

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ СВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ДИДРОГЕСТЕРОНА С РЕЦЕПТОРАМИ ПРОГЕСТЕРОНА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК, ВКЛЮЧЕННЫХ В ПРОГРАММУ ЭКО

М. В. Сукновалова¹, Л. Х. Бехбудова¹, М. П. Клименко², Л. М. Каппушева³,
Е. Н. Карева¹, Н. Л. Шимановский¹, Г. М. Савельева²

Показано, что специфическое связывание дидрогестерона с рецепторами прогестерона мононуклеарных клетках периферической крови пациенток, включенных в программу ЭКО, варьирует от 0 до 298 %, при этом у 62 % женщин дидрогестерон превосходит прогестерон в конкуренции за гестагеновые рецепторы. Выявленные вариации специфического связывания дидрогестерона с рецепторами прогестерона являются резервом повышения эффективности вспомогательной репродуктивной технологии за счет индивидуального подбора препаратов гормональной терапии.

Ключевые слова: дидрогестерон; прогестерон; рецепторы прогестерона; гестагенная терапия

ВВЕДЕНИЕ

Частота женского бесплодия в структуре гинекологической заболеваемости за последние 50 лет возросла почти в 2 раза [10]. Для его лечения был разработан метод экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [11], успех которого во много связан с применением препаратов гестагенной поддержки. Проведение поддерживающей гестагенной терапии является обязательным этапом в перечне процедур, предусмотренных циклом ЭКО. Для этой цели используют препараты натурального прогестерона или дидрогестерон. Несмотря на невысокую активность в тестах Clauberg-McPhail и Corner-Allen [2], дидрогестерон включен в протоколы ЭКО как альтернативный препарат гестагенной поддержки. Тем не менее эффективность гестагенной терапии не достаточно высока, возможно, потому, что не существует четких рекомендаций по выбору гестагенного препарата при проведении ЭКО, и врач назначает лечение эмпирически [3]. Химическая модификация молекулы прогестерона отражается на гестагенной активности соединений и их

специфической связывающей способности с рецепторами прогестерона [4]. Структурные различия молекул прогестерона и дидрогестерона, с одной стороны, и индивидуальные колебания аффинитета рецепторов прогестерона конкретных женщин, с другой, могут служить основой для персонализированного назначения гормональной терапии с целью повышения ее эффективности [6].

Поскольку гравидопротекторная роль принадлежит не только тканям репродуктивного тракта, но и иммунной системе матери, в клетках которой экспрессированы рецепторы прогестерона [1, 9] и которые более доступны для исследования, чем клетки эндометрия, то в качестве тест системы персонального подбора гестагенов в программе ЭКО мы использовали клетки мононуклеарной фракции периферической крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование вошли 44 женщины 26–38 лет, включенные в программу экстракорпорального оплодотворения, которые наблюдались на базе отделения ЭКО (зав. отделением ЭКО КДО — врач высшей категории Е. Г. Лебедева) Центра Планирования и Репродукции Семьи (главный врач центра — главный акушер гинеколог Москвы, чл.-корр. РАМН М. А. Курцер).

Условиями включения в исследование были отсутствие у пациенток тяжелой соматической патологии и выраженных метаболических нарушений, а также бесплодный брак. Все пациентки, включенные в наше исследование, были проинформированы о проведении научного поиска наиболее эффективных препаратов

¹ Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П. В. Сергеева медико-биологического факультета (зав.-член-корр. РАМН, проф. Н. Л. Шимановский), ГБОУ ВПО Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1.

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы “Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы”, 113152, Москва, Севастопольский проспект, 24 “А”.

³ Медицинский центр “КЛИНИКА+31”, 119415, Москва, ул. Лобачевского, 42, строение 4.

гестагенной поддержки первого триместра беременности в цикле ЭКО и дали свое согласие на то, что часть крови предназначенной для определения уровня гормонов, будет направлена на исследование содержания рецепторов прогестерона и выявление их активности по отношению к тому или иному препарату гестагенной поддержки.

Возраст пациенток составил в среднем $33,08 \pm 3,4$ г. Больше количество женщин, включенных в исследование, находились в позднем репродуктивном возрасте, тогда как в репродуктивном возрасте — 44 % исследуемых.

Выделение мононуклеарной фракции клеток крови (МНФК) проводили по методу А. Воуим [8]. Кровь (10 мл) с гепарином (0,5 мл) разводили равным объемом раствора прозрачного Хэнкса, после чего в объеме 5 мл наслаивали на 3 мл теплого раствора фиколла ($c = 1,077$ г/см³). Затем центрифугировали 45 мин при 2000 об/мин (центрифуга РС-6) и стерильной пипеткой отбирали фракцию мононуклеаров (интерфаза). Полученную фракцию переносили в чистую пробирку и для отмытки от фиколла доводили раствором Хэнкса до 10 мл. Далее центрифугировали 15 мин при 1600 об/мин. Процедуру повторяли 2 раза. Далее сливали надосадочную жидкость, а оставшуюся суспензию МНФК поднимали 1 мл физиологического раствора и считали количество клеток в камере Горяева. Все операции проводили при 0 – 4 °С.

Определение специфического связывания ³H-прогестерона (рецепторов прогестерона) с МНФК периферической крови проводили по методу Л. С. Бассалык [5] с модификациями В. П. Фисенко [7]. Для определения общего связывания пробы содержали 20 мкМ ³H-прогестерона (“Amersham”, Англия) и 1 мкМ дексаметазона (“Bayer”, Германия) в инкубационной среде. Для определения неспецифического связывания пробы дополнительно содержали 2 мкМ прогестерона (“Merck”, Германия). Этанол, используемый для разведения стероидов, после раскапывания в 96-луночный планшет, испаряли. Затем добавляли исследуемую фракцию крови (~1 млн. клеток/лунка/100 мкл) и инкубировали 60 мин для определения связывания ³H-прогестерона, после чего всю клеточную суспензию из каждой лунки помещали на стеклянные фильтры (Whatman GF/B) и промывали 100-кратным объемом ледяного ТЭД-буфера рН 7,4 (10 мМ трис-аминометан (“Merck”, Германия). Стеклянный фильтр из каждой пробы после высушивания помещали во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости.

Все исследования проводились в триплетах. Связывание стероидных гормонов в МНФК выражали в фемтомолях гормона на млн. клеток по формуле:

$$N = (T - NSB) \cdot K / (2,22 \cdot A \cdot C),$$

где: N — специфическое связывание; T — средняя величина общего (в отсутствии конкурентного гестаге-

на) связывания меченого гормона в имп/мин, регистрируемых жидкостным сцинтилляционным радиометром SL-30 (“Intertechnique” Франция); NSB — средняя величина неспецифического (в присутствии конкурентного гестагена) связывания в аналогичной аликвоте в имп/мин, регистрируемых бета-радиометром; K — коэффициент, учитывающий разведение пробы суспензией угля (“Serva”, Германия) и эффективность счета-радиометра; 2,22 — коэффициент пересчета из имп/мин, регистрируемых бета-радиометром, в Кюри/мМ; A — удельная радиоактивность ³H-стероида в Кюри/мМ; C — количество клеток в мл.

Величину специфического связывания дидрогестерона (9бета,10альфа-прегна-4,6-диен-3,20-дион “Serva”, Германия) с рецепторами прогестерона (% ингибирования специфического связывания ³H-прогестерона дидрогестероном) вычисляли по формуле:

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

где: I — ингибирование специфического связывания ³H-прогестерона с рецептором дидрогестероном, B спец.преп. — специфическое связывание ³H-прогестерона в присутствии дидрогестерона; B спец.горм. — специфическое связывание ³H-прогестерона в отсутствии дидрогестерона.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism 5, для каждой из непрерывных величин приведены среднее (M) и стандартная ошибка или медиана и верхняя и нижняя квартили в зависимости от типа распределения исследуемой величины. Гипотезу о нормальном распределении изучаемого показателя проверяли с использованием критерия Шапиро-Вилкса.

Таблица 1. Описательная статистика показателей специфического связывания прогестерона и относительной связывающей активности дидрогестерона с рецепторами прогестерона в МНФК пациенток включенных в программу ЭКО

Показатель	Прогестерон, фемтомоляр/млн кл.	Дидрогестерон, %
Минимум	0,0	0,0
25 % перцентиль	0,20	41,7
Медиана	1,75	138,3
75 % перцентиль	6,27	256,9
Максимум	22,90	1126
Среднее	4,25	196,4
Стандартное отклонение	5,82	229,4
Стандартная ошибка	0,87	37,7
Нижняя граница доверительного интервала 95 %	2,48	119,9
Верхняя граница доверительного интервала 95 %	6,02	272,8

Таблица 2. Характеристика групп пациенток в зависимости от связывающей активности дидрогестерона в отношении рецепторов прогестерона МНФК

Показатель	I группа	II группа
Количество пациенток	14 (38 %)	23 (62 %)
Связывающая активность дидрогестерона с РП ($M \pm m$)	28,57 \pm 8,17	298,32 \pm 49,68

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности специфического связывания прогестерона и дидрогестерона в МНФК периферической крови пациенток выявило широкие колебания изученного параметра представленные в табл. 1.

У 4 пациенток не выявлено специфического связывания ^3H -прогестерона с МНФК, поэтому они были исключены из дальнейшего анализа.

При определении относительной связывающей активности дидрогестерона в качестве препарата сравнения стандартно использован прогестерон, активность которого принята за 100%. В свою очередь сила связывания положительно коррелирует с эффективностью препаратов. Поэтому, всех пациенток, вошедших в исследование, разделили на две группы в зависимости от способности рецепторов прогестерона (РП) в МНФК связывать дидрогестерон: I группа — РП активнее связывают прогестерон, II группа — РП лучше связывают дидрогестерон. Сравнительная характеристика относительного связывания дидрогестерона в двух группах приведена в табл. 2.

Уровень связывающей активности дидрогестерона с рецепторами прогестерона более 100 % может служить основанием выбора этого препарата в качестве гестагенной терапии, а у пациенток с более низкими значениями, адекватная гестагенная терапия должна проводиться препаратами натурального прогестерона. Для проверки данной гипотезы необходимо проведение клинического исследования.

ВЫВОДЫ

1. Специфическое связывание дидрогестерона с рецепторами прогестерона (РП) МНФК пациенток, включенных в программу ЭКО, варьирует от 0 до 298 %.

2. Среднее значение относительной связывающей активности РП МНФК с дидрогестероном у пациенток первой группы (38 % пациенток; связывание прогестерона выше, чем дидрогестерона) составило 28,57 \pm 8,17 %, тогда как у пациенток второй группы (62% пациенток; связывание прогестерона ниже, чем дидрогестерона) данный показатель составил 298,32 \pm 49,68 % ($p < 0,0001$).

Работа выполнена в рамках НИР-2 “персонализированная медицина” РНИМУ им. Н. И. Пирогова.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Семейкин, А. С. Духанин, Р. В. Самойликов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 43 – 46 (2006).
2. В. В. Корхов, Е. А. Лесик, М. А. Петросян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(1), 39 – 41 (2005).
3. Г. М. Савельева, *Акушерство*, Геотар Медиа, Москва (2008).
4. Е. Н. Карева, Г. С. Гриненко, Н. Д. Гаспарян и др. *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 36 – 38 (2006).
5. Л. С. Бассалык, *Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека*, Медицина, Москва (1987).
6. П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, В. И. Петров, *Рецепторы физиологически активных веществ*, 2-е изд., Семь ветров, Волгоград (1999).
7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, В. П. Фисенко (ред.), Ремедиум, Москва (2000).
8. В. Boyum, *J. Clin. Lab. Invest.*, № 97, 77 – 89 (1968).
9. C. Ermisch, U. R. Markert, *Z. Geburtshilfe, Neonatology*, **215**(3), 93 – 97 (2011).
10. E. Kalu, M. Thum, H. Abdalla, *Prognostic Assist Reprod Genet.*, **28**(4), 379 – 382 (2011).
11. N. S. Macklon, R. L. Stouffer, L. C. Giudice, B. C. Fauzer, *Endocrine Reviews*, **27**(2), 170 – 207 (2006).

Поступила 18.04.13

RELATIVE BINDING ACTIVITY OF DYDROGESTERONE WITH BLOOD MONONUCLEAR CELLS PROGESTERONE RECEPTORS OF WOMEN INCLUDED IN THE IVF PROGRAM

M. V. Suknovolova¹, L. H. Behbudova¹, M. P. Klimenko², L. M. Kappusheva³,
E. N. Kareva¹, N. L. Shimanovsky¹, and G. M. Savelyeva²

¹ Sergeev department of molecular pharmacology and radiobiology of medico-biological faculty Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanov st. 1, Moscow, 117997, Russia.

² “Center of family planning and reproduction Department of health care of Moscow”.

³ Medical center “CLINIC+31”

It has been shown that specific binding of dydrogesterone with progesterone receptors in blood mononuclear cells of the patients included in the programs of in vitro fertilization, varies from 0 to 298 %, thus at 38 % of women dydrogesterone concedes to a progesterone in the competition for receptors of a progesterone, and 62 % – exceed. The revealed variations of specific binding dydrogesterone with receptors of a progesterone are a reserve of increase of efficiency of auxiliary reproductive technology at the expense of individual selection of hormonal agents.

Keywords: dydrogesterone; progesterone; progesterone receptors; progestin therapy