

Оценка влияния комбинированного орального контрацептива Линдинет 20 на механизмы регуляции пролиферативных процессов при эндометриозной болезни

В.А. Потапов¹, В.И. Ивах¹, С.А. Пашенко², Е.В. Куликовская²

¹Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины

²Киевский областной центр охраны здоровья матери и ребенка

В работе представлены результаты иммуногистохимического исследования маркеров экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER), пролиферации (Ki-67), апоптоза (Bcl-2) и ангиогенеза (VEGF, CD34) в тканях операционных образцов из очагов ретроцервикального эндометриоза у 68 больных. Цель исследования — оценка антипролиферативного эффекта гормонального лечения, которое пациенты получали на протяжении 6 мес до операции: микродозированного комбинированного орального контрацептива Линдинет 20 («Richter Gedeon»), содержащего этинилэстрадиола 0,02 мг и гестодена 0,075 мг, и аналога гонадотропин-рилизинг-гормонов гозерелина в дозе 3,6 мг/мес. Контрольную группу составили пациенты, которым адьювантную терапию перед операцией не проводили. У больных, принимавших перед операцией Линдинет 20, в эктопическом эндометрии наблюдали снижение экспрессии ER в 2 раза, что сопровождалось супрессией эстрогенозависимых сигнальных путей пролиферативных каскадов: снижением индекса пролиферативной активности Ki-67 на 51,1%, маркеров локального ангиогенеза VEGF — на 48,7% и CD34 — на 28,6%, экспрессии протоонкогена Bcl-2, ингибирующего апоптоз, — на 36,1% по сравнению с контрольной группой. По антипролиферативному эффекту Линдинет 20 не намного уступал базовому препарату для лечения эндометриоза гозерелину, при лечении которым аналогичные показатели редуцировались на 60; 62,5; 42,9 и 38,9% соответственно. Сделан вывод, что Линдинет 20, продемонстрировавший хорошие антипролиферативные свойства, может быть успешно применен в терапии эндометриозной болезни как самостоятельно, так и в сочетании с оперативным лечением.

Ключевые слова: эндометриозная болезнь, эндометриоз, Линдинет 20, гозерелин.

Введение

Эндометриоз относится к числу наиболее распространенных гинекологических заболеваний у женщин репродуктивного возраста, приводящих к существенному нарушению качества жизни и снижению фертильности. При этом проблема этиологии, патогенеза и, соответственно, подходов к лечению данного заболевания остается открытым вопросом для дискуссий (Адамян Л.В., Андреева Е.Н., 2001; Баскаков В.П. и соавт., 2002; Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005; Адамян Л.В. и соавт., 2006; Линде В.А., Татарова Н.А., 2010).

С современных позиций эндометриоз — эстрогензависимое доброкачественное пролиферативное заболевание, при котором за пределами границ нормального расположения слизистой оболочки матки происходит разрастание ткани, по морфологическим и функциональным свойствам идентичной эндометрию («эндометриозные очаги», «эндометриозные эктопии», «эндометриозные гетеротопии») и сопровождающейся локальной воспалительной реакцией, гиперэстрогемией, усиленным ангиогенезом, иммуносупрессией и дисбалансом в системе про- и антиапоптотических сигналов в клетках эктопического эндометрия,

их выраженным инвазивным и пролиферативным потенциалом (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005; Потапов В.А. и соавт., 2008). Эндометриоз следует рассматривать как длительно текущее заболевание, требующее планового лечения в течение всей жизни, цель которого — достичь максимального эффекта от медикаментозной терапии и избежать повторных операций (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008).

Эндокринная зависимость эндометриозных гетеротопий не вызывает сомнений, поэтому гормональная терапия занимает ведущее место в консервативном лечении эндометриозной болезни, при неэффективности которой рекомендовано оперативное лечение с последующей медикаментозной поддержкой как для профилактики рецидивов заболевания, так и при неполной эрадикации очага эктопии (Баскаков В.П. и соавт., 2002). В последнее время консервативные и хирургические методы рассматривают не как альтернативные подходы, а этапы одной стратегии лечения эндометриоза (Адамян Л.В. и соавт., 2006).

Среди консервативных методов лечения эндометриоза обычно применяют различные группы гормональных препаратов, позволяющие достичь состояния ги-

позстрогении, способствующей обратному развитию и уменьшению размеров эндометриозных гетеротопий. Основными фармакологическими эффектами этих препаратов являются торможение выделения гонадотропных гормонов гипофиза и подавление функции яичников (агонисты гонадотропин-рилизинг-гормонов (ГнРГ), антигонадотропины), умеренное антигонадотропное влияние и периферическая деградация эстрогеновых рецепторов (гестагены и комбинированные оральные контрацептивы (КОК)), блокада внегонадной локальной конверсии андрогенов в эстрогены (ингибиторы ароматазы) (Баскаков В.П. и соавт., 2002; Адамян Л.В. и соавт., 2006).

Несмотря на разногласия экспертов, на данном этапе агонисты ГнРГ являются своего рода золотым стандартом в лечении эндометриоза, хотя препараты этой группы имеют ограничения по длительности применения (до 6 мес) из-за риска развития остеопороза (Баскаков В.П. и соавт., 2002; Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005; Адамян Л.В. и соавт., 2006). Доказано воздействие агонистов ГнРГ на факторы роста, пролиферативный потенциал, апоптоз и ангиогенез (Адамян Л.В. и соавт., 2006). Следует признать, что доказательная база в отношении антипролифе-

ративного эффекта различных гестагенов и КОК, несмотря на все более широкое их позиционирование с целью лечения эндометриоза (Міністерство охорони здоров'я України, 2003), на сегодняшний день недостаточна. В 4 систематических обзорах показана одинаковая эффективность постоянного (в течение 6 мес) применения даназола, гестринона, медроксипрогестерона, КОК, аналогов гонадолиберина в сравнении с плацебо в купировании болевого синдрома при эндометриозе (Потапов В.А. и соавт., 2008). Существуют опасения, что эстрогены в составе КОК могут оказывать нежелательное противоположное влияние (Sinaii N. et al., 2007). Данные литературы об эффективности медикаментозной терапии иногда могут ввести в заблуждение при выборе формы гормонального лечения с учетом того, что ни один из известных сегодня препаратов не устраняет морфологический субстрат эндометриоза, а лишь оказывает опосредованное влияние на него, чем и объясняется симптоматический клинический эффект.

Учитывая то, что истинные механизмы, регулирующие процессы имплантации и развития эндометриодных гетеротопий сложны и недостаточно изучены, существующая практика оценки терапевтической эффективности лекарственных препаратов, применяемых при эндометриодной болезни в основном базируется на динамике характерных для данной патологии клинических критериев (болевого синдрома), аппаратно-визуальных (ультразвуковое исследование (УЗИ), компьютерная томография, магнитно-резонансная томография — МРТ) и эндоскопических признаков манифестации болезни, результатах серологических тестов (биохимические и иммунологические показатели, уровни стероидных гормонов и онкомаркеров), которые не являются патогномичными в отношении механизмов клеточной пролиферации, носят неспецифический или субъективный характер с высокой вариабельностью признаков. Разработка и все более широкое внедрение в медицину молекулярных технологий и методов иммуногистохимического (ИГХ)-исследования митотической активности и генетически детерминированных ростовых факторов в различных тканях открывают хорошую перспективу не только для расширения знаний об эндометриодной болезни в целом, но и объективизации и стандартизации терапевтической стратегии, основанной на строгих закономерностях цитоиммунофенотипа эндометриодных гетеротопий. С этих позиций особенно актуальным становится переоценка существующих и поиск новых подходов к оптимизации гормональной терапии эндометриоза с направленной антиэстрогенной активностью и минимальными побочными эффектами при длительном применении.

Цель проведенного нами исследования — оценка супрессорного влияния монофазного микродозированного КОК Линдинет 20 («Richter Gedeon»), содержащего этинилэстрадиол 0,02 мг и гестоден

на 0,075 мг, на пролиферативную функцию эндометриальных желез и стромы у женщин с эндометриозом ретроцервикальной локализации.

Обоснованием выбора данного КОК, кроме низкого содержания эстрогенного компонента, послужило наличие в его составе производного нортестостерона последнего поколения — гестодена, который занимает одну из лидирующих позиций по антипролиферативной активности в линейке современных гестагенов и имеет практически 100% биодоступность. Гестоден обладает выраженными антиэстрогенными свойствами в клетках эндометрия, нейтрализуя нежелательные метаболические эффекты, и небольшой андрогеноподобной активностью, однако в комбинации с этинилэстрадиолом оказывает антиандрогенное действие за счет индукции синтеза глобулинов, связывающих половые стероиды, и ингибирования выработки гонадотропных гормонов, стимулирующих синтез андрогенов в яичниках. Кроме этого, за счет антиминералокортикоидного действия при приеме гестодена отсутствуют напряжение молочных желез, головная боль (Міністерство охорони здоров'я України, 2003).

Объект и методы исследования

Проведено сравнительное морфо- и ИГХ-исследование операционных образцов тканей 68 больных репродуктивного возраста (31,6±6,4 года) с эндометриозом ретроцервикальной локализации I–III степени распространения по классификации Л.В. Адамян и соавторов (2006), которым в течение 6 мес перед операцией проведено гормональное лечение.

Больных рандомизировали случайным образом на три группы. В 1-ю группу вошли 26 пациенток, применявших в пролонгированном режиме (без перерывов на менструальноподобную реакцию) микродозированный КОК Линдинет 20. Во 2-ю группу включены 18 пациенток, применявших аналог ГнРГ гозерелин в дозе 3,6 мг/мес. Гозерелин выбран препаратом сравнения, поскольку относится к группе препаратов, признанных стандартом медикаментозной терапии эндометриоза. Контрольную группу составили 24 женщины, которым адьювантную терапию перед операцией не проводили, а операция проведена в конце 1-й фазы менструального цикла, когда, как известно, эстрогенная стимуляция органов-мишеней максимальна.

Гормональное лечение применяли с целью уменьшения объема гетеротопий, интраоперационной кровопотери и травматизации окружающих тканей, а также облегчения симптомов заболевания в тех случаях, когда выполнение операции по разным причинам было отсрочено.

Показаниями к проведению операции были выраженная тазовая боль и диспареуния на почве эндометриоза ретроцервикальной локализации, диагностированного на основании характерной клинической симптоматики и данных гинекологического обследования, результатов УЗИ, МРТ,

а также диагностической лапароскопии по поводу перитонеального бесплодия.

Биопсию образцов тканей в ходе операции брали из очагов эктопии эндометрия до их деструкции (иссечение или абляция) и из макроскопически неповрежденных участков брюшного покрова и подлежащих тканей вблизи очага (эутопические ткани).

Для проведения ИГХ-исследования операционный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина на протяжении 10–12 ч с последующей проводкой и заливкой в парафин, согласно принятым стандартам. Парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм, полученные на микротоме марки «Microm HM 340», наносили на специально обработанные адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus и депарафинировали с последующим проведением тепловой индукции путем нагревания в автоклаве в течение 8 мин при температуре 121 °С в цитратном буфере с pH 6,0.

В основе прогрессирования эндометриодных гетеротопий, как и какого-либо другого гиперпролиферативного процесса в репродуктивной системе, лежит соотношение процессов пролиферации, апоптоза, синтеза ростовых факторов, уровня гормональных промоторов сигнальных путей пролиферативных каскадов и чувствительность к ним рецепторного аппарата. В связи с этим в исследовании проведена оценка следующих основных ИГХ клеточных маркеров пролиферативных каскадов: маркера клеточной пролиферации Ki-67 (клон MIB-1 (Dako), SP6 (LabVision)), фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF) (клон VG1 (Dako), Bcl-2 (клон 124 (Dako)), рецепторов эстрогена (estrogen receptor — ER) (клон 1D5 (Dako), SP1 (LabVision)) и прогестерона (progesterone receptor — PR) (клон PgR 636 (Dako), SP2 (LabVision)), маркера ингибитора апоптоза Bcl-2 (клон 124 (Dako)), а также маркера эндотелиальных клеток сосудов CD34 (клон QBEnd (Dako)).

В основе ИГХ-исследования лежит специфическое взаимодействие между поликлональными или моноклональными антителами и антигенными детерминантами тканей с последующей визуализацией реакции на светооптическом уровне. Титр антител подбирали индивидуально для каждого маркера с использованием в качестве растворителя специального раствора Antibody Diluent (DakoCytomation). Вторичные антитела, которые содержали большое количество молекул пероксидазы хрена, наносили на срезы и инкубировали во влажных камерах на протяжении 30 мин с промыванием в трис-буферном растворе между каждым этапом в течение 10 мин. Идентификацию реакции проводили путем нанесения хромогена (DakoCytomation) под контролем микроскопа на протяжении от 20 с до 3 мин с проявлением в виде темно-коричневого окрашивания специфических структур в зависимости от маркера (интрануклеарная, цитоплазматическая, мембранная реакции). Для дифференцирования структур тканей срезы дополнительно окрашивали гематоксили-

ном Майера в течение 1–3 мин. Последующую их дегидратацию и заключение в бальзам осуществляли в соответствии с общепринятым стандартом.

Количественные и качественные показатели экспрессии маркеров изучали при микроскопии гистологических срезов как минимум на 8–10 случайно выбранных полях зрения при увеличении в 100; 200; 400 и 1000 раз с использованием микроскопа «Leica» (Германия).

Для оценки ИГХ-реакции использовали полуколичественный компьютерный анализ цифровых изображений (Semi-quantitative digital image analysis) плагинами «Colour Deconvolution» и «Cell Counter», которые позволяют выделить 10 полей по 100 клеток в разных областях микропрепарата и подсчитать количество окрашенных ядер и индексы экспрессии маркеров с интрануклеарной окраской. Цифровые изображения TIFF-формата (в каждом срезе — 10 репрезентативных зон) получали с помощью фотокамеры «Сапоп EOS D30» (ручной режим фотографирования А/Н/М; светочувствительность ISO-100, экспозиция 1/15 с, диафрагма 1,6 мм).

Для максимальной точности количественной оценки изучаемых ИГХ-маркеров подсчитывали уровень их экспрессии не менее чем в 1000 клеток. Для определения среднего значения (Н-индекса) ER, PR оценивали только интрануклеарные реакции в клетках не менее как в 10 полях зрения при увеличении в 400 раз. При анализе учитывали количество прореагировавших клеточных ядер, а также интенсивность окрашивания, которая варьирует в пределах 0–3 баллов (0 — отсутствие интрануклеарного окрашивания (негативная реакция), 1 — слабопозитивная, 2 — умеренновыраженная, 3 — интенсивная равномерная внутриядерная реакция. Средние значения (Н-индекс) рассчитывали полуколичественным методом по формуле:

$$H = (\text{доля } (\%) \text{ слабопрореагировавших клеток} \cdot 1) + (\text{доля } (\%) \text{ клеток с умеренно-выраженной реакцией} \cdot 2) + (\text{доля } (\%) \text{ клеток с интенсивной реакцией} \cdot 3).$$

Показатели 0–50 баллов расценивали как отсутствие экспрессии, 50–100 — как слабопозитивную, ≥ 100 баллов — как позитивную экспрессию антигенов к рецепторам.

Индекс пролиферации Ki-67 высчитывали как процент клеток с позитивной интрануклеарной реакцией (антигенные детерминанты расположены в ядре) от общего среднего количества клеток при изучении всех участков.

При анализе ИГХ-окрашивания с VEGF использовали следующие критерии в баллах: 0 — негативная реакция (отсутствие какой-либо позитивно окрашенной клетки), 1 — слабоокрашено (позитивно окрашены дискретно расположенные клетки), 2 — умеренновыраженное окрашивание (большое количество позитивноокрашенных клеток), 3 — интенсивное мембранное и/или цитоплазматическое окрашивание.

Расчет протеинов Bcl-2 проводили согласно рекомендациям D. Dixon и соавто-

рами (2002) по следующей балльной шкале: 0 — отсутствие реакции (негативная), 1 — слабопозитивная реакция (1–25% клеток позитивноокрашены), 2 — умеренно выраженная позитивная реакция (26–50%), 3 — интенсивная реакция (51–75%), 4 — очень интенсивная цитоплазматическая и/или мембранная реакция (76–100%).

Подсчет плотности микрососудов в CD34-позитивных структурах проводили при увеличении в 200 раз (площадь поля зрения — 0,74 мм²). Результаты отображали как среднее количество сосудов в 5 наиболее васкуляризованных полях зрения.

Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента, а также расчета интенсивных и экстенсивных показателей.

Результаты и их обсуждение

Антитело Ki-67 позволяет идентифицировать ядерный антиген, который экспрессируется во всех клетках, вышедших из G0 фазы митоза, то есть дает возможность оценить пролиферативный потенциал клеток образца ткани. В контрольной группе больных, не получавших гормонального лечения, экспрессия Ki-67 выявлена как в железистом эпителии, так и в стромальных клетках практически во всех биоптатах тканей из очагов эндометриоза. Как продемонстрировано на рис. 1, в целом для образцов тканей эктопического эндометрия была характерна более высокая (в 4,5 раза) пролиферативная активность в сравнении с образцами эутопических тканей ($p < 0,01$).



Причиной повышенной пролиферации эндометриальных клеток могут быть выявленные нами нарушения в регуляции их апоптоза и избыточная экспрессия ядерных рецепторов к эстрогенам (ER), являющихся важным звеном гормонозависимых сигнальных путей пролиферативных каскадов.

Апоптоз представляет собой биологический механизм поддержания клеточного гомеостаза посредством уничтожения ненужных или избыточно пролиферирующих в физиологических условиях клеток с их последующей элиминацией из орга-

низма. Циклический рост, или так называемый тканевой ремоделинг, отмечаемый в репродуктивный период, представляет собой в сущности этапы планирования программирования клеточной гибели. Апоптоз, наблюдаемый в процессе секреторной и менструальной фаз цикла, является ключевым событием, регулирующим количество клеток нормально расположенного эндометрия. Индукция апоптоза происходит без вовлечения иммунных реакций или воспаления и требует активной экспрессии генов (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005).

Ключевой механизм апоптоза — регулирование распада ДНК с участием белков семейства Bcl-2 (B-клеточная лимфома/лейкемия 2), которые первоначально изучены на клетках лимфом (отсюда и название) и к настоящему времени наиболее исследованы. Ген Bcl-2 (регулятор смерти) является протоонкогеном, локализующимся в хромосомах человека и кодирующим одноименный белок, расположенный на внутренней мембране митохондрий (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005). Гиперэкспрессия Bcl-2 несет антиапоптотический потенциал и защищает ее от гибели (апоптотическая устойчивость).

Накопление онкопротеина Bcl-2 отмечено нами как в цитоплазме железистого эпителия, так и в стромальных клетках, при этом его экспрессия в очагах эктопического эндометрия в 1,8 раза превышала аналогичный показатель в эутопических тканях (см. рис. 1). По-видимому, избыток экспрессии Bcl-2 препятствует восстановлению баланса в про- и антиапоптотических сигнальных путях (и, таким образом, формирует основу для выживания эктопических эндометриальных клеток) и их аномальному накоплению в очагах эндометриоза, что способствует прогрессированию заболевания.

Известно, что на клеточном уровне процессы пролиферации и апоптоза в репродуктивной системе индуцируют половые гормоны с участием генов и протоонкогенов. При этом степень экспрессии ER определяет ответ клетки на эстрогены, которые вовлечены во множество пролиферативных каскадов, в том числе развитие и рост эндометриодных гетеротопий (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005).

Способность эндометриальных имплантов сохранять гормональные ответы доказана еще в конце XX ст. (Dizerega G.S. et al., 1980) при изучении влияния эстрогенов, прогестерона и плацебо на рост перитонеальных эндометриальных имплантов у кастрированных обезьян. Эстрогены были способны поддерживать рост эндометриальной ткани на брюшине, при гипостерогении наблюдали атрофию ткани эндометрия. Это послужило основанием для формирования гипотезы, что именно гормональные ответы эндометриальной ткани формируют физиологическую основу для эффективной супрессорной гормональной терапии.

Следует отметить (см. рис. 1), что экспрессия ядерных рецепторов к эстрогенам в ИГХ-позитивных клетках эпителия и стро-

мы эндометриальных гетеротопий и эндометрии женщин контрольной группы, не получавших гормональное лечение, существенно не различались ($p < 0,1$). Однако в сравнении с аналогичными исследованиями в эутопических участках брюшины ретроцервикальной области экспрессия их в очагах эндометриоза была в 3,8 раза выше, что свидетельствует о более высоком потенциале колонизации подобных эндометрию клеток в зоне инвазии за счет высокой плотности ядерных гормон-рецепторных комплексов, запускающих механизмы транскрипции эстроген-зависимых генов, результатом которой является цитопролиферативная активность. Это обстоятельство дало нам основание провести сравнительную оценку экспрессии ростовых факторов в очагах эндометриоза и расположенных рядом эутопических тканях, считая, что именно этот критерий на границе «поражение — здоровая ткань» в значительно большей степени характеризует пролиферативный потенциал зоны эктопии эндометрия и способность к прогрессу заболевания, чем сравнение с нормально расположенным эндометрием в полости матки.

Исследование тканей биоптатов из очагов эндометриоза с использованием антител к рецептору CD34 — маркеру клеток эндотелия сосудов — позволило визуализировать сосуды и оценить уровень ангиогенеза. В контрольной группе пациентов с эндометриозом ретроцервикальной локализации, не получавших гормональное лечение, распределение сосудов в исследованных биоптатах было неравномерным и зависело от пролиферативной активности эктопии. Вокруг неактивных зон (отсутствие экспрессии Ki-67) в очагах склероза сосудов их или практически не было, или, наоборот, из-за коллапса стромы они были сближены. Только вокруг участков активного эндометриоза (позитивная экспрессия Ki-67) отмечена высокая выявляемость CD34, свидетельствующая о повышенном ангиогенезе.

Количественная оценка плотности гемокapилляров при ИГХ-исследовании CD34 показала, что в целом в очагах эндометриоза плотность сосудов в сравнении с эутопическими тканями была в 2,1 раза выше ($p < 0,05$). Плотность сосудов была выше в материале, полученном из обширных очагов эндометриоза, чем в препаратах из небольших участков поражения, что свидетельствует о том, что прогресс заболевания возможен только при наличии адекватного кровоснабжения с формированием зоны активного эктопического роста эндометриальных клеток.

В регуляции ангиогенеза участвует ряд биологических веществ. Главным общепризнанным индуктором ангиогенеза является VEGF, который индуцирует пролиферацию клеток эндотелия и важен для заживления ран, роста опухоли и метастазирования. Высокая экспрессия VEGF в эктопическом эндометрии, по-видимому, является одним из условий успешной имплантации и прогрессирования эндометриоза (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005).

Нами выявлена высокая экспрессия VEGF не только в зоне эктопии эндометрия, но и на периферии очага с эутопическими тканями, где этот показатель оказался повышенным почти в 4 раза (рис. 2). Это свидетельствует о более высоком потенциале к росту эктопического эндометрия именно на периферии очага, что объясняет феномен инвазии эндометриодных очагов вглубь тканей, в котором, по-видимому, участвуют не только клетки-импланты, но и клетки-реципиенты.

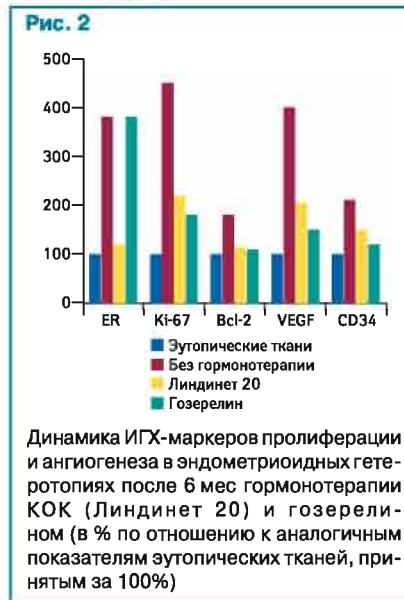
Известно, что экспрессия VEGF увеличивается при гипоксии, наблюдается также накопление VEGF клетками, вовлеченными в воспаление (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005). Очевидно, что деструкция и «микромеланурия» клеток-имплантов эндометрия на эктопированных участках с развитием воспаления в окружающих тканях постоянно поддерживает активный ангиогенез вблизи границ эктопии.

Таким образом, как показалось проведенное нами исследование, для иммунофенотипа ретроцервикального эндометриоза характерны высокая экспрессия ER, ингибитора апоптоза протоонкогена Bcl-2, ростового фактора VEGF и повышенный ангиогенез не только в очагах эктопического эндометрия, но и в пограничных зонах эутопических тканей, которые, по-видимому, играют важную роль в патогенезе эндометриодной болезни.

Супрессивное гормональное лечение, проведенное в течение 6 мес у пациенток 1-й и 2-й групп внесло существенную коррекцию в большинство изученных нами ИГХ-маркеров пролиферации. Так, у пациенток 1-й группы, принимавших с целью лечения эндометриоза КОК, отмечено снижение пролиферативной активности в зоне эктопического эндометрия на 51,1% (рис. 2), что не намного уступало этому показателю во 2-й группе пациентов с депривацией яичникового стероидогенеза, вызванной агонистом ГнРГ, где редукция экспрессии Ki-67 составила в среднем 60% по отношению к контрольной группе. Однако (см. рис. 2), полного угнетения митотической функции клеток в эндометриодных очагах ни в одном случае не зарегистрировано, разве что в половине случаев экспрессия Ki-67, как в 1-й, так и 2-й группе, приблизилась к этому показателю в эутопических тканях этих же пациентов. Таким образом, можно сделать вывод, что антиэстрогенное медикаментозное лечение воздействует только на гормонозависимый сигнальный путь регуляции пролиферации, который, как известно, является не единственным.

После гормонального лечения с применением КОК у пациенток 1-й группы экспрессия гена Bcl-2 снизилась на 36,1% по отношению к контрольной группе и практически достигла уровня апоптоза в эутопических тканях (рис. 2), что свидетельствует о гормонозависимости этого процесса в репродуктивных органах. Очевидно, что один из позитивных моментов приема КОК — это усиление программированной клеточной смерти и уменьшение роста эктопического эндометрия. Анало-

гичная тенденция отмечена и при применении в лечении эндометриоза агониста ГнРГ (см. рис. 2).



Считается, что синтез ER регулируется соответствующим гормоном (Киселев В.И., Ляшенко А.А., 2005), поэтому на фоне применения агониста ГнРГ и достигнутой выраженной гипоэстрогении, что сопровождалось аменореей у больных 2-й группы, можно было ожидать уменьшения экспрессии ER в эндометриодных очагах. Вопреки ожиданиям, снижения экспрессии ER в исследованных морфологических образцах тканей не наблюдали, и этот показатель, как и в контрольной группе больных, у которых не проводили гормонального лечения, почти в 4 раза превышал уровень экспрессии ER в эутопических тканях. Таким образом, центральное торможение стероидогенеза в яичниках не отразилось на экспрессии ER, что можно объяснить только наличием локальных условий для стимуляции рецепторного аппарата непосредственно в тканях эндометриодных гетеротопий.

К. Zeitoun и соавторами (1998) показано, что значительные изменения фермента ароматазы — представителя надсемейства цитохромов P450 19 семейства — в стромальных клетках при эндометриозе вызывают в этой ткани конверсию андростендиола в эстрон, являющийся слабым эстрогеном, но способным к преобразованию в 17-β-эстрадиол в процессе катализу с участием фермента 17-β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 1. Высокая вероятность локального стероидогенеза в какой-то степени объясняет выявленную нами сохранность высокой экспрессии рецепторов половых гормонов с потенциальной эстрогенной стимуляцией в эндометриодных очагах сразу после окончания лечения агонистом ГнРГ, хотя требует проверки — достаточно ли того количества конверсированного эстрогена для гиперэкспрессии ядерного рецепторного аппарата. Вместе с тем, проведенные исследования полностью подтверждают тезис, что эффект лечения эндометриоза при применении агонистов ГнРГ наблюда-

ється тільки в процесі лікування, а після його закінчення швидко нивелюється, і не менше ніж у 78% хворих після відміни медикаментозної терапії відзначається персистенція захворювання (Баскаков В.П. і соавт., 2002; Адамян Л.В. і соавт., 2006). Ню, в відмінності від авторів, вважають, що чутливість рецепторів стероїдних гормонів в ектопічних очагах знижена або змінена, що може проявлятися резистентністю ендометріоза до дії гормонотерапевтичних препаратів, по нашому мнению, витікає з проведеного дослідження, недостатня ефективність супресивної гормонотерапії, в частині аналогами ГНРГ, пояснюється як раз високою збереженістю рецепторного апарату, обумовленого локальним стероїдогенезом і швидким відновленням процесу гіперпроліферації ендометриальних імплантів після закінчення лікування і встановлення стероїдогенезу в яєчниках.

В протилежності вищеозначеному явленню, в 1-й групі пацієнтів, отримавших КОК, спостерігалось зниження експресії естрогенових рецепторів в 2 рази в порівнянні з контрольною групою, то єсть очевидне зниження активності рецепторного апарату. Механізм цього явлення прогнозуємо. Як відомо, гестагени, як в чистому вигляді, так і в складі КОК, викликають деградацію ER, і в цьому заключається їх головний супресивний ефект при гіперпроліферативних процесах в репродуктивних органах. Крім того, прогестерон стимулює інактивізацію 17- β -естрадіола з перетворенням його в малоактивний естрон під каталітичним дією 17- β -гидроксистероїддегідрогенази типу 2. В користь супресивного ефекту гестагенов свідчить той факт, що ендометріоз в значительній ступені знижує свою активність в період вагітності і знову обостряється в післяродовий період і після абортів (Баскаков В.П. і соавт., 2002).

Після 6 міс терапії КОК у пацієнток 1-й групи виявлено зниження експресії маркерів ангиогенезу CD34 на 28,6% і VEGF — на 48,7% по порівнянню з контрольною групою (см. рис. 2). Для порівняння во 2-й групі хворих на фоні медикаментозної менопаузи, викликаній гозереліном, зниження щільності судин мікроциркуляторного русла по результатам оцінки CD34 і продукції VEGF в зоні ендометриальної ектопії було більш виражено (зниження експресії вказаних маркерів на 42,9 і 62,5% відповідно). Поки неясно, являється ли обструкція мікроциркуляції слідствием опосередкованого впливу гормонотерапії на ростовий фактор VEGF або результатом зниження загальної митотическої активності і регресса маси ектопіческо-го ендометрія, по результаті всіх випадків був однозначний — локальна редукція кровоснабження супроводжувалась зменшенням кількості Ki-67-позитивних клітин і клінічним зменшенням очага ураження. В цій зв'язі очевидно,

що процес деваскуляризації прямо пропорційно експозиції гормонотерапії, і в цьому відношенні КОК мають перед аналогами ГНРГ перевагу, яке заключається в можливості проведення більш тривалого курсу терапії (≥ 12 міс).

Висновки

По даним проведеного ІГХ-дослідження маркерів проліферації, супресивний ефект мікродозованого КОК Ліндинет 20 (етинілестрадіола 0,02 мг і гестодену 0,075 мг) при застосуванні в неперервному режимі в відповідності з клінічним протоколом лікування генітального ендометріоза (Міністерство охорони здоров'я України, 2003) не поступає по ряду позицій агоністу ГНРГ гозереліну, а, відповідно, вказаний КОК може бути успішно застосований в терапії ендометриальної хвороби як самостійно, так і в поєднанні з оперативним лікуванням.

Відзначимо, що дослідження маркерів проліферації, ангиогенезу, апоптозу і рецепторів стероїдних гормонів не тільки грає важливу роль в розумінні процесів імплантації і прогресування ендометриальних гетеротопій на рівні ауто-, інтра- і паракринної регуляції, але і дає можливість отримати молекулярні докази ефективності різних методів гормонотерапії ендометріоза.

Список використаної літератури

- Адамян Л.В., Андреева Е.Н. (2001) Генітальний ендометріоз. Етіопатогенез, клініка, діагностика, лікування. Метод. посібник для лікарів. Медицина, Москва, 35 с.
- Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. (2006) Ендометріоз: Руководство для лікарів. Медицина, Москва, 416 с.
- Баскаков В.П., Цвелев Ю.В., Кира Е.Ф. (2002) Ендометриальна хвороба. Видавництво Н-Л, Санкт-Петербург, 452 с.
- Киселев В.И., Ляшенко А.А. (2005) Молекулярні механізми регуляції гіперпластических процесів. Дімітрід Графік Група, Москва, 348 с.
- Линде В.А., Татарова Н.А. (2010) Ендометріоз. Патогенез, клінічна картина, діагностика і лікування. ГЭОТАР-Медиа, Москва, 192 с.
- Міністерство охорони здоров'я України (2003) Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 15.12.2003 р. № 582 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги» (http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20031215_582.html).
- Потапов В.А., Медведєв М.В., Івах В.И. (2008) Коментарі до клінічної оцінки неперервного режиму застосування мікродозованого комбінованого орального контрацептива Ліндинет-20 в цілях профілактики післяопераційних рецидивів ендометриозу яєчників у жінок репродуктивного віку. Здоров'я жінки, 3(1): 136–139.
- Dixon D., Flake G.P., Moore A.B. et al. (2002) Cell proliferation and apoptosis in human uterine leiomyomas and myometria. Virchows. Arch., 441(1): 53–62.
- Dizerega G.S., Barber D.L., Hodgen G.D. (1980) Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. Fertil. Steril., 33(6): 649–653.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2008) Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. Fertil. Steril., 90(5 Suppl.): S260–S269.

Sinail N., Cleary S.D., Younes N. et al. (2007) Treatment utilization for endometriosis symptoms: a cross-sectional survey study of lifetime experience. Fertil. Steril., 87(6): 1277–1286.

Zeitoun K., Takayama K., Sasano H. et al. (1998) Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17 β -estradiol. J. Clin. Endocrinol. Metab., 83(12): 4474–4480.

Оцінка впливу комбінованого орального контрацептиву Ліндинет 20 на механізми регуляції проліферативних процесів при ендометриальній хворобі

В.А. Потапов, В.І. Івах,
С.А. Пащенко, Е.В. Куликовська

Резюме. У роботі наведено результати імуногістохімічного дослідження маркерів експресії естрогенових рецепторів (ER), проліферації (Ki-67), апоптозу (Bcl-2) і ангиогенезу (VEGF, CD34) у тканинах операційних зразків із вогнищ ретроцервікального ендометріозу у 68 хворих. Мета дослідження — оцінка антипроліферативного ефекту гормонотерапії, яке пацієнти отримували протягом 6 міс до операції: мікродозованого комбінованого орального контрацептиву Ліндинет 20 («Richter Geddon»), що містить етинілестрадіолу 0,02 мг та гестодену 0,075 мг, і аналога гонадотропін-релізінг-гормонів гозереліну в дозі 3,6 мг/міс. Контрольну групу становили пацієнти, яким ад'ювантну терапію перед операцією не проводили. У хворих, які застосовували перед операцією Ліндинет 20, в ектопічному ендометрії відзначали зниження експресії ER в 2 рази, що супроводжувалося супресією естрогенозалежних сигнальних шляхів проліферативних каскадів: зниженням індексу проліферативної активності Ki-67 на 51,1%, маркерів локального ангиогенезу VEGF — на 48,7% і CD34 — на 28,6%, експресії протоонкогену Bcl-2, інгібуючого апоптоз, — на 36,1% порівняно з контрольною групою. За антипроліферативним ефектом Ліндинет 20 не набагато поступає базовому препарату для терапії ендометріозу — гозереліну, при лікуванні яким аналогічні показники редукувалися на 60; 62,5; 42,9 і 38,9% відповідно. Зроблено висновок, що Ліндинет 20, який продемонстрував хороші антипроліферативні властивості, може бути успішно застосований у терапії при ендометриальній хворобі як самостійно, так і в поєднанні з оперативним лікуванням.

Ключові слова: ендометриальна хвороба, ендометріоз, Ліндинет 20, гозерелін.

Estimation of combined oral contraceptive Lindynette 20 influence upon the mechanisms

of proliferative processes regulation in case of endometriosis

V.A. Potapov, V.I. Ivah,
S.A. Paschenko, E.V. Kulikovskaya

Summary. The research presents the results of immunohistochemistry studies of markers expressing estrogen receptors (ER), cell proliferation (Ki-67), apoptosis (Bcl-2) and angiogenesis (VEGF, CD34) in the tissue of operative samples from foci of retrocervical endometriosis from 68 patients. The objective of the research is to estimate the antiproliferative effects of hormone treatment administered to

the patients during 6 months prior to surgery: micro-dosed combined oral contraceptive Lindynette 20 («Richter Gedeon») containing 0.02 mg of ethinylestradiol and 0.075 mg gestodene and gonadotropin-releasing hormone analogue goserelin at a dose of 3.6 mg/month. Control group consisted of patients who did not receive adjuvant therapy before surgery. The patients who received Lindynette 20 were found to show the decrease of ER expression in ectopic endometrium twice, that was accompanied by suppression of estrogen-dependent signaling pathways of proliferative cascades: reduced proliferative index Ki-67 by 51.1%, local angiogenesis VEGF by 48.7%,

CD34 by 28.6%, expression of proto-oncogene Bcl-2, that inhibits the apoptosis — by 36.1% comparing to the control group. Antiproliferative effect of Lindynette 20 was found no less effective than the basic treatment of endometriosis with goserelin, in the treatment of which analogical indices were reduced by 60, 62.5, 42.9 and 38.9%, respectively. It is concluded that Lindynette 20, showed good antiproliferative properties, can be used successfully in treatment of endometriosis both independently and in combination with surgery.

Key words: endometrial disease, endometriosis, Lindynette 20, goserelin.

Информация для профессиональной деятельности медицинских и фармацевтических работников.

Линдинет 20

№ UA/7688/01/01 от 15.02.2008 г.

Общая характеристика. Этинилэстрадиол 0,02 мг и гестоден 0,075 мг в таблетках, покрытых оболочкой. **Фармакологические свойства.** Комбинированный пероральный противозачаточный препарат. Блокирует действие гонадотропинов. Первичный эффект проявляется торможением овуляции. Применение препарата приводит к изменению характеристик цервикальной слизи, которая затрудняет проникновение сперматозоидов в полость матки и влияет на эндометрий, тем самым снижая возможность имплантации оплодотворенной яйцеклетки.

Все это способствует предотвращению беременности. Помимо предупреждения беременности, имеет ряд положительных свойств: оказывает регулирующее влияние на менструальный цикл, способствует снижению частоты возникновения функциональных овариальных кист и внематочной беременности, фиброаденом и фиброкист в молочных железах, воспалительных процессов в органах малого таза, рака эндометрия, улучшает состояние кожи при угревой сыпи. **Показания.** Контрацепция. **Побочные эффекты.** В первый период приема препарата возможно нагрубание молочных желез, ухудшение самочувствия, мажущие кровотечения (обычно слабо выражены и через 2–4 цикла исчезают), тошнота, рвота, головная боль, изменение массы тела и либидо, подавленное настроение, хлосазма, дискомфорт при ношении контактных линз и др.

Реферативна інформація

Как избавиться от головной боли без медицинских препаратов?



Лечение частой и сильной головной боли у детей и взрослых, включая мигрень, является серьезной проблемой современной медицины в связи с ее широкой распространенностью и нередкой резистентностью к терапии. Так, по данным, полученным в США, распространенность этой патологии среди детей и подростков составляет около 17%. У таких пациентов часто наблюдаются проблемы в академическом и социальном развитии, а также снижение качества жизни.

Метод биологической обратной связи (БОС), согласно докладу комитета по стандартам качества Американской академии неврологии (American Academy of Neurology — AAN), является рекомендованным для лечения мигрени у взрослых (Silberstein S.D., 2000). Однако, как свидетельствуют результаты недавно проведенного исследования, этот метод можно с успехом применять и у детей.

В этой работе доктор Хайди Блуме (Heidi Blume) из Вашингтонского университета (University of Washington), США, и соавторы обследовали детей в возрасте 8–18 лет, проходивших лечение в период 2004–2008 гг. по поводу головной боли (n=132) с применением терапии БОС.

Исследование носило характер ретроспективного и включало сбор анамнеза заболевания со слов родителей ребенка, первичный визит к врачу с медицинским обследованием и последующее проведение в среднем 8 сессий терапии БОС. Интервал между сессиями составлял 1–2 нед.

Сам метод БОС заключался в снижении боли и стресса путем изучения реакции организма на эти раздражители. С этой целью использовали специальные мониторинговые инструменты, регистрирующие сердцебиение, температуру тела, артери-

альное давление, мышечное напряжение и мозговые волны. Таким образом, пациенты, наблюдая за изменениями электромиограммы, электроэнцефалограммы, артериального давления, температуры конечностей и частоты сердечных сокращений, учились самостоятельно их контролировать, снижая общее напряжение, психомоторное возбуждение, интенсивность и частоту головной боли.

Как показали результаты, после проведенного лечения средняя частота возникновения головной боли снизилась с 3,5 до 2 дней в неделю (p<0,001), а интенсивность — с 6 до 5 баллов (из возможных 10 баллов).

У 58% пациентов наблюдали положительный ответ на БОС, что определялось как менее чем 50% снижение частоты возникновения головной боли или снижение ее интенсивности на >3 пунктов. Среди лиц с эпизодической головной болью получены еще более хорошие результаты с положительным ответом у 73% пациентов.

Ученые отметили, что позитивные изменения коснулись также лиц с хронической головной болью. В этой подгруппе число дней, прожитых с этим симптомом, в среднем снизилось с 7 до 4 в неделю (p<0,001).

Среди факторов, связанных с отсутствием положительного эффекта БОС, выделили прием ингибиторов селективного захвата серотонина, более короткий период применения БОС. Одним из факторов, ассоциированных с положительным ответом на терапию, было овладение навыком поднимать температуру рук более чем на 3° по Фаренгейту (то есть на 5,4° по Цельсию).

Резюмируя полученные данные, исследовательская группа отметила высокую эффективность метода БОС, которая как минимум не уступает таковой многих фармакологических препаратов, применяемых в терапии педиатрической головной боли.

Blume H.K., Brockman L.N., Breuner C.C. (2012) Biofeedback therapy for pediatric headache: factors associated with response. *Headache*, 52(9): 1377–1386.

Silberstein S.D. (2000) Practice parameter: evidence-based guidelines for migraine headache (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 55(6): 754–762.

Виталий Безмейко