

На правах рукописи

КРАСНОЩОК ЕКАТЕРИНА ВАДИМОВНА

**МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕНОПАУЗАЛЬНОЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ
ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК С ОСТЕОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Карева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Якушева Елена Николаевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующий кафедрой

Доктор медицинских наук, доцент

Иловайская Ирэна Адольфовна

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», отдел общей эндокринологии, отделение нейроэндокринных заболеваний, заведующий отделением

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.01 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте <http://rsmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор медицинских наук, профессор



Духанин Александр Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Остеопенический синдром относится к категории наиболее значимых медико-социальных заболеваний (Лесняк О.М., 2022). Самой частой причиной данной патологии является менопауза – обусловленная возрастным снижением уровня гормонов. Постменопаузальный остеопороз диагностируется практически у половины женщин в постменопаузальном периоде (Лесняк О.М., 2018).

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), связанные с дефицитом эстрогенов, прогестерона и тестостерона. Поздние проявления (сердечно-сосудистые, урогенитальные, метаболические нарушения, остеопороз) характеризуются наиболее тяжёлыми течениями и представляют значимую проблему здоровья женщины.

Патогенез остеопороза включает дефицит витамина D. Кроме этого, дефицит витамина D связан с высоким риском общей смертности, развитием онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, и другой патологией костной системы (рахит, остеопороз) (Pietschmann P, 2022; Майлян Э.А., 2021; Порядин Г.В., 2022).

Выбор терапии остеопенического синдрома основан на учете противопоказаний предполагаемого лечения. При отсутствии противопоказаний к гормональной терапии (семейный анамнез, тромбофилия, тяжёлые сердечно-сосудистые заболевания и др.) менопаузальная гормональная терапия (МГТ) остается самой эффективной и безопасной. МГТ является первой линией терапии остеопенического синдрома (ОС) и в большей степени имеет профилактическое значение, чем лечебное (Иловайская И.А., 2018). 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 частоты переломов у постменопаузальных женщин с остеопенией (Ершова О.Б., 2012; Марченкова Л.А., 2022, Шалина М.А., 2019, Якушева Е.Н., 2020). Но, к сожалению, как и любая лекарственная терапия, МГТ не может быть эффективна у 100% пациенток. Положительный эффект на костно-минеральный обмен (по показателям минеральной плотности костной ткани – МПКТ) отмечен только у 70–80% женщин, липидного обмена – 65-75% (Дедов И.И., 2021, Сметник А.А., 2017). Так как эффект становится очевидным только через 0,5–1 год после старта терапии, то пациентки с отсутствием удовлетворительного эффекта лишаются возможности вовремя получить альтернативное лечение. Поэтому поиск маркеров прогноза эффективности МГТ у пациенток с остеопеническим синдромом является актуальным. Известно, что

предшественниками остеокластов служат клетки мононуклеарной фракции крови (МНФК), поэтому в качестве объекта исследования был выбран стероидно-рецепторный транскриптом МНФК.

Так как регуляция костно-минерального и липидного обмена находится под контролем половых стероидов и витамина D - потенциальными маркерами прогноза эффективности гормональной терапии служат: уровень экспрессии (количество мРНК) генов рецепторов эстрогенов (mER , ER_{α} , ER_{β}), гестагенов (mPR , $PGRmC1$, $PR-A$, $PR-B$) и витамина D (VDR) стероидно-рецепторного транскриптома клеток МНФК.

К любой гормональной терапии в течение 3–5 лет развивается резистентность. Это связано с тем, что применяемые гестагены снижают чувствительность клеток-мишеней к гормонам. Поэтому перспективным направлением фармакологической науки является поиск новых синтетических гестагенов, не снижающих чувствительность клеток к эстрогенам. Сотрудники Института органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН (лаборатория химии стероидов и оксипиринов - заведующий д.х.н. И.В.Заварзин) – д.х.н., профессором И.С.Левиной и д.х.н., профессором А.В.Камерницким был синтезирован и предложен для исследования ряд гестагенов с уникальной структурой (прегна-D'-пентараны).

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 и остеопеническим синдромом, а также скрининг 8 прегна-D'-пентаран по их влиянию на экспрессию молекул-мишеней МГТ.

Задачи исследования:

1. Определить уровень мРНК генов рецепторов эстрадиола (mER , ER_{α} , ER_{β}), прогестерона ($PGRmC1$, mPR , $PR-A$, $PR-B$) и витамина D (VDR) в МНФК 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 вит. Д 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. Определить относительно связывающую активность (RBA) синтетических гестагенов (пентаранов) с прогестерон-связывающими участками клеток МНФК.

6. Изучить влияние пентаранов (10^{-6} – 10^{-8} М) на экспрессию генов рецепторов эстрадиола (mER , ER_{α} , ER_{β}), прогестерона (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.

Найдены маркеры прогноза эффективности МГТ на костно-минеральный (уровень мРНК гена $VDR \geq 0,06$ о.е.) и липидный обмен (уровень мРНК гена $ER_{\beta} \geq 0,18$ о.е.) у пациенток с нарушением костно-минерального обмена после хирургической менопаузы.

Практическая значимость

В качестве маркера прогноза эффективности лечения остепенического синдрома выявлен и охарактеризован - уровень мРНК гена VDR (специфичность - 88%, чувствительность - 67%), липидного обмена – уровень мРНК гена ER_{β} (специфичность - 67%, чувствительность - 100%).

Данные маркеры предложены для создания алгоритма персонализированного подхода к назначению менопаузальной гормональной терапии пациенткам с хирургической менопаузой, учитывающий потенциальное влияние терапии на костно-минеральный и липидный обмен. Алгоритм персонализированного подхода к назначению МГТ поможет своевременно и рационально 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_{α}) 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 и положительно 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 МНФК 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 коррелирует с уровнем мРНК ER_{β} в мононуклеарах периферической крови: у пациенток с положительным эффектом МГТ на липидный обмен уровень мРНК ER_{β} в МНФК в 3 раза выше по сравнению с пациентками, не ответившими на терапию ($p=0,01$).
4. Прегна-D'-пентаран – **6(E)-гидрокси-имино-16a,17a-циклогексано-прегн-4-ен-3β-ол-20-он** (К-1044) обладает высоким уровнем связывания с прогестероновыми рецепторами RBA = 95,1%, повышает экспрессию рецепторов витамина D и не влияет на уровень мРНК рецепторов

эстрадиола ER_{β} в МНФК и потому является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения 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 ГКБ №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 курсов 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).

Апробация

Апробация диссертации 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).

Личное участие автора

Автор лично разрабатывал дизайн исследования, постановке задач и подборе методов исследования, составления схемы экспериментов, проводила экспериментальные исследования, статистическую обработку и критический анализ полученных результатов в сравнении с литературными данными и результатами предыдущих исследований. Подготовка статей к публикации, написание диссертации и автореферата, научное обоснование и формулировка выводов и практических рекомендаций выполнены автором самостоятельно. Предложила и использовала полученные значения маркеров прогноза эффективности МГТ в составлении алгоритма ведения пациенток с хирургической менопаузой и остеопеническим синдромом на основе влияния МГТ на костно-минеральный и липидный обмен.

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).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, глав, посвященных обзору литературы, описанию методов исследования, изложению результатов работы и их обсуждению, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 136 источников. Работа изложена на 131 странице, иллюстрирована 10 рисунками, содержит 11 таблиц, 9 диаграмм и 4 схемы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты исследования

1.1. Характеристика пациенток, включенных в исследование

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

В работе использованы данные параметров костно-минерального обмена - минеральная 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).

1.2. Синтетические лиганды рецепторов прогестерона

Прегна-D³-пентараны синтезированы, очищены и в лиофилизированном виде переданы сотрудниками Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (лаборатория химии

стероидов и оксипинов - 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 1.

Таблица 1

Структура исследуемых прегна- D'-пентаранов

№	Стероид	D' (16 α ,17 α)	X	Y	R ₁
К-338	16 α ,17 α -циклопропано-прегн-4-ен-3,20-дион	-CH ₂ -	O	C	H ₂
К-993	3-оксим -16 α ,17 α -циклогексано-прогестерона	-(CH ₂) ₄ -	(E) NOH	C	H ₂
К-1030	3'-фенил[16 α ,17 α]-циклопропано-прегн-4-ен-3,20-дион	-CH ₂ -C ₆ H ₅	O	C	H ₂
К-1036	16 α ,17 α -циклогексано-4-оксапрегн-5-ен-3,20-дион	-(CH ₂) ₄ -	O	O	H ₂
К-1044	6(E)-гидрокси-имино-16 α ,17 α -циклогексано-прегн-4-ен-3 β -ол-20-он	-(CH ₂) ₄ -	H, OH	C	(E) NOH
К-1045	6(E)-гидроксиимино-16 α ,17 α -циклогексано-прегн-4-ен-3,20-дион	-(CH ₂) ₄ -	O	C	(E) NOH
К-1046	6(E)-метокси-имино-16 α ,17 α -циклогексано-прегн-4-ен-3 β -ол-20-он	-(CH ₂) ₄ -	H, OH	C	(E) NOCH ₃

К- 1047	6(E)-метокси-имино-16 α ,17 α -циклогексано- прегн-4-ен-3,20-дион	-(CH ₂) ₄ -	О	С	(E) NOCH ₃
--------------------	--	------------------------------------	---	---	--------------------------

2. 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.

2.1. Выделение МНФК из периферической крови

Перед началом исследования у пациенток забирали кровь из кубитальной вены в объеме 5 мл. Из периферической крови пациенток выделяли мононуклеарную фракцию клеток (МНФК) по методу Воуит А (Воуит, 1968), основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла. Гепаринизированную кровь 5 мл разводили в 3 раза изотоническим раствором (NaCl 0,9%) и наслаивали на фиколл ($\rho=1,077$ г/см³). Пробирки помещали в центрифугу 1.6 тыс. об на 45мин. Далее отбирали кольцо МНФК в пластиковую пробирку, разводили раствором (NaCl 0,9%) до 7 мл и снова помещали в центрифугу 1.6 тыс. об на 15 мин (отмывку повторяли 2 раза). Подсчет мононуклеарных клеток производили в камере Горяева под микроскопом в присутствии красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия). Затем разводили осадок в 1 мл физ. раствора, пипетировали и переносили МНФК в эппендорф 1,5 мл.

2.2. ПЦР – РТ

Выделение мРНК из МНФК проводили с помощью набора готовых реагентов «РИБО – преп» («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Получение кДНК на матрице мРНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции с использованием комплекта готовых реагентов «ОТ» («Синтол», Россия). Для полимеразной цепной реакции в реальном времени использовали набор готовых реактивов для ПЦР «Реакционная смесь 2,5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» на приборе iCycler iQ5 real-time PCR (BioRad, Германия). В качестве контрольного гена использовали ген GAPDH.

Для определения уровней экспрессии генов использовали формулы $0,5-\Delta Ct$ (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) - ΔCt (при 2 патологии).

2.3. Анализ специфического связывания новых стероидных молекул со специфическими участками связывания МНФК

а) Специфическое связывание ³H-Р₄ с клетками МНФ периферической крови.

Определение рецепторов прогестерона в моноклеарной фракции клеток периферической крови проводили по (Маняхина А.Е., 2010) методу Бассалык (Миронов А.Н., 2012). «Для определения общего связывания пробы содержали 20 мкМ $^3\text{H-P}_4$ 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 (Миронов А.Н., 2012)., после чего по 100 мкл суспензии из каждой лунки помещали на стеклянные фильтры и промывали 100 кратным избытком ТЭД-буфера (Миронов А.Н., 2012). 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 (Сергеев П.В., 2005):

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

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» (Миронов А.Н., 2012).

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» (Миронов А.Н., 2012).

Формула расчета рецепторного связывания:

$$I = (B \text{ спец. преп.} / B \text{ спец. горм.}) * 100\%, \text{ где}$$

I – ингибирование специфического связывания с рецептором ^3H -прогестерона препаратом;

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

В спец. горм. – специфическое связывание прогестерона в отсутствие избытка пентарана.

Регистрацию радиоактивной метки ($^3\text{H-P}_4$) осуществляли методом сцинтилляционной жидкостной радиометрии, используя сцинтилляционный альфа-бета радиометр «Tri-carb 3110» («PerkinElmer», США). Эффективность счета для дейтерия составила - 66%.

2.4. Влияние новых синтетических гестагенов на транскрипционную активность мононуклеаров периферической крови человека

Инкубацию клеток МНФ крови здоровых доноров с тестируемыми веществами (пентаранами) (табл.1.) проводили в компактном CO_2 инкубаторе Midi 40 (Thermo Scientific, США), в среде DMEM («ПанЭко», Россия). Условия инкубации: 37°C , 5% CO_2 , 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 выше.

2.5. 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 (Файнзильберг Л.С., 2009). Выявленные маркеры характеризовали по чувствительности, специфичности и индексу Йодена. Для этого использовали формулы: $\text{SENS (Se)} = \text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$; $\text{SPEC (Sp)} = \text{TN}/(\text{FP}+\text{TN})$; $\text{YDN (J)} = \max(\text{SENS} + \text{SPEC} - 1)$, 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 (Григорьев С. Г., 2016).

3. Результаты исследования и их обсуждение

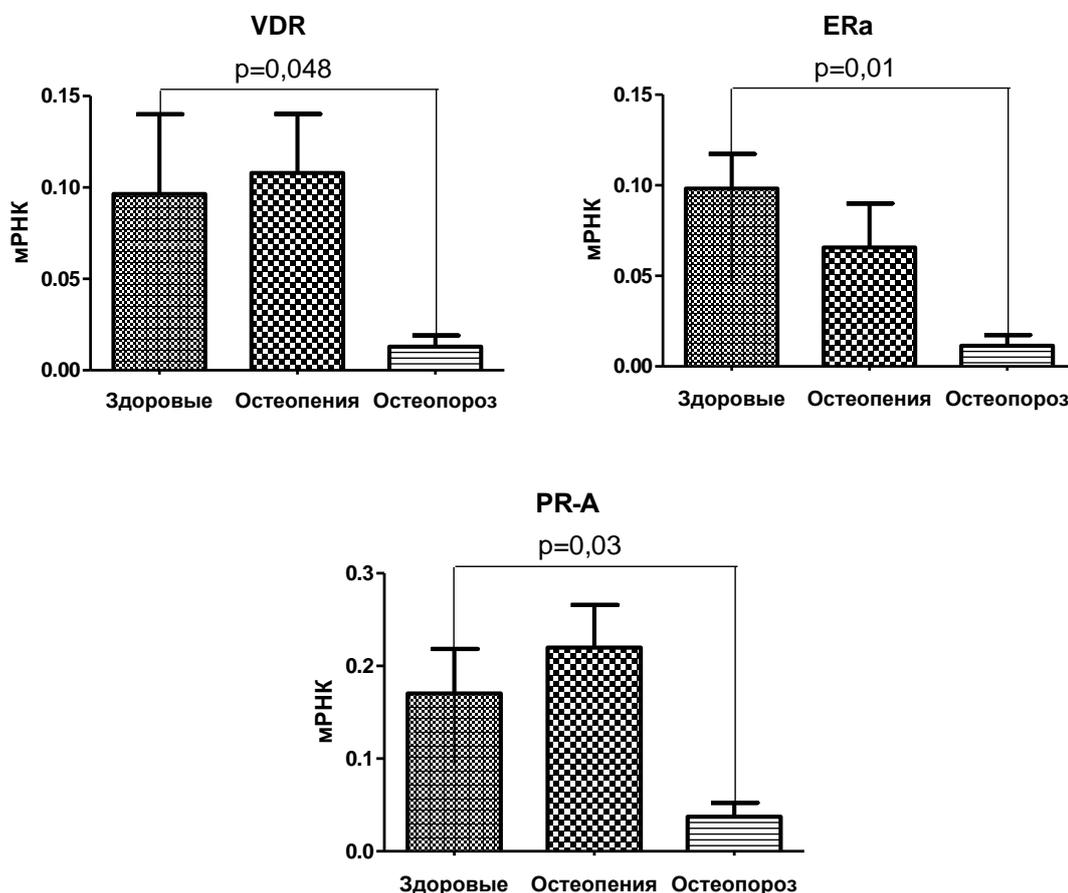
3.1. Определение уровня мРНК генов рецепторов эстрадиола (mER , ER_α , ER_β) и прогестерона ($PGRmC1$, mPR , $PR-A$, $PR-B$), витамина D (VDR) в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой методом РТ-ПЦР до старта МГТ.

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. Полученные данные продемонстрировали статистически достоверные различия в уровне мРНК трех рецепторов (витамина D, эстрадиола ER_{α} и прогестерона $PR-A$) в МНФК у пациенток с нарушенными параметрами костно-минерального обмена относительно данных параметров у пациенток группы «Здоровые» (диаграмма 1).

Диаграмма 1

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



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

У пациенток с остеопеническим синдром выявлен значительный разброс показателей мРНК стероидных рецепторов в мононуклеарах периферической крови по сравнению с пациентками группы «Здоровые». В частности, концентрация мРНК рецептора витамина D

(VDR), эстрадиола (ER_{α}) 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).

В результате полученных данных выявили, что у пациенток с хирургической менопаузой в группе «остеопороз» наибольшее снижение экспрессии рецептора эстрадиола ER_{α} . ER_{α} – 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

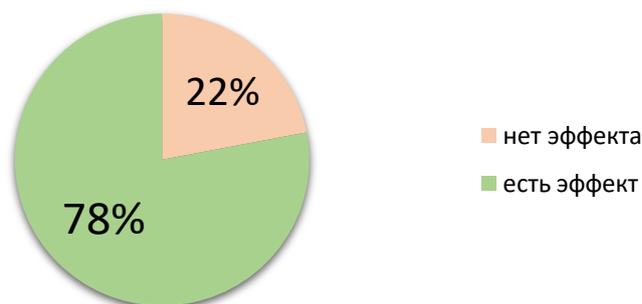
Комбинированные эстроген-гестагенные препараты повсеместно используются для лечения менопаузальных расстройств (в том числе после хирургической операции – овариэктомии). Гормональная терапия доказала высокую эффективность в уменьшении количества переломов у пациенток с остеопеническим синдромом.

Основными методами оценки ответа лечения ОС являются последовательные измерения МПКТ или биохимических маркеров костно-минерального обмена. Но не все пациенты отвечают на терапию и определить количество таких 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 Ca^{2+} с пищей (Francis R.M., 2004), а также индивидуальная чувствительность к гормонотерапии. Для повышения эффективности/профилактики остеопороза является актуальным поиск маркеров прогноза эффективности среди выбранных препаратов.

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 Ca^{2+} и вит. D. Далее пациентки были разбиты на две группы: отвечающие на терапию (есть эффект МГТ на МПКТ) и не отвечающие на терапию (нет эффекта МГТ на МПКТ) (Диаг. 2.)

Диаграмма 2

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

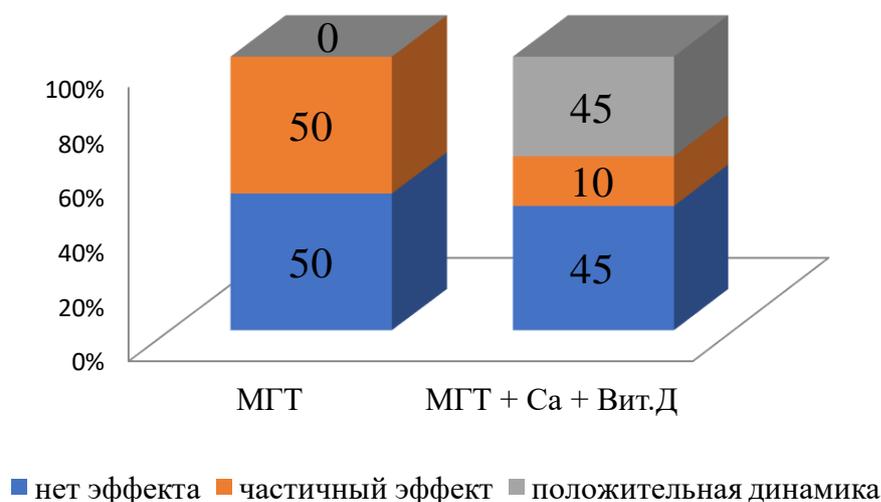


Примечание: n – количество пациенток, «есть эффект» - положительная динамика параметров костно – минерального обмена (денситометрия) на фоне гормональной терапии, «нет эффекта» - отсутствие положительной динамики параметров костно – минерального обмена на фоне МГТ

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 (колекальцеферол 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.)

Диаграмма 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 (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 гиповитаминоза D), и плейотропным действием витамина D.

Представленные данные на диаг. 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 (Cesareo R., 2015; Paschalis E.P., 2017).

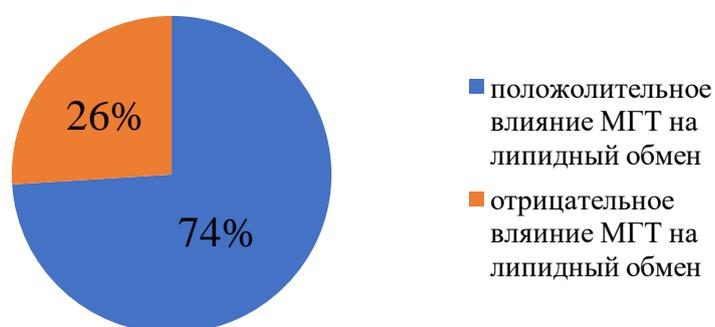
3.2.2. Липидный обмен

Нарушение липидного обмена приводит к повышенному риску развития метаболического синдрома, включая центральное ожирение, резистентность к инсулину, дислипидемию, гипертонию и другие кардиоваскулярные 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 (Camacho Pm, 2020).

Пациентки основной группы (n=68) были также разбиты на 2 группы: положительное и отрицательное влияние МГТ на липидный обмен (диаг. 4.).

Диаграмма 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

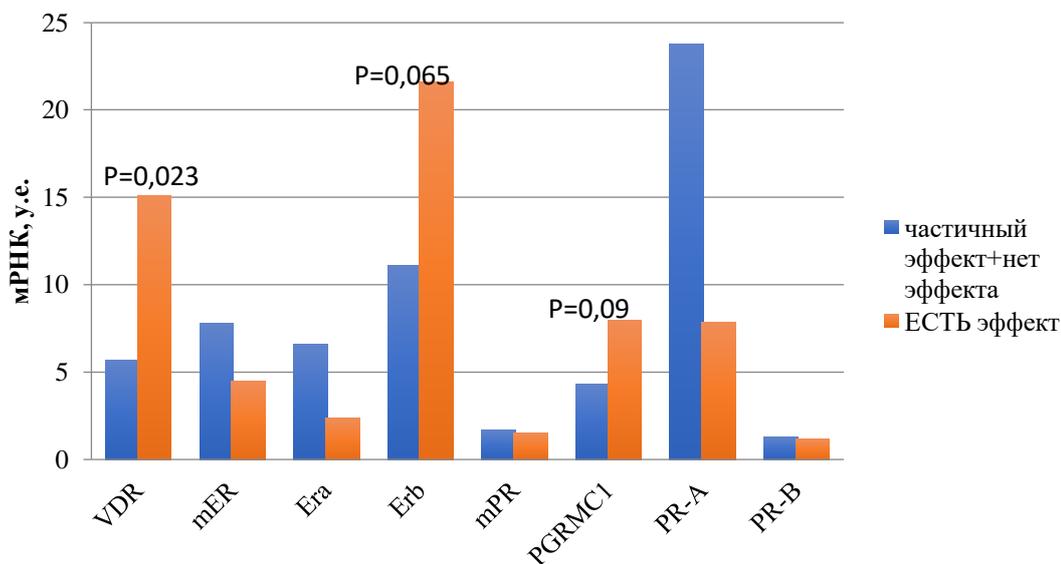
Из диаг.4 видно, что использованная стандартная терапевтическая схема оказалась неэффективной в 26% случаев. Это позволило в результате сравнительного анализа стероидно-рецепторного транскриптома МНФК у пациенток после овариоэктомии выявить маркеры прогноза эффективности лечения.

3.3. Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на костно – минеральный и липидный обмен.

Большое число пациенток, не отвечающих на терапию в обеих группах, позволило провести сравнительный анализ уровня мРНК стероидных рецепторов в мононуклеарах крови у женщин с остеопеническим синдромом в зависимости от эффективности МГТ (диаг.5).

Диаграмма 5

Уровень мРНК рецепторов эстрадиола, прогестерона и витамина D в МНФК у пациенток с хирургической менопаузой и эффективность терапии



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 -

PGRmCI 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 сведения об аналогичных исследованиях отсутствуют.

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.

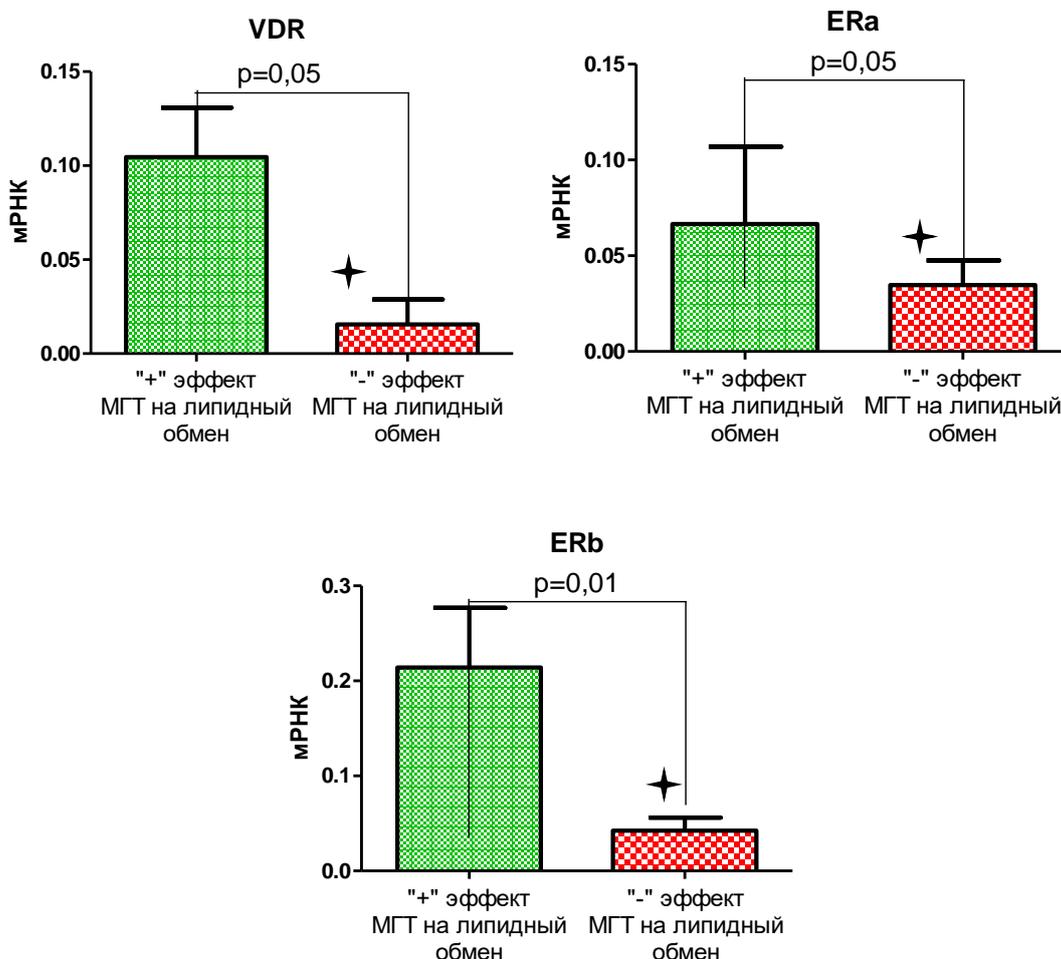
Кратное снижение чувствительности клеток-мишеней к гормонам, по-видимому, объясняет отсутствие клинического эффекта препаратов МГТ. Выявленный факт можно использовать в качестве фактора прогноза чувствительности пациенток к МГТ, особенно у пациенток с дополнительными факторами риска остеопении. Это актуально 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-минеральным обменом 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 клеток-мишеней на гормоны позволит получить более полную картину эндокринного контроля важнейшего физиологического аспекта жизни человека – костно-минерального обмена.

Результаты сравнения относительного стероидно-рецепторного транскриптома МНФК у пациенток с хирургической менопаузой в зависимости от влияния МГТ на липидный обмен представлены на диаг. 6.

Диаграмма 6

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



Примечание: p – уровень достоверности (по Манну-Уитни); [мРНК] – экспрессия тестируемого гена по отношению к *GAPDH* ($0,5^{\Delta Ct} * 100$)

Оценка экспрессии генов рецепторов эстрогена, прогестерона и витамина D в МНФК выявил больший уровень мРНК (ER_{β}), а также тенденцию к увеличению ER_{α} 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_{β} в мононуклеарах периферической крови: у пациенток с «положительным эффектом» МГТ на липидный обмен выявлен повышенный уровень мРНК ER_{β} 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 (Файнзильберг Л.С., 2009). 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 (Файнзильберг Л.С., 2009., Григорьев С. Г., 2016., Fawcett T., 2006).

Для оценки чувствительности и специфичности найденных маркеров (VDR и ER_{β}) был проведен ROC – анализ для классификации маркеров.

Характеристика маркера VDR – прогноз эффективности МГТ в отношении костно – минерального обмена: *специфичность – 88%, чувствительность – 67%, AUC = 0,81*.

Характеристика маркера ER_{β} – прогноз эффективности МГТ в отношении липидного обмена: *специфичность – 67%, чувствительность – 100%, AUC = 0,88*.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что маркеры (VDR и ER_{β}) являются очень хорошими классификаторами.

3.5. 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. 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.

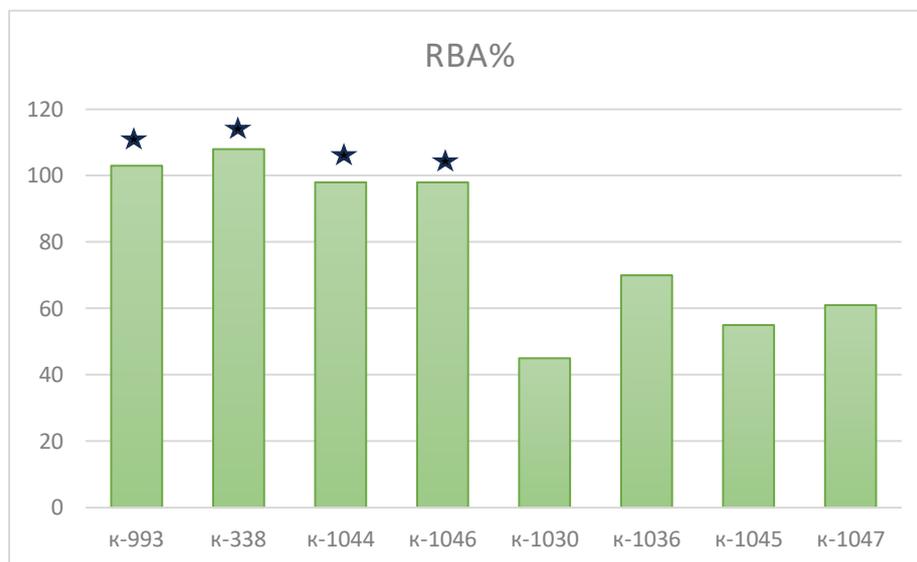
Мононуклеарная фракция периферической крови здоровых пациенток репродуктивного возраста была использована для анализа связывания исследуемых соединений с рецепторами прогестерона. Такой выбор обусловлен тем, что уровень прогестерона в крови в этом возрасте выше, чем в пре- и постменопаузальный периоды.

С помощью вытеснения избытка немеченного синтетического стероида 3H -P₄ из связи со связывающими участками мононуклеаров (суммарная емкость рецепторов прогестерона) была изучена относительная связывающая активность (RBA%) 8 прегна-D'-пентаранов (Миронов

А.Н., 2012). Полученные результаты RBA 8 прегна-D'-пентаранов с клетками МНФ периферической. крови представлены на диаграмме 7.

Диаграмма 7

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



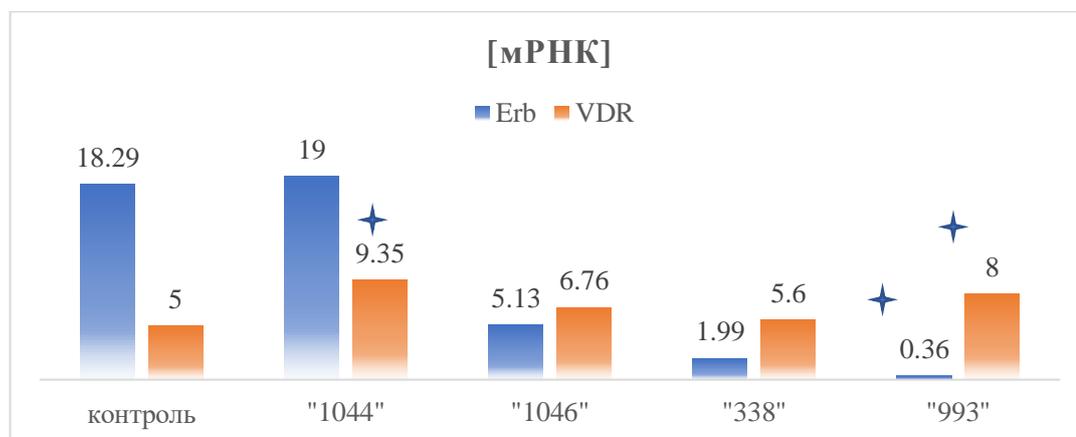
Соединения под маркировкой К-338, К-993, К-1044, К-1046 проявили наиболее высокое сродство к рецепторам прогестерона.

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

3.6. Влияние пентаранов на уровень мРНК генов стероидных рецепторов (*mER*, *ER α* , *ER β* , *mPR*, *PGRmC1*, *PR-A*, *PR-B*) и витамина 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 α* , *ER β*) 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 8 (представлены только результаты по достоверно измененной транскрипции).

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. 6 видно, что соединение К-993 проявило выраженную ингибирующую активность ER_{β} , 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 α ,17 α -циклогексано-прегн-4-ен-3 β -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_{β} , и потому является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения и внедрения в клиническую практику в качестве гестагенного компонента МГТ (для профилактики развития резистентности к терапии).

Выводы:

1. Развитие остеопенического синдрома у пациенток с хирургической менопаузой сопровождается снижением уровня экспрессии ядерных рецепторов прогестерона ($PR-A$), витамина D (VDR) и эстрадиола (ER_{α}) в МНФК в 7–30 раз соответственно по сравнению с группой контроль.
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 мРНК рецептора витамина D (VDR) в мононуклеарах по сравнению с пациентками группы «без эффекта».

4. У пациенток с положительным влиянием МГТ на липидный обмен обнаружен в 3 раза более высокий уровень мРНК рецептора эстрадиола (ER_{β}) по сравнению с пациентками группы «без эффекта».

5. Рассчитаны пороговые значения выявленных маркеров, которые составили для ER_{β} ($mRNA \geq 0,06$) 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-Д'-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).

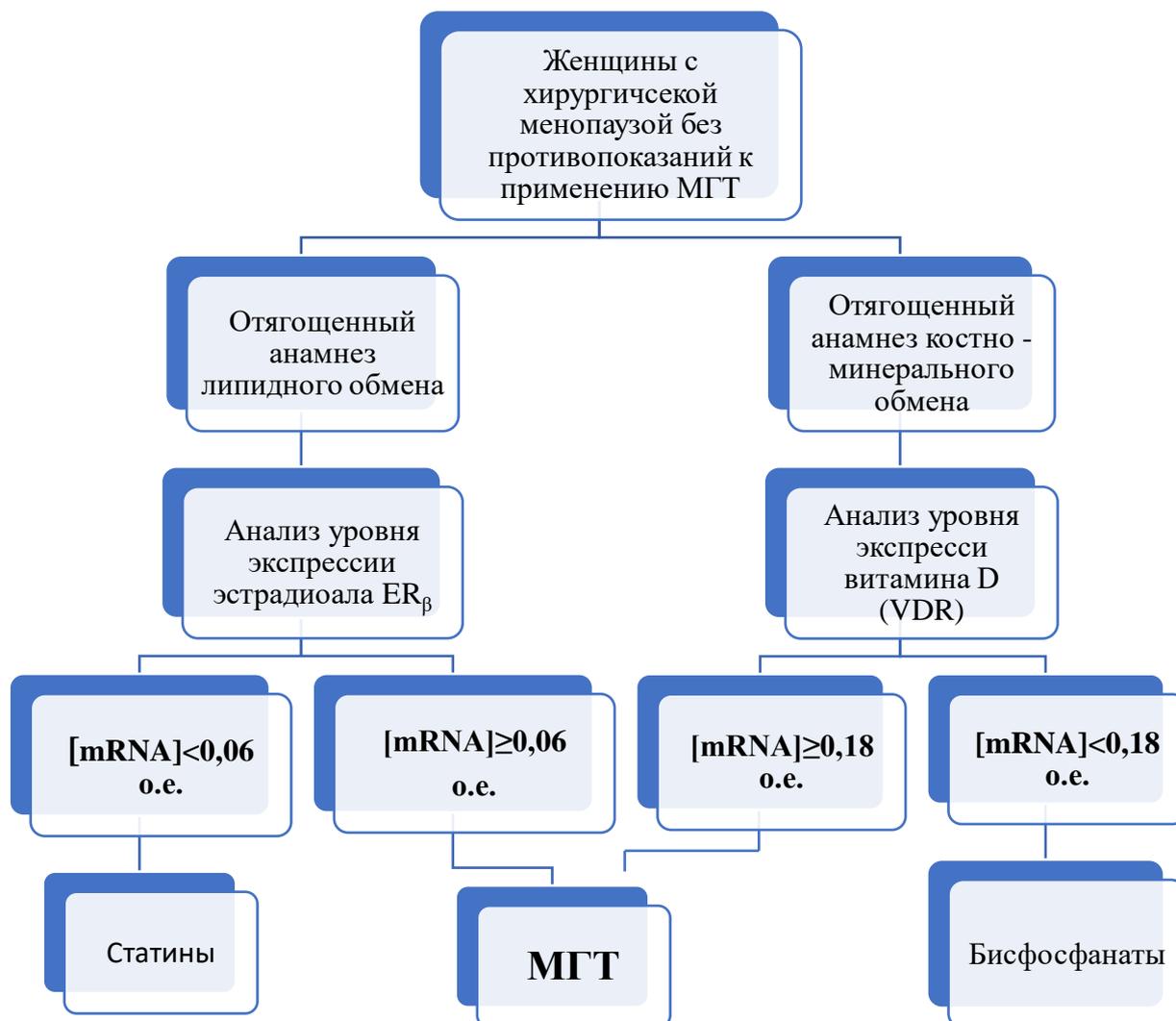
7. Прегна-Д'-пентаран - *6(E)-гидрокси-имино-16 α ,17 α -циклогексано-прегн-4-ен-3 β -ол-20-он* (К-1044) повышает экспрессию генов рецепторов витД (VDR) и не влияет на экспрессию гена рецептора эстрадиола (ER_{β}) в мононуклеарах крови.

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: о.е. – 0,5^{delta}, относительно гена Gapdh

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.

Результаты диссертации позволяют рекомендовать новый отечественный лиганд рецепторов прогестерона - 6(E)-гидрокси-имино-16α,17α-циклогексано-прегн-4-ен-3β-ол-20-он

– для дальнейших доклинических испытаний и последующего внедрения в практику в качестве гестагенного компонента менопаузальной гормональной терапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ct – пороговый цикл амплификации

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – ген, кодирующий синтез глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

mER – мембранный рецептор эстрадиола

ER α , ER β – ядерные рецепторы эстрадиола

mPR, PGRmC1 – мембранные рецепторы прогестерона

PR-A, PR-B – ядерные рецепторы прогестерона

VDR – ядерный рецептор витамина D

ДРА – двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия

кДНК – комплиментарная ДНК

ЛПВП – липопротеиды высокой плотности

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

МГТ – менопаузальная гормональная терапия

МНФК – моноклеарная фракция клеток периферической крови

МП - менопауза

МПКТ – минеральная плотность костной ткани

мРНК – матричная РНК

ПЦР-RT – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Краснощок, Е.В. Эффективность лечения остеопенического синдрома у пациенток с хирургической менопаузой/ Зайдиева Я.З., Кручинина Е.В., Горенкова О.С., Глазкова А.В., Полякова Е.Ю., Карева Е.Н., Кочина Н.А., Краснощок Е.В., Сереброва С.Ю. // Экспериментальная и клиническая фармакология – 2019. - Т.82. - №10. – С. 19-24.
2. Краснощок, Е.В. Потенциальный маркер прогноза эффективности лечения остеопенического синдрома у женщин с хирургической менопаузой/ Зайдиева Я.З., Кручинина Е.В., Горенкова О.С., Полякова Е.Ю., Карева Е.Н., Кургузова Д.О., Кочина Н.А., Краснощок Е.В., Сереброва С.Ю. // Гинекология – 2020. – Т.22. - №4. – С.39-42.
3. Краснощок, Е.В. Уровень экспрессии рецепторов прогестерона, эстрадиола и витамина D в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с хирургической менопаузой/ Кручинина Е.В., Горенкова О.С., Кочина Н.А., Краснощок Е.В., Глазкова А.В., Полякова Е.Ю., Зайдиева Я.З., Карева Е.Н., Сереброва С.Ю. // Молекулярная медицина – 2020. – Т.18. - №1. – С.61-64.
4. Krasnoshchok, K.V. Biomarker for predicting the efficacy of osteopenic syndrome therapy in women after surgical menopause/ Soperna S., Kochina N.A., Kruchinina E.V.// Сборник тезисов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Нижний Новгород, 2021 – с. 305–307
5. Краснощок, Е.В. Экспрессия мембранного рецептора эстрадиола (mER) – маркер прогноза эффективности менопаузальной гормональной терапии, влияющей на костно – минеральный обмен у женщин с хирургической менопаузой/ Смолева С.В., Алексеева А.О. // Сборник тезисов XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. — Москва: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 2023 – с. 20-21