

эффекты, обладает значительными преимуществами в составе низкодозированных препаратов: гормонального контрацептива Джесса® с новым режимом приема (24/4) и зарегистрированными лечебными эффектами и препарата для лечения менопаузальных расстройств Анжелика®, характеризующегося особыми свойствами и представляющего новые возможности для снижения риска сердечно-сосудистой патологии и сохранения качества жизни и здоровья женщин в постменопаузе. По сути они превосходят ожидаемые стандартные эффекты низкодозированных гормональных контрацептивов и ЗГТ, поэтому на данном этапе их можно рассматривать как наиболее значимые и приемлемые у женщин и для контрацепции, и для ЗГТ у женщин в перименопаузе.

#### Литература

1. Hannaford PC, Selvaraj S, Elliott AM et al. Cancer risk among users of oral contraceptives: cohort data from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study. *BMJ* 2007; 335: 651.
2. Vessey M, Painter R. Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968–2004. *Br J Cancer* 2006; 95: 385–9.
3. Beral V, Doll R, Hermon C et al. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 2008; 371: 303–14.
4. Rosenberg MJ, Waugh MS. Oral contraceptive discontinuation: a prospective evaluation of frequency and reasons. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 577–82.
5. Scouby SO. Contraceptive use and behavior in the 21<sup>st</sup> century: a comprehensive study across five European countries. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2004; 9: 57–68.
6. Oelkers WK. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 1996; 61: 166–71.
7. Rosano GM, Vitali C, Tilli A. Managing cardiovascular risk in menopausal women. *Climacteric* 2006; 9 (Suppl. 1): 19–27.
8. Perchere-Betschi A, Burnier M. Female sex hormones, salt and blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 2004; 17: 994–1001.
9. Hernandez Schulman I, Aranda P, Raji L. Surgical menopause increases salt sensitivity of blood pressure. *Hypertension* 2006; 47: 1168–74.
10. Vasan RS, Larson MG, Leip EP et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2001; 345 (18): 1291–7.
11. Oelkers W, Foidart JM, Dombrovic N et al. Effects of a new oral contraceptive containing an antimineralocorticoid progestogen, drosiprenone, on the renin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1816–21.
12. Прилепская ВН. Руководство по контрацепции. М., 2006.
13. Halbreich U, Backstrom T, Eriksson E et al. Clinical diagnostic criteria for premenstrual syndrome and guidelines for their quantification for research studies. *Gynecological Endocrinology* 2007; 23 (3): 123–30.
14. Angst J, Sellaro R, Stolar M et al. The epidemiology of premenstrual psychological symptoms. *Acta Psychiatr Scand* 2001; 104: 110–6.
15. Borenstein JE, Dean BB, Endicott J et al. Health and economic impact of the premenstrual syndrome. *J Reprod Med* 2003; 48: 515–24.
16. Chawla A, Swindell R, Long S et al. Premenstrual dysphoric disorder: is there an economic burden of illness? *Med Care* 2002; 40: 1101–12.
17. Halbreich U. The diagnosis of premenstrual syndromes and premenstrual dysphoric disorder – clinical procedures and research perspectives. *Gyn Endocrinol* 2004; 19: 320–34.
18. Wittchen HU, Becker E, Lieb R, Krause P. Prevalence, incidence and stability of premenstrual dysphoric disorder in the community. *Psychol Med* 2002; 32: 1119–32.
19. Endicott J, Nee J, Harrison W. Daily Record of Severity of Problems (DRSP): reliability and validity. *Arch Women Ment Health* 2006; 9: 41–9.
20. Pearlstein TB, Bachmann GA, Zucar HA, Yonkers KA. Treatment of premenstrual dysphoric disorder with a new drosiprenone-containing oral contraceptive formulation. *Contraception* 2005; 72: 414–21.
21. Malone JM, Kunz M, Lee-Rugh S et al. Drosiprenone 3 mg/ethynodiol 20 mcg combined oral contraceptive in the treatment of acne vulgaris: lesion count. *ISGA Obstet Gynecol* 2007; 109: 115.
22. Koltun W, Lucky AW, Thiboutot D et al. Efficacy and safety of 3 mg drosiprenone/20 mcg ethynodiol oral contraceptive administered in 24/4 regimen in the treatment of acne vulgaris: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Contraception* 2008; 77: 249–56.
23. Gray RH. Biological and social interactions in determination of late fertility. *J Biosoc Sci* 1979; Suppl. 6: 97–115.
24. Archer DF, Thorneycroft IH, Foegh M et al. Long-term safety of drosiprenone-estradiol for hormone therapy: a randomized, double-blind, multicenter trial. *Menopause* 2005; 12: 716–27.
25. White WB, Pitt B, Preston RA, Hanes V. Effect of a New Hormone therapy, DRSP and 17  $\beta$ -E2 in Postmenopausal Women with Hypertension. *Hypertension* 2006; 48: 1–8.
26. Прилепская ВН. Новые возможности и перспективы современной контрацепции. Пробл. репродукции. 2009; 5: 59–61.
27. Knuutila J, Kallokoski R, Janatuinen T et al. Effect of estradiol-drosiprenone hormone treatment on myocardial perfusion reserve in postmenopausal women with angina pectoris. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1648–52.
28. Carpio M, Zennaro M-C, Feve B et al. Potential role of progestogens in the control of adipose tissue and salt sensitivity via interaction with mineralocorticoid receptor. *Climacteric* 2008; 11: 258–64.
29. Tarko LB, Christiansen C. Effects of 17  $\beta$ -oestradiol plus different doses of drosiprenone on adipose tissue, adiponectin and atherogenic metabolites in postmenopausal women. *J Internal Med* 2005; 258: 544–53.
30. Порыжкина ОН, Адашева ТВ, Задионченко В.С. и др. Эффективность и безопасность применения препарата Анжелик у пациенток с метаболическим синдромом в постменопаузе. 2008.

# Молекулярные механизмы дидрогестерона (Дюфастон®). Полногеномное исследование транскрипционных эффектов рецепторов прогестерона, андрогенов и эстрогенов

И.Ю.Торшин<sup>2, 3</sup>, О.А.Громова<sup>2,3</sup>, Г.Т.Сухих<sup>1</sup>, С.А.Галицкая<sup>3</sup>, И.С.Юргель<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И.Кулакова, Москва;

<sup>2</sup>Вычислительный центр им. А.А.Дородницына РАН;

<sup>3</sup>ГОУ ВПО Ивановская государственная медицинская академия Росздрава

#### Резюме

Дидрогестерон – высокоселективный прогестаген, использующийся при широком спектре гинекологических заболеваний. Из всех стероидных рецепторов, дидрогестерон значительно взаимодействует только с прогестерон-рецепторами. Результаты проведенного нами ранее исследования моделей структур комплексов прогестин-рецептор позволяют предположить, что ключевым моментом высокой селективности и специфичности дидрогестерона является уникальное для этой молекулы позиционирование метильной группы C<sub>19</sub>. Некоторые другие препараты прогестинов взаимодействуют и с другими типами рецепторов и как следствие приводят к нежелательным побочным эффектам. Побочными эффектами применения некоторых прогестинов являются вирилизация, являющаяся результатом активации андрогеновых рецепторов и также нежелательная активация эстрогеновых рецепторов. В настоящей работе мы приводим результаты полногеномного исследования транскрипционных эффектов активации прогестероновых, андрогенных и эстрогеновых рецепторов. Результаты показывают, что эти три типа рецепторов активируют существенно разные группы генов. Путем анализа функционального связывания установлены гены, предположительно влияющие на вирилизацию или феминизацию плода. Результаты исследования подчеркивают, что использование разновидностей прогестинов, побочно активирующих эстрогеновые или андрогеновые рецепторы, нежелательно при беременности и вмешивается в гормональные процессы развития плода. И, наоборот, применение во время беременности высокоселективных прогестинов (например, дидрогестерона) является безопасным для правильного развития плода как женского, так и мужского пола.

## Введение

Прогестагены – стероидные гормоны, необходимые для поддержания беременности и других функций (например, поддержки менструального цикла). Идея использовать препараты прогестерона для лечения угрозы прерывания беременности относится к 1960-м годам [1]. Необходимость прогестерона в поддержании беременности показана в экспериментах, в которых индуцировалось прерывание беременности введением антител к прогестерону. Выкидыши предотвращались введением прогестерона. Однако длительное время применение прогестерона в виде инъекций масляного раствора не рекомендовалось в связи с тем, что, как полагали, он обладает слабым вирилизирующим действием на плод женского пола. Дискуссия о том, оказывают ли гестагены, применяемые во время беременности, какое-либо влияние на плод, в том числе на его физическое и половое развитие, продолжается. Именно эти вопросы заставляют задуматься о том, какие именно эффекты реализуются посредством воздействия лекарственно-го препарата (прогестагена) на разные типы стероидных рецепторов.

Дидрогестерон (действующее нача-ло препарата Дюфастон<sup>®</sup>) – высоко-селективный прогестаген, не облада-ющий андрогенными или эстроген-ными свойствами. Как показали ре-зультаты проведенного нами ранее исследования структурных и энерге-тических свойств моделей прогес-тина-рецептор [2], дидрогестерон ха-рактеризуется одной из самых высо-ких энергий связывания с прогесте-роновым рецептором и самыми низ-кими энергиями связывания с други-ми разновидностями стероидных ре-цепторов. Пертурбационный анализ структуры дидрогестерона показал, что наличие метильной группы  $C_{19}$  в  $\alpha$ -положении является наиважней-шим фактором, определяющим высо-кую активность и специфичность дидрогестерона (рис. 1).

Проведенное нами изучение моде-лей структур прогестин-рецептор указано, в частности, на необходи-мость проведения рентгеноструктур-ных исследований комплексов дидро-гестерона и прогестерона с ли-гандсвязывающими доменами стеро-идных рецепторов и, что не менее важно, проведение сравнительных ис-следований связывания дидрогестеро-на и прогестерона с ферментами био-синтеза стероидов. Эксперименталь-ное установление структур комплексов «лекарство–белок» – одна из ос-новных характеристик любого препа-рата в современной молекулярной и клинической фармакологии, указыва-ющая на фундаментальные особенно-сти исследуемого препарата.

Помимо экспериментальных иссле-дований структур комплексов «прогес-тин–белок», не менее важным являет-

ся сравнительное изучение транс-крипционной активности различных прогестинов. Хорошо известно, что основным клеточным механизмом биологического воздействия прогес-терона и других стероидов является активация специальной разновидно-сти рецептора, который затем переме-щается в ядро клетки и активирует/модулирует транскрипцию многих сотен генов [3]. Обычно подобного ро-да исследования проводятся с исполь-зованием методов функциональной геномики и транскриптомики. Изуче-ние транскриптомики того или иного препарата должно быть тщательно спланировано, включать адекватный выбор типов клеток и режима стиму-ляции [4].

Прогестины связываются со стеро-идными рецепторами и активируют транскрипцию генов. Некоторые про-гестины или их метаболиты активиру-ют не только прогестероновые ре-цепторы, но и другие типы стероидных ре-цепторов, что и приводит к побоч-ным эффектам. В настоящей работе предпринята попытка смоделировать возможные различия в экспрессии ге-нов, активируемых разными типами стероидных ре-цепторов. Принимая во внимание разную аффинность про-гестинов к разным типам стероидных ре-цепторов [2], эти модельные данные по экспрессии генов будут отражать биологический эффект того или ино-го прогестина.

Моделирование проводилось по-средством полногеномного анализа сайтов связывания стероидных ре-цепторов. Для анализа использовался раз-работанный авторами интегральный метод аннотации генов и нуклеотид-ных полиморфизмов [4, 5]. Вирилизация (от лат. *virilis* – мужской), протека-ющая вследствие активации андроген-ных ре-цепторов, – наиболее серьез-ный побочный эффект некоторых прогестинов или их производных. Из-лишняя активация эстрогеновых ре-цепторов также нарушает гормональ-ный баланс и беременной, и плода. Бол-ее того, избыточная активация эстрогеновых ре-цепторов приводит к ги-перпролиферации клеток и увеличи-вает риск канцерогенеза. Поэтому в данной работе изучалась сравнитель-ная транскриптомика именно прогес-теронового, андрогенного и эстроге-нового ре-цепторов. Это исследование позволило получить детальную ха-рактеристику различий молекулярно-биологических механизмов действия дидрогестерона, прогестерона и дру-гих прогестинов.

## Методы исследования

Анализ транскрипции определенными факто-рами транскрипции – составная часть интегрального метода аннотации генов и нуклеотид-ных полиморфизмов. Этот метод анализирует возможное функциональное значение каждого участка гена и находящихся в нем полиморфиз-мам [5] через систематический перебор фунда-

ментальных молекулярно-биологических механиз-мов (транскрипция, трансляция, стабильность ДНК функции белков и т.д.).

Для предсказания возможных сайтов связыва-ния стероидных ре-цепторов использовались ста-тистические модели распознавания стероид-ак-тивных участков ДНК (*steroid-responsive element – SRE*). Известно, что консенсусная последователь-ность ДНК соответствующая, например, эстроген-активному элементу (*estrogen-responsive element – ERE*), обычно цитируется как *GGTC-Анти-TGACC*, варьирует в разных генах и может прини-мать такие формы, как *GGGCA-nnn-TGACC*, *GGGCA-nnn-TGACT*, *GAGCA-nnn-TGCC* и т.д. [6, 7]. Для учета этих вариаций использовалась база данных более чем 600 экспериментально опреде-ленных последовательностей стероид-активных элемен-то-в ДНК [8].

Используя множественное выравнивание *SRE*, были рассчитаны матрицы позиционных весов. Элементы такой матрицы содержат инфор-мацию об идентичности соответствующих нуклео-тидов ДНК и вычисляются по следующей формуле:

$$C_i = \left( \frac{1}{\ln(4)} \right) \times \left[ \sum p_i(x) \times \ln(p_i(x)) + \ln(4) \right],$$

$$x = A|C|G|T$$

где  $p_i(x)$  – частота нуклеотида типа  $x$  в пози-ции  $i$ ,  $i=1, L$ , где  $L$  – число нуклеотидов в интересую-щем нас *SRE*. В то время как именно мононуклео-тический вес позиций дает основной вклад, дополне-ние схемы распознавания парными и тройными со-четаниями («взаимодействиями») нуклеотидов значи-тельно увеличивает аккуратность предсказа-зания. Парные и тройные взаимодействия учитыва-ются как произведение частот  $p_i(x)$  индивиду-альных нуклеотидов:

$$p_i(xy) = p_i(x) \times p_i=1(y), \quad i = 1, \dots, L-1$$

$$p_i(xyz) = p_i(xy) \times p_i=2(z), \quad i = 1, \dots, L-2$$

Для распознавания, является ли последователь-ность  $S=s_1 \dots s_L$  длины  $L$  сайтом определенноготи-па *SRE* (т.е. прогестеронсвязывающим, андроген-связывающим и т.д.), использовали матричные рейт-инги сходства (отражавшие, до некоторой степе-ни, энергию связывания [9]), которые рассчи-тывали по следующей формуле:

$$M = \frac{\left[ \sum C_i \times p_i(s_i) - \sum C_i \times \min_x(p_i(x)) \right]}{\left[ \sum C_i \times \max_x p_i(x) - \sum C_i \times \min_x(p_i(x)) \right]}$$

$$x = A|C|G|T, \quad i = 1, \dots, L$$

Для предсказания сайтов *SRE* использовался эм-пирический критерий  $M > 0.8$ . Потенциальные сай-ты связывания исследованных стероидных ре-цепторов (прогестеронового, андрогенового и эстрогенового) изучали в диапазоне – 4000.0 нуклеоти-дов от сайта начала транскрипции (ATG<sub>-</sub>). Списки генов, полученные в результате полногеномно-го предсказания сайтов транскрипции, анализи-ровали посредством функционального связывания [5] с исполь-зованием функциональных категорий стандартной аннотации генома человека.

## Результаты исследования

По результатам полногеномного анализа установлено, что активация прогестероновых ре-цепторов приведет к модулированию транскрипции по крайней мере около 1800 генов, ак-тивация эстрогеновых ре-цепторов – к модулированию экспрессии около 600 генов, а активация андрогенных

**Рис. 1. Структурные особенности, отличающие дидрогестерон (Дюфастон®) от прогестерона и других прогестинов. Наиажнейшая из них –  $\alpha$ -положение метильной группы C<sub>19</sub>.**



рецепторов – к изменениям в транскрипции около 250 генов. Попарное сравнение этих трех списков генов показало значительные различия.

Так, экспрессия только 59 генов может модулироваться как прогестероновыми, так и андрогенными рецепторами. Другими словами, прогестероновые рецепторы активируют около 1740 генов, которые не могут быть активированы андрогеновыми рецепторами. И, наоборот, андрогеновые рецепторы активируют около 200 генов, которые не активируются прогестероновыми рецепторами.

Подобная ситуация наблюдается и по отношению к эстрогеновым рецепторам. Экспрессия 140 генов модулировалась и прогестероновыми, и эстрогеновыми рецепторами. Прогестероновые рецепторы активируют около 1660 генов, которые не могут быть активированы андрогеновыми рецепторами, а эстрогеновые рецепторы могут активировать около 460 генов, которые не активируются прогестероновыми рецепторами. Таким образом, активация андрогенового и эстрогенового рецепторов приводит к молекулярно-биологическим эффектам, существенно отличающимся от эффектов прогестерона.

Очевидно, что сравнение функциональных особенностей столь больших массивов данных по экспрессии генов не может проводиться вручную и необходимо использовать какую-то форму компьютерной обработки данных. Для анализа функциональных сходств и различий использовали стандартные функциональные категории, которыми аннотирован геном человека (так называемые GO-категории, от англ. gene ontology). Более подробный анализ функциональных различий проводили посредством метода функционального связывания [5], позволяющего проверить отношение групп функциональных категорий к интересующему физиологическому процессу (например, вирлизации).

Одним из показателей сходств и различий молекулярных эффектов генов является использование наиболее распространенных функциональных категорий («регуляция транскрип-

тии», GO0006355; «внутриклеточная передача сигнала», GO0007165 и т.д.). Сравнение основных функциональных категорий 3 групп генов показало, что каждый из 3 рецепторов активирует гены, участвующие в фундаментальных клеточных процессах (рис. 2). В то же время процент этих генов достаточно невелик: например, гены, участвующие в процессах транскрипции, составляют менее 10% от всех активированных генов.

Следует отметить, что списки генов, принадлежащие категориям «связывание цинка», «связывание ДНК», «фактор транскрипции», «регуляция транскрипции», совпадают не менее чем на 80%. Другими словами, белки, соответствующие этим генам, связывают цинк, ДНК и, являясь факторами транскрипции, регулируют этот фундаментальный клеточный процесс. ДНК-связывающие домены типа цинковый палец входят в состав по крайней мере 1/3 всех факторов транскрипции в геноме человека [10]. Например, все стероидные рецепторы содержат ДНК-связывающие домены типа цинковый палец. Последний факт имеет огромное значение для любой терапии стероидными препаратами. Цинк абсолютно необходим для активации ДНК-связывающих доменов рецепторов (рис. 3), и на фоне дефицита цинка активация транскрипции будет резко замедлена даже при связывании рецептором стероида-агониста, т.е., дефицит цинка имеет такой же функциональный эффект, как и дефицит стероидов. Поэтому эффективность терапии прогестинами может быть существенно снижена при дефиците цинка.

Все рецепторы так или иначе стимулируют энергетический метаболизм (категория «митохондрии», GO0005739), но эти гены составляют менее 5% от всех генов, активированных тем или иным рецептором. Каждый из трех рассматриваемых типов стероидных рецепторов активирует гены, отвечающие за фундаментальные клеточные функции, приблизительно в одинаковой пропорции (см. рис. 2). Таким образом, принципиальные различия в транскрипционных

эффектах, производимых исследуемыми стероидными рецепторами, следует искать в более специфических функциональных категориях генов, которые рассматриваются в последующих разделах.

### Прогестероновый рецептор

Большинство эффектов прогестерона, включая влияние на овуляцию и имплантацию яйцеклетки в матку, опосредуются через рецепторы. В большинстве органов-мишеней экспрессия рецепторов прогестерона усиливается под влиянием эстрогена и ослабляется под влиянием самого прогестерона. Форма «В» рецептора приводит к пролиферации клеток, а форма «А» – препятствует пролиферации клеток, вызванной рецептором типа А и рецепторами эстрогенов. Обе формы имеют одинаковый стероидсвязывающий домен. Анализ комплексов прогестинов с этим доменом показал, что особенности структуры дидрогестерона приводят к специфической адаптации всей структуры стероидсвязывающего домена рецептора к молекуле дидрогестерона [2].

В настоящем исследовании найдено, что активация прогестероновых рецепторов приведет к модуляции транскрипции не менее 1800 генов. С помощью анализа функциональной связи найдено 60 специфических функциональных категорий, соответствующих уникальному влиянию активации именно прогестероновых рецепторов на транскрипцию. Данные по основным из этих категорий суммированы в табл. 1.

Данные по функциональным категориям генов позволяют сделать несколько выводов о физиологических процессах, которые стимулируются прогестероном, но не андрогенами и не эстрогенами. Эти процессы относятся прежде всего к организму матери, хотя могут воздействовать и на развивающийся плод. Активация прогестероновых рецепторов приводит к экспрессии генов, связанных с ростом ткани. В частности, увеличиваются уровни агонистов/вспомогательных белков рецептора трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) и рецептора фактора роста эпидермиса (EGF). Эти рецепторы через внутриклеточные сигнальные каскады типа МАРК (митогенактивируемые протеинкиназы) стимулируют прохождение клеточного цикла и деление клеток (переход G2/M при митозе клетки, репликация ДНК, ремонт ДНК, антиоксидантный ответ, стабилизация митотического веретена клатрином). Увеличивая экспрессию генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса, активированные прогестероновые рецепторы способствуют росту тканей и, в частности, эпидермиса. Имеются также неврологические следствия (обонятельные рецепторы, серотониновые рецепторы, обучение и память) и

Рис. 2. Процент генов основных функциональных категорий при активации разных стероидных рецепторов.

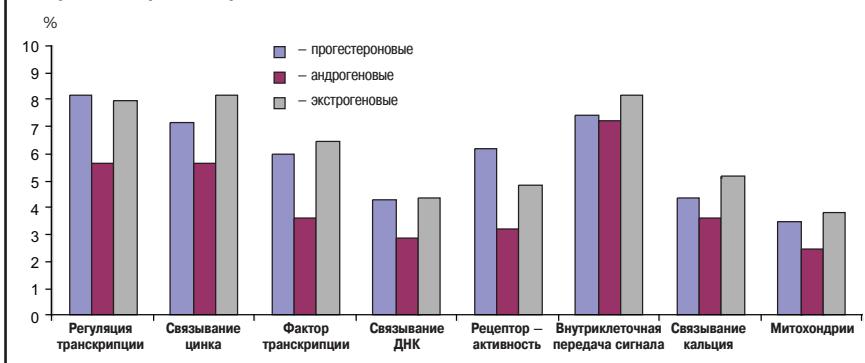


Рис. 3. Доменная структура стероидных рецепторов.

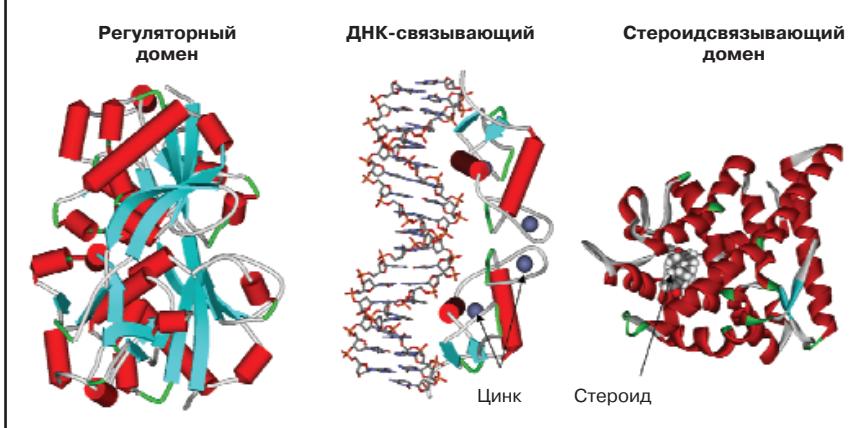


Таблица 1. Основные функциональные категории генов, транскрипция которых уникально активируется прогестероновым рецептором

Категория GO	Число генов	Функциональное значение
04984	24	Обонятельные рецепторы
05201	18	Внеклеточный матрикс
06260	9	Репликация ДНК
08544	9	Развитие эпидермиса
03684	6	Ремонт ДНК
07229	6	Сигнальный каскад интегринов
00187	5	Активация MAPK внутриклеточных сигналов
04993	5	Серотониновые рецепторы
30125	5	Клатриновые покрытия везикул
05160	4	Связывание рецептора TGF-β
07204	4	Увеличение внутриклеточного кальция
07611	4	Обучение и память
08016	4	Регуляция сердечных сокращений
08217	4	Регуляция артериального давления
00086	3	Переход G2/M при митозе клетки
06825	3	Транспорт меди
00302	2	Антиоксидантный ответ
04829	2	Треонин-тРНК-лигаза
04831	2	Тирозин-тРНК-лигаза
05154	2	Рецептор EGF
07530	2	Гендерная дифференциация
01659	1	Терморегуляция
05134	1	Связывание рецептора ИЛ-2
05138	1	Связывание рецептора ИЛ-6
05153	1	Связывание рецептора ИЛ-8

Примечание. TGF – трансформирующий фактор роста, EGF – фактор роста эпидермиса, ИЛ – интерлейкин.

соматические следствия (терморегуляция, регуляция сердечных сокращений, артериального давления – АД) активации прогестероновых рецепторов. Эти результаты важны как для понимания фундаментальных механизм

мов действия прогестинов, так и для осознанного применения различных прогестиновых препаратов в клинической практике. В табл. 2 проводится сравнение этих данных, полученных при проведении полногеномного ана-

лиза, с общизвестными в акушерстве клиническими наблюдениями.

Полногеномное сканирование позволило получить наиболее общий охват физиологических эффектов прогестерона. Каждый из нижеперечисленных выводов требует проведения отдельного систематического анализа с привлечением всех имеющихся биохимических, молекулярно-биологических и клинических данных.

1. Именно активация транскрипции серотониновых рецепторов, а не какие-либо воображаемые метаболиты прогестерона приводят к формированию доминанты беременности. Более того, образование избыточных метаболитов при передозировках прогестероновых препаратов может активировать систему ГАМК и вызывать снижение внимания, когнитивных функций, а при более высоких дозировках – даже раздражение и агрессию.

2. Влияние активированных прогестероновых рецепторов на транскрипцию десятков генов обонятельных рецепторов – результат, который позволяет развить повышенную обонятельную чувствительность у беременных, определить пищевые предпочтения беременных и, вероятно, даже обосновать рекомендацию особых видов пищи в соответствии со специализацией установленных обонятельных рецепторов.

3. Усиление экспрессии рецептора фактора роста эпидермиса – EGF и генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса, указывает на стимулирование прогестероном развития эпидермиса. Это наиболее важно для организма будущей матери, так как обеспечивает увеличение площади кожи на животе и рост брюшинных складок для подготовки организма к родам.

4. Представляет особый интерес изучить более подробно регуляцию АД и токолитический эффект прогестинов в отношении миометрия. Известно, что дидрогестерон вызывает токолитический эффект, в том числе за счет снижения уровней простагландинов в эндометрии. В то же время дидрогестерон (Дюфастон<sup>®</sup>) в отличие от прогестерона не образует биологически активных производных, таких как, например, мифологические «β-метаболиты» и т.д. Следует отметить, что волонтаристская и архаичная терминология типа «β-метаболит» практически неизвестна в современной научной литературе по биохимии и фармакологии (см., например, базу данных PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Поэтому токолитический эффект прогестинов можно отнести именно к активации прогестероновых рецепторов. Регуляция АД важна как фактор, предотвращающий появление и развитие гестозов.

5. Регуляция экспрессии интерлейкинов (ИЛ) и, возможно, других белков, вовлеченных в иммунный ответ, особенно интересна в связи с имму-

**Таблица 2. Функциональные категории генов, регулируемых прогестероновым рецептором, и клинические наблюдения**

Функциональные категории, физиологические процессы	Клинические наблюдения
Усиление транскрипции обонятельных рецепторов	Обострение обоняния у беременных – защитный механизм, сигнализирующий о загрязненной воздушной среде, несвежей пище и т.д.
Усиление транскрипции серотониновых рецепторов и генов, связанных с регуляцией сердечных сокращений и АД	Участие в формировании доминанты беременности (чувство спокойствия, умиротворения, осознание главной задачи – рождение ребенка)
Усиление экспрессии рецептора фактора роста эпидермиса – EGF, МАРК, генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса, рост эпидермиса	Увеличение площади кожи на животе в процессе беременности, рост брюшинных складок для подготовки организма к родам

**Таблица 3. Гены, активируемые андрогеновым рецептором и влияющие на вирилизацию**

Ген	Название	Функция
PAZ7	Фактор транскрипции	Принципиально важен для развития плода (в частности, развития сфинктера уретры)
SEMA4A	Семафорин	Миграция аксонов и иммунитет плода
TNNI2	Тропонин I-2	Ингибиование ангиогенеза
FES	Тирозинкиназа FES	Поддержка трансформации клеток, развитие сперматид
SPTBN4	Спектрин $\beta_4$	Развитие нейронов, влияет на дифференциацию и рост клеток плода
HOXD9	HX D9, фактор транскрипции	Морфогенез, развитие конечностей и гениталий
HSD17B8	Гидроксистероиддегидрогеназа 8	Регулирует уровни эстрогенов и андрогенов
PTP4A1	Тирозинфосфатаза 4A1	Регулировка деления тестикулярных клеток
MEFV	Пирин	Регулятор иммунитета, развитие гениталий
ANKH	Анкилозис-гомолог	Развитие простаты

нотолерантностью во время беременности, благодаря которой возможны прогрессирование беременности и развитие плода. Исследования последних лет показали, что взаимодействие эндогенного прогестерона с собственными рецепторами приводит к стимуляции синтеза так называемого прогестерониндуцированного блокирующего фактора (PIBF), который запускает механизмы иммуносупрессии во время беременности: ингибирование цитотоксичности NK-клеток, изменение пути дифференциации Т-клеток в сторону Th2, преобладание регуляторных противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10). Из всего ряда прогестагенных препаратов, применяемых во время беременности, доказанным воздействием на увеличение продукции PIBF обладает только дидрогестерон (Дюфастон®) (вероятно, в связи с высокой аффинностью к рецепторам прогестерона) [11].

В той или иной мере упомянутые физиологические процессы активируются всеми прогестинами и являются нормальной составляющей действия прогестерона. Некоторые из прогестинов или продуктов их биотрансформаций активируют другие типы стероидных рецепторов, вызывая нежелательные побочные эффекты.

#### Рецептор андрогенов

Андрогенные эффекты – один из основных побочных эффектов применения неселективных прогестинов или прогестинов в повышенных дозах. Используемые в настоящее время гестагены, помимо прогестагенного эффекта, могут вызывать умеренную вирилизацию (появление на лице волосяного пушка и др.). Дидрогестерон не приводит к активации рецептора андрогенов вследствие специфиче-

ской адаптации всей структуры стероидсвязывающего домена рецептора к молекуле дидрогестерона [12]. Это изменение конформации приводит к дестабилизации комплекса дидрогестерон-рецептор и как следствие к отсутствию активации андрогеновых рецепторов дидрогестероном [2].

В настоящем исследовании показано, что активация андрогеновых рецепторов может модулировать транскрипцию около 250 генов. Применение метода анализа функциональной связи с использованием матрицы терминов, построенной на основании цитируемых ниже данных литературы, привело к идентификации 10 генов (табл. 3), активация которых может приводить к андрогенсвязанным побочным эффектам.

Список генов в табл. 3 установлен посредством авторского метода анализа функциональной связи. Не для всех идентифицированных нами генов установлены вирилизирующие эффекты. Тем не менее для некоторых генов эта связь установлена. Так, белок PAX7 необходим для развития сфинктера уретры [13] и участвует во внутриклеточной передаче сигнала через каскады типа WNT. Каскады WNT важны для развития яичек [14] и вирилизации [15]. Белок пирин, кодируемый геном MEFV, является регулятором иммунитета, но также влияет на развитие гениталий [16]. Белковый продукт гена ANKH не только необходим для переработки фосфата, но также участвует в развитии предстательной железы [17]. Гидроксистероиддегидрогеназа 8 (ген HSD17B8) регулирует уровни эстрогенов и андрогенов и, как и другие белки биосинтеза стероидных гормонов (CYP21A2 [18], CYP11A1 [19], HSD3B2 [20]), неизбежно влияет на уровни андрогенов.

В случае андрогеновых и рассматриваемых далее эстрогеновых рецеп-

торов следует подчеркнуть, что для правильной половой дифференциации плода принципиальное значение имеет взаимодействие с этими рецепторами именно эндогенных андрогенов (у плода мужского пола) или эстрогенов (у плода женского пола). Любое экзогенное вмешательство (например, передозировка какого-либо прогестеронового препарата) неизбежно приведет к нарушению половой дифференцировки плода. Поэтому принципиальное значение имеют высокая селективность гестагенного препарата и полное отсутствие взаимодействия препарата или его метаболитов с рецепторами к тестостерону или эстрогенам. В среде детских эндокринологов, занимающихся проблемами нарушений пола, хорошо известно, что если любое вещество связывает андрогеновые рецепторы, это вещество не дает работать собственному, эндогенному тестостерону. Именно в этом случае и возникают аномалии развития репродуктивной системы плода.

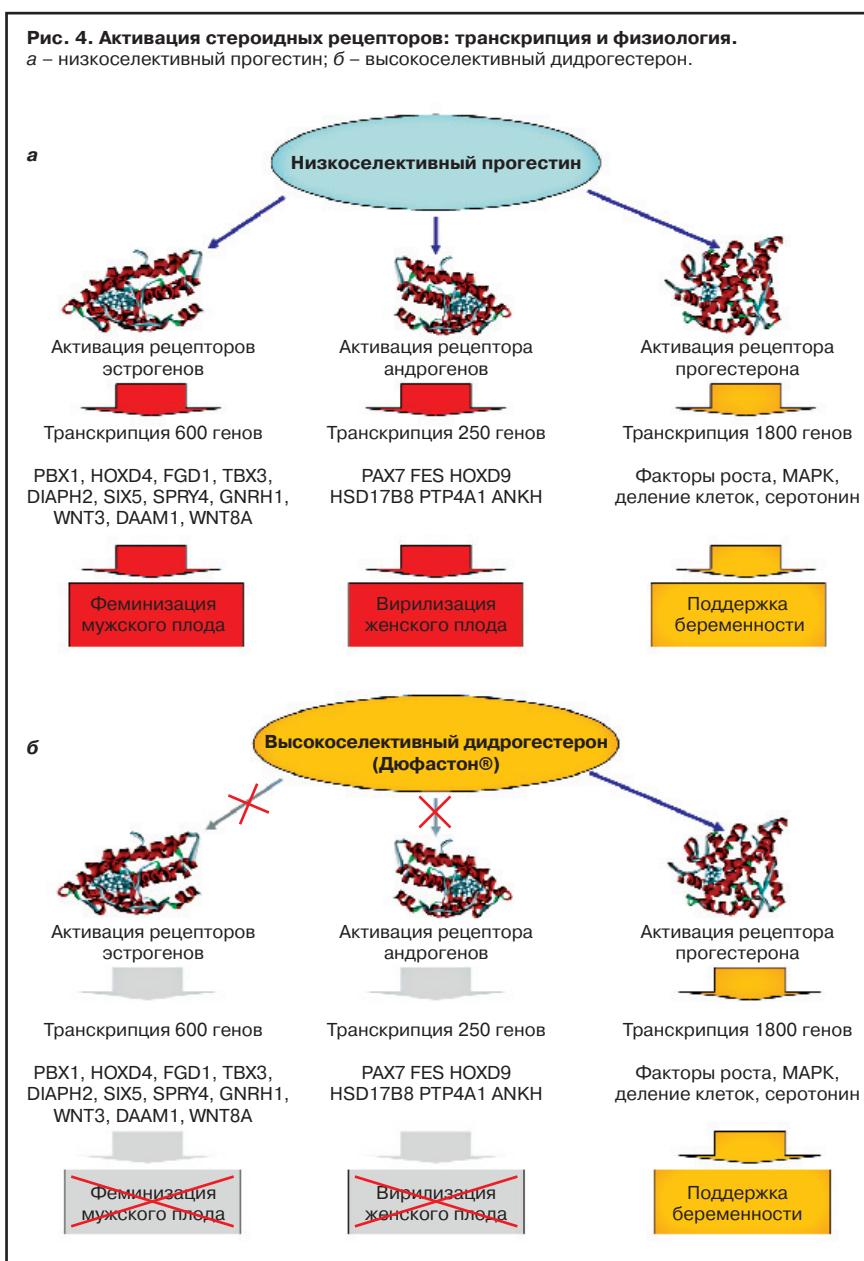
#### Эстрогеновые рецепторы

Рецепторы эстрогена активируются основной формой эстрогена – 17 $\beta$ -эстрадиолом [21]. Формы ER-A и ER-B рецепторов имеют одинаковую структуру стероидсвязывающего домена. Расчет свободных энергий разных прогестинов (в том числе дидрогестерона) показал положительные значения относительной энергии образования комплексов гестоген-рецептор, из чего следует невозможность образования таких комплексов [2]. Однако прогестерон и некоторые другие прогестины будут трансформироваться внутри клеток, а продукты их трансформации (прежде всего эстрадиол) будут взаимодействовать с эстрогеновыми рецепторами.

Таблица 4. Гены, активируемые эстрогеновым рецептором и влияющие на феминизацию и гиперэстрогению

Ген	Название	Функция
PDPN	Подопланин	Поддержка слизистых оболочек
PBX1	PBX1, фактор транскрипции	Взаимодействие с HOXD9: морфогенез, развитие конечностей и гениталий
TNNI2	Тропонин I-2	Ингибиование аngиогенеза
PLXNC1	Плексин C1	Взаимодействие с семафорином: миграция аксонов
HOXC8	HX C8, фактор транскрипции	Развитие хряща
DAAM1	Активатор морфогенеза 1	Внутриклеточная передача сигнала через каскад WNT, изменение цитоскелета при гастроуляции
DLK1	Фактор роста DLK1	Развитие эндокринной системы, рост жировой ткани
HOXD4	HX D4, фактор транскрипции	Морфогенез, развитие конечностей и гениталий
NNAT	Нейронатин	Развитие мозга
PTHR1	Рецептор паратгормона	Развитие соединительной ткани
WNT8A	Белок WNT8A	Сигнальный белок во время эмбриогенеза
HSD17B8	Гидроксистероид дегидрогеназа 8	Регулирует уровень эстрогенов и андрогенов
DIAPH2	Диафан-формин-2	Развитие и рост яичников
ID3	ID3, регулятор транскрипции	Ангиогенез, рост гладкой мускулатуры сосудов
TBX3	T-бокс-3-фактор транскрипции	Развитие конечностей, гland и гениталий
WNT3	Белок WNT3	Сигнальный белок во время эмбриогенеза
DLX3	Белок DLX3	Развитие костной ткани
SIX5	Белок SIX5	Регулирует сперматогенез и рост клеток Лейдига
PLXNB1	Плексин B1	Взаимодействие с семафорином: миграция аксонов
SPRY4	Белок SPRY4	Регулировка роста клеток яичек
GNRH1	Гонадотропинсекретирующий гормон	Рост гонад, развитие яичников, секреция эстрогена
FGD1	Белок FGD1	Развитие гениталий

Рис. 4. Активация стероидных рецепторов: транскрипция и физиология. а – низкоселективный прогестин; б – высокоселективный дидрогестерон.



В настоящем исследовании установлено, что активация эстрогеновых рецепторов может влиять на транскрипцию более 600 генов, и анализ функциональной связи привел к идентификации более 20 генов (табл. 4), которые, по всей видимости, непосредственно влияют на феминизацию и гиперэстрогению при применении прогестинов, активирующих эстрогеновые рецепторы.

Как показывают результаты проведенного полногеномного анализа, активация рецепторов эстрогенов затрагивает экспрессию ряда генов, имеющих прямое отношение к репродуктивной системе: гены, влияющие на развитие гениталий (PBX1, HOXD4, FGD1, TBX3) и поддержку специфических функций клеток репродуктивной системы (DIAPH2, SIX5, SPRY4, GNRH1). Белок Six5 необходим для выживания сперматид и сперматогенеза [22]. Белок DAAM1 участвует во внутриклеточной передаче сигнала через каскад WNT, которые важны для развития яичек [14, 23]. Следует особо отметить, что эстроген регулирует синтез гонадотропинсекретирующего гормона (ген GNRH1) – центрального репродуктивного гормона. Избыточная активация эстрогеновых рецепторов воздействует на уровни белков раннего развития плода (WNT3, DAAM1, WNT8A), что указывает на риск нарушений программы роста плода. Транскрипционные результаты активации трех исследованных типов рецепторов представлены на рис. 4.

#### Заключение

Ряд прогестинов, несмотря на их «естественное» происхождение и «полную аналогичность» прогестерону, могут вызывать побочные эффекты вследствие нежелательной активации непрогестероновых стероидных рецепторов. С использованием методов анализа всей последовательности ге-

нома человека в настоящей работе мы изучили различия в транскрипционных эффектах трех групп стероидных рецепторов: прогестеронового, андрогенового и эстрогенового. Каждый из этих рецепторов активирует экспрессию многих сотен различных генов. Анализ позволил установить гены, активация которых стероидными рецепторами может значительно влиять на развитие плода в целом и репродуктивной системы плода в частности.

В целом активация прогестероновых рецепторов будет управлять транскрипцией около 1800 генов, эстрогенового – транскрипцией около 600 генов, андрогенового – около 250 генов. Активация всех 3 рецепторов соответствует управлению транскрипцией более 2400 генов (около 10% всего генома человека). Применение неселективных прогестинов, повышенных доз прогестинов или прогестинов, метаболиты которых активируют эстрогеновые рецепторы, приведет к вмешательству в экспрессию всех этих 2400 генов. В то же время для поддержания беременности прогестерон активирует только около 1800 генов. Таким образом, селективность взаимодействия прогестинов со стероидными рецепторами – фундаментальный фактор, определяющий спектр побочных эффектов того или иного препарата.

Следует еще раз подчеркнуть, что на развитие побочных эффектов влияет не только взаимодействие самого прогестина с рецепторами, но и биологическая активность метаболитов этого прогестина. В самом деле, даже сам прогестерон при избыточном его употреблении будет неизбежно вызывать побочные эффекты. Это обусловлено тем, что прогестерон является основным промежуточным продуктом в синтезе практически всех остальных стероидных гормонов и прежде всего, эстрогенов и андрогенов. Следовательно, высокие дозы прогестерона будут увеличивать риск развития тех или иных нарушений развития плода вследствие систематических нарушений экспрессии сотен генов. Поэтому необходимо использовать высокоселективные прогестины, которые активируют исключительно прогестероновые рецепторы и в то же время метаболически не преобразуются в агонисты андрогеновых или эстрогеновых рецепторов. Тем не менее использование даже высокоселективных прогестинов также должно соответствовать основному требованию клинической фармакологии: укладываться в диапазон апробированных в акушерстве эффективных, но безопасных доз.

#### Литература

1. Сидельникова В.М., Эндокринология беременности в норме и в патологии. М.: Медпресс-Информ, 2007.
2. Сухих Г.Т., Торшин И.Ю., Громова О.А. Молекулярные механизмы дидрогестерона (Дюфастона). Часть 1: исследование селективности взаимодействия дидрогестерона с прогестероновыми рецепторами. Методами молекулярной механики. Принята к публикации. Проблемы репродукции, 2010.
3. Leonhardt S.A, Boonyaratpalakornkitt V, Edwards D.P. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 2003; 68 (10–13): 761–70.
4. Torsbin I.Yu. *Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine*. NY: Nova Biomedical Books, 2007; 35–67.
5. Torsbin I.Yu. *Bioinformatics in the post-genomic era: sensing the change from molecular genetics to personalized medicine*. In series: «*Bioinformatics in the Post-Genomic Era*». NY: Nova Biomedical Books, 2009.
6. Krieg A.J, Krieg S.A, Abn B.S, Shapiro D.J. Interplay between estrogen response element sequence and ligands controls *in vivo* binding of estrogen receptor to regulated genes. *J Biol Chem* 2004; 279 (6): 5025–34.
7. Jegga AG, Chen J, Gourisankar S et al. *GenomeTrafac: a whole genome resource for the detection of transcription factor binding site clusters associated with conventional and microRNA encoding genes conserved between mouse and human gene orthologs*. *Nucleic Acids Res* 2007; 35.
8. Stepanova M, Lin F, Lin V.C. Establishing a statistic model for recognition of steroid hormone response elements. *Comput Biol Chem* 2006; 30 (5): 339–47.
9. Storno GD. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics* 2000; 16 (1): 16–23.
10. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Intl Human Genome Sequencing Consortium Nature* 2001; 409: 860–920.
11. Kalinka J, Szekeres-Bartko J. The impact of dydrogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *AJRI* 2005; 53: 1–6.
12. Raudrant D, Rabe T. Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs* 2003; 63 (5): 463–92.
13. Yiu R, Lefaucon JP, Atala A. The regeneration process of the striated urethral sphincter involves activation of intrinsic satellite cells. *Anat Embryol (Berl)* 2003; 206 (6): 429–35.
14. Biason-Laufer A, Konrad D. *WNT4 and sex development*. *Sex Dev* 2008; 2 (4–5): 210–8.
15. Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R et al. Genetic interactions of the androgen and Wnt/beta-catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol Endocrinol* 2009; 23 (6): 871–80.
16. Dumaual CM, Sandusky GE, Crowell PL, Randall SK. Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006;



**Дюфастон®**  
диидрогестерон

## Создан для успешной беременности



✓ Чистое прогестагенное действие

✓ Высокая эффективность в низких дозах

✓ Безопасен для матери и плода во время беременности

[www.solvay-pharma.ru](http://www.solvay-pharma.ru)

[www.zdorovievochki.ru](http://www.zdorovievochki.ru)

[www.beremennost.info](http://www.beremennost.info)

- 54 (12): 1401–12.
17. Dharanisekaran SM, Dash A, Yu J et al. Molecular profiling of human prostate tissues: insights into gene expression patterns of prostate development during puberty. *FASEB J* 2005; 19 (2): 243–5.
18. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300 (1–2): 192–6.
19. Pusalkar M, Meberji P, Gokral J et al. *CYP11A1 and CYP17 promoter polymorphisms associate with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome*. *Fertil Steril* 2009; 92 (2): 653–9.
20. Goto M, Piper Harley K, Marcos J et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J Clin Invest* 2006; 116 (4): 953–60.
21. Dabholkar-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA et al. International Union of Pharmacology LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58 (4): 773–81.
22. Sarkar PS, Paul S, Han J, Reddy S. *Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis*. *Hum Mol Genet* 2004; 13 (14): 1421–31.
23. Sato A, Khadka DK, Liu W et al. *Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation*. *Development* 2006; 133 (21): 4219–31.

# Предпосылки к применению омега-3 полинасыщенных жирных кислот у женщин в климактерическом периоде

С.П. Синчихин, О.Б. Мамиев

Кафедра акушерства и гинекологии (зав. – доктор мед. наук О.Б. Мамиев)

ГОУ ВПО Астраханская государственная медицинская академия

В жизни каждого человека, как мужчины, так и женщины, наступает естественный период перехода от половой зрелости к старости, который называется климаксом и может продолжаться 10–20 лет. В этот период значительно снижается активность половых желез и прекращается генеративная функция.

Как известно, человек продолжает достаточно долго жить после прекращения репродуктивной функции. Благодаря адекватной интеллектуальной деятельности, а также при благоприятных социальных условиях он может успешно интегрироваться в общественную жизнь. Любая экспериментальная модель, стремящаяся воспроизвести климакс у животного, не может отражать полной и точной картины возникающих изменений у человека в указанный период.

Как у мужчин, так и у женщины морфологические изменения половых желез начинаются уже с 25–30-летнего возраста, тогда как с функциональной точки зрения инволюция гораздо наблюдается значительно позже. Климактерий у женщин объективно выражается в прекращении менструаций (менопаузы), в то время как у мужчины переход осуществляется очень медленно, и в отдельных случаях с сохранением половой функции и даже воспроизводительной способности вплоть до пожилого возраста. Возможно, что биологическое значение этой межполовой разницы связано со значительно более комплексной ролью женщины в процессе деторождения, требующей больших морфофункциональных ресурсов во многих системах организма для благополучного сохранения беременности и успешного родоразрешения.

Физиологический возраст наступления климактерия у женщин зависит от расовых и наследственных факторов, общего состояния здоровья, времени наступления менархе.

Прекращение менструаций не происходит синхронно с прекращением овуляции. Известно, что в период полового созревания и в первые годы половой зрелости менструальные циклы часто являются ановуляторными. В климактерическом периоде наблюдаются те же явления – становятся более частыми ановуляторные менструальные циклы. Поэтому вероятность наступления беременности в климактерическом периоде снижается, но не исключается. В некоторых клинических случаях женщина может иметь беременность в климактерическом периоде и даже, что наблюдается очень редко, через несколько месяцев после прекращения последней менструации ввиду спонтанно возникшей овуляции. Образование желтого тела после прошедшей овуляции в менопаузальном периоде доказывается гистологическим исследованием слизистой оболочки матки по поводу маточного кровотечения, когда в соскобе эндометрия обнаруживают морфологическую картину секреторной фазы.

Согласно современным представлениям климактерический период (син.: климакс, климактерий) у женщин обусловлен функциональными изменениями в системе гипоталамус – гипофиз – яичники и выражается в постепенном прекращении менструаций с последующим почти полным угасанием гормональной активности яичников на фоне общих возрастных изменений [15, 18].

Клинически удобным представляется разделение климактерического пе-

риода на следующие фазы.

Пременопауза характеризуется нарушением ритма менструаций и продолжительности менструального цикла. У большинства женщин постепенно увеличиваются интервалы между менструациями и уменьшается интенсивность кровотечений. Реже наблюдается укорочение интервалов и усиление кровотечений. В пременопаузе могут наблюдаться соматические и психологические изменения, обусловленные гипоэстрогенемией. В некоторых ситуациях клиническим проявлением, связанным с угасанием функции яичников, женщина или ее врач не придают должного значения и могут связывать обострение сопутствующей экстрагенитальной патологии или появление быстрой утомляемости, слабости, раздражительности с физическим или психическим перенапряжением. Вместе с тем раннее выявление и своевременное лечение совместно с другими врачами терапевтического профиля клинически неблагоприятного течения пременопаузы позволяет предупредить развитие тяжелого климактерического синдрома в будущем. Пременопауза наступает обычно в возрасте 45 лет или несколько позже и продолжается около 4–5 лет до полного прекращения менструаций.

Менопауза наступает после последнего менструально-подобного маточного кровотечения. Возраст менопаузы определяется ретроспективно, по истечении 1 года после последней менструально-подобной реакции. В настоящее время средний возраст наступления менопаузы составляет 50–51 год. На возраст наступления менопаузы влияют курение, прием гормональных контрацептивов, голодание, стрессы, проживание над уров-