

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИОЛОГИИ

Нурмиева Динара Альбертовна

Выпускная квалификационная работа бакалавра

**Структурно-функциональные изменения
эндометрия при воздействии мепрегенола диацетата –
синтетического аналога прогестерона**

Научный руководитель:
Руководитель лаб. клеточной биологии
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»,
профессор РАН, д.б.н. В.О. Полякова

Научный консультант:
Ведущий научный сотрудник
группы фармакологии
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»,
к.б.н. М.А. Петросян

Санкт-Петербург, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Структурно-функциональная организация эндометрия человека	6
1.1.1 Морфология и клеточный состав эндометрия	6
1.1.2 Функциональные изменения в эндометрии в течение менструального цикла.....	7
1.2 Прогестерон и его роль в регуляции репродуктивной функции.	13
1.2.1 Стероидогенез. Строение и функции прогестерона.....	13
1.2.2 Рецепторы прогестерона: типы, структура, распределение в тканях.....	17
1.2.3 Молекулярные механизмы действия прогестерона	20
1.3 Гестагены – синтетические аналоги прогестерона	22
1.3.1 Обзор существующих гестагенов. Их классификация, сходство, различие	22
1.3.2 Методы изучения гестагенной активности	24
1.3.3 Мепрегнола диацетат – новый аналог прогестерона.....	26
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Дизайн эксперимента.....	28
2.2 Характеристика экспериментальных животных	28
2.3 Метод изучения гестагенной активности лигандов прогестеронового рецептора - тест Clauberg-McPhail.....	29
2.4 Приготовление гистологических препаратов ткани матки	31
2.5 Статистическая обработка полученных результатов.....	32
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Метод Клауберга-МакФейла по изучению гестагенной активности мепрегнола диацетата	33
3.2 Гистологическая характеристика эндометрия кроликов после воздействия разных доз мепрегнола диацетата.....	34

3.3 Влияние разных доз мепрегенола диацетата на степень секреторной трансформации эндометрия кроликов	37
3.4 Изучение корреляции между степенью секреторной трансформации эндометрия кроликов и относительной массой маток при воздействии различных доз мепрегенола диацетата	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
ВЫВОДЫ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	45

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время лекарственные препараты на основе прогестерона находят широкое применение в клинической практике. Они не заменимы в акушерстве при невынашивании и угрозе прерывания беременности, в терапии гинекологических заболеваний, связанных с прогестероновой недостаточностью, а также в качестве гормональных контрацептивных препаратов, применение которых является эффективным средством регулирования рождаемости и предупреждения абортов, главным осложнением которых является бесплодие. За последние 20 лет перечень гестагенов значительно вырос: появились более активные препараты, изменялся спектр их действия, дозы и режимы назначения, пути введения в организм, расширились показания к их применению (Корхов В. В., Лесик Е. А., Петросян М. А., 2004). Однако использование прогестинов в клинической практике нередко связано с рядом побочных эффектов, таких как влияние на плотность кости, артериальное давление, иммунная функция, неврологические эффекты, а также влияние на перепады настроения, увеличение веса, приливы и потеря либидо. Нежелательные эффекты гестагенных препаратов вызваны различиями в их метаболизме, фармакокинетике, биодоступности, специфичности для белков сыворотки, а также разным сродстве к различным стероидным рецепторам или изоформам рецепторов, опосредующих действие гормона (Africander, 2011).

Учитывая вышесказанное, поиск новых прогестинов, проявляющих наименьшие побочные эффекты, продолжается во всем мире. Одним из таких соединений, безопасность и эффективность которого исследуется в настоящее время, является мепрегенола диацетат. Данный стероид обладает избирательным действием в отношении рецепторов прогестерона и практически индифферентен в отношении других ядерных рецепторов, что делает его привлекательным для клинического применения.

Для изучения возможности использования нового гестагенного препарат в акушерско-гинекологической практике важно получить ясное представление о его влиянии на морфологию эндометрия – главной ткани-мишени прогестерона и его аналогов. Способность гестагена вызывать значительную трансформацию эндометрия

иметь большое значение для эффективной подготовки эндометрия к наступлению беременности в случае прогестерондефицитных состояний. Полученные результаты также послужат для накопления общих знаний о влиянии гестагенов на эндометрий. Поэтому наше исследование было направлено на изучение влияния мепрегенола диацетата на структурно-функциональные изменения эндометрия экспериментальных животных.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Освоить метод изучения гестагенной активности мепрегенола диацетата.
2. Охарактеризовать гистологические изменения эндометрия кроликов после воздействия разных доз мепрегенола диацетата.
3. Оценить влияние мепрегенола диацетата на степень секреторной трансформации эндометрия кроликов.
4. Изучить корреляцию между степенью секреторной трансформации эндометрия кроликов и массой органа-мишени при воздействии разных доз мепрегенола диацетата.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структурно-функциональная организация эндометрия человека

1.1.1 Морфология и клеточный состав эндометрия

Эндометрий представляет собой многослойную динамически изменяющуюся ткань внутренней поверхности матки, и включает функциональный и базальный слой. Каждый месяц во время менструации клетки функционального слоя отделяются от базального. Базальный слой прикрепляется к миометрию и остается неповрежденным во время менструации, служа основой для регенерации функционального слоя эндометрия. Эндометрий состоит из нескольких различных типов клеток, в том числе, эпителиальных клеток просвета и железы, стромы с фибробластическими клетками, иммунокомпетентных клеток и кровеносных сосудов. Количество, активность, структура и функции этих клеток изменяются в течение менструального цикла, а также во время беременности. (Diedrich,2007)

Базальный слой прикрепляется к миометрию и в отдельных участках может проникать в него. Содержит дистальные участки маточных желез, окруженные стромой с плотным расположением клеточных элементов. Мало чувствителен к гормонам. Служит источником восстановления функционального слоя в менструальном цикле, а также при нарушении его целостности после аборта, родов. Получает питание из прямых артерий, отходящих от радиальных, которые проникают в эндометрий из миометрия. Содержит проксимальные отделы спиральных артерий, служащих продолжением радиальных в функциональный слой.

Функциональный слой, при нормальном развитии много толще базального. Адекватный рост эндометрия является важным фактором для успешной имплантации, поэтому проблема тонкого эндометрия активно обсуждается в настоящее время. Рост эндометрия зависит в значительной степени от ангиогенеза и маточного кровотока. Следовательно, тонкий эндометрий может быть обусловлен нарушением ангиогенеза и низким кровотоком матки. При всех имеющихся данных, пороговая толщина между «тонким» и «нормальным» внутренним слоем все еще обсуждается (Miwa , 2009)). Функциональный слой эндометрия высоко чувствителен к гормонам, под влиянием которых изменяется его строение и функция. В конце каждого цикла эндометрий разрушается, восстанавливаясь в следующем цикле. Как было сказано ранее,

снабжается кровью за счет спиральных артерий, которые разделяются на ряд артериол, связанных с капиллярными сетями (Быков, 1997).

Маточные железы (железы эндометрия) – это простые трубчатые железы, местами дихотомически ветвятся вблизи миометрия, а иногда проникают в него на небольшую глубину. Образованы цилиндрическим эпителием (сходным с покровным, но с меньшим числом реснитчатых клеток), функциональная активность и морфологические особенности которого существенно меняются в ходе менструального цикла. Следует отметить, что глубокое внедрение маточных желез рассматривают как патологию – аденомиоз (Deneris, 2016).

Строма эндометрия содержит отростчатые фибробластоподобные клетки (способные к ряду превращений), лимфоциты, гистиоциты и тучные клетки. Между клетками располагается сеть коллагеновых и ретикулярных волокон; эластические волокна обнаруживаются только в стенках артерий. Кровеносные сосуды эндометрия имеют решающее значение для менструации. Спиральная форма артериол в верхних двух третях функционального слоя характерна для менструирующих видов. Такие сосуды участвуют как в поступлении лейкоцитов, так и в вазоконстрикции сосудов; вполне очевидна и их роль в менструации. Сопротивление мелких артериальных сосудов в эндометрии определяется сочетанием эндотелиальных клеток, базальной мембраны и гладкомышечных клеток, которые окружают эту мембрану (Jabbour, 2006)

1.1.2 Функциональные изменения в эндометрии в течение менструального цикла

Существует три классических фазы менструального цикла: преовуляторная фаза с преобладанием эстрогенов, секреторная (лютеиновая или постовуляторная) фаза с доминированием прогестерона и менструальная фаза после отмены прогестерона, сопровождающая гибель желтого тела. Эндометрий является главной тканью-мишенью для стероидных гормонов. За пролиферативные изменения во время фолликулярной фазы овариального цикла отвечает эстроген, а за дифференцировку во время секреторной фазы - прогестерон.

Вторая половина менструального цикла, в которой преобладает прогестерон, состоит из ранней, средней и поздней секреторной фазы. Характер экспрессии половых

стероидных рецепторов в эндометрии в течение секреторной фазы свидетельствует о том, что ранняя секреторная фаза регулируется как эстрогеном, так и прогестероном; средняя секреторная фаза регулируется только прогестероном, так как рецептор эстрогена (ER) в этот момент не экспрессируется в эндометриальных железах и строме; поздняя секреторная фаза связана с прекращением выработки прогестерона и, как следствие, менструацией.

Следует отметить, что у женщин есть два тесно связанных репродуктивных цикла. Менструальный цикл связан с изменениями, происходящими в матке. Менструальные циклы в среднем составляют 28 дней (хотя циклы варьируются в пределах от 20 до 40 дней). Под влиянием физиологических изменений в гипоталамусе и гипофизе в яичниках происходят циклические изменения, определяющие овариальный цикл. Гормональная активность связывает два цикла друг с другом, синхронизируя рост яичникового фолликула и овуляцию с формированием слизистой оболочки матки, которая может поддерживать эмбриональное развитие.

Овариальный цикл начинается с высвобождения из гипоталамуса гонадолиберина, что стимулирует аденогипофиз к выделению небольших количеств ФСГ и ЛГ. Фолликулостимулирующий гормон стимулирует рост фолликула, этому же способствует ЛГ, и клетки растущих фолликулов начинают вырабатывать эстрадиол. В течение большей части фолликулярной фазы наблюдается медленный рост эстрадиола во время которого растут фолликулы и созревают ооциты. Низкие уровни эстрадиола ингибируют секрецию гормонов гипофиза, сохраняя уровни ФСГ и ЛГ относительно низкими.

Когда секреция эстрадиола растущим фолликулом начинает резко возрастать, уровни ФСГ и ЛГ также заметно увеличиваются. В то время как низкий уровень эстрадиола ингибирует секрецию гонадотропинов гипофиза, высокая концентрация имеет противоположный эффект: он стимулирует секрецию гонадотропинов, воздействуя на гипоталамус, увеличивая выработку гонадолиберина. Следует отметить, что высокая концентрация эстрадиола увеличивает чувствительность к гонадолиберинам клеток в гипофизе, высвобождающих ЛГ. Кроме того, фолликулы сильнее реагируют на ЛГ на этой стадии, потому что у большинства клеток есть рецепторы для этого гормона.

Увеличение концентрации ЛГ, вызванное повышенной секрецией эстрадиола из растущего фолликула, является примером положительной обратной связи. Результатом является окончательное созревание фолликула. Созревающий фолликул, содержащий заполненную жидкостью полость, увеличивается, образуя выпуклость вблизи поверхности яичника. Фолликулярная фаза заканчивается овуляцией, примерно через день после всплеска выброса ЛГ. В ответ на повышение уровня ЛГ фолликул и прилегающая стенка яичника разрываются, высвобождая вторичный ооцит.

За овуляцией следует лютеиновая фаза овариального цикла. ЛГ стимулирует превращение фолликулярной ткани, оставшейся в яичнике в желтое тело, которое секретирует прогестерон и эстроген. При продолжительной стимуляции ЛГ желтое тело выделяет прогестерон и эстрадиол. По мере повышения уровня прогестерона и эстрадиола комбинация этих стероидных гормонов проявляется отрицательная обратная связь с гипоталамусом и гипофизом; в результате секреция ЛГ и ФСГ сильно снижается. Эта отрицательная обратная связь препятствует созреванию другой яйцеклетки во время вероятной беременности.

Ближе к концу лютеиновой фазы низкие уровни гонадотропина приводят к деградации желтого тела, вызывая резкое снижение концентраций эстрадиола и прогестерона. Снижение уровня стероидных гормонов яичников приводит к ослаблению отрицательной обратной связи с гипоталамусом и гипофизом. Гипофиз может снова начать выделять достаточное количество ФСГ, чтобы стимулировать рост новых фолликулов в яичнике, инициируя следующий овариальный цикл.

Такие же циклические изменения происходят в менструальном цикле. До овуляции стероидные гормоны яичников готовят матку к возможному появлению эмбриона и его дальнейшему развитию. Эстрадиол, выделяемый в возрастающих количествах растущими фолликулами приводит к утолщению эндометрия. Таким образом, фолликулярная фаза овариального цикла координируется с пролиферативной фазой маточного цикла. После овуляции эстрадиол и прогестерон, выделяемые желтым телом, стимулируют дальнейшее развитие слизистой оболочки матки, в том числе рост артерий и желез эндометрия. Таким образом, лютеиновая фаза овариального цикла координируется с секреторной фазой менструального цикла (Reese, 2014).

Под влиянием стероидных гормонов эндометрий претерпевает значительные изменения и становится рецептивным только в течение нескольких дней в середине секреторной фазы менструального цикла. Просветный эпителий является местом первого контакта матки с бластоцистой и, соответственно, он значительно дифференцируется в течение «имплантационного окна», чтобы облегчить прикрепление эмбриона и последующую имплантацию. Трансформация плазматической мембраны в клетках просветного эпителия из неадгезивной поверхности в адгезивную включает в себя ремоделирование элементов, которые вносят вклад в барьерную функцию эндометрия, таких как гликокаликс, полярность эпителиальных клеток, эпителиально-мезенхимальный переход и латеральные комплексы контактов. Важно отметить, что у людей плацентарные трофобласты проникают между эпителиальными клетками без разрушения эпителия, которое наблюдается у других видов с гемохориальным типом строения плаценты. Этот тип является наиболее инвазивным, т.к. материнская кровь непосредственно контактирует с хорионом вследствие нарушения целостности децидуальной оболочки матки со вскрытием ее сосудов. Встречается у приматов, кроликов, крыс и мышей.

Дефекты во взаимодействии между эмбрионами и эпителием эндометрия в значительной степени способствуют бесплодию и проблемам с имплантацией эмбриона.

Известные на данный момент молекулярные изменения, влияющие на рецептивность эндометрия человека и происходящие в его просветном эпителии, влияют на интегрины, остеопонтин, Notch-сигналинг, гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста, муцины, связанные с поверхностью клетки, гликоделин и ионные каналы. Некоторые цитокины, вероятно, также играют важную роль в восприимчивости эпителия эндометрия (Evans, 2016).

После распада желтого тела быстрое падение уровня гормонов в яичниках приводит к сужению артерий в эндометрии. В связи с нарушением кровообращения, большая часть слизистой оболочки матки отторгается, а матка, в ответ на секрецию главным образом простагландина, сокращается. Мелкие кровеносные сосуды в эндометрии сужаются, и кровь, вместе с тканями эндометрия выделяется из влагалища. Иногда отторжение жизнеспособных клеток эндометрия способно стать причиной такого заболевания, как эндометриоз; по крайней мере, наибольшее распространение

получила именно имплантационная теория возникновения эндометриоза, впервые предложенная Сампсоном в 1921 г. Автор предположил, что формирование очагов эндометриоза происходит в результате ретроградного заброса в брюшную полость жизнеспособных клеток эндометрия, отторгнувшихся во время менструации, и дальнейшей их имплантации на брюшину и окружающие органы (при условии проходимости маточных труб). Соответственно занос частиц эндометрия различными путями в полость малого таза считается критическим моментом развития эндометриоза. Одним из очевидных вариантов такого заноса являются хирургические манипуляции, включая диагностические выскабливания, акушерские и гинекологические операции, связанные со вскрытием полости матки и хирургической травмой слизистой оболочки матки. Ятрогенный момент развития заболевания доказан ретроспективным анализом этиологии эндометриоза у женщин, которым проводились те или иные операции. Значительный интерес представляет возможность метастазирования эндометриоза по кровеносным и лимфатическим сосудам. Такой тип диссеминации частиц эндометрия считают одной из важнейших причин возникновения известных вариантов экстрагенитального эндометриоза, таких как эндометриоз легких, кожи, мышц. Распространение жизнеспособных клеток эндометрия по лимфатическим путям - нередкое явление, о чем свидетельствует достаточно частое обнаружение значительных очагов эндометриоза в просвете лимфатических сосудов и узлах (Ищенко, 2002).

Отторжение слоя эндометрия во время менструации вызывается падением уровня эстрогена и прогестерона по мере деградации желтого тела и рассматривается как воспалительный процесс. Точные клеточные и биохимические механизмы, лежащие в основе менструации, остаются в основном неизвестными; однако считается, что численно большая популяция лейкоцитов, проникающая в ткань непосредственно перед менструацией, также имеет решающее значение. Эти лейкоциты, такие как нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги, специфичные для матки природные клетки-киллеры (uNK) и тучные клетки, могут секретировать широкий спектр медиаторов воспаления, которые способны инициировать очаговый распад эндометрия и усиливать воспалительный ответ по всему эндометрию. Миграция лейкоцитов в ткани регулируется специфическими хемокинами, которые опосредуют адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и инициируют трансэндотелиальную миграцию и органотропизм. На сегодняшний день было продемонстрировано, что эндометрий

продуцирует IL-8, моноцитарный хемотаксический белок-1 и -2, макрофагальный белок воспаления -1 α и -3 α , эотаксин и RANTES (регулируется активацией нормальных Т-клеток, экспрессированных и секретированных). Поскольку IL-8 и моноцитарный хемотаксический белок-1 негативно регулируются прогестероном, утверждается, что прекращение его секреции перед менструацией влияет на повышение экспрессии этих хемокинов (Yang, 2015).

После отделения функционального слоя эндометрия быстро происходит регенерация всех типов клеток, эпителиальных, эндотелиальных и стромальных. Оставшийся базальный слой действует как зародышевый компартмент, из которого растут и дифференцируются различные типы клеток. Медленно растущие плюрипотентные стволовые клетки были обнаружены в эндометрии приматов, где они находятся в базальном слое, ближайшем к миометрию. Эти клетки дифференцируются в коммитированные клетки-предшественники, которые активно пролиферируют, реагируя на соответствующие факторы роста, обеспечивающие быстрый рост ткани.

Существуют данные, подтверждающие что в эндометрии человека и мыши существуют эпителиальные стволовые клетки / клетки-предшественники. Исследования, в которых использовалось клонирование клеток человеческого эндометрия показали, что 0,2% эпителиальных клеток обладают активностью колониеобразующих клеток/колониеобразующих единиц. Однако образуются два типа колониеобразующих клеток: большие (0,09%) и маленькие (0,14%), что приводит к гипотезе о том, что большие колониеобразующие клетки инициируются стволовыми клетками / клетками-предшественниками, которые, по видимому, расположены в базальной части эндометриальных желез. Предполагается, что малые колониеобразующие клетки инициируются более дифференцированными переходными делящимися клетками (Transit-Amplifying Cells, или TACs), которые расположены в функциональном слое. (Gargett, 2008).

Доминирующую роль среди факторов роста играет эстроген, а в случае с эпителиальными клетками, вероятно, участие принимают также EGF (эпидермальный фактор роста), TGF α (трансформирующий фактор роста) и рецептор EGF. И TGF α и EGF конкурируют за рецептор EGF, а вместе с тромбоцитарным фактором роста (PDGF), являются митогенами для эпителиальных клеток из базального слоя. Хотя эндотелины обнаружены в эпителиальных клетках эндометрия и являются мощными

митогенами для этих клеток, т.е. стимулируют их деление, максимальная экспрессия их рецепторов наблюдается в секреторной фазе цикла (Jabbour, 2006).

Нарушение функции эндометрия может привести к широкому кругу расстройств, включая меноррагию (обильные и продолжительные менструации), болезненные менструации (дисменорею), эндометриоз и проблемы при имплантации эмбриона. Одним из самых распространенных заболеваний является меноррагия, которая определяется как чрезмерная менструальная кровопотеря, влияющая на физическое, эмоциональное состояние, социальное и/или материальное качество жизни женщины. Меноррагия может быть результатом патологии матки, системного или даже ятрогенного заболевания. Тем не менее, примерно 50% случаев меноррагии регистрируются при отсутствии распознанной патологии. При таких обстоятельствах заболевание, вероятно, является следствием нарушения хода локальных процессов в эндометрии, приводящих к обильным и/или длительным кровотечениям. Продолжительное менструальное кровотечение (> 8 дней) может быть связано с сильным воспалением во время менструации или с задержкой восстановления сосудов и тканей эндометрия. Увеличение кровотока во время менструации, вероятно, связано с нарушением вазоконстрикции специализированных спиральных артериол эндометрия (Maubin, 2011).

1.2 Прогестерон и его роль в регуляции репродуктивной функции.

1.2.1 Стероидогенез. Строение и функции прогестерона

Стероидные гормоны характеризуются тем, что в их основе лежит ядро циклопентанпергидрофенантрена, или стерана, полициклического комплекса из 17 атомов углерода, образующего систему из четырех колец. По количеству атомов углерода половые стероиды делятся на три группы:

- прогестины, характеризующиеся 21 атомом углерода;
- андрогены, характеризующиеся 19 атомами углерода;
- эстрогены, характеризующиеся 18-атомами углерода.

Предшественником всех стероидных гормонов является холестерин. Его синтез начинается с промежуточного преобразования двух молекул ацетил-КоА и протекает через образование двух промежуточных продуктов - сквалена и ланестерола (5).

Холестерин, переносимый в плазме в виде холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), взаимодействует с мембранными рецепторами и интернализуется в везикулы, а затем сливается с лизосомами. Лизосомные гидролазы обеспечивают внутриклеточное высвобождение холестерина в свободной форме, который транспортируется в митохондрии для последующего превращения в прегненолон. Прегненолон, высвобождаемый из митохондрий под действием цитохрома P450, может следовать по двум метаболическим путям:

D5-гидроксистероидный путь, который приводит к синтезу 17 - гидроксипрегненолона, дегидроэпиандростерона (DHEA) и андростендиола, и является основным метаболическим путем в надпочечниках, а не в лютеинизированном фолликуле,

D4-кетостероидный путь, который приводит к синтезу 17 - гидроксипрогестерона и андростендиона, и характерен для зернистых клеток желтого тела (рис. 1).

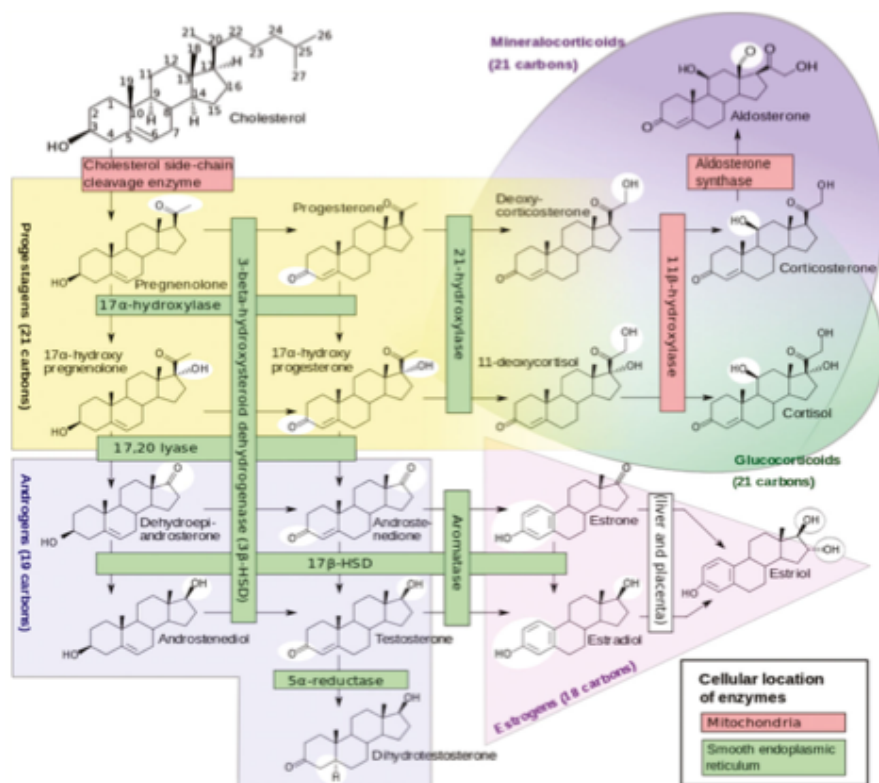


Рис. 1. Стероидогенез.

В то время как прогестерон, вырабатываемый из гонад, в основном циркулирует в крови для осуществления своей биологической функции, прогестерон надпочечникового происхождения в основном превращается в глюкокортикоиды и андрогены. Прогестерон циркулирует в кровотоке в форме, связанной с кортизол-связывающим глобулином (около 10%) и сывороточным альбумином. Прогестерон имеет относительно короткий период полураспада в организме продолжительностью пять минут. Гормон метаболизируется в печени, и метаболиты выводятся с мочой. (Taraborrelli, 2015)

Что касается основных функций, которые прогестерон выполняет в организме, то этот гормон крайне необходим для имплантации эмбриона и сохранения беременности на ранних сроках. Рассмотрим функции прогестерона в течение менструального цикла. В фолликулярной фазе менструального цикла преобладает секреция эстрогена, а в лютеиновой фазе менструального – прогестерона. Секреция прогестерона преобразует пролиферирующий эндометрий в секреторный, готовый принять бластоцисту. Перед овуляцией зернистые клетки в фолликуле синтезируют и выделяют эстроген. После разрыва фолликула и высвобождения яйцеклетки эти клетки созревают с образованием желтого тела, которое отвечает за секрецию прогестерона и эстрогена в последней фазе цикла. В случае с человеческим организмом, если оплодотворение не произойдет в течение 1–2 дней, желтое тело будет увеличиваться в течение 10–12 дней с последующей регрессией и сопутствующим прекращением секреции эстрогена и прогестерона. Если же оплодотворение произойдет, желтое тело будет продолжать расти и функционировать в течение первых 2-3 месяцев беременности. По истечении этого срока желтое тело постепенно начнет регрессировать, поскольку далее функцию секреции гормонов для поддержания беременности будет выполнять плацента (Леонова З. А., Флоренсов В. В, 2013).

Большое количество прогестерона выделяется также при дифференцировке (лютеинизации) зернистых клеток. Открытие того, что эти клетки экспрессируют рецепторы к прогестерону, позволило предположить, что прогестерон действует локально, опосредуя овуляцию и лютеинизацию. Как было показано, усиленная секреция прогестерона и экспрессия рецепторов к нему в течение 12 часов после стимуляции овуляции в фолликуле макаки играют важную роль в овуляции и лютеинизации. Однако механизмы, посредством которых прогестерон способствует овуляции и лютеинизации, остаются неизвестными.

Преовуляторный выброс гонадотропинов активирует каскад протеолитических ферментов, что во время овуляции приводит к разрыву фолликулярной оболочки и высвобождению яйцеклетки, готовой к оплодотворению. Существует несколько доказательств, подтверждающих роль прогестерона в индукции протеолитической активности в преовуляторном фолликуле приматов и не приматов; так, уровень мРНК для матричных металлопротеиназ-1 (ММП-1) и их тканевых ингибиторов (ТИМР-1) резко увеличивается в течение 12 часов после стимуляции гонадотропином и прогестероном. Более того, ингибирование синтеза прогестерона или блокирование действия прогестерона с помощью RU486 снижало активность ММП у крыс и овец. Также была предложена регуляторная роль прогестерона в активации других связанных с овуляцией протеаз. (Maha Al-Asmakh, 2007)

Остановимся на том, как действует прогестерон во время беременности. Во время беременности прогестерон влияет на такие процессы, как преобразование эндометрия в децидуальную ткань, овуляция и имплантация, торможение сократимости матки, подавление материнской иммунной системы, накопление питательных веществ в виде подкожного жира для обеспечения ими плода, рост и развитие молочных желез, участие в развитии тканей зародыша. Важно отметить, что уменьшение продукции гормона ведет к прерыванию беременности; поддержание беременности осуществляется, в частности, посредством стимуляции роста матки. Прогестерон влияет на рецепторную активность эндометрия и характерные морфологические изменения, определяющие готовность эндометрия к имплантации. Имеются сведения о том, что роль гормона проявляется как в его действии на матку, так и на развивающуюся бластоцисту. Прогестерон влияет на процесс имплантации путем активации ферментов, лизирующих оболочку яйцеклетки (*zona pellucida*). Помимо того, индукция специфичной клеточной пролиферации в матке опосредована локальной продукцией факторов роста, на большую часть которых прогестерон оказывает прямое модулирующее влияние. Данные факторы стимулируют образование компонентов межклеточного матрикса, активируют синтез ДНК, стимулируют пролиферацию клеток, способствуют митогенезу, усиливают ангиогенез. Среди них: ТФР – трансформирующий фактор роста (*transforming growth factor – TGF*), оФРФ – основной фактор роста фибробластов (*basic fibroblast growth factor*), ЭФР – эпидермальный фактор роста (*epidermal growth factor – EGF*), ТРФ – тромбоцитарный ростовой фактор (*platelet-derived growth factor – PDGF*), СЭФР – сосудистый

эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor – VEGF), ИПФР – инсулиноподобный фактор роста (insulin-growth factor – IGF), ГФР – гемопоэтический фактор роста (HGF) и пролактин. Прогестерон потенцирует действие ТФР-β. Предполагается, что гемопоэтический фактор роста, колониестимулирующий фактор роста-1 оказывают влияние на рост и дифференцировку плацентарного трофобласта, и их секреция регулируется прогестероном и эстрогенами. Прогестерон повышает уровень ЭФР, который оказывает митогенный эффект на ряд репродуктивных тканей и облегчает процесс имплантации. ИПФР секретируется с самых первых дней беременности, он обеспечивает рост матки, пролиферацию и дифференцировку клеток.

Прогестерон способствует также васкуляризации миометрия, стимулируя экспрессию мРНК СЭФР-А и СЭФР-В; СЭФР, в свою очередь, является важным фактором регуляции ангиогенеза в организме человека, и обнаруживается в тканях плаценты и плода. Есть данные, что СЭФР участвует в координации процессов дифференцировки, миграции и инвазии трофобласта.

Прогестерон стимулирует экспрессию оФРФ в матке, который, в свою очередь, регулирует ангиогенез и клеточную дифференцировку в плаценте, стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток артерий матки и плода, контролирует рост и дифференцировку клеток, развитие эмбриона.

Препятствование сокращению матки – это одна из самых функций прогестерона при беременности. Прогестерон подавляет сократимость миометрия посредством множества механизмов, например, влияя на уровень простагландинов, концентрацию внутриклеточного кальция, уровень релаксина и окситоцина. Под его воздействием замедляется передача нервного возбуждения с одного мышечного волокна на другое, соответственно, снижается активность нервно-мышечного аппарата матки.

Следует уточнить, что к сокращению миометрия ведет увеличение концентрации кальция; секреция кальцитонина (пептидного гормона кальциевого гомеостаза) его уровень в матке, предотвращая сокращение. Именно под воздействием прогестерона кальцитонин вырабатывается в клетках железистого эпителия в ранний период беременности. (Довжикова И. В., Луценко М. Т., 2016)

1.2.2 Рецепторы прогестерона: типы, структура, распределение в тканях

Как и все ядерные рецепторы, рецепторы прогестерона (PR) являются транскрипционными факторами, и состоят из ДНК-связывающего домена (DBD), расположенного между восходящим N-концевым участком, который содержит активирующие (AF) и ингибирующие (IF) функциональные единицы, и шарнира, за которым следует C-концевой лиганд-связывающий домен (LBD). Существуют две PR-изоформы, PRA и PRB, которые отличаются тем, что PRB человека содержит дополнительную N-концевую область из 164 аминокислот, называемую «B-upstream сегмент» (BUS), включающую транскрипционную активационную функциональную единицу AF3. BUS отсутствует в PRA. Сайт-специфический мутагенез в BUS приводит к потере функции PRB, однако переключения PRB на PRA не происходит. Это говорит о том, что уникальные свойства PRB и PRA зависят от еще-каких то значительных структурных особенностей, помимо BUS.

Экспрессия обеих изоформ наблюдается и у грызунов и людей и пространственно перекрывается в женских репродуктивных тканях. Однако соотношения отдельных изоформ варьируют в репродуктивных тканях как следствие развития и гормонального статуса и во время канцерогенеза. Кроме того, модельные млекопитающие, используемые для исследований рака, часто имеют соотношения изоформ, которые отличаются от таковых в тканях человека. Обычно соотношение PRA: PRB в нормальных зрелых тканях мышей и крыс составляет 3: 1, что позволяет предположить, что неизвестные факторы, регулирующие эквимолярность у людей, существенно различаются у грызунов. Кроме того, это вызывает вопросы об отсутствии эквимолярности, и, если эквимолярность важна, о рациональности использовании моделей грызунов для изучения физиологии прогестерона человека и процессов заболевания.

Как уже было отмечено, PR имеют модульную структуру белка, состоящую из отдельных функциональных доменов, способных связывать стероидный лиганд, димеризировать лигандированные рецепторы, взаимодействовать с гормон-чувствительными элементами ДНК и взаимодействовать с корегуляторными белками, необходимыми для соединения рецепторов с транскрипционным аппаратом. Связывание агонистов прогестина вызывает конформационные изменения в структуре рецептора, которые способствуют взаимодействию белков-коактиваторов с различными активационными доменами (AFs), расположенными как в amino-, так и в карбоксиконцевых областях рецептора. Такие коактиваторы способствуют

ремоделированию и соединению хроматина с общими факторами транскрипции, что приводит к образованию продуктивных инициаторных транскрипционных комплексов на рецептор-чувствительном промоторе. Напротив, связывание соединений-антагонистов рецептора вызывает конформационные изменения рецептора, которые делают АФ непермиссивными для связывания коактиватора и вместо этого способствуют взаимодействию с ко-репрессорными белками, которые ингибируют транскрипционную активность рецептора. Способность PR взаимодействовать с различными коактиваторными и ко-репрессорными белками вместе с различной экспрессией ко-регуляторов иллюстрирует ключевую роль этих белков в опосредовании различных тканеспецифических ответов рецепторов прогестерона на стероидный лиганд. Важно отметить, что рецепторы прогестерона также могут активироваться в отсутствие стероидного лиганда с помощью фосфорилирования, регулирующего их взаимодействие с ко-регуляторными белками.

Изоформы PR-A и PR-B отличаются тем, что белок PR-B содержит дополнительную последовательность аминокислот на своем аминоконце. Этот PR-B-специфический домен кодирует третью функцию транскрипционная активационная функциональная единица (AF3), которая отсутствует в PR-A. Последние данные показали, что AF3 позволяет PR-B связывать подгруппу коактиваторов, с которой PR-A связывается менее эффективно. Таким образом, в опытах с определением уровня экспрессии в отдельных клеточных культурах, PR-A и PR-B проявили различные свойства трансактивации, специфичные как для типа клеток, так и для промотора гена-мишени что связано со способностью этих рецепторов рекрутировать специфические ко-регуляторные белки. (Conneely O. M. et al., 2002)

PR-экспрессия у животных.

Рецепторы PRA и PRB были впервые показаны в яйцевом курицы в начале 1970-х годов и за последние годы во многих исследованиях обнаружили относительные уровни экспрессии изоформ PRA и PRB у различных видов, включая птиц, рептилий, грызунов и млекопитающих. Например, в матке кролика экспрессировался только PRB, тогда как в репродуктивных тканях грызунов преобладал PRA (Schott D. R. et al., 1991). В матке и молочной железе мыши соотношение PRA: PRB составляло 3: 1, в то время как в вагинальной ткани мыши оно составляло 2: 1 (Ilenchuk and Walters, 1987). Сборные данные позволяют предположить, что соотношение PRA и PRB

является специфичным как для вида, так и для ткани. Также у мышей было показано, что обе PR-изоформы присутствуют в строме матки и клетках миометрия, и их уровни колеблются при циклическом системном гормональном воздействии. Аналогичным образом в яичниках мыши происходят изменения в соотношении PRA и PRB, связанные с эстральным циклом. Существует также временное и / или пространственное разделение экспрессии PRA и PRB в эпителиальных клетках молочной железы грызунов во время нормального развития молочной железы (Aupperlee et al., 2005).

PR-экспрессия в человеческом организме.

В отличие от преобладающей экспрессии одной изоформы PR (что часто наблюдается в тканях животных), в нормальных тканях человека *in vivo*, включая грудь и матку, все PR+ эпителиальные клетки совместно экспрессировали PRA и PRB на одном уровне. Это говорит о том, что совместное расположение и, следовательно, совместное действие PRA и PRB опосредует их работу в организме человека. Несмотря на то, что PRA и PRB обычно экспрессируются в тканях человека на одном уровне, существуют некоторые доказательства гормональной регуляции экспрессии изоформ PR в железистых эпителиальных клетках эндометрия. Во время секреторной фазы менструального цикла, когда высокие уровни прогестерона в кровотоке связаны со сниженной экспрессией PR, количество PRA преимущественно снижается, что приводит к явному преобладанию PRB в этих клетках в это время.

В отличие от сбалансированной экспрессии PRA и PRB в нормальных тканях человека, прогрессирование тканей молочной железы и эндометрия от нормального до злокачественного образования часто сопровождается изменениями экспрессии изоформы PR.

Таким образом, исследования экспрессии PR как у людей, так и у животных показывают, что данные рецепторы экспрессируются специфично для вида, ткани и типа клеток; следовательно при экстраполяции результатов на другие виды нужно принимать это во внимание. (Scarpin K. M. et al, 2009)

1.2.3 Молекулярные механизмы действия прогестерона

Механизмы действия прогестерона в основном опосредованы связыванием лиганда с ядерными рецепторами прогестерона (классический сигнальный путь). Данные комплексы рецептор-лиганд впоследствии связываются с регуляторными областями прогестерон-зависимых генов и индуцируют их транскрипцию. Было показано, что прогестерон также действует через неклассические сигнальные пути; в этом случае его эффекты основаны на способности вызывать быструю стимуляцию инициированных на мембране сигнальных каскадов.

В данном обзоре будет рассмотрен только классический сигнальный путь, опосредованный ядерными рецепторами прогестерона. Связывание с прогестероном индуцирует конформационные изменения в PR, которые способствуют диссоциации шаперона от мультипротеинового комплекса, гомодимеризации и связыванию со специфическими элементами ответа на прогестерон (PRE) в промоторе генов-мишеней [7,8]. Связанные с ДНК рецепторы увеличивают или уменьшают скорость транскрипции генов, влияя на рекрутирование РНК-полимеразы II в сайт инициации. Посредством межбелкового взаимодействия активированный гормонами рецептор рекрутирует коактиваторы, которые служат важными интермедиатами для передачи сигналов от рецептора в комплекс инициации транскрипции и непосредственно облегчают её (*Рис. 2*) (Garg D. et al, 2017).

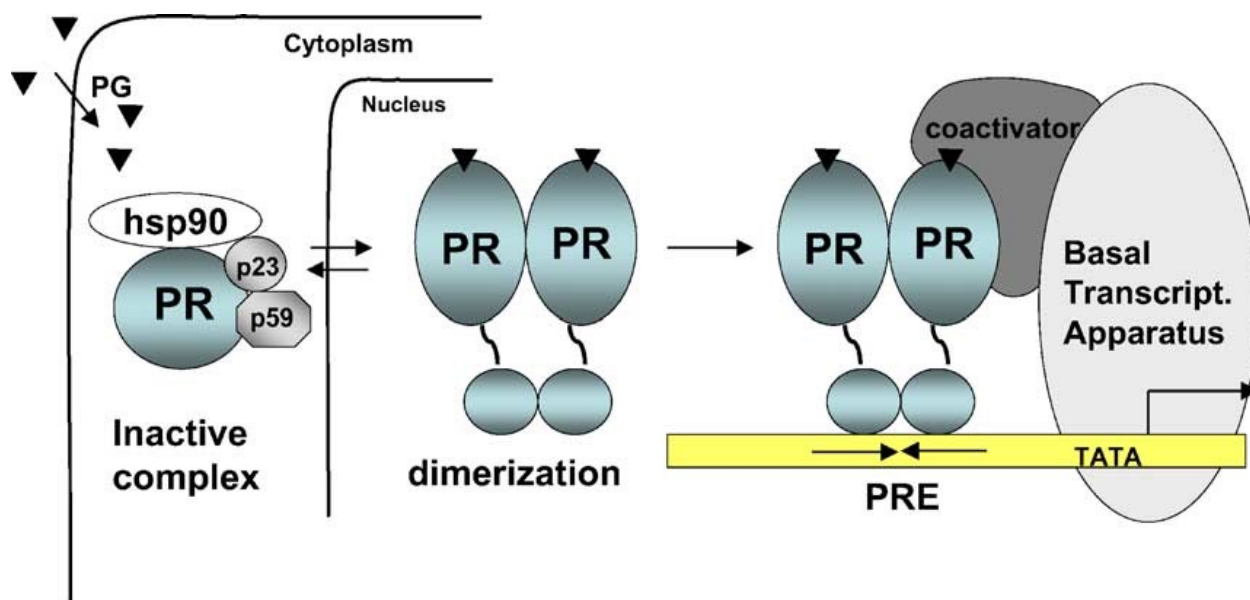


Рисунок 2. Прогестерон-зависимая активация рецептора прогестерона.

Связывание прогестерона с неактивным рецепторным комплексом вызывает

изменение конформации, которое приводит к диссоциации иммунофиллина и hsp90, димеризации рецептора, связыванию ДНК и рекрутированию коактиваторов для облегчения связи с базальным аппаратом транскрипции. PRE - элемент ответа прогестерона. (Leonhardt S. A., 2003)

1.3 Гестагены – синтетические аналоги прогестерона

1.3.1 Обзор существующих гестагенов. Их классификация, сходство, различие

Методика синтеза природного гормона прогестерона была разработана в 1934 г учеными А. Бутенандом и Л. Ружичка, которые были удостоены Нобелевской премии за это открытие. При проведении дальнейших исследований было обнаружено, что при оральном приеме прогестерон (Рис. 3) быстро инактивируется в печени и недостаточно эффективно абсорбируется (из-за низкой водной растворимости P_4), что влияет на его биодоступность. Позднее проблема низкой биодоступности была решена с помощью процесса микронизации прогестерона. После того, как роль и механизмы действия гормона в организме были изучены, а также по мере разработки синтеза стероида, появилась необходимость создания его аналогов (прогестинов, гестагенов, прогестагенов) с более высокой биологической активностью.

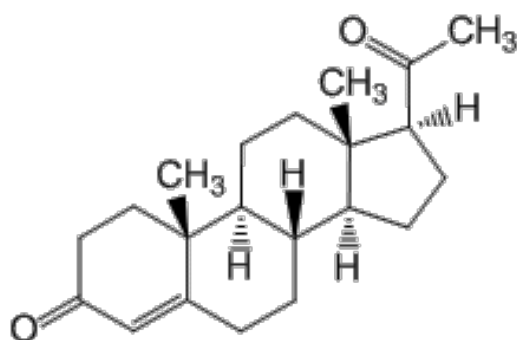


Рис. 3. Химическая формула прогестерона.

Определение понятия гестагены было дано в 1996 году на первой европейской конференции в Германии (First Meeting of the European Progestin Club, 1996, Wesel, Niederrhein, Germany); тогда же были обозначены классификация и номенклатура гестагенов, а также основные показания к применению (Сергеев, Шимановский, 2003). Согласно определению, к гестагенам относятся вещества, которые подобно

прогестерону способны трансформировать в секреторное состояние эстрогенподготовленный эндометрий. Соответствующие этому определению химические соединения имеют стероидную структуру и оказывают схожий эффект на эндометрий, но отличаются между собой по воздействию на другие органы-мишени и ряд метаболических процессов.

Первоначально гестагенные соединения на основании схожести их химической структуры подразделялись на производные (дериваты) прогестерона и тестостерона. В последние десятилетия были разработаны соединения, которые могут действовать не только как агонисты или антагонисты, но и как модуляторы рецепторов прогестерона. Изначально они использовались в целях контрацепции, но впоследствии их применение расширилось. На данный момент существует значительное число препаратов, которые обладают прогестагенным действием, но различаются по другим биологическим эффектам, что обусловлено химическим строением молекулы. Спектр применения данных препаратов крайне широк (*Royer P., 2014*).

В настоящее время синтетические гестагены в зависимости от химической структуры стероидной молекулы подразделяют на 3 класса: дериваты прогестерона, дериваты тестостерона и другие дериваты, к которым относят дериваты спиронолактона, модуляторы прогестероновых рецепторов (МПР) и селективные модуляторы прогестероновых рецепторов (СМПР).

Фармакологический профиль гестагенов определяется взаимодействием лиганда с различными стероидными рецепторами, включая ПР, рецептор эстрогена (ЭР), рецептор андрогена (АР), а также минералкортикоидные и глюкокортикоидные рецепторы. На сегодняшний день разработка новых гестагенных соединений ориентирована на повышение специфичности связывания с одними стероидными рецепторами и снижения связывания с другими.

Биологические эффекты гестагенов определяются не только их способностью связываться с PR (т.е. гестагенный эффект), рецепторами других стероидов, а также воздействием на ферменты (сульфатазу, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназу, 17 β -гидроксистероиддегидрогеназу, 5 α -редуктазу, ароматазу и др.) и транспортные белки (альбумины и глобулин, связывающий половые стероиды). Только свободный прогестерон, имеющий сродство к какому-либо рецептору может образовать с ним комплекс рецептор-лиганд и опосредованно через рецептор проявить свой эффект.

Первоначально разработка новых прогестинов была направлена на создание соединений, обладающих высокой биодоступностью при пероральном приеме. Проводилась модификация молекулы, повышающая стабильность соединения при попадании в желудочнокишечный тракт (производные тестостерона). Позднее были разработаны другие способы доставки действующего вещества, основанные на его замедленном высвобождении. В основном они связаны с контрацепцией и представляют собой вагинальные кольца, трансдермальные системы доставки, импланты, инъекции и внутриматочные средства (ВМС). Преимущество этих систем над пероральными формами заключается в поддержании концентраций, позволяющих снизить колебания уровней прогестина при более продолжительном действии препарата (Royer P., 2014).

1.3.2 Методы изучения гестагенной активности

Для изучения гестагенной активности новых лигандов прогестеронового рецептора разработано несколько методов в основе которых лежат *in vivo* и *in vitro* подходы. Рекомендуемые методы направлены на изучение специфической фармакологической активности соединений, а также относительной связывающей активности (relative binding affinities, RBA%) тестируемого соединения с различными стероидными рецепторами (для гестагенов это — рецепторы прогестерона, андрогенов, эстрогенов, минералокортикоидов, глюкокортикоидов). Связывание с рецепторами определяют, используя радиоактивные специфические лиганды в тесте конкурентного связывания с человеческими рекомбинантными стероидными рецепторами, либо с цитозольными стероидными рецепторами биоптатов тканей-мишеней. Как правило, данные представляют в процентах относительно соответствующего стероида (прогестерона для гестагенных рецепторов, тестостерона для андрогеновых, дексаметазона для глюкокортикоидных, альдостерона для минералокортикоидных и эстрадиола-17-бета для эстрогеновых), специфическое связывание которого принимается за 100%. Параллельно также должен проводиться анализ связывающих свойств контрольных препаратов, т.е. гестагенов с известным спектром активности. Необходимо использование аналога тестируемого вещества, структурного/функционального в качестве препарата сравнения. В соответствии с

полученными в ходе исследования данными, новый лиганд рецепторов прогестерона должен демонстрировать очевидное преимущество по меньшей мере по одному из указанных параметров. В основном результаты конкурентного связывания демонстрируют селективность нового препарата по отношению к рецептору прогестерона в сравнении с другими стероидными рецепторами (особенного внимания заслуживают андрогеновые рецепторы). Соединения, обладающие высокой селективностью к рецепторам прогестерона, предположительно будут демонстрировать меньшее количество неблагоприятных побочных эффектов, таких как головные боли, напряжение и боль в молочных железах, увеличение веса, акне, изменения эмоционального состояния, прорывные межменструальные кровотечения.

В фармакологическом справочнике приводится ряд рекомендуемых тестов и биологических моделей исследования лекарственных средств, обладающих гормональной активностью:

1. Определение относительной связывающей активности (RBA%) нового вещества с рецепторами прогестерона, тестостерона, глюкокортикоидов, минералокортикоидов, эстрадиола.

2 Исследование специфической фармакологической /гормональной активности нового вещества:

2.1 Прогестинная/антигестагенная могут исследоваться в тесте Клауберга-МакФейла (*Clauberg-McFail*) и в тесте на сохранение/несохранение беременности;

2.2. Контрацептивная активность;

2.3. Антиовуляторная активность;

2.4. Андрогенная/антиандрогенная активность — прямой и обратный тест Хершбергера;

2.5. Эстрогенная/антиэстрогенная активность — эстроген-индуцированный рост матки и кератинизация эпителия влагалища;

2.6. Глюкокортикоидная/антиглюкокортикоидная активность — тимолитический тест;

2.7. Минералокортикоидная/антиминералокортикоидная активность — электролитный баланс и задержка жидкости. (Миронов А. Н. и др., 2012)

В настоящее время рассматривается возможность изучения гестагенной

активности препаратов на клеточных моделях на основе первичной культуры эндометрия. Как уже было сказано ранее, гестагенная активность изучается на животных моделях и оценивается по степени прегравидных изменений эндометрия эстрогенподготовленных неполовозрелых самок кроликов [6], однако использование животных в качестве моделей делает первичный отборочный этап исследований дорогостоящим, трудоемким и времязатратным. Использование в качестве модельного объекта клеточных линий дает возможность более быстрого получения результатов, прижизненного наблюдения за объектом исследования в течение всего эксперимента, относительную дешевизну и доступность используемого материала. Также значительным преимуществом является воспроизводимость результатов, полученных на клеточных линиях, т.к. клетки способны сохранять видовую и органотканевую специфичность на протяжении всего эксперимента. (Айламазян Э. К. и др, 2012)

1.3.3 Мепрегенола диацетат – новый аналог прогестерона

Мепрегенола диацетат (Рис. 4) является первым представителем немногочисленной группы сложных эфиров по гидроксильной группе при C₃ молекуле мепрегенолацетата, которые были описаны в литературе. Этот 3,17-диэфир, впервые синтезированный в фирме «Merck-A.-G.» в 1960-х гг. [17] проявляет моногормональное действие при отсутствии нежелательных сопутствующих гормональных эффектов (эстрогенность, андрогенность и др.), характерных для большинства известных гестагенных препаратов, особенно 19-норстероидного ряда.

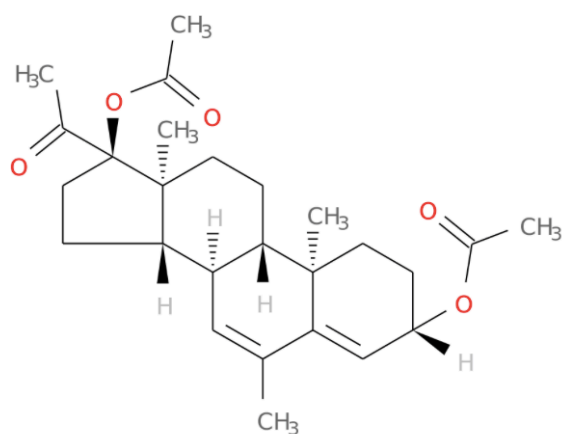


Рис.4. Химическая формула мепрегенола диацетата.

Соединение, как моногормональный препарат для лечения нарушений гестаген-эстрогенного баланса, кожных заболеваний и онкологических заболеваний, было

впервые разработано во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (сейчас ЦХЛС-ВНИХФИ) (Корхов В. В., Петросян М. А.).

Свойство сложных эфиров мепрегнолацетата проявлять моногормональное действие – крайне важное качество, и в последние годы наблюдается повышенный научный и практический интерес к данной группе веществ с целью разработки новых лекарственных средств направленного действия с минимальным количеством побочных эффектов.

Сложные эфиры мепрегнолацетата по положению 3 сохраняют высокую активность при пероральном использовании. Благодаря этому соединения перспективны для лечения гинекологических заболеваний, требующих длительного приема препарата у женщин репродуктивного возраста. Сложные эфиры мепрегнолацетата представляются идеальным средством для лечения данных заболеваний с учетом их моногормонального действия, отсутствия побочных эффектов и высокой гестагенной активности, которая позволяет достигать терапевтического эффекта при использовании в микродозах.

Также ведется изучение активности этих соединений в другом направлении - в качестве противоопухолевых средств при гормонально зависимых формах рака.

Исследование сферической токсичности препарата показало отсутствие у него тератогенной, канцерогенной, алергизирующей, мутагенной активностей. При исследовании гормонального спектра физиологической активности соединения установлено, что данный препарат является чистым гестагеном, не проявляющим эстрогенной, анаболической, противовоспалительной, минералокортикоидной, тимолитической, антиандрогенной и антиэстрогенной активности, т.е. является многогормональным препаратом с минимумом побочных гормональных действий.
(патент)

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн эксперимента

Для изучения структурно-функциональных изменений эндометрия при воздействии синтетического аналога прогестерона - мепрегенола диацетата был разработан дизайн исследования, включающий следующие этапы:

1. подготовка протоколов проведения исследований воздействия мепрегенола диацетата на структурно-функциональные изменения эндометрия;
2. выбор доз, их диапазона и способа введения препарата в организм подопытных животных;
3. отбор и маркировка 25 модельных животных (неполовозрелые кролики-самки) для введения в эксперимент;
4. проведение эстрогенной подготовки с последующей рандомизацией животных по группам (5 групп по 5 животных в каждой);
5. введение мепрегенола диацетата согласно выбранной методике в установленных дозах (1 группа – 1 доза) с учетом массы тела животных на момент начала исследования;
6. определение массы тела животных и выведение их из эксперимента на следующий день после последнего введения тестируемого препарата;
7. проведение вскрытия животных с извлечением матки, определение ее массы, иссечение фрагмента одного рога для гистологического исследования;
8. приготовление парафиновых блоков из взятого биоматериала, проведение серии срезов, окраска гематоксилином и эозином;
9. характеристика морфологических изменений эндометрия по гистологическим препаратам фрагментов матки в зависимости от вводимой дозы препарата;
10. оценка степени секреторной трансформации эндометрия по шкале McPhail;
11. статистическая обработка полученных данных.

2.2 Характеристика экспериментальных животных

В качестве модельных животных в проводимом исследовании использовали инфантильных самок кроликов породы «Шиншилла». Все лабораторные животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН» и содержались в регламентированных условиях вивария ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта» при соблюдении всех правил содержания лабораторных животных (время и порядок проведения карантина, постоянный санитарный контроль, стандартный рацион питания, свободный доступ к воде и пище) при полном исключении отрицательных воздействий.

Перед началом эксперимента все животные были промаркированы, взвешены, на каждого был заведен протокол. Всего в эксперименте было использовано 25 самок кроликов массой 600-1100г.

2.3 Метод изучения гестагенной активности лигандов прогестеронового рецептора - тест Clauberg-McPhail

Для изучения гестагенной активности новых аналогов прогестерона разработано несколько методов, однако «золотым стандартом» является тест Clauberg-McPhail. Согласно данному методу всем модельным животным перед введением испытуемого препарата проводили эстрогенную подготовку, для этого в течение 5 дней животным внутримышечно вводили эстрадиол в дозе 5 мкг на животное в масляном растворе по 0,2 мл. Затем следовал один день перерыва и в течение последующих 5 дней животным ежедневно вводили испытуемый аналог прогестерона в выбранном диапазоне доз (0,0626-1мг/кг).

Всего было сформировано 5 рандомизированных групп животных, соответствующих количеству выбранных доз. Таким образом, на каждую группу/дозу приходилось по 5 самок кроликов.

Все подопытные животные получали препарат в виде масляного раствора (растворитель – оливковое масло) в объеме 0,3 мл per os (внутрижелудочно) с использованием зонда. Препарат вводили ежедневно в утренние часы (09.00 - 11.00). Каждое животное получало определенную дозу препарата в пересчете на килограмм массы тела. На следующий день после последнего введения препарата кроликов под

легким эфирным наркозом выводили из опыта путем введения воздуха в латеральную ушную вену. После вскрытия брюшной полости матку извлекали с целью определения массы органа-мишени. Взвешивание проводили на весах лабораторных квадрантных (ВЛК-500г). Затем иссекали фрагмент рога матки для последующей гистологической обработки и изучения структурно-функциональных характеристик эндометрия модельных животных в зависимости от вводимой дозы гестагена.

Оценку структурно-функциональных изменений эндометрия проводили с помощью шкалы McPhail. Во внимание принимали степень секреторной трансформации эндометрия, которую обозначали в баллах согласно шкале McPhail, где «0 баллов» – только эстрогенная реакция и отсутствие каких-либо признаков трансформации ткани; «1» - «4» балла – возрастающие степени гестагенной реакции.

Каждая стадия секреторной трансформации эндометрия имеет определенную характеристику, согласно которой:

- “0” соответствует так называемой нулевой стадии секреторной трансформации, которая характеризуется определенной морфологической картиной – эндометрий и многие железы стромы компактны; эпителиальный слой просвета матки непрерывный, изредка прерывается устьями желез.
- Первая стадия секреторной трансформации эндометрия определяется началом развития желез вокруг просвета, но на данной стадии они короткие; более глубокая строма не изменена.
- Вторая стадия секреторной трансформации эндометрия характеризуется увеличением размеров и количества желез; отсутствием изменений стромы; усилением интенсивности окраски от более глубоких слоев к просвету.
- При третьей стадии секреторной трансформации эндометрия наблюдаются такие изменения, как: железы проникают в более глубокие слои стромы, но остаются узкими; железистая ткань теряет способность концентрироваться вокруг просвета.
- Четвертая стадия секреторной трансформации эндометрия характеризуется тем, что железы проникают близко к миометрию; на срезах соединительнотканые участки стромы встречаются в эндометриальных полях. Эта конечная стадия характеризуется сильным развитием желез.

2.4 Приготовление гистологических препаратов ткани матки

Процесс приготовления гистологических препаратов ткани матки включал в себя следующие этапы:

1. фиксация ткани;
2. гистологическая проводка;
3. создание парафиновых блоков;
4. изготовление срезов;
5. окраска срезов;
6. микроскопия.

После изъятия матки из брюшной полости ее фрагмент размером 10-15 мм помещали в гистологическую кассету, а затем погружали в этиловый спирт для фиксации ткани, где он находился в течение 14-30 дней до начала гистологической проводки. Цель фиксации заключалась в стабилизации живой системы и в остановке в ней процессов жизнедеятельности.

Перед приготовлением гистологических препаратов объекты 4 часа отмывали в проточной, а затем 1 час в дистиллированной воде для удаления фиксатора.

Для приготовления гистологических препаратов объекты заливали в парафин, согласно следующему протоколу:

1. 70% этиловый спирт – 2 часа;
2. 80% этиловый спирт – 2 часа;
3. 96% этиловый спирт – 1,5 часа;
4. Изопропиловый спирт – две смены по 1,5 часа;
5. Раствор изопропилового спирта с вазелиновым маслом (5:1) при 50 °С – 2 часа;
6. Раствор изопропилового спирта с вазелиновым маслом (2:1) при 50 °С – 2 часа;
7. Вазелиновое масло при 50 °С – 2 часа;
8. Пропитка парафином при 57 °С – три смены по 1 часу.

После этого материал заливали чистой порцией парафина. Парафиновые срезы толщиной 3 мкм изготавливали на ротационном микротоме Rotary 3002 (производитель PFM, Германия).

Для удаления остатков парафина перед окраской срезов проводили их депарафинирование последовательно в двух сменах ксилола; для удаления остатков ксилола использовали этиловый (96%) спирт. Для морфологических исследований матки парафиновые срезы окрашивали гематоксилином по Майеру и эозином. После окраски срезы обезвоживали, и заключали в монтирующую среду UltraKitt (производитель Avantor — J.T. Baker, Нидерланды).

Гистологические препараты поперечных срезов матки кроликов исследовали на светооптическом уровне при увеличении 12х.

2.5 Статистическая обработка полученных результатов

Обработку экспериментальных данных проводили методом регрессионного анализа. Вычисления вели по уравнению регрессии: $y = a + b \lg x$, где y — индекс McPhail, x — доза соединения (мг/кг), a и b — коэффициенты регрессии.

Массу матки для получения относительных значений пересчитывали на 1000 г массы тела животного в программе Microsoft Excel.

Корреляцию между баллами по шкале McPhail и массами маток рассчитывали с помощью коэффициента Спирмена.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программной среды R (версия 3.4.0) и программы GraphPadPrism v.6 (GraphPad Software, Inc, USA).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Метод Клауберга-МакФейла по изучению гестагенной активности мепрегенола диацетата

На сегодняшний день с целью изучения гестагенной активности аналогов прогестерона разработано несколько тестов, основанных на *in vivo* и *in vitro* методах. Для нашего исследования мы остановились на тесте Клауберга-МакФейла, так как ранее в литературе неоднократно отмечалось, что именно он является наиболее информативным и точным методом изучения гестагенной активности препаратов. Метод основан на определении степени секреторной трансформации эндометрия у эстроген-подготовленных неполовозрелых самок кроликов после введения различных доз изучаемых препаратов. (Корхов В. В., Тапильская Н. И, 2005).

Использование в качестве экспериментальных животных неполовозрелых самок кроликов дает возможность изучить активность препарата в чистом виде без влияния собственного гормонального фона животных. Предварительно перед введением испытуемого препарата всем кроликам проводили эстрогенную подготовку. Известно, что успешная трансформация эндометрия под действием гестагенов возможна только в результате его полноценной эстрогенной подготовки. Под действием эстрогенов в эндометрии происходят пролиферативные процессы, а также повышается чувствительность эндометрия к прогестерону. Без предварительного введения эстрогена прегестерон и его аналоги не оказывают влияния на эндометрий.

В нашем эксперименте в качестве испытуемого препарата кроликам вводили синтетический аналог прогестерона – мепрегенола диацетат в выбранном диапазоне доз. С помощью последующего изготовления гистологических срезов матки мы получили возможность изучить и охарактеризовать изменения в эндометрии, происходящие в результате воздействия препарата. Данные изменения оценивали с помощью световой микроскопии, где каждому отдельному срезу присваивали балл от 0 до 4 по шкале McPhail. Во внимание принимали количество и размеров маточных желез эндометрия, а также глубину их проникновение в строму эндометрия. Полученные данные подвергали статистической обработке.

3.2 Гистологическая характеристика эндометрия кроликов после воздействия разных доз мепрегенола диацетата

Под влиянием прогестерона и его аналогов в эндометрии происходят морфологические изменения, которые характеризуют активность лигандов рецепторов прогестерона. Для возможности визуализации и последующей характеристики данных изменений поперечные срезы фрагментов рога матки кроликов подвергали окраске гематоксилином-эозином и в дальнейшем исследовали с помощью светового микроскопа.

В ходе нашего исследования мы охарактеризовали в общей сложности порядка 200 поперечных срезов матки кроликов, в результате чего каждому образцу ткани был присвоен соответствующий его стадии трансформации балл по шкале МакФейла.

Как известно, в эндометрии различают базальный и функциональный слои, и именно последний высоко чувствителен к гормонам, под влиянием которых изменяется его строение и функции.

Функциональный слой содержит поверхностный (компактный) слой с плотно лежащими клетками стромы и глубокий (губчатый) с многочисленными маточными железами. Последние образованы цилиндрическим эпителием, функциональная активность и морфологические особенности которого существенно меняются в ходе секреторной трансформации эндометрия (Быков, 1997).

Ранее нами был изучен эндометрий неполовозрелых кроликов, подвергнутых воздействию эстрогена (Петросян М.А., 1998). Эти животные составили контрольную группу, а их эндометрий характеризовался следующим образом: эндометрий и железы стромы компактны (рис. 5). Просвет матки обширен (рис. 5 А). Эпителиальный слой просвета матки непрерывный, местами прерывается устьями желез. Глубокие слои стромы не затронуты (рис. 5 Б).

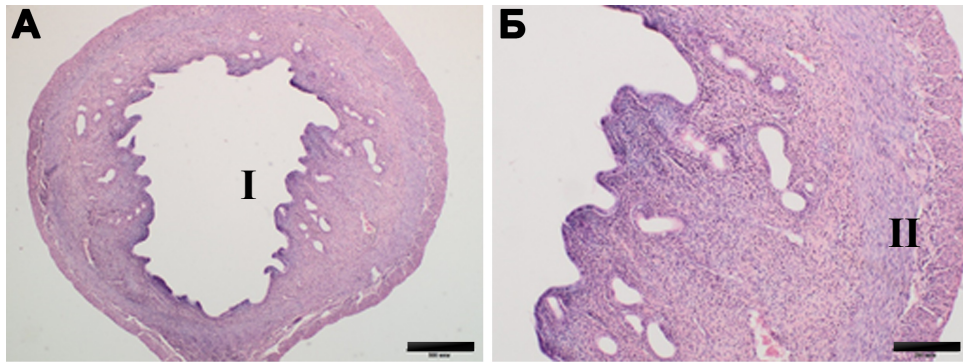


Рис.5. Поперечный срез матки неполовозрелых кроликов после введения эстрадиола в течение 5 дней: Окраска гематоксилином и эозином.

I – просвет матки, II – глубокая строма. Масштабная линейка А – 500 мкм, Б – 200 мкм

После введения эстрогенподготовленным животным мепрегенола диацетата даже в самой низкой из изученных доз – 0,0625 мг/кг можно наблюдать значительные трансформации эндометрия (рис. 5 И-К). Так, просвет матки заметно меньше (рис. 6 А, В, Д, Ж и И), а в эндометриальных полях встречаются участки волокнистой соединительной ткани (рис. 6 Г, Е, и К), в которые вдаются сильно развитые железы эндометрия. При введении доз 0,125 мг/кг (рис. 6 Ж-З), 0,25 мг/кг (рис. 6 Д-Е), 0,5 мг/кг (рис. 6 В-Г) и 1 мг/кг (рис. 6 А-Б) также наблюдали данные изменения.

Таким образом, можно заключить, что введение мепрегенола диацетата во всем изученном диапазоне доз вызывает секреторные изменения в эндометрии эстрогенизированных самок кроликов подобно прогестерону.

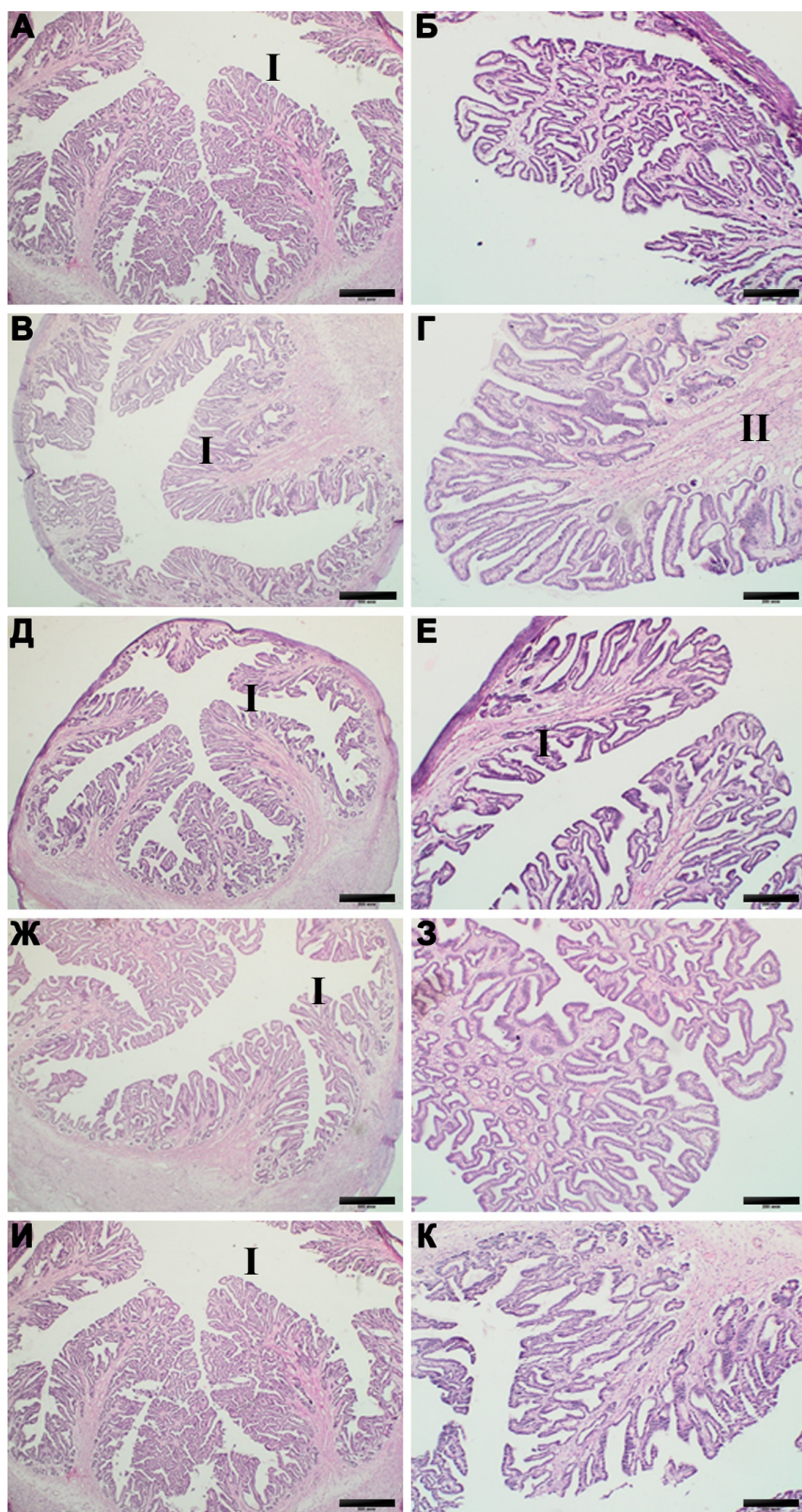


Рис. 6. Поперечный срез матки невозрелых кроликов после введения мепрегенола диацетата в течение 5 дней:

Окраска гематоксилином и эозином. I – просвет матки, II – волокнистая соединительная ткань. Дозировка препарата: А, Б – 1 мг/кг, В, Г – 0,5 мг/кг, Д,Е – 0,25

мг/кг, Ж,З – 0,125 мг/кг, И,К – 0,0625 мг/кг; Масштабная линейка А, В, Д, Ж и И – 500 мкм; Б, Г, Е, З и К – 200 мкм

3.3 Влияние разных доз мепрегенола диацетата на степень секреторной трансформации эндометрия кроликов

В соответствии с общепринятыми стандартами степень секреторной трансформации эндометрия животных оценивали по 4-хбальной шкале McPhail; для дальнейших расчетов определяли среднее значение баллов по группам. Результаты представлены в таблице (Табл.1).

В изученном диапазоне доз (0,0625-1,0 мг/кг) мепрегенола диацетат вызывал значительные прегравидные изменения в эндометрии, оцениваемые более 2-х баллов по шкале McPhail. Следует отметить, что в дозе 1 мг/кг они достигали максимальных значений (4 балла).

Табл. 1: Значения баллов по шкале McPhail в соответствии с изученным диапазоном доз

дозы, мг/кг	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
баллы	4	4	3	2,5	3,5
	4	3	3	2,5	3,5
	4	4	3	3	3
	4	3	4	3,5	3
	3,5	4	3,5	4	2
Ср. знач. баллов	3,9	3,6	3,3	3,1	3

Обработка экспериментальных данных методом регрессионного анализа позволяет говорить о достоверном дозозависимом эффекте препарата. Зависимость индекса МакФейла от введенной дозы описывается уравнением регрессии $y=a+b \lg x$, где y — индекс McPhail, x — доза соединения (мг/кг), a и b — коэффициенты регрессии. В данном случае уравнение имеет вид: $y=0,764*\lg x + 3,62$ ($R^2 = 0,96533$, $p < 0.001$).

Дозозависимый эффект препарата представлен на рисунке в виде столбчатой диаграммы (Рис 6). Так, при пероральном введении мепрегенола диацетата в минимально изученной дозе (0,0625 мг/кг) наблюдается выраженная секреторная трансформация эндометрия, оцениваемая в 3 балла по шкале McPhail. В дозе 0,125 мг/кг активность препарата увеличивается до 3,1 балла. Дальнейшее повышение дозы до 0,5 мг/кг усиливает эффект до 3,6 баллов. При дозе 1 мг/кг степень секреторной трансформации эндометрия приближается к максимальному значению и соответствует 3,9 баллам.

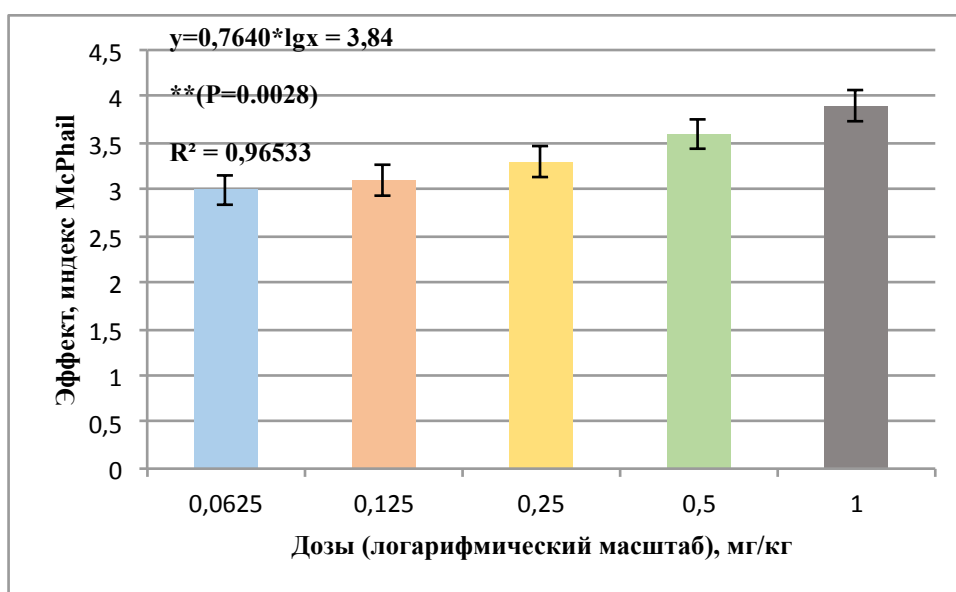


Рис.6 Зависимость степени секреторной трансформации эндометрия от дозы вводимого мепрегенола диацетата.

В результате обработки экспериментальных данных методом регрессионного анализа для изучаемого соединения определили фармакологическую активность. Оценку проводили по ED₅₀ (эффективная доза, вызывающая 50% эффект). Так, ED₅₀ для мепрегенола диацетата составила 0,0078 мг/кг. Мы рассчитали относительную активность мепрегенола диацетата в сравнении с прогестероном, ED₅₀ которого соответствовал 0,27 мг/кг. Относительная прогестагенная активность мепрегенола диацетат в 34,6 раз превышает активность природного прогестерона.

Таким же образом мы показали изменения относительной массы матки в зависимости от дозы вводимого мепрегенола диацетата. Обработка экспериментальных данных методом регрессионного анализа позволяет говорить о достоверном дозозависимом эффекте. Зависимость индекса МакФейла от введённой дозы описывается уравнением регрессии, в данном случае уравнение имеет вид: $y=0,7640*\lg x + 3,84$ ($R^2 = 0,96533$, $P=0.0028$).

Результаты изменений массы матки кроликов в зависимости от вводимой дозы препарата представлены на столбчатой диаграмме (Рис.7).

Дозозависимый эффект обнаруженный при сопоставлении относительной массы матки и дозы вводимого мепрегенола диацетата позволяет сделать предварительные выводы о том, что препарат влияет на секреторную активность эндометрия, однако неясно, за счет какого слоя эндометрия растет масса органа-мишени, следовательно, необходимы морфологические исследования эндометрия с оценкой степени его трансформации.

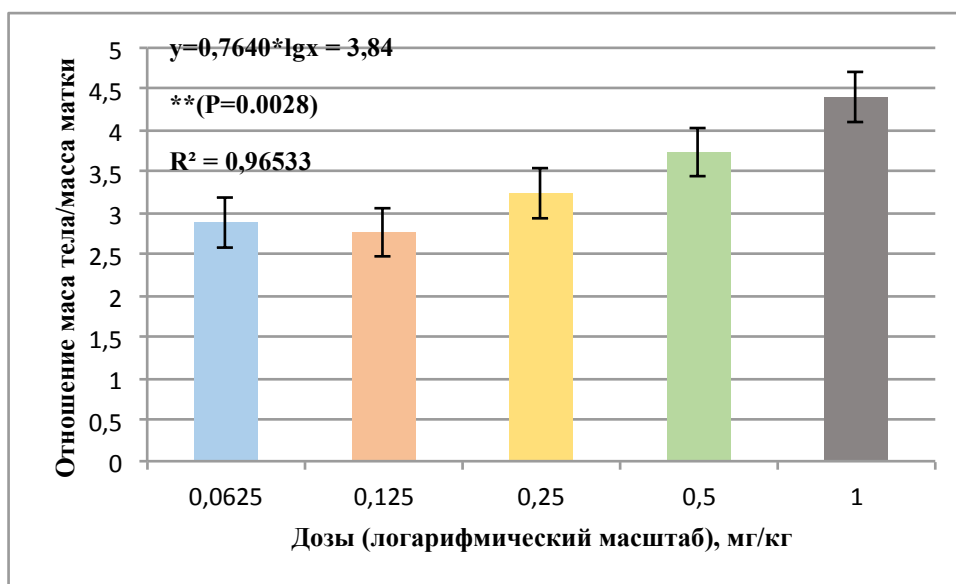


Рис.7. Зависимость отношения масса матки/масса тела от дозы вводимого мепрегенола диацетата.

Важно отметить, что изучаемый нами препарат проявил высокую активность по сравнению с другими аналогами прогестерона, такими как дидрогестерон, мегестрола капронат и медроксипрогестерона ацетат (Табл 2), относительная активность которых

была изучена в ранее опубликованных работах. (Корхов В. В., Лесик Е. А., Петросян М. А, 2004).

Табл 2. Сравнительное изучение гестагенной активности стероидных соединений в тесте McPhail на самках кроликов.

Соединение, способ введения	Диапазон доз, мг/кг	ЕД50, мг/кг	Относительная активность
Прогестерон, подкожно (53)	0,0125-0,4	0,27	1
Дидрогестерон, внутрь (20)	0,004-0,5	1,96	0,14
Мегестрола капронат, подкожно (21)	0,004-0,25	0,0266	10,2
Медроксипрогестерона ацетат, внутрь (25)	0,0016-0,4	0,026	10,39
Мепрегенола диацетат, внутрь (25)	0,008-0,4	0,011	24,6
Изопропиловый эфир АМОЛа, внутрь (25)	0,004-0,5	0,0058	46,6
Бутагест, внутрь (25)	0,004-0,5	0,0021	128,6

3.4 Изучение корреляции между степенью секреторной трансформации эндометрия кроликов и относительной массой маток при воздействии различных доз мепрегенола диацетата

Представляло интерес изучить наличие корреляции между степенью секреторной трансформации эндометрия и изменениями относительной массы матки животных в зависимости от введения разных доз препарата.

По окончании эксперимента матки всех животных отпрепарировали, определяли их массу, рассчитали отношение массы матки (г) к массе тела кролика на момент окончания эксперимента (кг), средние отношения по группам и данные вносили в таблицу (Табл. 3).

Табл. 3. Масса животных, масса маток, рассчитанные относительные масса матки и средние относительных масс маток по группам.

	Масса животного, кг	Масса матки, г	Относительная масса матки	Относительная масса матки, средние значения по группам
группа 1	1,01	4	3,96	4,40
	0,91	5,01	5,51	
	0,89	4,61	5,18	
	1,18	5	4,24	
	1,1	3,45	3,14	
группа 2	1,15	3,51	3,05	3,74
	0,94	3,71	3,95	
	0,98	4,51	4,60	
	1,14	3,65	3,20	
	1,33	5,19	3,90	
группа 3	0,9	3	3,33	3,24
	0,98	3,63	3,70	
	0,95	3	3,16	
	0,99	3,26	3,29	
	1,34	3,63	2,71	
группа 4	1,29	3,53	2,74	2,77
	1,25	2,63	2,10	
	1,05	2,72	2,59	
	1,18	4,35	3,69	
	1,42	3,87	2,73	
группа 5	1,33	4,92	3,70	2,89
	1,29	3	2,33	
	1,18	2,71	2,30	
	1,48	4,1	2,77	

	0,93	3,1	3,33	
--	------	-----	------	--

Для оценки корреляции между относительными массами маток кроликов и степенью секреторной трансформации эндометрия кроликов использовали коэффициент Спирмена, который позволяет оценить связь между количественными показателями без учета нормальности распределения, а также не только при линейной зависимости.

Коэффициент корреляции по Спирмену составил $R = 0.4804$ ($p < 0.05$). Данные расчеты позволяют сделать вывод о том, что с вероятностью 0,48 при увеличении степени секреторной трансформации эндометрия при воздействии мепрегенола диацетата относительная масса органа-мишени – матки достоверно увеличивается.

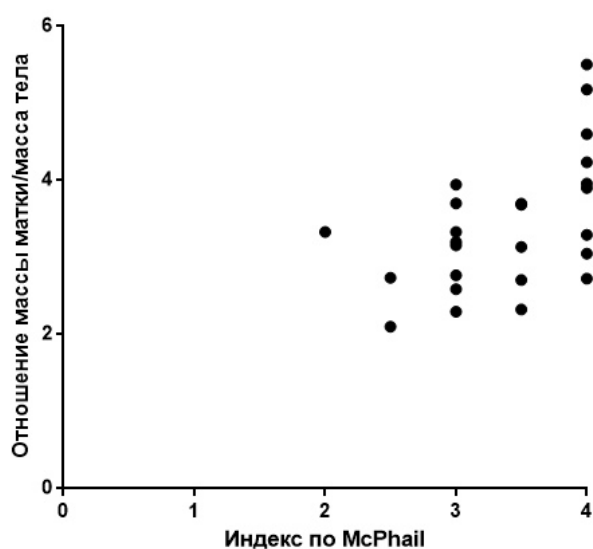


Рис. 8. Графическое изображение корреляции между относительной массой маток и степенью секреторной трансформации эндометрия под воздействием мепрегенола диацетата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное исследование по изучению структурно-функциональных изменений эндометрия при воздействии мепрегенола диацетата показало, что новый синтетический аналога прогестерона вызывает значительные дозозависимые секреторные изменения в эндометрии модельных животных, превышающие в 34,6 раза таковые для прогестерона. Между степенью секреторной трансформации эндометрия и относительными массами маток кроликов установлена корреляция, позволяющая сделать предварительные выводы об активности препарат в зависимости от вводимой дозы, однако для точного определения гестагенной активности необходимо проведение морфологического исследования ткани эндометрия и определения степени его секреторной трансформации. Согласно полученным результатам, изученный в работе синтетический аналог прогестерона является высокоактивным гестагеном, способным вызывать прегравидные изменения в эндометрии в большей степени чем прогестерон, а также ряд его аналогов, что открывает большую перспективу для его применения в акушерско-гинекологической практике.

ВЫВОДЫ

1. Под воздействием мепрегенола диацетата в эндометрии кроликов происходит секреторная трансформация ткани, которая носит дозозависимый характер.
2. Мепрегенола диацетат проявляет высокую гестагенную активность, превышающую активность прогестерона в 34,6 раза.
3. Между степенью секреторной трансформации эндометрия кроликов и массой матки при воздействии разных доз мепрегенола диацетата наблюдается корреляция (коэффициент Спирмена = 0.48, $p < 0.05$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Africander D., Verhoog N., Hapgood J. P. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception //Steroids. – 2011. – Т. 76. – №. 7. – С. 636-652.
2. Diedrich K. et al. The role of the endometrium and embryo in human implantation //Human reproduction update. – 2007. – Т. 13. – №. 4. – С. 365-377.
3. Быков В. Л. Частная гистология человека. – СПб. : Сотис, 1997.
4. Deneris A. PALM-COEIN Nomenclature for Abnormal Uterine Bleeding //Journal of midwifery & women's health. – 2016. – Т. 61. – №. 3. – С. 376-379.
5. Jabbour H. N. et al. Endocrine regulation of menstruation //Endocrine reviews. – 2005. – Т. 27. – №. 1. – С. 17-46.
6. Reece J. B. et al. Campbell biology. – Boston : Pearson, 2014. – №. s 1309.
7. Evans J. et al. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease //Nature Reviews Endocrinology. – 2016. – Т. 12. – №. 11. – С. 654.
8. Ищенко А. И., Кудрина Е. А. Эндометриоз. Диагностика и лечение. – М. : ГЭотАР-мед, 2002.
9. Miwa I. et al. Pathophysiologic features of “thin” endometrium //Fertility and sterility. – 2009. – Т. 91. – №. 4. – С. 998-1004.
10. Yang H. P. et al. PTEN expression in benign human endometrial tissue and cancer in relation to endometrial cancer risk factors //Cancer Causes & Control. – 2015. – Т. 26. – №. 12. – С. 1729-1736.
11. Gargett C. E., Chan R. W. S., Schwab K. E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells //Molecular and cellular endocrinology. – 2008. – Т. 288. – №. 1-2. – С. 22-29.
12. Леонова З. А., Флоренсов В. В. Синтез и функции женских половых гормонов //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – Т. 117. – №. 2.
13. Maybin J. A., Critchley H. O. D., Jabbour H. N. Inflammatory pathways in endometrial disorders //Molecular and cellular endocrinology. – 2011. – Т. 335. – №. 1. – С. 42-51.
14. Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone //Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica. – 2015. – Т. 94. – С. 8-16.

15. Al-Asmakh M. Reproductive functions of progesterone //Middle East Fertility Society Journal. – 2007. – Т. 12. – №. 3. – С. 147.
16. Довжикова И. В., Луценко М. Т. Современные представления о роли прогестерона (обзор литературы) //Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – №. 60.
17. Jacobsen B. M., Horwitz K. B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription //Molecular and cellular endocrinology. – 2012. – Т. 357. – №. 1-2. – С. 18-29.
18. Conneely O. M. et al. Reproductive functions of progesterone receptors //Recent progress in hormone research. – 2002. – Т. 57. – С. 339-356.
19. Schott D. R. et al. Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor //Biochemistry. – 1991. – Т. 30. – №. 28. – С. 7014-7020.
20. ILENCHUK T. T., WALTERS M. R. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [3H] R5020 photoaffinity labeling: evidence that the A and B subunits are not equimolar //Endocrinology. – 1987. – Т. 120. – №. 4. – С. 1449-1456.
21. Aupperlee M. D. et al. Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development //Endocrinology. – 2005. – Т. 146. – №. 8. – С. 3577-3588.
22. Scarpin K. M. et al. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression //Nuclear receptor signaling. – 2009. – Т. 7. – №. 1. – С. nrs. 07009.
23. Garg D. et al. Progesterone-mediated non-classical signaling //Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2017. – Т. 28. – №. 9. – С. 656-668.
24. Leonhardt S. A., Boonyaratanakornkit V., Edwards D. P. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms //Steroids. – 2003. – Т. 68. – №. 10-13. – С. 761-770.
25. Айламазян Э. К. и др. Культура эндометрия человека: модель изучения репродуктивной функции //Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12. – №. 1. – С. 28-35.
26. Миронов А. Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – 2012.
27. Корхов В. В., Петросян М. А. Гестагены: структура, действие, практическое применение.

28. Корхов В. В., Тапильская Н. И. Гестагены в акушерско-гинекологической практике. – 2005.
29. Петросян, М.А. Гестагенная, контрацептивная и abortивная активность новых синтетических препаратов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 1998.
30. Корхов В. В., Лесик Е. А., Петросян М. А. Исследование и поиск новых гестагенных препаратов для применения их в акушерстве и гинекологии //Журнал акушерства и женских болезней. – 2004. – Т. 53. – №. 2.