13000 оборотов/мин 1 минуту), переносили в отдельные пробирки 1,5 мл.

#### **2.3.2.2. Реакция «обратной транскрипции» (синтез кДНК).**

По протоколу (ООО «Синтол», РФ) готовили реакцию смесь, предназначенную для получения кДНК на матрице мРНК (на 12 реакций). В эппендорфе (1,5 мл) вносили: 500 мкл «2,5xРеакционной смеси» + 50 мкл раствора фермента MMLV-RT + 50 мкл раствора Олиго(dT) + 150 мкл дистиллированной воды, перемешивали на вортексе. Далее полученную смесь раскапывали по 15 мкл в ПЦР-пробирки (0,2 мл) и вносили по 10 мкл раствора тестируемых мРНК. Полученные пробирки с образцами термостатировали при 37<sup>0</sup>С 30 минут.

#### **2.3.2.3. ПЦР-РВ**

ПЦР-РВ осуществляли с помощью наборов реактивов «SYBR Green I» с использованием амплификатора iCycler iQ5 real-time PCR («BioRad», Германия). Амплификацию тестируемого гена рассчитывали с учетом амплификации глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH) мРНК из тех же образцов биологического материала.

Подбор последовательности для праймеров целевых генов и их синтез осуществлен в ООО Синтол, Россия. Последовательность праймеров представлена в табл. 2.2.

Таблица 2.2.

**«Нуклеотидная последовательность (5'-3') праймеров ядерных и мембранных рецепторов эстрадиола, ядерных и мембранных рецепторов прогестерона, витамина D и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы человека»**

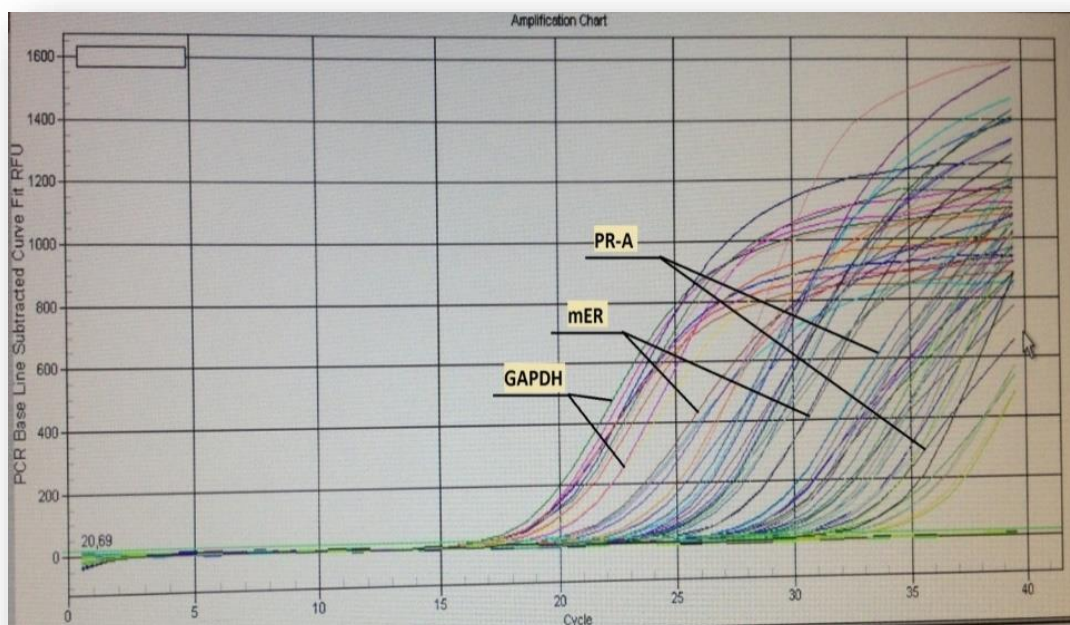
ГЕН	Нуклеотидная последовательность	
	up	low
<i>GAPDH</i>	gaaggtgaaggtcggagt	gaagatgggtgatgggatttcc
<i>mER</i>	agggacaagctgaggctgta	gtctacacggcactgctgaa
<i>ER<sub>α</sub></i>	tgccaaggagactcgctact	ctggcgcttgtgttcaac
<i>ER<sub>β</sub></i>	tcagcttgtgacctctgtgg	tgtatgacctgctgctggac
<i>mPR</i>	tgccctgctgtgtgatctta	gatagctgaggctcctggat
<i>PGRmC1</i>	aggtgttcgatgtgaccaaag	atcgactcatccttcagtgc
<i>PR-A</i>	aaatcattgccagggtttcg	tacagcatctgcccactgac
<i>PR-B</i>	gactgagctgaaggcaaagg	cgaaactccaggcaagggtgt
<i>VDR</i>	gca-gag-tgt-gca-ggc-gat-tcg	tga-agc-tcg-tgt-tcc-ccg-caa-t

**Примечание:** *GAPDH* – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, *mER* – мембранный эстрогеновый рецептор, *ER<sub>α</sub>*, *ER<sub>β</sub>* – ядерные эстрогеновые рецепторы, *mPR*, *PGRmC1* – мембранные прогестиновые рецепторы, *PR-A*, *PR-B* – ядерные прогестиновые рецепторы, *VDR* – ядерный рецептор витамина D.

В работе использована следующая программа: 1 цикл (10 мин 95<sup>0</sup>C), 2–40 циклы (15 мин 95<sup>0</sup>C), 41 цикл (01:00 мин - 60<sup>0</sup>C).

В качестве примера на рис.2.2 приведены графики амплификации кДНК тестируемых генов (iCycler iQ5 real-time PCR («BioRad», Германия) с SYBR Green I).

Один из примеров амплификации кДНК тестируемых генов - глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, мембранного рецептора эстрадиола, ядерного рецептора прогестерона PR-A

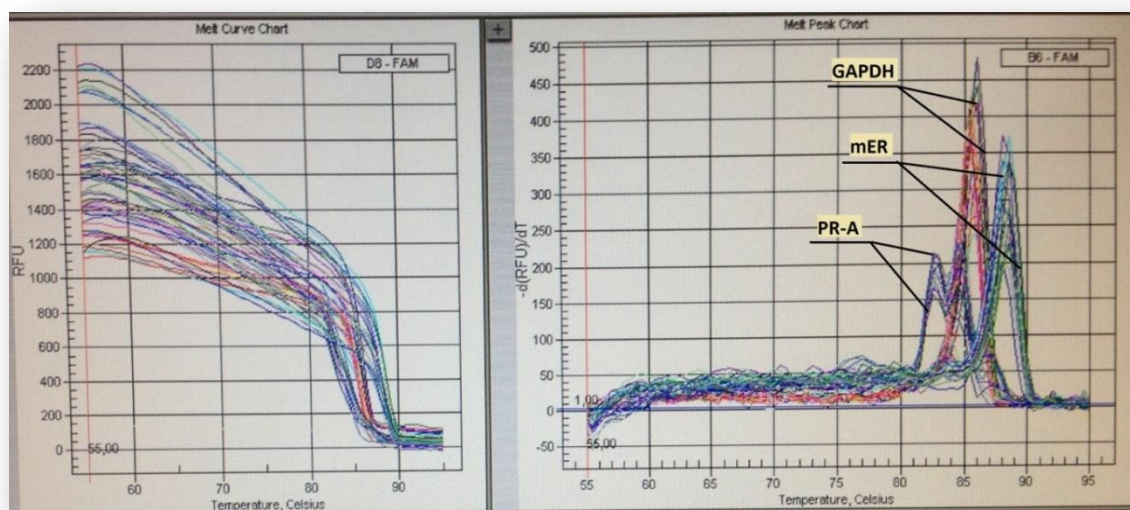


#### 2.3.2.4. Реакция плавления (Melt Curve)

Для оценки качества использованных праймеров и условий проведения амплификации в каждой серии экспериментов проводили рекомендованную для этих целей процедуру - реакцию плавления (Melt Curve). Для этого использовали рекомендованную схему анализа: 1 цикл (01:00 мин 95<sup>0</sup>C), 2 цикл (01:00 мин 55<sup>0</sup>C) 3–84 цикл (00:10 мин 55<sup>0</sup>C).

Примеры кривых плавления приведены на рис. 2.3.

**Примеры кривых плавления кДНК тестируемых генов глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, мембранного рецептора эстрадиола, ядерного рецептора прогестерона PR-A, необходимые для оценки качества продуктов амплификации**



Для «количественного определения уровней мРНК тестируемых генов применяли формулу  $0,5-\Delta Ct$  (для выявления достоверных различий между группами данных) и  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (для выяснения кратности различий), где  $\Delta Ct = Ct$  (искомого гена)  $- Ct(GAPDH)$  и  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (при 1 патологии)  $- \Delta Ct$  (при 2 патологии)» [4].

### **2.3.3. Анализ специфического связывания новых стероидных молекул со специфическими участками связывания МНФК**

а) Специфическое связывание  $^3H$ -P<sub>4</sub> с клетками МНФ периферической крови.

«Определение рецепторов прогестерона в мононуклеарной фракции клеток периферической крови проводили по» [23] методу Бассалык [25]. «Для определения общего связывания пробы содержали 20 мкМ  $^3H$ -P<sub>4</sub> и 1мМ гидрокортизона. Для определения неспецифического связывания пробы дополнительно содержали 3 мМ спиртовой раствор прогестерона. Этанол, после



раскапывания, испаряли в токе азота. Затем добавляли исследуемую фракцию крови и инкубировали 60 мин для определения связывания прогестерона [25], после чего по 100 мкл суспензии из каждой лунки помещали на стеклянные фильтры и промывали 100 кратным избытком ТЭД-буфера [25]. Стеклянный фильтр из каждой пробы помещали во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости для радиометрирования. Все исследования проводили в триплетах.

Связывание стероидных гормонов в МНФ выражали в фемтомолях гормона, связанного одним мг белка. Эту величину рассчитывали по формуле [27]:

$$N = (T - NSB) * K / (2.22 * A * C), \text{ где}$$

**N** – специфическое связывание (фмоль/мг белка аликвоты ткани);

**T** – средняя величина общего (в отсутствии конкурента) связывания меченого гормона в имп/мин., регистрируемых β-радиометром;

**NSB** – средняя величина неспецифического (в присутствии конкурента) связывания в аналогичной аликвоте в имп/мин., регистрируемых β-радиометром;

**K** – коэффициент, учитывающий разведение пробы суспензией угля и эффективность счета β-радиометра;

**2.22** – коэффициент пересчета из имп/мин, регистрируемых β-радиометром, в Кюри/мМ;

**A** – удельная радиоактивность 3H-стероида в Кюри/мМ;

**C** – концентрация белка в аликвоте в мг/мл» [25,27].

б) Относительно-связывающая активность синтетических гестагенов с МНФ клеток периферической крови.

Классическим методом определения рецепторного связывания лиганда с рецептором/клеткой является конкурентное ингибирование неспецифических участков связывания (гидрофобных зон белков и липидов мембран) избытком немеченого гормона. Для этого в лунки 96-луночного планшета раскапывали

образцы прегна-D'пентаранов до конечной концентрации 2 мкМ. Величину рецепторного связывания прогестерона рассчитывали по формуле согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [25].

#### **Формула расчета рецепторного связывания:**

**«И= (В спец. преп./В спец. горм.) \*100%, где**

*И* – ингибирование специфического связывания с рецептором <sup>3</sup>H-прогестерона препаратом;

*В спец. преп.* – специфическое связывание прогестерона в присутствии избытка пентарана;

*В спец. горм.* – специфическое связывание прогестерона в отсутствии избытка пентарана» [23, 25].

Регистрацию радиоактивной метки (<sup>3</sup>H-P<sub>4</sub>) осуществляли методом сцинтилляционной жидкостной радиометрии, используя сцинтилляционный альфа-бета радиометр «Tri-carb 3110» («PerkinElmer», США). Эффективность счета для дейтерия составила - 66%.

#### **2.3.4. Влияние новых синтетических гестагенов на транскрипционную активность мононуклеаров периферической крови человека**

Инкубацию клеток МНФ крови здоровых доноров с тестируемыми веществами (пентаранами) (табл. 2.1.) проводили в компактном СО<sub>2</sub> инкубаторе Midi 40 (Thermo Scientific, США), в среде DMEM («ПанЭко», Россия). Условия инкубации: 37<sup>0</sup>С, 5% СО<sub>2</sub>, 48 часов.

Выделение мРНК из клеток МНФК, инкубированных с синтетическими гестагенами (пентаранами) в разных концентрациях, синтез кДНК методом обратной транскрипции, РТ-ПЦР проведены в соответствии с методиками, описанными ранее в этой главе.

### 2.3.5. Статистический анализ результатов исследования

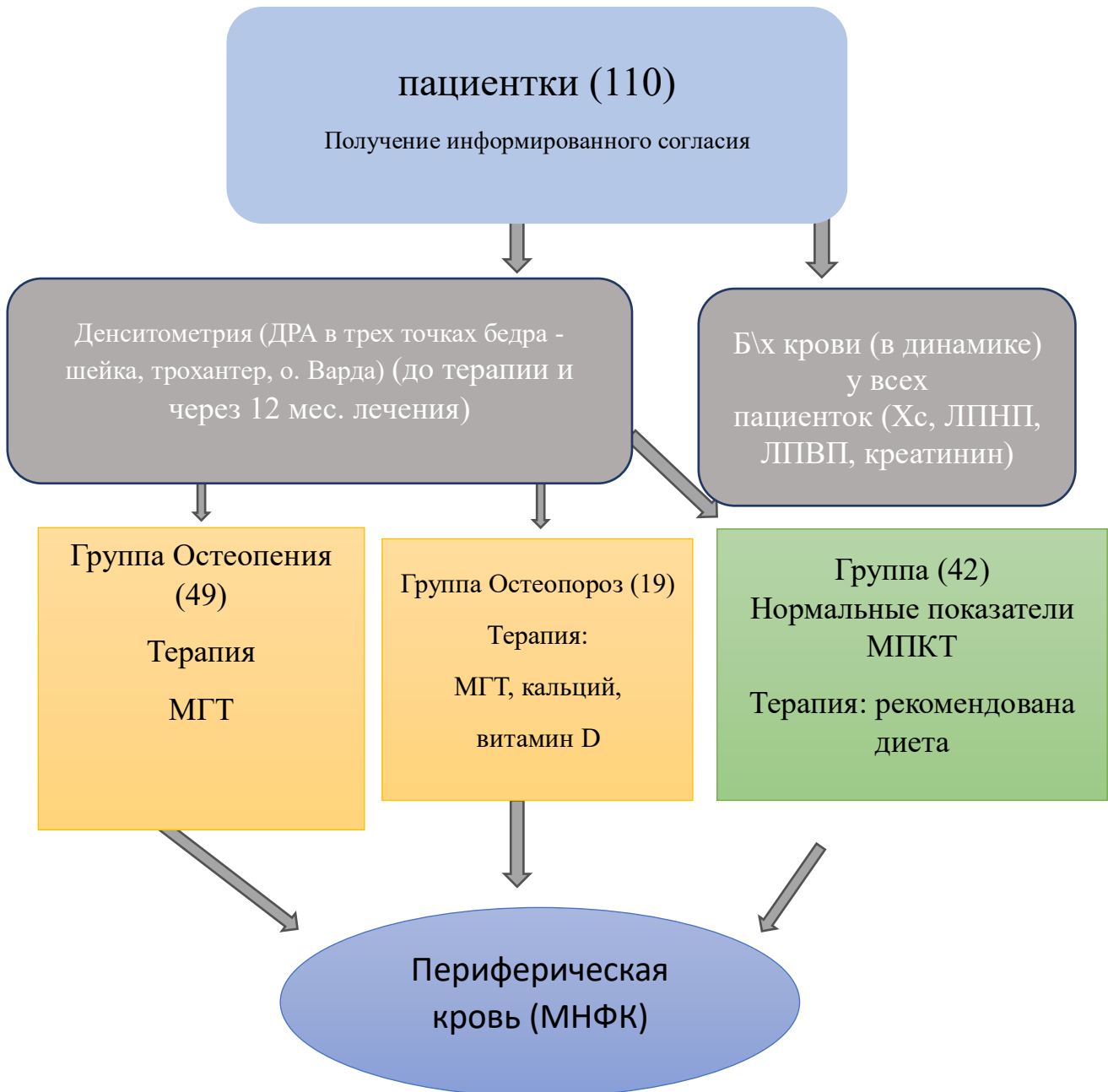
Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты подвергали статистической обработке с помощью программы GraphPadPrism 5.0. Для оценки нормальности распределения данных использовали критерии Колмогорова – Смирнова. При несоответствии выборки нормальному распределению использовали непараметрические методы статистики (критерии Манна-Уитни). Уровень достоверности (вероятность ошибки (p) не более 5%  $p \leq 0,05$ ).

Для выявления порогового значения предполагаемого маркера прогноза эффективности терапии использовали ROC-анализ в составе статистической программы GraphPadPrism 5.0 [40]. Выявленные маркеры характеризовали по чувствительности, специфичности и индексу Йодена. «Для этого использовали формулы:  $SENS (Se) = TP/(TP+FN)$ ;  $SPEC (Sp) = TN/(FP+TN)$ ;  $YDN (J) = \max (SENS + SPEC - 1)$ , где: SENS - чувствительность, SPEC - специфичность, YDN -индекс Йодена, TP - число истинно положительных (число положительных примеров, спрогнозированных как положительные), TN - число истинно отрицательных, FP – число ложно положительных, FN - число ложно отрицательных предсказаний» [6,40].

## 2.4. Синописис исследования

Схема 2.1.

### Распределение пациенток по группам



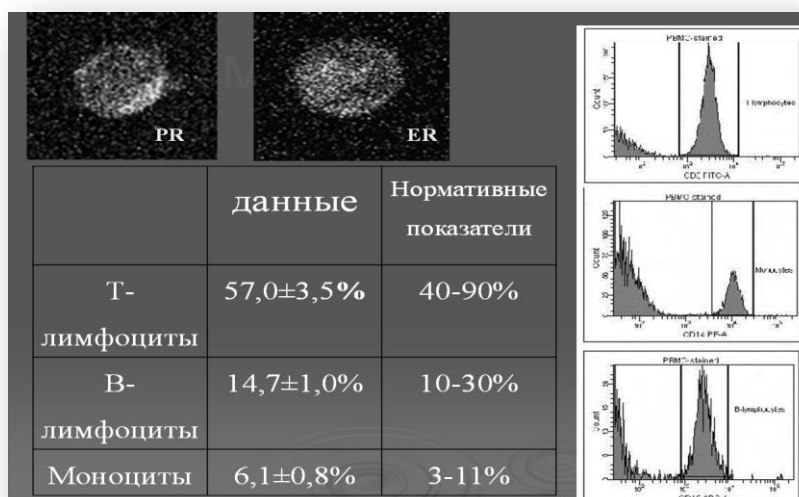


### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточный состав МНФК анализировали с помощью проточного цитофлуориметра сортировщика для анализа и высокоскоростной сортировки клеток «BD FACSAria™ SORP» («Becton Dickinson», США). Пример проведенного исследования представлен на рис.3.1.

Рисунок 3.1.

Пример количественного состава МНФК у пациенток с хирургической менопаузой



**3.1. Определение уровня мРНК генов рецепторов эстрадиола ( $mER$ ,  $ER_{\alpha}$ ,  $ER_{\beta}$ ) и прогестерона ( $PGRmC1$ ,  $mPR$ ,  $PR-A$ ,  $PR-B$ ), витамина D ( $VDR$ ) в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой методом РТ-ПЦР до старта МГТ.**

В проспективное исследование, проведенное на клинической базе ГБУЗ МО МОНИИАГ, были включены 110 пациенток (возраст 39–54 года) после хирургической овариоэктомии (постменопауза от 1 до 6 лет).

В зависимости от минеральной плотности костной ткани (ДРА) включенные в исследование женщины (n=110) были распределены по двум группам: 1 (основная) группа, в которую вошли 68 пациенток с нарушением костно – минерального обмена: из них 49 женщин с остеопенией и 19 с остеопорозом; 2

группа (контрольная) – включала 42 женщины с показателями МПКТ соответствующими физиологическим параметрам пациенток данной возрастной группы. Пациентки обеих групп по наличию антропометрических показателей и соматической патологии достоверно не различались. Общая характеристика исследуемых групп представлена в таблице 3.1.

**Таблица 3.1.**  
**Общая характеристика исследуемых групп**

Параметр	Основная группа (n=68 49 остеопения + 19 остеопороз)	Контрольная группа (n=42)
Возраст	53±0,2	54,1±0,4
Вес, кг	69,7±1,3	76,9±1,1
Рост, см	164,3±13,1	166,7±13,2
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	25,6±4,9	27,6±2,1

Таблица 3.2.

**Уровень мРНК генов стероидных рецепторов и вит. D в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с остеопеническим синдромом ( $0,5^{\Delta Ct} * 100$  относительно глицеральдегидфосфатдегидрогеназы).**

Рецептор	Параметр	Без патологии (n=42)	Остеопения (n=49)	Остеопороз (n=19)
<b>VDR</b>	M ± Std.Err	0,09±0,04	0,12±0,03	0,01±0,01
	Std.dev	0,08	0,07	0,01
	Min	0,03	0,02	0,001
	25% per	0,03	0,04	0,002
	Med	0,07	0,08	0,01
	75% per	0,2	0,2	0,02
<b>mER</b>	M ± Std.Err	0,03±0,01	0,1±0,02	0,04±0,01
	Std.dev	0,01	0,04	0,03
	Min	0,01	0,02	0,01
	25% per	0,02	0,04	0,02
	Med	0,04	0,07	0,04
	75% per	0,04	0,11	0,1
	Max	0,04	0,12	0,08
<b>ER<math>\alpha</math></b>	M ± Std.Err	0,1±0,02	0,3±0,02	0,01±0,01
	Std.dev	0,04	0,1	0,02
	Min	0,1	0,0002	0,0001



	25% per	0,1	0,002	0,001
	Med	0,1	0,1	0,01
	75% per	0,13	0,12	0,01
	Max	0,13	0,2	0,1
<b><i>ER<sub>β</sub></i></b>	M ± Std.Err	0,12±0,03	0,2±0,1	0,12±0,1
	Std.dev	0,1	0,14	0,14
	Min	0,1	0,02	0,03
	25% per	0,01	0,12	0,04
	Med	0,11	0,12	0,06
	75% per	0,16	0,32	0,10
	Max	0,17	0,46	0,44
<b><i>mPR</i></b>	M ± Std.Err	0,02±0,01	0,02±0,003	0,01±0,004
	Std.dev	0,02	0,01	0,01
	Min	0,01	0,01	0,001
	25% per	0,01	0,01	0,001
	Med	0,02	0,02	0,02
	75% per	0,04	0,03	0,03
	Max	0,05	0,03	0,03
<b><i>PGRmCI</i></b>	M ± Std.Err	0,06±0,02	0,06±0,011	0,03±0,01
	Std.dev	0,04	0,02	0,02
	Min	0,03	0,02	0,002
	25% per	0,03	0,03	0,01

	Med	0,04	0,06	0,03
	75% per	0,1	0,1	0,04
	Max	0,1	0,06	0,04
<b>PR-A</b>	M ± Std.Err	0,2±0,04	0,2±0,04	0,03±0,02
	Std.dev	0,1	0,11	0,03
	Min	0,1	0,1	0,003
	25% per	0,1	0,12	0,01
	Med	0,2	0,2	0,04
	75% per	0,2	0,3	0,1
	Max	0,3	0,4	0,1
<b>PR-B</b>	M ± Std.Err	0,01±0,002	0,01±0,004	0,01±0,003
	Std.dev	0,003	0,01	0,01
	Min	0,004	0,002	0,001
	25% per	0,004	0,01	0,001
	Med	0,01	0,01	0,006
	75% per	0,01	0,02	0,02
	Max	0,01	0,03	0,02

*Примечание: Полученные показатели представлены в виде  $M \pm SE (*100)$ , где  $Me$  – среднее, а  $SE$  - стандартная ошибка.*

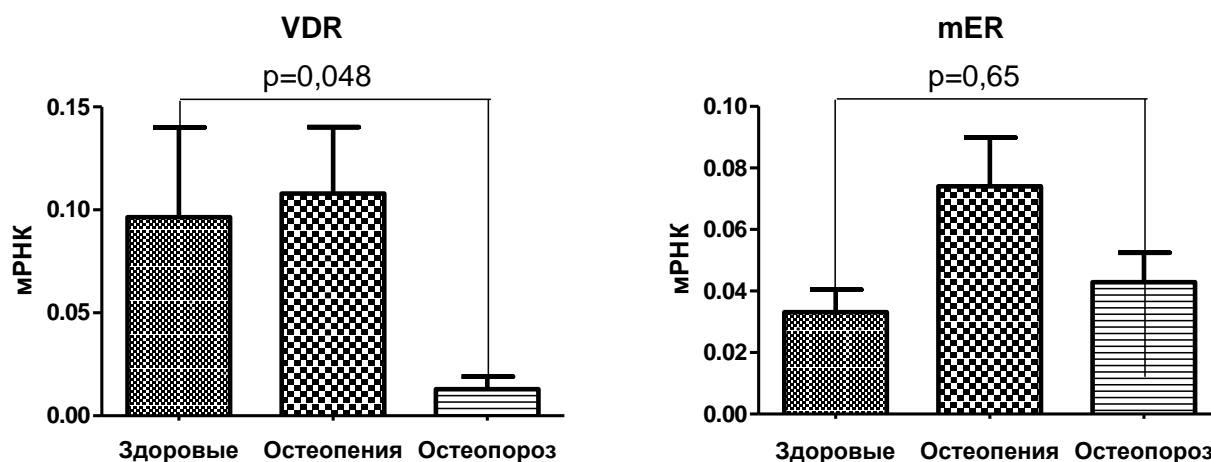
Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ GraphPad Prism 5.0. Количественные и порядковые данные обработаны методами описательной статистики и представлены в виде медианы ( $Me$ ) и диапазона между «нижним» ( $LQ$ , 25 перцентиль) и «верхним» ( $UQ$ , 75 перцентиль)

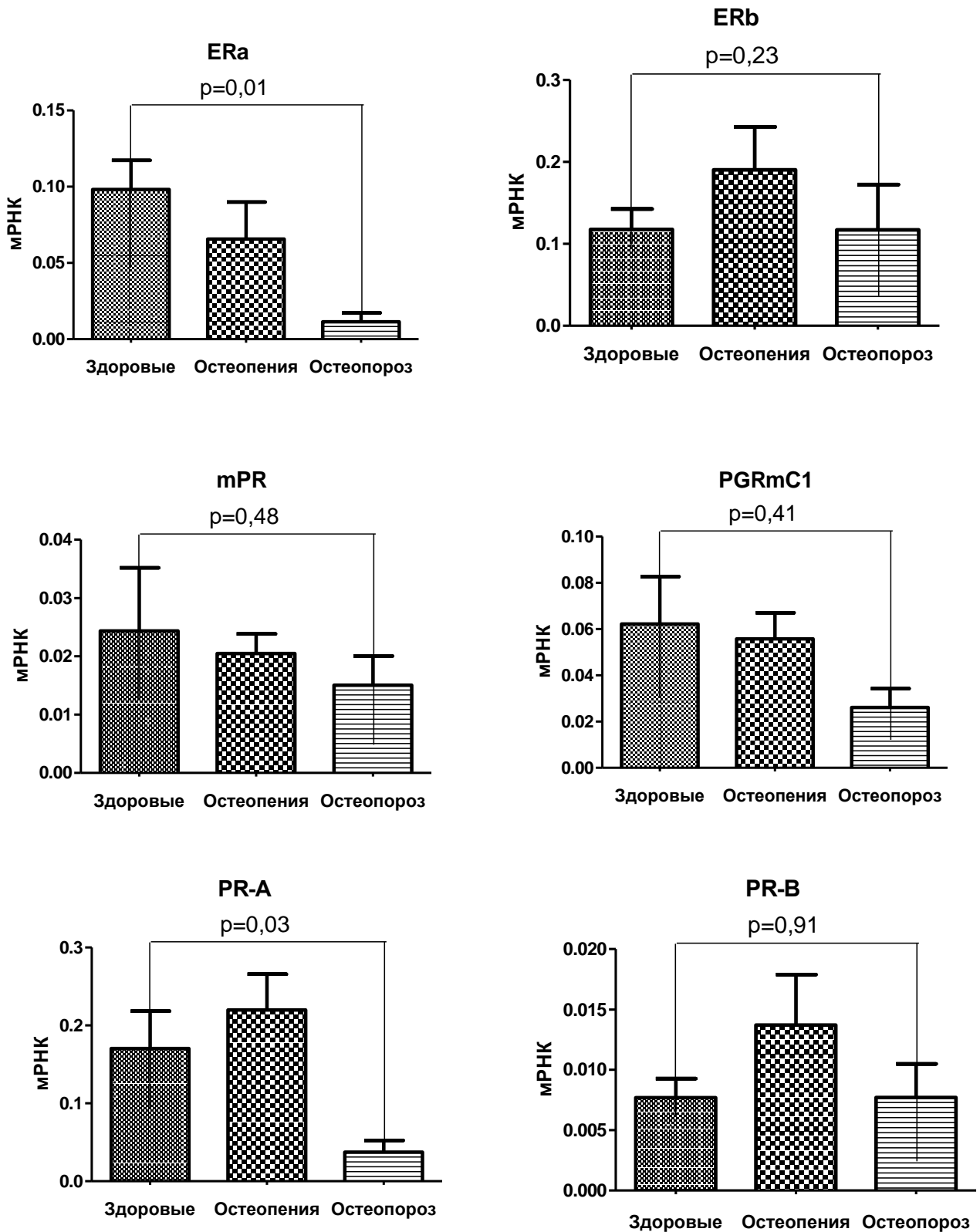
квартилями. При оценке соответствия полученных данных нормальному распределению критерий Колмогорова-Смирнова оказался меньше 0,05 (а именно  $P \leq 0,0001$ ), следовательно, данная выборка не соответствует распределению Гаусса. Поэтому для статистического анализа использованы непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни).

Полученные данные продемонстрировали статистически достоверные различия в уровне мРНК трех рецепторов (витамина D, эстрадиола  $ER_{\alpha}$  и прогестерона  $PR-A$ ) в МНФК у пациенток с нарушенными параметрами костно-минерального обмена относительно данных параметров у пациенток группы «Здоровые» (диаграмма 3.1).

Диаграмма 3.1.

Уровень экспрессии стероидных рецепторов и вит. D в клетках МНФК у пациенток с хирургической менопаузой





*Подписи к диаграмме: p – уровень достоверности (критерий Манна-Уитни);*

*MPHK – экспрессия тестируемого гена по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы ( $0,5^{\Delta Ct} * 100$ ).*

У пациенток с остеопеническим синдром выявлена значительный разброс показателей мРНК стероидных рецепторов в мононуклеарах периферической крови по сравнению с пациентками с группой «Здоровые». В частности, концентрация мРНК рецептора витамина D (*VDR*), эстрадиола (*ER $\alpha$* ) и прогестерона (*PR-A*) в мононуклеарах у пациенток с остеопеническим синдромом – в 7–30 раз ( $p \leq 0,05$ ) меньше, чем у женщин в контрольной группе (с нормальными показателями МПКТ).

Полученные данные выявили у пациенток с хирургической менопаузой в группе остеопороз наибольшее снижение экспрессии рецептора эстрадиола *ER $\alpha$* . *ER $\alpha$*  – основной тип рецепторов эстрадиола в моноцитах/макрофагах и Т-хелперах.

Эффект половых стероидов на иммунокомпетентные клетки в целом заключается в противовоспалительном действии. Экспрессия рецепторов стероидных гормонов в МНФК тесно и положительно коррелирует с выраженностью сдвигов параметров костно-минерального обмена у пациенток с остеопеническим синдромом. Выявленный факт убедительно демонстрирует непосредственное участие дефицита половых гормонов (плотности рецепторов) в патогенезе постменопаузального остеопороза.

### **3.2. Эффективность менопаузальной гормональной терапии в отношении костно – минерального и липидного обмена у пациенток с хирургической менопаузой.**

#### **3.2.1. МПКТ**

Комбинированные эстроген-гестагенные препараты повсеместно используются для лечения менопаузальных расстройств (в том числе после хирургической операции – овариоэктомии). Гормональная терапия доказала высокую эффективность в уменьшении количества переломов у пациенток с остеопеническим синдромом.

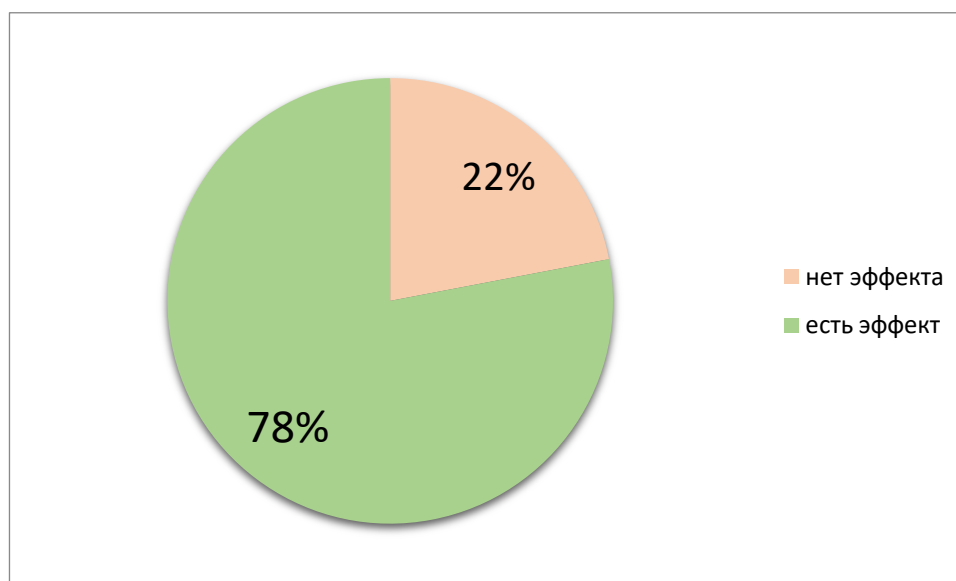
Основными методами оценки ответа на лечение ОС являются последовательное измерение МПКТ или биохимических маркеров костно-минерального обмена. Но не все пациенты отвечают на терапию и определить

количественно данных пациентов трудно. Клинические испытания показывают продолжающуюся потерю костной массы у 15% женщин на фоне приема МГТ. Причинами неэффективности лечения могут быть: не соблюдение рекомендаций врача, недостаточность витамина D, низкое потребление  $\text{Ca}^{2+}$  с пищей [80], а также индивидуальная чувствительность к гормонотерапии. Для повышения эффективности/профилактики остеопороза является актуальным поиск маркеров прогноза эффективности среди выбранных препаратов.

Далее всех пациенток с выявленным нарушением костно-минерального обмена ( $n=68$ ) распределили на две терапевтические подгруппы. 1 подгруппа ( $n=19$ ) – пациентки получали системную МГТ, в соответствии с текущими клиническими рекомендациями, пациентки 2 подгруппы ( $n=49$ ) – получали системную МГТ (дидрогестерон + эстрадиол-17 бета) в комбинации с препаратами  $\text{Ca}^{++}$  и вит. D. Пациентки были разбиты на две группы: отвечающие на терапию (есть эффект МГТ на МПКТ) и не отвечающие на терапию (нет эффекта МГТ на МПКТ) (Диag. 3.2.)

### Диaгpамма 3.2.

#### Распределение эффективности терапии среди пациенток основной группы ( $n=68$ )



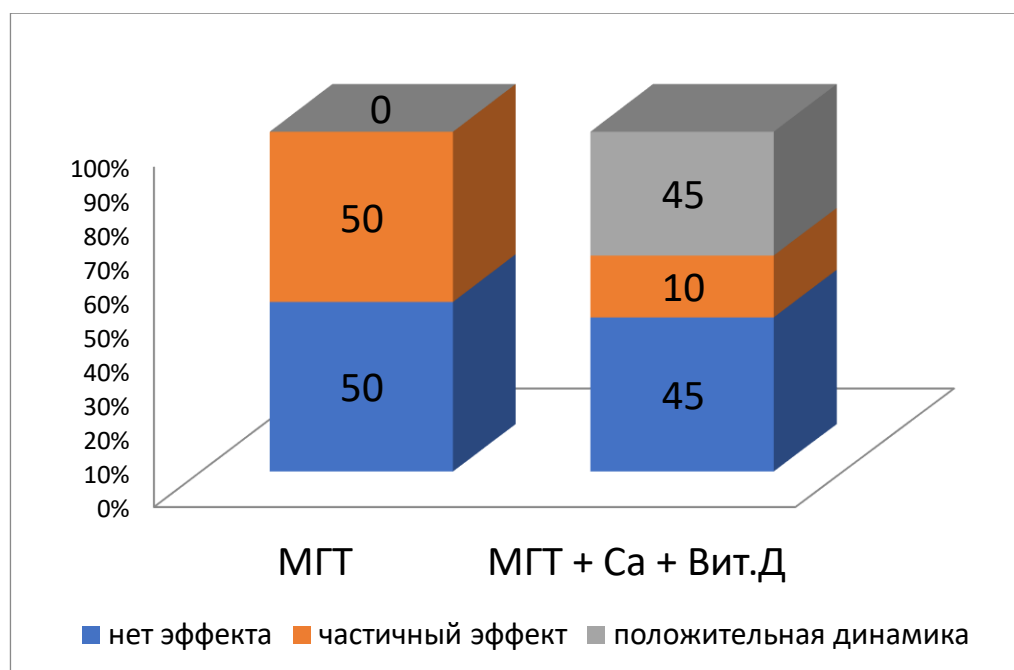
*Примечание:*  $n$  – количество пациенток, «есть эффект» - положительная динамика параметров костно – минерального обмена (денситометрия) на фоне

*гормональной терапии, «нет эффекта» - отсутствие положительной динамики параметров костно – минерального обмена на фоне МГТ*

МГТ – эстроген – гестагенный препарат (эстрадиол 1 мг + дидрогестерон 5 мг) подбирали индивидуально согласно клиническим рекомендациям Минздрава России «Менопауза и климактерическое состояние у женщины» 2021 г. Пациенткам 2-й группы были дополнительно назначены препараты кальция (кальция карбонат 1250 мг, колекальцеферол 400 МЕ 2 таблетки в сутки) и препарат витамина D (колекальциферол 1000 МЕ). Эффективность терапии оценивали по данным МПКТ через 12 месяцев после старта терапии. Пациентки были разбиты на две группы: отвечающие на терапию и не отвечающие на терапию. (Диаг. 3.3.)

### Диаграмма 3.3.

**Эффективность гормональной терапии и комбинации гормональной терапии с препаратами кальция и витамина D (12 месяцев, по параметрам костно – минерального обмена) у пациенток с хирургической менопаузой**



**Примечание:** МГТ – системная менопаузальная гормональная терапия, включавшая эстрадиол + дидрогестерон. «Нет эффекта» - доля пациенток с отсутствием изменений показателей МПКТ (ДРА). «Частичный эффект» - доля пациенток с положительной динамикой в одной из трех точек контроля МПКТ (шейка бедра, трохантер, область Варда). «Положительная динамика» – доля пациенток, у которых прирост МПКТ более 4% в первый год терапии по всем контрольным точкам.

Добавление к системной МГТ препаратов кальция и вит. D характеризовалось более выраженным эффектом на параметры костно-минерального обмена у пациенток с хирургической менопаузой. Данный результат может быть связан с исходно низким уровнем показателей ДРА у данных пациенток (ОС на фоне гипоавитаминоза D), и плейотропным действием витамина D.

Представленные данные на диаг. 3.3. убедительно свидетельствуют, что подобранная в соответствии с текущими клиническими рекомендациями терапевтическая схема эффективна всего лишь у 50% пациенток. Данные по эффективности совпадают со сведениями из литературных источников [63, 111].

### **3.2.2. Липидный обмен**

Нарушение липидного обмена приводит к повышенному риску развития метаболического синдрома, включая центральное ожирение, резистентность к инсулину, дислипидемию, гипертонию и другие сердечно-сосудистые заболевания. Системная гормональная терапия через полгода после старта ее применения вызывает снижение уровня атерогенных липопротеидов и повышение – антиатерогенных. Под действием эстрогенного компонента МГТ нормализуются параметры не только липидного, но и углеводного обменов [61].

Пациентки основной группы (n=68) были также разбиты на 2 группы: положительное и отрицательное влияние МГТ на липидный обмен (диаг. 3.4.).



**Диаграмма 3.4.****Влияние системной гормональной терапии у пациенток после хирургической менопаузы на параметры липидного обмена, n=68**

*Примечание: n – количество пациенток: «положительное влияние» - положительная динамика на параметры липидного обмена на фоне гормональной терапии, «отрицательное влияние» - отсутствие положительной динамики параметров липидного обмена на фоне МГТ*

Из диаграммы 3.4. видно, что использованная стандартная терапевтическая схема оказалась неэффективной в 26% случаев. Это позволило в результате сравнительного анализа стероидно-рецепторного транскриптома МНФК у пациенток после овариоэктомии выявить маркеры прогноза эффективности лечения.

### **3.3. Оценка стероидно-рецепторного транскриптома и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на костно – минеральный и липидный обмен.**

Достаточное число пациенток, не отвечающих на терапию во всех исследованных подгруппах, обеспечило возможность поиска маркеров прогноза

эффективности фармакотерапии. Для этого проведен сравнительный анализ стероидно-рецепторного транскриптома МНФК до старта терапии с эффективностью лечения (табл. 3.3).

**Таблица 3.3.**

**Экспрессия стероидно-рецепторного транскриптома клеток МНФК пациенток с остеопеническим синдромом и разным ответом костно-минерального обмена на МГТ ( $0,5^{\Delta}Ct*100$  по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы)**

Рецептор	Параметр	Нет эффекта (n=15)	Есть эффект (n=53)
<b>VDR</b>	M ± Std.Err	0,03±0,01	0,12±0,04
	Std.dev	0,03	0,12
	Min	0,001	0,001
	25% per	0,002	0,01
	Med	0,02	0,1
	75% per	0,05	0,23
	Max	0,1	0,3
<b>mER</b>	M ± Std.Err	0,03±0,01	0,07±0,01
	Std.dev	0,01	0,04
	Min	0,02	0,01
	25% per	0,02	0,05
	Med	0,04	0,07
	75% per	0,04	0,10
	Max	0,05	0,14
<b>ER<math>\alpha</math></b>	M ± Std.Err	0,05±0,03	0,05±0,02

	Std.dev	0,06	0,06
	Min	0,0005	0,0002
	25% per	0,004	0,003
	Med	0,012	0,03
	75% per	0,11	0,06
	Max	0,13	0,19
<b><i>ER<sub>β</sub></i></b>	M ± Std.Err	0,07±0,02	0,24±0,06
	Std.dev	0,04	0,16
	Min	0,02	0,06
	25% per	0,03	0,11
	Med	0,08	0,17
	75% per	0,11	0,42
	Max	0,12	0,46
<b><i>mPR</i></b>	M ± Std.Err	0,01	0,02
	Std.dev	0,01± 0,005	0,01±0,004
	Min	0,0012	0,0007
	25% per	0,0015	0,013
	Med	0,01	0,02
	75% per	0,02	0,03
	Max	0,02	0,04
<b><i>PGRmCI</i></b>	M ± Std.Err	0,03±0,02	0,06±0,02
	Std.dev	0,03	0,06

	Min	0,002	0,0008
	25% per	0,007	0,010
	Med	0,02	0,05
	75% per	0,06	0,07
	Max	0,09	0,18
<b><i>PR-A</i></b>	M ± Std.Err	0,09±0,04	0,18±0,06
	Std.dev	0,08	0,20
	Min	0,014	0,0003
	25% per	0,023	0,02
	Med	0,09	0,12
	75% per	0,17	0,31
	Max	0,18	0,63
<b><i>PR-B</i></b>	M ± Std.Err	0,004±0,001	0,02±0,003
	Std.dev	0,003	0,01
	Min	0,001	0,005
	25% per	0,002	0,008
	Med	0,006	0,02
	75% per	0,007	0,02
	Max	0,007	0,03

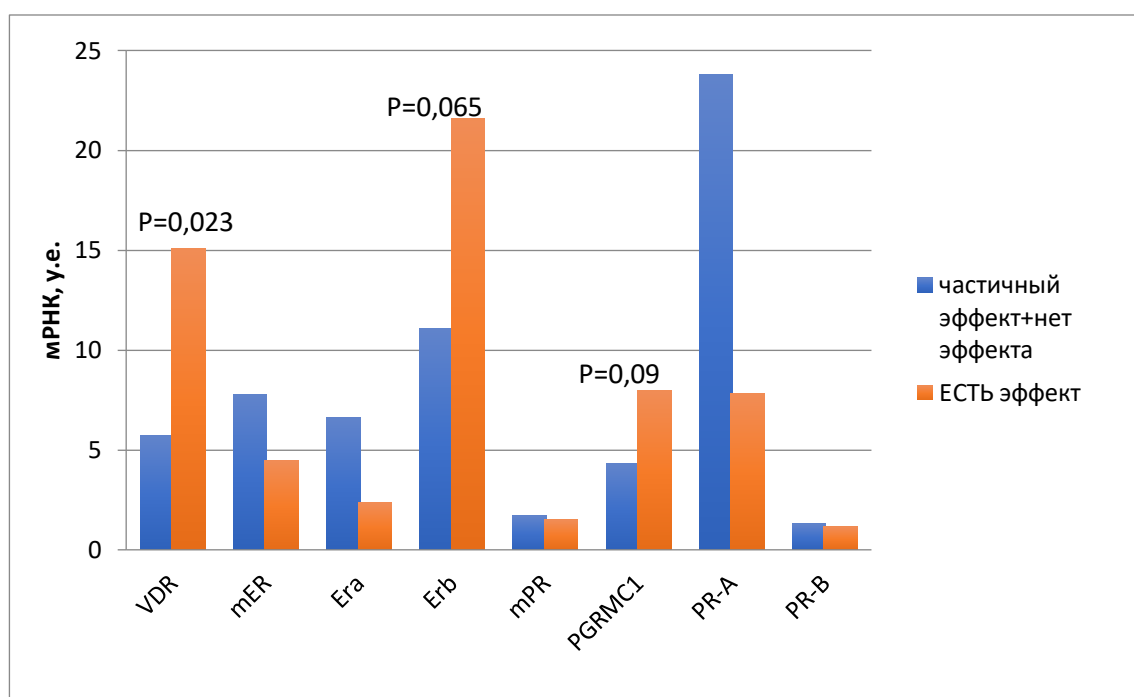
При оценке соответствия полученных данных нормальному распределению критерий Колмогорова-Смирнова оказался меньше 0,05 (а именно  $P \leq 0,0001$ ), следовательно, данная выборка не соответствует распределению Гаусса. Поэтому

для статистического анализа использованы непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни).

Данные сравнительного анализа уровня мРНК стероидных рецепторов в мононуклеарах крови у женщин с остеопеническим синдромом в зависимости от эффективности МГТ представлены на диаг.3.5.

**Диаграмма 3.5.**

**Уровень мРНК стероидных рецепторов и вит. D в клетках МНФК до лечения и эффективность терапии в отношении костно-минерального обмена у женщин после овариэктомии**



*Подписи к диаграмме: p – уровень достоверности (критерий Манна-Уитни);*

*мРНК – экспрессия тестируемого гена по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы ( $0,5^{\Delta Ct} * 100$ ).*

Положительный эффект системной МГТ на показатели костно-минерального обмена у пациенток с хирургической менопаузой тесно ассоциирован с уровнем мРНК витамина D (VDR) в клетках мононуклеаров периферической крови. Таким образом, количество мРНК витамина D в МНФК может служить потенциальным критерием оценки прогноза эффективности МГТ нарушений костно-минерального обмена у женщин после хирургического удаления яичников. У пациенток,

положительно отвечающих на гормональную терапию отмечена тенденцию к повышению концентрации мРНК рецептора эстрадиола типа бета и рецептора прогестерона - *PGRmC1* до начала лечения (не достигнута достоверность,  $p=0,065$  и  $p=0,09$ ). Увеличение выборки, вероятно, позволит достигнуть статистической достоверности, однако уже из представленных данных видно, что наибольшей информативной значимостью обладает именно экспрессия витамина D. Таким образом, становится возможным персонализированный подход в подборе терапии для конкретного пациента, что позволит повысить эффективность лечения. В литературных источниках сведений об аналогичных исследованиях отсутствует.

Показатели кальций-фосфорного обмена улучшились у большинства пациенток при использовании моно- и комбинированной МГТ. Выбранные режимы МГТ могут значительно уменьшить костную резорбцию у пациенток после хирургической менопаузы. Все пациентки отметили хорошую переносимость МГТ, и в дальнейшем все женщины продолжили данное лечение, что говорит об абсолютной приемлемости терапии в нашем исследовании.

Кратное снижение чувствительности клеток-мишеней к гормонам, по-видимому, объясняет отсутствие клинического эффекта препаратов МГТ. Выявленный факт можно использовать в качестве фактора прогноза чувствительности пациенток к МГТ, особенно у пациенток с дополнительными факторами риска остеопении. Это актуально потому, что эффект от МГТ развивается не сразу, и пациентка, при отсутствии терапевтического эффекта, упускает в среднем полгода для старта более эффективной для нее терапии (например, бисфосфонаты). Утраченная возможность раннего старта в случае с костно-минерального обмена имеет принципиальное значение, так как вовремя начатое лечение значительно эффективнее.

Кроме того, известно, что сами стероидные гормоны (особенно натуральные эстрогены) способны стимулировать экспрессию стероидных рецепторов в клетках, потому у пациенток первоначально со сниженным уровнем рецепторов возможно проявление отсроченного эффекта. Ограничением нашего исследования

является использование одной точки контроля – до старта терапии. Дальнейшее изучение влияния препаратов МГТ на динамику чувствительности клеточных мишеней на гормоны позволит получить более полную картину эндокринного контроля важнейшего физиологического аспекта жизни человека – костно-минерального обмена.

В табл.3.4. представлены параметры описательной статистики результатов анализа стероидно-рецепторного транскриптома МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на липидный обмен.

**Таблица 3.4.**

**Экспрессия генов рецепторов стероидных гормонов и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от эффекта МГТ на липидный обмен ( $0,5^{\Delta Ct} * 100$  по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы)**

<b>Ген</b>	<b>Параметр</b>	<b>Отрицательное влияние на липидный обмен (n=18)</b>	<b>Положительное влияние на липидный обмен (n=50)</b>
<b>VDR</b>	M ± Std.Err	0,1±0,03	0,02±0,01
	Std.dev	0,1	0,03
	Min	0,0001	0,001
	25% per	0,02	0,001
	Med	0,04	0,003
	75% per	0,2	0,03
	Max	0,3	0,1
<b>mER</b>	M ± Std.Err	0,06±0,01	0,05±0,01

	Std.dev	0,03	0,03
	Min	0,02	0,01
	25% per	0,03	0,02
	Med	0,05	0,04
	75% per	0,09	0,07
	Max	0,09	0,11
<b><i>ER<sub>α</sub></i></b>	M ± Std.Err	0,004±0,004	0,07±0,03
	Std.dev	0,006	0,07
	Min	0,0002	0,01
	25% per	0,0002	0,01
	Med	0,0005	0,05
	75% per	0,011	0,12
	Max	0,011	0,2
<b><i>ER<sub>β</sub></i></b>	M ± Std.Err	0,06±0,004	0,19±0,05
	Std.dev	0,007	0,14
	Min	0,05	0,08
	25% per	0,05	0,10
	Med	0,06	0,12
	75% per	0,06	0,32
	Max	0,06	0,44
<b><i>mPR</i></b>	M ± Std.Err	0,015±0,008	0,02±0,005
	Std.dev	0,02	0,01



	Min	0,001	0,0007
	25% per	0,001	0,01
	Med	0,01	0,02
	75% per	0,03	0,02
	Max	0,03	0,04
<b><i>PGRmC1</i></b>	M ± Std.Err	0,03±0,02	0,06±0,03
	Std.dev	0,04	0,07
	Min	0,002	0,0008
	25% per	0,002	0,02
	Med	0,01	0,04
	75% per	0,08	0,09
	Max	0,09	0,19
<b><i>PR-A</i></b>	M ± Std.Err	0,19±0,15	0,14±0,05
	Std.dev	0,29	0,13
	Min	0,0003	0,003
	25% per	0,004	0,03
	Med	0,08	0,12
	75% per	0,51	0,19
	Max	0,63	0,41
<b><i>PR-B</i></b>	M ± Std.Err	0,01±0,007	0,01±0,003
	Std.dev	0,015	0,007
	Min	0,001	0,001

	25% per	0,001	0,006
	Med	0,004	0,012
	75% per	0,03	0,02
	Max	0,03	0,02

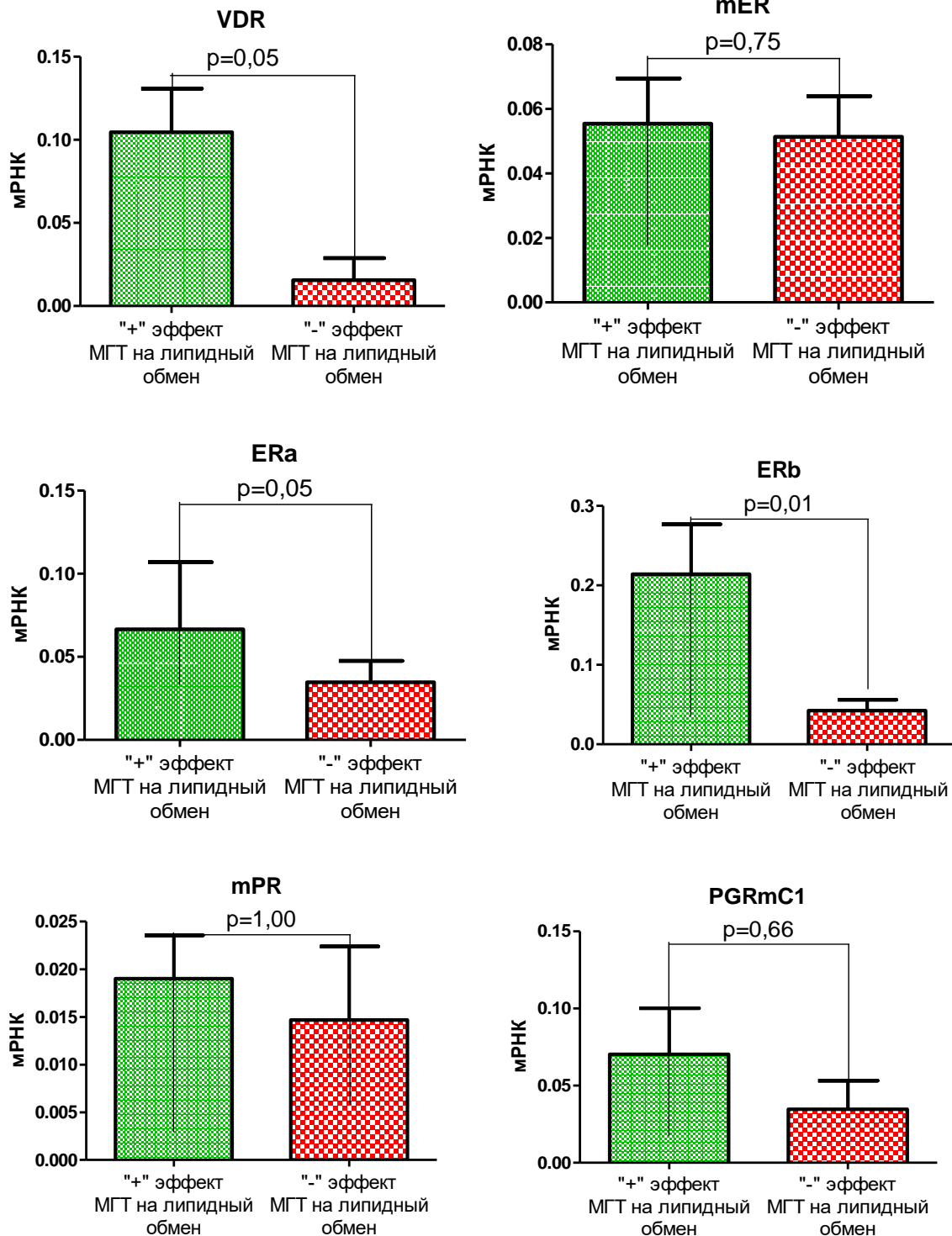
*Примечание: показатели представлены в виде  $M \pm SE (*100)$ , где Me – среднее, а SE - стандартная ошибка.*

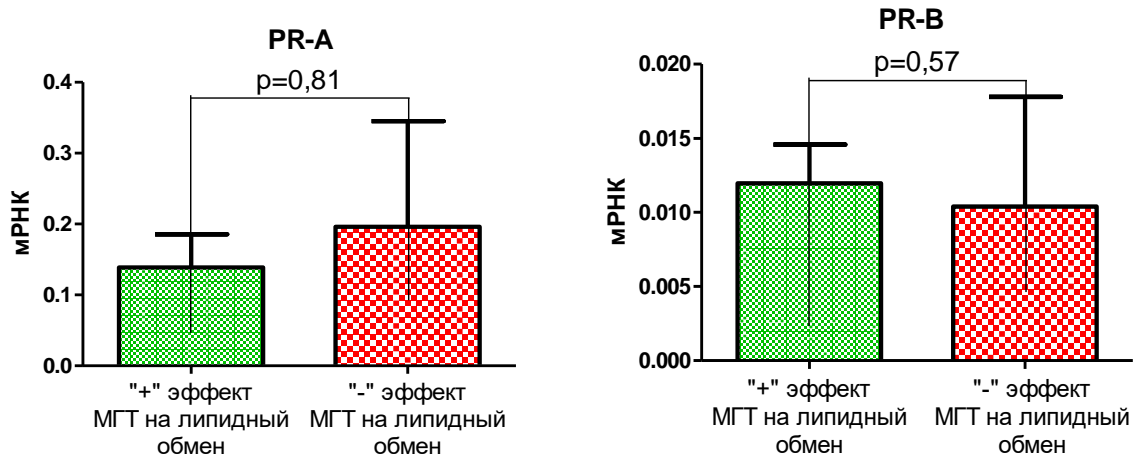
Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ GraphPad Prism 5.0. Количественные и порядковые данные обработаны методами описательной статистики и представлены в виде медианы (Me) и диапазона между «нижним» (LQ, 25 перцентиль) и «верхним» (UQ, 75 перцентиль) кватрилями. При оценке соответствия полученных данных нормальному распределению критерий Колмогорова-Смирнова оказался меньше 0,05 (а именно  $P \leq 0,0001$ ), следовательно, данная выборка не соответствует распределению Гаусса. Поэтому для статистического анализа использованы непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни).

Результаты сравнения относительного стероидно-рецепторного транскриптома МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на липидный обмен представлены на диаг. 3.6.

### Диаграмма 3.6.

Уровни экспрессии генов эстрадиола, прогестерона и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на липидный обмен





*Подписи к диаграмме: p – уровень достоверности (критерий Манна-Уитни); mRNA – экспрессия тестируемого гена по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы ( $0,5^{\Delta Ct} * 100$ ).*

Оценка экспрессии генов рецепторов эстрогена, прогестерона и витамина D в МНФК выявил большой уровень mRNA ( $ER_{\beta}$ ), а также тенденцию к увеличению  $ER_{\alpha}$  и  $VDR$  в группе пациенток с положительным эффектом МГТ на липидный обмен по сравнению с группой «отрицательный эффект».

Эффективность профилактики дислипидемии у пациенток с хирургической менопаузой положительно связан с уровнем экспрессии  $ER_{\beta}$  в мононуклеарах периферической крови: у пациенток с «положительным эффектом» МГТ на липидный обмен выявлен повышенный уровень mRNA  $ER_{\beta}$  в 3 раза ( $p=0,01$ ) по сравнению с пациентками, не ответившими на терапию.

### **3.4. Оценка параметров качества потенциальных маркеров прогноза эффективности применения МГТ (МПКТ, липидный обмен) у пациенток с хирургической менопаузой.**

Receiver Operator Characteristic (ROC - анализ) – это классический алгоритм для классификации и определения предсказательной способности теста [40,77]. ROC – кривая «показывает зависимость количества верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных

отрицательных примеров. Оценка надежности выражается в показателях чувствительности (sensitivity, Se) и специфичности (specificity, Sp). Сравнение двух и более тестов проводится с учетом площади под кривыми (AUC). С допущениями можно считать, что чем ближе показатель AUC к 1,0, тем лучшей прогностической силой обладает модель. Экспертная шкала для значений AUC с помощью которой можно судить о качестве модели: 0,9–1,0 - отличное, 0,8–0,9 - очень хорошее, 0,7–0,8 - хорошее, 0,6–0,7 - среднее, 0,5–0,6 – неудовлетворительное» [3,6,40,77].

Для характеристики (чувствительности и специфичности) найденных маркеров был использован ROC – анализ.

Характеристика маркера  $VDR$  – прогноз эффективности МГТ в отношении костно – минерального обмена:

*Специфичность – 88%*

*Чувствительность – 67%*

*AUC = 0,81*

Характеристика маркера  $ER_{\beta}$  – прогноз эффективности МГТ в отношении липидного обмена:

*Специфичность – 67%*

*Чувствительность – 100%*

*AUC = 0,88*

Из полученных данных становится очевидным, что маркеры ( $VDR$  и  $ER_{\beta}$ ) являются очень хорошими классификаторами.

### 3.5. Проанализировать возможное влияние функционального состояния почек (креатинин, мочеви́на, белок) пациенток на эффективность МГТ.

Для исключения вмешательств фармакокинетических межличностных вариаций уровня гормонов в плазме крови в работе оценена возможная связь эффективности терапии с функциональной активностью органов элиминации. У пациенток, включенных в исследование, патологии печени не было, поэтому проведен анализ возможного влияния работы почек на эффективность МГТ.

В основной группе пациенток с нарушением костно-минерального обмена (n=68) был проведен анализ влияния функционального состояния почек (креатинин, мочеви́на, белок) на эффективность менопаузальной гормональной терапии. (табл.3.5.)

**Таблица 3.5.**

**Вероятность различий между показателями функциональной активности почек (уровень креатинина, мочеви́ны и белка) у пациенток в группах с положительной динамикой параметров костно-минерального и липидного обмена на фоне гормональной терапии (n=68)**

Параметр		Р, Манна-Уитни
МПКТ	Креатинин	0,33
	Мочевина	0,88
	Белок	0,11
ЛПНП	Креатинин	0,61
	Мочевина	1,00
	Белок	0,23

**Примечание:** n – количество пациенток

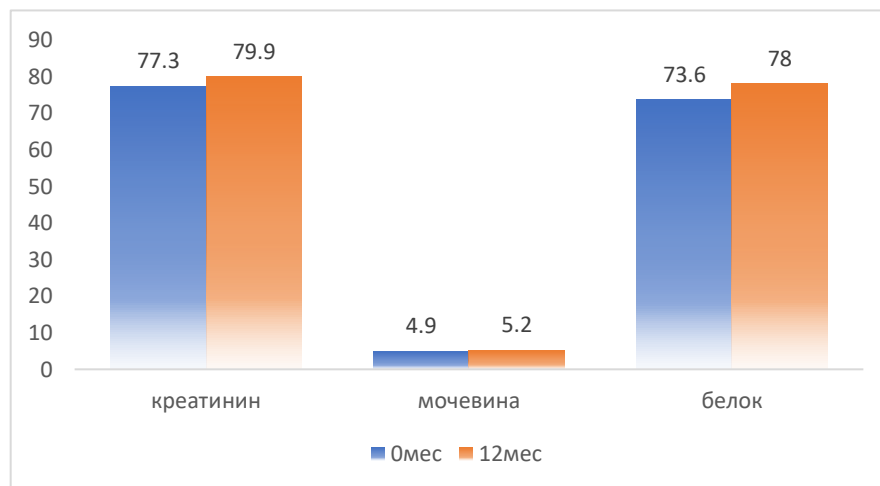
Следовательно, эффективность МГТ на минерально-костный и липидный обмен не зависит от функционального состояния почек. Ограничением данного

вывода является то, что в исследование не входили пациентки со значительным повреждением почек и ХПН.

Оценивали изменение креатинина, мочевины и белка до старта терапии и через 12 месяцев (диаг. 3.7.)

### Диаграмма 3.7.

#### Изменение показателей креатинина, мочевины и белка до начала терапии и через 12 месяцев, n=68



*Примечание: n – количество пациенток*

По полученным данным видно, что уровень креатинина, мочевины и белка не изменился спустя год после старта терапии. По-видимому, МГТ не влияет на функциональное состояние почек.

### 3.6. Определение относительной связывающей активности синтетических гестагенов (пентаранов) с прогестеронсвязывающими участками клеток МНФК.

Длительность МГТ зачастую ограничена прогрессирующим снижением её эффективности. Это связано с тем, что наиболее частые применяемые гестагены снижают чувствительность клеток-мишеней к гормонам. Поэтому поиск новых синтетических гестагенов, не снижающих чувствительность к гестагенам, является актуальным. Поэтому в экспериментальной части работы были проанализированы

новые синтетические гестагены. Прегна-D'-пентараны синтезированы, очищены и в лиофилизированном виде переданы сотрудниками Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (лаборатория химии стероидов и оксипиринов - заведующий д.х.н. И.В. Заварзин) - д.х.н., профессором Инной Саломовной Левиной и д.х.н., профессором Алексеем Владимировичем Камерницким. Химическая модификация молекулы прогестерона получена в результате встраивания дополнительного карбоцикла в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$  – положение стероидного скелета.

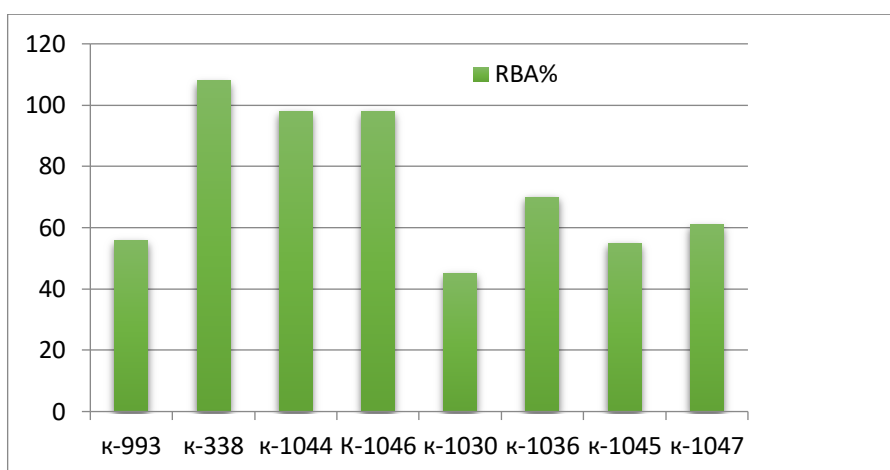
Мононуклеарная фракция периферической крови здоровых пациенток репродуктивного возраста была использована для анализа связывания исследуемых соединений с рецепторами прогестерона. Такой выбор обусловлен тем, что уровень прогестерона в крови в этом возрасте выше, чем в пре- и постменопаузальный периоды.

С помощью вытеснения избытка немеченного синтетического стероида  $^3\text{H-R}_4$  из связи со связывающими участками мононуклеаров (суммарная емкость рецепторов прогестерона) была изучена относительная связывающая активность (RBA%) 8 прегна-D'-пентаранов [25]. Полученные результаты RBA 8 прегна-D'-пентаранов с клетками МНФ периферической крови представлены на диаграмме 3.8.

### Диаграмма 3.8.

**Относительная связывающая активность прегна-D'-пентаранов с прогестерон-связывающими участками в МНФ крови женщин репродуктивного возраста (n=10)**





Соединения под маркировкой К-338, К-993, К-1044, К-1046 проявили наиболее высокое сродством к рецепторам прогестерона (табл.3.6.).

**Таблица 3.6.**

**RBA пентаранов (К-338, К-993, К-1044, К-1046) со специфическими участками связывания прогестерона в клетках МНФК у женщин группы сравнения ( $M \pm SE$ , %).**

Гестаген	RBA, %
<b>К-338</b>	107,1 $\pm$ 31,2
<b>К-1044</b>	94,6 $\pm$ 36,1
<b>К-1046</b>	96,3 $\pm$ 32,8
<b>К-993</b>	103,2 $\pm$ 34,7

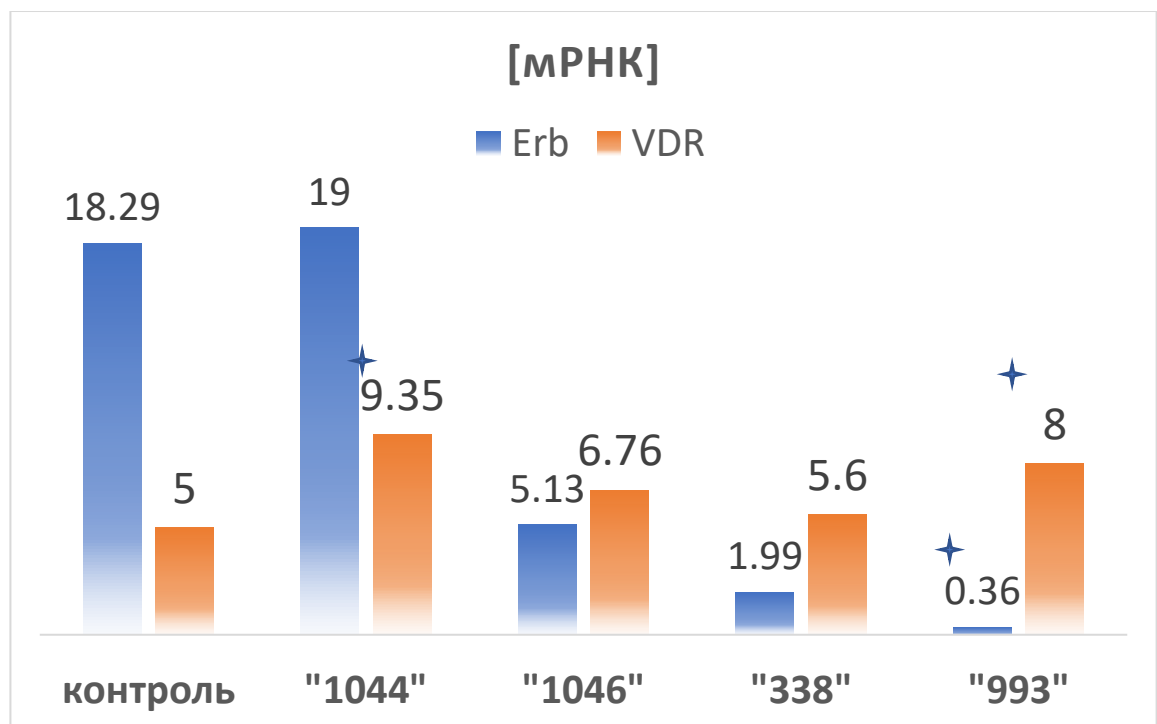
Учитывая высокую аффинность синтетических гестагенов (пентаранов) к рецепторам прогестерона, можно предположить перспективным дальнейшее изучение выделенных прегна-D'-пентаранов в качестве гестагенов-кандидатов для МГТ.

**3.7. Влияние пентаранов на уровень мРНК генов стероидных рецепторов ( $mER$ ,  $ER_{\alpha}$ ,  $ER_{\beta}$ ,  $mPR$ ,  $PGRmCl$ ,  $PR-A$ ,  $PR-B$ ) и вит. D ( $VDR$ ).**

Используя результаты рецепторного профиля МНФК у пациенток с остеопеническим синдромом, мы исследовали действие прегна-D'-пентаранов на уровень экспрессии генов витамина D (*VDR*), эстрадиола (*ER $\alpha$* , *ER $\beta$* ) и прогестерона (*PR-B*) в мононуклеарах периферической крови здоровых пациенток. Инкубацию МНФК проводили с 4 пентаранами (К-1044, К-1046, К-338, К-993). Полученные данные о влиянии новых лигандов рецепторов прогестерона на транскрипцию интересующих генов в клетках МНФК здоровых пациенток приведены на диаграмме 3.9. (представлены только результаты по достоверно измененной транскрипции).

**Диаграмма 3.9.**

**Эффект инкубации синтетических гестагенов с мононуклеарами периферической крови здоровых пациенток на уровень мРНК стероидных рецепторов**



*Подпись к диаграмме: мРНК -  $(0,5^{\Delta Ct} * 100)$  по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы*

Из 4-х наиболее перспективных стероидов два соединения (К-1044 и К-993) не только не снижают, но и повышают уровень мРНК витамина D в МНФК. Из диаг. б видно, что соединение К-993 проявило выраженную ингибирующую активность

$ER_{\beta}$ , который является критичным параметром прогноза эффективности менопаузальной гормональной терапии на липидный обмен. При этом соединение К-1044 не снижало указанного параметра.

Следовательно прегна-D'-пентаран - **6(E)-гидрокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3 $\beta$ -ол-20-он** (К-1044) обладает высоким уровнем связывания с прогестероновыми рецепторами RBA= 95,1%, повышает уровень мРНК в МНФК рецепторов витамина D и не влияет на уровень мРНК рецептора гена ядерного эстрадиола  $ER_{\beta}$ , и потому является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения и внедрения в клиническую практику в качестве гестагенного компонента МГТ (для профилактики развития резистентности к терапии).

## Заключение

Повышение эффективности лечение остеопенического синдрома является актуальной задачей современной медицины. Это связано с широким распространением заболевания, недостаточной эффективностью стандартных схем терапии и высоким риском переломов, инвалидизации и смертности.

Остеопенический синдром может развиваться из-за разных факторов, таких как образ жизни, генетические особенности, состояние эндокринной системы, наличие других заболеваний, приемом лекарств и прочие обстоятельства.

Наиболее обсуждаемым вопросом патогенеза является связь остеопенического синдрома с дефицитом витамина D.

В диссертационной работе впервые проведен сравнительный анализ уровня мРНК рецепторов витамина D (*VDR*), эстрадиола (*mER*, *ER $\alpha$* , *ER $\beta$* ) и прогестерона (*mPR*, *PGRmC1*, *PR-A*, *PR-B*) в мононуклеарах периферической крови женщин после овариэктомии и нарушением костно-минерального обмена по сравнению с контролем (пациентки без остеопении). Выявлено снижение уровня мРНК нескольких подтипов рецепторов (*PR-A*, *VDR*, *ER $\alpha$* ) в МНФК в 7–30 раз ( $p \leq 0,05$ ) у пациенток с остеопеническим синдромом.

В соответствии с современными национальными и международными рекомендациями по менопаузе, первой линией лечения остеопенического синдрома является использование МГТ [69, 128]. Эффективность МГТ заключается в профилактике потери костной массы и снижении риска переломов в группе постменопаузальных женщин с остеопенией. Но, к сожалению, эффективность МГТ не всегда удовлетворяет потребностям пациенток. Положительный эффект гормональной терапии на костно-минеральный обмен отмечен только у 70–80% пользователей [80]. Так как эффективность можно оценить только через 0,5–1 год, то при отсутствии ее эффекта пациентка, кроме финансовых потерь, утрачивает возможность своевременного начала более перспективного лечения.

Поэтому поиск маркеров прогноза эффективности МГТ у пациенток после овариэктомии и нарушением костно-минерального обмена остается актуальным. Полученные результаты диссертационной работы позволяли предложить отдельные параметры рецепторного профиля моноклеаров периферической крови в качестве прогностического фактора эффективности МГТ в отношении липидного и костно-минерального обмена у пациенток с остеопеническим синдромом. Таким маркером в отношении костно-минерального обмена является уровень мРНК гена *VDR* ( $mRNA \geq 0,18$ ). В случае меньших значений данного маркера пациентке следует незамедлительно назначить эффективную негормональную терапию остеопении (бисфосфонаты, анти-RANKL и др.). Данный маркер был использован для составления алгоритма подбора персонализированной терапии женщин после овариэктомии и нарушением костно-минерального обмена.

Нарушение липидного обмена отмечается в постменопаузальном возрасте и может привести к развитию метаболического синдрома, включая центральное ожирение, резистентность к инсулину, дислипидемию, гипертонию и другие сердечно-сосудистые заболевания. Системная МГТ способствует снижению атерогенности плазмы крови пациенток [37]. Эффективность гормональной профилактики дислипидемии у пациенток с хирургической менопаузой тесно связан с уровнем мРНК *ER $\beta$*  в моноклеарах периферической крови пациенток. Маркером прогноза такой эффективности может служить уровень мРНК *ER $\beta$*  ( $mRNA \geq 0,06$ ). В случае меньших значений данного маркера пациентке следует незамедлительно назначить эффективную негормональную гиполипидемическую терапию (статины, ингибиторы пропротеин конвертазы субтилизин кексина 9 и др.).

Известно, что к любой гормональной терапии в течение 3–5 лет развивается резистентность [52]. Это связано с тем, что наиболее частые применяемые гестагены снижают чувствительность клеток-мишеней к гормонам. Поиск новых синтетических гестагенов, не снижающих чувствительность к гестагенам, является

актуальным. В диссертационной работе оценили *in vitro* влияние пентаранов ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$ М) на уровень мРНК генов стероидных рецепторов (*mER*, *ER $\alpha$* , *ER $\beta$* , *mPR*, *PGRmC1*, *PR-A*, *PR-B*) и витамина D (*VDR*) в МНФК у здоровых пациенток репродуктивного возраста. Впервые предложен новый синтетический гестаген прегна-D'-пентаран - **6(E)-гидрокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3 $\beta$ -ол-20-он** (К-1044), который обладает высоким уровнем связывания с прогестероновыми рецепторами (RBA= 95,1%), который повышает экспрессию в мононуклеарах рецепторов витамина D и не влияет на уровень мРНК *ER $\beta$* . Потому К-1044 является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения и внедрения в клиническую практику в качестве гестагенного компонента МГТ (для дополнительной профилактики развития резистентности к терапии).

## Выводы

1. Нарушение костно-минерального обмена у пациенток после овариэктомии сопровождается снижением уровня экспрессии ядерных рецепторов прогестерона ( $PR-A$ ), витамина D ( $VDR$ ), эстрадиола ( $ER_\alpha$ ) в мононуклеарах периферической крови в 7–30 раз соответственно по сравнению с группой контроль ( $p \leq 0,05$ ).

2. Эффективность МГТ у пациенток с хирургической менопаузой и остеопеническим синдромом составила 78 и 74% в отношении костно – минерального и липидного обмена соответственно.

3. У пациенток с положительным эффектом МГТ на костно – минеральный обмен выявлен в 2 раза более высокий уровень мРНК рецептора витамина D ( $VDR$ ) в мононуклеарах по сравнению с пациентками группы «без эффекта» ( $p = 0,02$ ).

4. У пациенток с положительным влиянием МГТ на липидный обмен обнаружен в 3 раза более высокий уровень мРНК рецептора эстрадиола ( $ER_\beta$ ) по сравнению с пациентками группы «без эффекта» ( $p=0,01$ ).

5. Рассчитаны пороговые значения выявленных маркеров, которые составили для  $ER_\beta$  ( $mRNA \geq 0,06$ ) и для  $VDR$  ( $mRNA \geq 0,18$ ). Чувствительность данных маркеров равна 100 и 67%, специфичность – 67 и 88%, соответственно. Оба маркера являются «очень хорошими классификаторами».

6. Прегна-D'-пентараны К-993, К-338, К-1044 и К-1046 обладают высоким уровнем относительной связывающей активности с прогестероновыми рецепторами МНФК (RBA= 103, 107, 95 и 96%, соответственно).

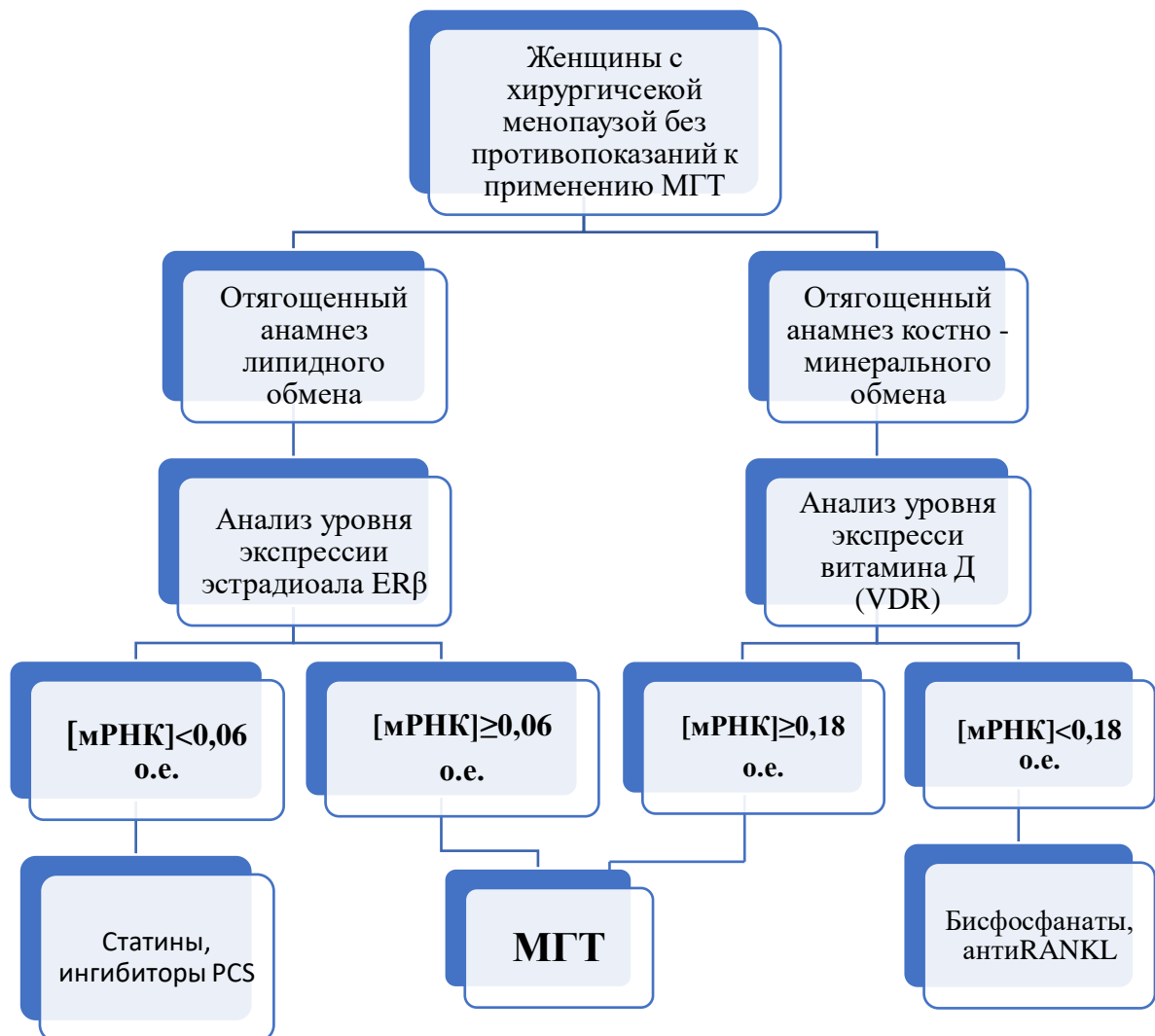
7. Прегна-D'-пентаран - *6(E)-гидрокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3 $\beta$ -ол-20-он* (К-1044) повышает экспрессию генов рецепторов витамина D ( $VDR$ ) и не влияет на экспрессию гена рецептора эстрадиола ( $ER_\beta$ ) в мононуклеарах крови.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

По результатам исследований, полученных в ходе диссертационной работы, предложен алгоритм персонализированного ведения пациенток с остеопеническим синдромом на основе влияния МГТ на липидный и костно-минеральный обмен (схема 1).

Схема 1.

### Алгоритм ведения пациенток с остеопеническим синдромом на основе влияния МГТ на МПКТ и липидный обмен



*Примечание: мРНК - (о.е.= $0,5^{\Delta Ct} * 100$ ) по отношению к экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы*



Составленный алгоритм позволит своевременно и с высокой степенью надежности выбрать эффективный способ профилактики и коррекции нарушений костно – минерального и/или липидного обмена у пациенток с хирургической менопаузой.

Результатом диссертации является рекомендация углубленного изучения нового отечественного лиганда рецептора прогестерона - *6(E)-гидрокси-имино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3 $\beta$ -ол-20-он* для последующего внедрения в практику в качестве гестагенного компонента менопаузальной гормональной терапии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

Ct – пороговый цикл амплификации

*GAPDH* – ген, кодирующий синтез глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

IMS – Международное общество менопаузы

*mER* – мембранный эстрогеновый рецептор

*ER $\alpha$* , *ER $\beta$*  – ядерные эстрогеновые рецепторы

*mPR*, *PGRmC1* – мембранные прогестинные рецепторы

*PR-A*, *PR-B* – ядерные прогестинные рецепторы

RBA – относительно связывающая активность

*VDR* – ядерный рецептор витамина D

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ГСПГ - гормонсвязывающий плазменный глобулин

ДРА – двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия

кДНК – комплиментарная ДНК

КСГ - кортикостероидсвязывающий глобулин

ЛПВП – липопротеиды высокой плотности

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

МГТ – менопаузальная гормональная терапия

МНФК – моноклеарная фракция клеток периферической крови

МПКТ – минеральная плотность костной ткани

мРНК – матричная РНК

ОП - остеопороз

ОС – остеопенический синдром

ПКТ – плотность костной ткани

ПМО – постменопаузальный остеопороз

ПЦР-RT – полимеразная цепная реакция в реальном времени

### Список литературы

1. Аляев, Ю.Г. «Остеопороз –Эпидемия 21 Века» // Эндокринология. Эффективная фармакотерапия. – 2015. – С. 4–12.
2. Беляева, И.Б. Современные принципы диагностики и терапии постменопаузального остеопороза: фокус на бисфосфонаты / И. Б. Беляева, В. И. Мазуров, А.Л. Чудинов // Медицинский совет. – 2020. - №11. – С. 141–148.
3. Бударова, К.В. Возможности ROC-анализа в интенсивной терапии новорожденных / К. В. Бударова, А.Н.Шмаков, С.И. Сирота // Здоровье и образование в XXI веке. - 2017. №6. – С. 88–92.
4. Булатова, Л.С. Особенности экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в тканях первичных и рецидивирующих эндометриодных образований яичников / Л.С.Булатова, А.А.Соломатина, Е. Н. Карева, Н. А. Коцюбинская // Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2018. - № 1. - С.60-64.
5. Всемирный день борьбы с остеопорозом ([https://medcentrprof.ru/ckeditor\\_images/Vsem.%20den%20borby%20s%20osteopor.%202020g.pdf](https://medcentrprof.ru/ckeditor_images/Vsem.%20den%20borby%20s%20osteopor.%202020g.pdf) )
6. Григорьев, С.Г. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач / С. Г. Григорьев, Ю.В. Лобзин, Н. В. Скрипченко // Журнал инфектологии. – 2016. - 8(4). – С. 36–45.
7. Громова, О.А. Роли витамина D в профилактике и лечении женского бесплодия / О. А. Громова, И.Ю. Торшин, Л.К. Джиджихия и др. // Гинекология. - 2016. – Т.18. - №3. – С.34-39.
8. Дедов, И. И. Дефицит витамина D у взрослых: диагностика, лечение и профилактика. Учебное пособие: Клинические рекомендации российской ассоциации эндокринологов / И. И. Дедов, Г. А. Мельниченко, Е. А. Пигарова, Л. и др., – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада». - 2020. – С. 48.
9. Дедов, И.И. «Остеопороз – от редкого симптома эндокринных болезней до безмолвной эпидемии 20–21 века» / И.И. Дедов, Мельниченко Г. А., Белая Ж.Е. и др. // Проблемы эндокринологии. – 2011. - Т. 57. - С. 35–45.

10. Ершова, О. Б. Эпидемиология переломов проксимального отдела бедренной кости / О. Б. Ершова, Синицына О. С., Белова К. Ю. и др. // Фарматека. - 2012. - №2s. - С. 10–16.
11. Камерницкий, А.В. Прегна - D'-Пентараны – Прогестины И Антипрогестины I. Разделение Биологических Функций Стероидных Гормонов / А.В. Камерницкий, И. С. Левина // Биоорганическая химия. – 2005. - № 2. - С. 115–129.
12. Камилов, Ф.Х. Биохимические маркёры костного и остеокластического дифференцирования в плазме крови при подострой интоксикации дихлорэтаном/ Ф.Х. Камилов, Е.Р. Фаршатова, Д.А. Еникеев, Г. В. Иванова // Казанский медицинский журнал. - 2015. – Т.86. - № 5. - С. 828–831.
13. Карева, Е.Н. Мембранный рецептор прогестерона PGRMC1 - потенциальная мишень лекарственных средств / Е.Н.Карева, В.А.Булгакова, Д.С.Гуторова, и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2020. - Т. 83. - № 6. - С. 19–29.
14. Карева, Е. Н. Половые стероиды и иммунитет/ Е. Н. Карева, Л.В. Ганковская, Н. Л. Шимановский // Российский иммунологический журнал. - 2012. - №1. – С.3-14.
15. Карева, Е.Н. Эстрогены и головной мозг / Е. Н. Карева, О. М. Олейникова, В.О.Панов, и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2012. - Т. 67. - № 2. - С. 48–59
16. Клинические Рекомендации МЗ РФ «Менопауза И Климактерическое Состояние У Женщины» МКБ 10: N95.1 ID: Кр117 Год Утверждения: 2016 File:///C:/Users/User/desktop/Менопауза%20и%20к%20у%20женщин\_dhjq8ww.Pdf
17. Лесняк, О.М. О деятельности российской ассоциации по остеопорозу в 2021 году / О.М. Лесняк, О. Б. Ершова, К. Ю. Белова // Остеопороз и остеопатии. - 2022. -Т.25. - №2. – С.31-39.
18. Лесняк, О.М. Остеопороз в Российской Федерации: эпидемиология, медико-социальные и экономические аспекты проблемы (обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. - 2018. – 24(1). - С. 155–168.

19. Майлян, Э.А. Принципы профилактики и лечения постменопаузального остеопороза / Э.А. Майлян, А. Э. Эседова, Н. А. Резниченко и др. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. - 2022. - Т.12. -№1. – С. 93–101.
20. Майлян, Э. А. Роль витамина D в регуляции иммунных факторов, участвующих в патогенезе постменопаузального остеопороза / Э.А. Майлян, А. Э. Эседова, Н. А. Резниченко и др// ТМБВ. -2021. -Т.24. -№3.- С.97-104.
21. Мальцев, С. В. Обеспеченность витамином D детей разных возрастных групп в зимний период / С. В. Мальцев, А. М. Закирова, Г. Ш. Мансурова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. -2017. – Т. 62. -№2. – С.99-103.
22. Мальцев, С. В. Современные аспекты применения витамина D в клинической практике // РМЖ. Мать и дитя. -2022. -Т.5. - №3. – С. 244–252.
23. Маняхина, А. Е. Экспериментальное обоснование применения лигандов рецепторов прогестерона в терапии гиперпластических процессов тканей матки: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Маняхина Анна Евгеньевна. – М., 2010. – 137 с.
24. Марченкова, Л.А. Современные подходы к реабилитации пациентов с переломом бедра на фоне остеопороза: роль патогенетической терапии золедроновой кислотой // Вестник восстановительной медицины. – 2022. – Т.21. - №2. – С.139-149.
25. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А. Н. Васильев и др. // Москва. – 2012. – С.944.
26. Мурадянц, А.А. Постменопаузальный остеопороз в практике клинициста: диагностика и лечение / А.А. Мурадянц, Н. А. Шостак, А. А. Клименко // Клиницист. -2007. -№2(3). – С.30-37.
27. Пат. 2325911 С2 Российская Федерация, 10.06.2008. Способ гестагенотерапии гиперпластических процессов эндометрия / П.В.Сергеев, В. И. Краснопольский, Е.Н.Карева, и др. Заявка № 2005138072/14 от 07.12.2005 G

28. Пигарова, Е. А. Неклассические эффекты витамина D / Е. А. Пигарова, А. А. Петрушкина // Остеопороз и Остеопатии. – 2017. –Т.20. –№3. – С.90–101.
29. Порядин, Г.В. Патогенетические механизмы формирования постклимактерического остеопороза и их взаимосвязь с сердечно-сосудистой патологией / Г.В. Порядин, А.Н. Захватов, Д. В. Самарина // Бюллетень Сибирской Медицины. – 2022–№1 – С.144-151.
30. Прилепская, В.Н. Эволюция прогестагенов и прогресс современной контрацепции/ В.Н. Прилепская, Л. И. Острейкова // Гинекология. - 2004. - Т. 6. - №3. - С. 111–113.D
31. Раскина, К.В. История «Д» / К.В. Раскина, Ю.Е. Потешкин // Актуальная эндокринология. – 2015. - №5. – С.1-7.
32. Розен, В. Б. Основы эндокринологии // М. Медицина. - 1994. -С.197-208.
33. Савченко, Т. Н. Современный взгляд на влияние витамина D на здоровье женщины / Т. Н. Савченко, Дергачёва И.А., Озолия Л.А. // Архив акушерства гинекологии им. В. Ф. Снегирева. -2019. -6(2). – С. 73–79.
34. Сергеев, П.В. Биохимическая Фармакология / П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский. – М.: Медицинское Информационное Агентство, 2010 Г. - 624 С.
35. Сергеев, П.В. Очерки Биохимической Фармакологии / П. В. Сергеев, П. А. Галенко-Ярошевский, Н. Л. Шимановский. – М.: "Фармединфо", 1996. – 384 С.
36. Сергеев, П.В. Рецепторы Физиологически Активных Веществ / П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, В. И. Петров. - 2-Е Изд., Перераб. И Доп. – М.- Волгоград: Изд-Во Семь Ветров, 1999. – 640 С.
37. Сметник, А.А. Менопаузальная гормонотерапия с дидрогестероном: аспекты эффективности и безопасности ультранизких доз // Медицинский совет. - 2017. -№2. -С. 92–99.
38. Смирнов, А.В. Строение и функции костной ткани в норме и при патологии. Сообщение I / А. В. Смирнов, А. Ш. Румянцев // Нефрология - 2014. - Т.18. -№6. -С. 9–25.

39. Токмаков, А. А. Внегеномные Механизмы Действия Прогестерона / А.А. Токмаков, Я. Фуками // Цитология. – 2009. - № 5. – С. 403–416.
40. Файнзильберг, Л.С. Гарантированная оценка эффективности диагностических тестов на основе усиленного ROC-анализа / Л.С. Файнзильберг, Т. Н. Жук // Управляющие системы и машины. – 2009. – Том.5. – С. 3–13
41. Форум Остеопороза, 23–25 Сентября, 2012; Санкт-Петербург. Материалы Научно-Практической Конференции «Остеопороз – Важнейшая Мультидисциплинарная Проблема Здравоохранения XXI Века»; 23–27.
42. Шалина, М.А. Влияние гормональной терапии на костную ткань: мифы и реальность / М.А. Шалина, М.И. Ярмолинская, Е. И. Абашова // Журнал акушерства и женских болезней – 2018. – Т. 67. –№3. –С. 83–94.
43. Шалина, М.А. Метаболический синдром у женщин старшего возраста // Акушерство и женские болезни. - 2019 – Т. 68. –№3. – С.81-88.
44. Шафиева, И.А. Влияние эстроген-гестагенной терапии на минеральную костную плотность, состояние тканей пародонтального комплекса, клинические проявления суставного синдрома у женщин в постменопаузе / С. В. Булгакова, Е. В. Василькова, А. В. Шафиева // Медицинский Совет. -2020. -№3. - С. 139–142.
45. Шепелькевич, А.П. Современные подходы к профилактике и лечению дефицита витамина D // Медицинские Новости. – 2016. – №6. – С. 10–16.
46. Якубова, С.С. Влияние витамин D на опухолевые клетки / С. С. Якубова, А.Н.Рахмонов, Г. О. Исмаилова // ORIENSS. - 2023. -№1. – С. 280–287. В
47. Albrecht, C. In vitro inhibition of SKOV-3 cell migration as a distinctive feature of progesterone receptor membrane component type 2 versus type 1/ C. Albrecht, V. Huck, M. Wehling, et al // Steroids. -2012. - №77. - P. 1543-1550.
48. Aspray, TJ. Randomized controlled trial of vitamin D supplementation in older people to optimize bone health / TJ. Aspray, T. Chadwick, RM. Francis, et al // Am J Clin Nutr. – 2019. - 109(1). - P. 207-217.
49. Balasch, J. Sex steroids and bone: current perspectives // Human Reproduction. – 2003. -№ 9(3). – P. 207–222.



50. Bali N. PGRMC1: New roles in the microglial mediation of progesterone-antagonism of estradiol-dependent neurite sprouting and in microglial activation / N. Bali, T.E. Morgan, C.E. Finch, // *Front Neurosci.* - 2013. - №. 7. - P. 157.
51. Berger, Jm. Osteocalcin and the physiology of danger / Jm. Berger, G. Karsenty // *Febs Lett.* -2022. – vol. 596. - №.5. - P. 665-680.
52. Bertelloni, S. Bone mineral density in women living with complete androgen insensitivity syndrome and intact testes or removed gonads / S. Bertelloni, M.C. Meriggiola, E. Dati, et al // *Sex Dev.* – 2017. - 11(4). – P. 182-189.
53. Bikle, D. Nonclassic actions of vitamin D / *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2009. – 94 (1). – P. 26–34.
54. Bivona, G. Non- skeletal activities of vitamin D: from physiology to brain pathology / G. Bivona, L. Agnello, C. Bellia, et al // *Medicina (Kaunas).* -2019. –vol. 55. - №7. –P. 341.
55. Bivona, G. Standardized measurement of circulating vitamin d [25(oh)d] and its putative role as a serum biomarker in alzheimer's disease and parkinson's disease / G. Bivona, B. Lo Sasso, G. Iacolino, et al // *Clin Chim Acta.* – 2019. – vol. 497. –P. 82–7.
56. Black, D.M. An Assessment tool for predicting fracture risk in postmenopausal women / D.M. Black, M. Steinbuch, L. Palermo, et al // *Osteoporos Int.* -2001. –vol. 12. -№7. - P.519-528.
57. Boyle, W.J. Osteoclast differentiation and activation / W.S. Simonet, D.L. Lacey // *Nature.* – 2003. – vol. 423 – P. 337-342.
58. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow / A. Boyum // *Scand. J. Lab. Investig.* – 1968. – vol. 21 – № 97. - P. 1-9
59. Burch, J.B. Advances in geroscience: impact on health span and chronic disease / J.B. Burch, A.D. Augustine, L.A. Frieden, et al // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* - 2014. - vol. 69. - №1. - P.1-3.
60. Cahill, M.A. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology / M.A. Cahill, J.A. Jazayeri, S. M. Catalano et al. // *BBA - Reviews on Cancer.* - 2016. – vol. 1866. - №2. – P. 339 – 349.

61. Camacho, Pm. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for The Diagnosis and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis / Pm. Camacho, Sm. Petak, N. Binkley, et al // *EnDocr Pract.* – 2020. – 26(1). – P.1-46.
62. Carlberg, C. Nutrigenomics of vitamin D. // *Nutrients.* - 2019. - 11(3). – P. 676.
63. Cesareo, R. Effectiveness and safety of calcium and vitamin D treatment for postmenopausal osteoporosis / R. Cesareo, M. Iozzino, L. D'onofrio, et al // *Minerva endocrinologica.* – 2015. – vol. 40. – P. 231-237.
64. Cesareo, R. Hypovitaminosis D: is it time to consider the use of calcifediol? / R. Cesareo, A. Falchetti, R. Attanasio, et al // *Nutrients.* – 2019. – vol. 11. - №5. – P.1–20.
65. Cesareo, R. Italian Association of Clinical Endocrinologists (AME) And Italian Chapter of The American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) Position Statement: Clinical Management of Vitamin D Deficiency in Adults / R. Cesareo, R. Attanasio, M. Caputo, et al // *Nutrients.* – 2018 – vol.10. - №5. –P. 546.
66. Chang, S.W. Vitamin D and health — The Missing vitamin in humans / S.W. Chang, H.C. Lee // *Pediatrics and neonatology.* – 2019. – 60 (3). – P. 237–44.
67. Charoenngam, N. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease / N. Charoenngam, M. F. Holick // *Nutrients.* – 2020. – 12 (7).
68. Clark, N.C. Progesterone receptor membrane component 1 promotes survival of human breast cancer cells and the growth of xenograft tumors / N.C. Clark, A.M. Friel, C.A. Pru, et al. // *Cancer Biol Ther.* - 2016. - №17. - P. 262-271.
69. Cosman, F. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis / F. Cosman, M. Leboff, S.J. de Beur, et al // *National Osteoporosis Foundation.* – 2014. – 25(10). – P. 2359-2381.
70. Cushing, H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hosp.* – 1932. – 50. – P. 137—195.

71. Cvor0, A. Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes / A. Cvor0, D. Tatomer, M.K. Tee et al. // Immunol. – 2008. – vol.180. - №1. – P.630-636.
72. Daswani, B. “Omics” signatures in peripheral monocytes from women with low bmd condition / B. Daswani, M. Khatkhatay // Journal of Osteoporosis. -2018.
73. Dennis, M.K. In vivo effects of a GPR30 antagonist / M.K. Dennis, R. Burai // Nat Chem Biol. - 2009. - vol.1-2. - №214. - P.67-77.
74. Elassar, A. The relationship between follicle development and progesterone receptor membrane component-1 expression in women undergoing in vitro fertilization / A. Elassar, X. Liu, V. Scranton, et al. // Fertil Steril. - 2012. - № 97. - P. 572-578.
75. Engmann, L. Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an ru486-independent mechanism / L. Engmann, R. Losel, M. Wehling, et al // J Clin Endocrinol Metab. – 2006. – vol. 91. - № 12. – P. 4962-8.
76. Falkenstein, E. Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects / E. Falkenstein, H.C. Tillmann, M. Christ, et al // Pharmacol Rev. - 2000. – vol. 52. - № 4. – P. 513-56.
77. Fawcett, T. ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Research / T. Fawcett //Kluwer Acad. Publ. – 2004. – P.38.
78. Ferrer-Mayorga, G. Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer / G. Ferrer-Mayorga, M. J. Larriba, P. Crespo, et al // The journal of steroid biochemistry and molecular biology. -2019 – vol. 185. - P.1–6.
79. Francesca, S. In vitro method for the screening and monitoring of estrogen-deficiency osteoporosis by targeting peripheral circulating monocytes / S. Francesca, M. Melania, G. Gianluca, et al // Journal of the american aging association. – 2015 – 37(4). – P.82.
80. Francis, R.M. Non-response to osteoporosis treatment // British Menopause Society Journal. – 2004. – 10(2). – P. 76-80.
81. Galmozzi, A. PGRMC2 is an intracellular haem chaperone critical for adipocyte function / A. Galmozzi, BP. Kok, AS. Kim et al. // Nature. – 2019. - vol. 576(7785). - P. 138-142.

82. Haussler, M. R. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ : genomic and non-genomic mechanisms / M. R. Haussler, P. W. Jurutka, M. Mizwicki // *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2011. - 25(4). – P. 543–59.
83. Holick, M.F. Genomic or non-genomic? A question about the pleiotropic roles of vitamin D in inflammatory-based diseases / M.F. Holick, L. Mazzei, S. García Menéndez, et al // *Nutrients* – 2023. – vol. 15. – P. 767.
84. Hughes, G.C. Progesterone and autoimmune disease / G.C. Hughes // *Autoimmun Rev.* – 2012. - vol. 11. - № 6-7. – P. 502–514.
85. Hughes, G.C. The intracellular progesterone receptor regulates CD4 $^+$  T cells and T cell-dependent antibody responses / G.C. Hughes, E.A. Clark, A.H. Wong // *J Leukoc Biol.* – 2013. – vol. 93. - № 3. – P. 369-75.
86. Ibrahim-Quali, M. Recent advances in oxasteroid chemistry / M. Ibrahim-Quali // *Steroids*. – 2007. -vol. 72. - № 6-7. – P. 475-508.
87. Ishii, M. Chemorepulsion by blood s1p regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo / J. Kikuta, Y. Shimazu, M. Meierschellersheim et al // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2010. -vol. 207 - №13. - P. 2793–2798.
88. Jackson, A. Progesterone receptor signalling in retinal photoreceptor neuroprotection / C. Wyse, S.L. Roche, et al. // *J Neurochem*. - 2016. - №136. - P. 63-77.
89. Jeon, Sm. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer // *Exp Mol Med*. – 2018. - 50(4). – P. 1-14.
90. Kabe, Y. Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance / Y. Kabe, T. Nakane, I. Koike, T. et al. // *Nature Communications*. - 2016. - № 7. - P. 11030.
91. Karteris, E. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term / E. Karteris, S. Zervou, Y. Pang et al. // *Mol Endocrinol*. - 2006. - №20. - P. 1519–1534.

92. Keator, C. S. Alterations in progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) in the endometrium of macaques afflicted with advanced endometriosis / CS. Keator, K. Mah, OD. Slayden // *Mol Hum Reprod.* - 2012. - vol.18. - № 6. - P. 308-319.
93. Kersch-Schindl, K. Prevention and rehabilitation of osteoporosis // *Wien Med Wochenschr.* – 2016. – vol.166. - №1-2. – P. 22-27.
94. Kikuta, J. Osteoclast Migration, Differentiation and Function: Novel Therapeutic Targets for Rheumatic Diseases / J. Kikuta, M. Ishii, // *Rheumatology.* – 2013. - vol. 52. - № 2. - P. 226–234.
95. Kimura, I. Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins / I. Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, K. et al. // *Curr Protein Pept Sci.* - 2012. - №13. - P. 687-696.
96. Klein, Sl. Sex hormones and immunity to infection / Sl. Klein, Cw. Roberts // *Sex horm immun to infect.* - 2010. – P. 1–17.
97. Koivisto, O. A. Key vitamin D target genes with functions in the immune system / Hanel, C. Carlberg // *Nutrients.* – 2020. – vol. 12 -№4. – P.1140.
98. Komori, T. What is the function of osteocalcin? / *J Oral Biosci.* – 2020. – vol. 62 - №3. –P. 223-227.
99. Kongsbak, M. The Vitamin D receptor and T cell function / B. Trine, C.G. Levring, M.R. Von Essen // *Front Immunol.* – 2013. - №4. – P.148.
100. Kowalik, M.K. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract / M.K. Kowalik, R. Rekawiecki, J. Kotwica // *ReproD Biol.* – 2013. – vol. 13. - № 4. – P. 279-89.
101. Li, X. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of mcp-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts / X. Li, L. Qin, M. Bergenstock, L. M. Bevelock, D. V. Novack, et al // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2007. - vol. 282 - №45. - P. 33098–33106.
102. Lusher, S.J. X-Ray structures of progesterone receptor ligand binding domain in its agonist state reveal differing mechanisms for mixed profiles of 11 $\beta$ -substituted steroids / S.J. Lusher, H.C. Raaijmakers, D. Vu-Pham, et al // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287. - № 24. – P. 20333-43.

103. Matsumoto, R.R. Sigma ( $\sigma$ ) receptors as potential therapeutic targets to mitigate psychostimulant effects / L. Nguyen, N. Kaushal, M.J. Robson. // *Advances in Pharmacology*. - 2014. - vol. 69 - P. 323-386.
104. Mijatovic, V. Postmenopausal hormone replacement, risk estimators for coronary artery disease and cardiovascular protection / Mj. Mooren, CD. Stehouwer, Jc. Netelenbos, et al // *Gynecol Endocrinol*. – 1999. – vol. 13 - №2. – P.130–44.
105. Mónica, R. Functional effects of vitamin D: from nutrient to immunomodulator / Meza-Meza, A.I. Ruiz-Ballesteros & Ulises De La Cruz-Mosso // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. -2020. – vol. 62 -№11. – P. 3042-3062.
106. Mosheimer, B. A. Expression and function of rank in human monocyte chemotaxis / N. C. Kaneider, C. Feistritz, D. H. Sturn, C. J. Wiedermann // *Arthritis & Rheumatism*. -2004. - vol. 50 - № 7. – P. 2309–2316.
107. Mueck, AO. The effects of postmenopausal hormone replacement therapy and oral contraceptives on the endogenous estradiol metabolism / H. Seeger, T. Gräser, et al. // *Horm Metab Res*. – 2001. – vol. 33 - №12. – P. 744-747.
108. Nicholson, G. C. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ b ligand (RANKL) / G. C. Nicholson, M. Malakellis, F. M. Collier et al // *Clinical Science*. -2000. - vol. 99. - №2. - P. 133–140.
109. Oda, S. Progesterone receptor membrane component 1 modulates human cytochrome p450 activities in an isoform- dependent manner / M. Nakajima, Y. Toyoda, et al. // *Drug Metab Dispos*. - 2011. - vol.39 - P. 2057-2065.
110. Palmerini, C.A. Antagonistic effect of a salivary proline-rich peptide on the cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization induced by progesterone in oral squamous cancer cells / C.A. Palmerini, M. Mazzoni, G. Radicioni, V. et al. // *PLoS One*. - 2016. - vol.11.
111. Paschalis, E.P. Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix qualitybone / S. Gamsjaeger, N. Hassler, A. Fahrleitner-Pammer, et al // *Bone*. - 2017. – vol. 95 –P. 41-46.

112. Pietschmann, P. Mechanisms of systemic osteoporosis in rheumatoid arthritis / M. Butylina, K. Kersch-Schindl, W. Sipos, J. Int // Mol Sci. – 2022. – vol. 23 - №15. –P. 1–14.
113. Quinn, J.A. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30 / J.A. Quinn, C.T. Graeber // Mol Endocrinol. - 2009. - vol.7. - №23. - P.1052-1064.
114. Ray, R. Sex steroids and stem cell function / N.M. Novotny, P.R. Crisostomo et al. // Mol. Med. – 2008. -vol. 14 -№ 7-8. – P. 493–501.
115. Recklinghausen F.D. Die fibrose oder deformierende Ostitis, die Osteomalazie und die osteoplastische Carzinose in ihren gegen-seitigen Beziehungen. Festchrift Rudolf Virchow. George Reimer. – 1891. – 1.
116. Rodriguez J.A. Interplay between nuclear transport and ubiquitin/SUMO modifications in the regulation of cancer-related proteins // Semin Cancer Biol. - 2014. - vol. 27. - P. 11-19.
117. Runko, E. Caenorhabditis elegans VEM-1, a novel membrane protein, regulates the guidance of ventral nerve cord-associated axons / E. Runko, Z. Kaprielian // J Neurosci. - 2004. - vol. 24. - P. 9015-9026.
118. Salamanna, F. In vitro method for the screening and monitoring of estrogen-deficiency osteoporosis by targeting peripheral circulating monocytes / M. Maglio, G. Giavaresi, S. Pagani, R. Giardino, M. Fini // Age. – 2015. - vol. 37 - P. 9819.
119. Sh, Ko. Energy metabolism changes and dysregulated lipid metabolism in postmenopausal women / Ko. Sh, Y. Jung // Nutrients. - 2021. - 13(12). – P. 1–12.
120. Shalhoub, V. Characterization of osteoclast precursors in human blood / Elliott G., L. Chiu, R. Manoukian, M. Kelley, N. Hawkins, E. Davy, G. Shimamoto, J. Beck, S.A. Kaufman, G. Van, S. Scully, M. Qi, M. Grisanti, C. Dunstan, Wj. Boyle, D.L. Lacey // British Journal of Haematology. - 2000. – vol. 111- №2. –P. 501-12.
121. Schapira D., Schapira C. Osteoporosis: the evolution of a scientific term. Osteoporos Int. – 1992. – 2(4). – P. 164—167.

122. Sleiter, N. Progesterone receptor A (PRA) and PRB-independent effects of progesterone on gonadotropin-releasing hormone release / Y. Pang, C. Park, et al. // *Endocrinology*. - 2009. -vol. 150 - P. 3833–3844.
123. Stanczyk, F.Z. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects / F.Z. Stanczyk, J.P. Hapgood, S. Winer, D.R. Jr. Mishell // *Endocr Rev.* – 2013. – vol. 34. - № 2. – P. 171-208.
124. Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology// *Nature Reviews Immunology*. -2005. - vol. 40 - № 4. - P. 287-293.
125. Takayanagi, H. Immune and skeletal systems// *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*. – 2005. – vol. 63 (1) – P. 87-95.
126. Tanenbaum, D.M. Crystallographic Comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains / D.M. Tanenbaum, Y. Wang, S.P. Williams, P.B. Sigler // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1998. – vol. 95. - № 11. – P. 5998-6003.
127. Terzaghi, L. PGRMC1 participates in late events of bovine granulosa cells mitosis and oocyte meiosis / L. Terzaghi, I. Tessaro, F. Raucci, et al. // *Cell Cycle*. - 2016. - vol.15. - №15. - P. 2019-2032.
128. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society / *Menopause*. -2017. – vol. 24 (7) –P. 728-753
129. Thomas, P. Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions // *Front Neuroendocrinol.* - 2008. - vol. 29. - №2. - P. 292–312.
130. Thomas, P. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells / P. Thomas, Y. Pang // *Neuroendocrinology*. -2012. - vol. 96. - P. 162–171.
131. Thomas, P. Steroid and g protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins / P.



Thomas, Y. Pang, J. Dong, P. Groenen, J. KelDer, J. De Vlieg, Y. Zhu, C. Tubbs // *Endocrinology*. – 2007. – vol. 148. - № 2. - P.705-18.

132. Uhler, ML. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction / ML. Uhler, A. Leung, SY. Chan, C. Wang // *Fertil Steril*. - 1992. -vol.58. - P. 1191–1198.

133. Wessel, L. Long-term incubation with mifepristone (MLTI) increases the spine density in developing Purkinje cells: new insights into progesterone receptor mechanisms / A. Balakrishnan-Renuka, C. Henkel, et al. // *Cell Mol Life Sci*. - 2014. - vol.71 - P. 1723-1740.

134. Wojda, SJ. Parathyroid hormone for bone regeneration // *J Orthop Res*. – 2018. - 36(10) – P. 2586-2594.

135. Wright, L. M. Stromal Cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor cxcr4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts / W. Maloney, X. Yu, L. Kindle, P. Collin-Osdoby, P. Osdoby // *Bone*. - 2005. - vol. 36 -№5. - P. 840–853.

136. Xu, G. Leukemia inhibitory factor inhibits the proliferation of gastric cancer by inducing G1-phase arrest / G. Xu, Wang H., Li W., et al // *J. Cell. Physiol*. - 2019. - vol.234 - P. 3613–3620.

## Список иллюстративного материала

Рисунок 1.1. Синтез витамина D .....	25
Рисунок 1.2. Геномные и негеномные эффекты кальцитриола .....	27
Схема 1.1. Первичная доменная структура рецептора стероидного гормона.....	37
Рисунок 1.3. Внутриклеточный механизм действия стероидных гормонов.....	42
Рисунок 1.4. Рецепторные механизмы действия прогестерона в клетке – мишени..	54
Рисунок 1.5. Взаимодействие прогестерона с аминокислотными остатками лиганд-связывающего домена рецептора.....	60
Рисунок 1.6. Структура прегна-D'-пентаранов .....	61
Рисунок 2.1. Дифференциальное центрифугирование.....	68
Рисунок 2.2. Один из примеров амплификации: кДНК генов <i>Gapdh</i> , мембранного рецептора эстрадиола mER, ядерного рецептора прогестерона PR-A.....	71
Рисунок 2.3. Примеры кривых плавления кДНК генов <i>Gapdh</i> , мембранного рецептора эстрадиола mER, ядерного рецептора прогестерона PR-A.....	72
Схема 2.1. Распределение пациенток по группам .....	76
Схема 2.2. Синописис .....	77
Рисунок 3.1. Пример количественного состава МНФК у пациенток с хирургической менопаузой .....	78
Диаграмма 3.1. Уровень экспрессии рецепторов витамина D, эстрадиола и прогестерона в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой.....	83
Диаграмма 3.2. Распределение эффективности терапии среди пациенток основной группы (n=68).....	86
Диаграмма 3.3. Влияние варианта терапии на изменение костно – минерального обмена у пациенток с хирургической менопаузой.....	87
Диаграмма 3.4. Распределение пациенток на группы в зависимости от эффекта МГТ на липидный обмен (n=68) .....	89
Диаграмма 3.5. Уровень мРНК рецепторов эстрадиола, прогестерона и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой и эффективность терапии ....	93

Диаграмма 3.6. Уровни экспрессии генов эстрадиола, прогестерона и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на липидный обмен .....	99
Диаграмма 3.7. Изменение показателей креатинина, мочевины и белка до начала терапии и через 12 месяцев, n=68 .....	103
Диаграмма 3.8. Уровни специфического связывания прегна-D'-пентаранов с прогестерон-связывающими участками в мононуклеарах периферической крови женщин репродуктивного возраста (n=10) .....	104
Диаграмма 3.9. Эффект инкубации синтетических гестагенов с мононуклеарами периферической крови здоровых пациенток на уровень мРНК стероидных рецепторов .....	106
Схема 1. Алгоритм ведения пациенток с остепеническим синдромом на основе влияния МГТ на МПКТ и липидный обмен .....	112