

Таргетные механизмы антипролиферативного эффекта растительного препарата Тазалок™ при лейомиоме матки

В.А. Потапов, П.И. Польщиков, Е.П. Финкова

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

Лейомиома матки как доброкачественная опухоль характеризуется гормоно-зависимым характером регуляции, диагностическим критерием которой выступает относительная или абсолютная гиперэстрогения. Поэтому основополагающим направлением в лечении миомы матки является снижение эстрогенного влияния на клеточную пролиферацию, которое достигается путем выключения синтеза половых гормонов в яичниках или блокадой рецепторов эстрогенов в органах-мишенях. Исходя из концепции таргетного подхода к лечению гиперпластических процессов в матке и необходимости длительного применения без риска развития побочных эффектов, особый интерес представляют негормональные препараты с антипролиферативной активностью. Среди фитопрепаратов определенным потенциалом в лечении лейомиомы матки обладает фитокомплекс Тазалок™ исходя из его антиэстрогенной и антипролиферативной активности. Изучение иммуногистохимических показателей у пациенток с лейомиомой матки на фоне применения препарата Тазалок™ показало суперсильное воздействие на процессы пролиферации в матке (\downarrow Ki-67) и стабилизирующий эффект на апоптоз в лейомиоцитах (\downarrow Vcl-2), что подтверждает его возможности применения для патогенетической терапии миомы матки.

Ключевые слова: лейомиома матки, таргетная терапия, Тазалок™.

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению частоты заболеваемости лейомиомой матки среди женщин репродуктивного возраста, что связано с ее естественной высокой гормональной активностью в этот период жизни. Известно, что половые стероиды как непосредственно, так и опосредованно, влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток репродуктивных органов и в ряде случаев являются триггерами опухолевого роста. Согласно современным представлениям эстрогены могут быть как промоторами, так и инициаторами многоступенчатого процесса опухолеобразования [2]. Эстрогеновый гормонорецепторный комплекс стимулирует экспрессию так называемых эстрогензависимых генов, среди которых большая часть прямо или опосредованно контролирует клеточную пролиферацию, а также повышает чувствительность клеток к факторам, активирующим гиперпластические процессы и потенцирующим спонтанные мутации в гормонзависимых тканях.

В этой связи, учитывая гормонзависимый характер патогенеза лейомиомы матки, традиционные принципы лечения этого заболевания основываются на модели, в которой диагностическим критерием является относительная или абсолютная гиперэстрогения, а целью лечения является создание гипоэстрогенного фона, который достигается путем депривации яичников при использовании агонистов гонадотропин-рилизинг-гормонов (ГнРГ) или антиэстрогенных препаратов.

На сегодняшний день нет идеального лекарственного препарата, который бы привел к излечению больных с

миомой матки, поэтому при выборе того или иного подхода к терапии лейомиомы матки прежде всего ставят конкретные краткосрочные задачи, такие, как уменьшение доминирующей симптоматики и улучшение качества жизни пациентки, или конкретные задачи репродукции. Необходимо также учитывать, что применение гормональных препаратов у женщин с лейомиомой матки при исходном нестабильном гормональном фоне может привести к его дальнейшей дестабилизации и не только к рецидиву лейомиомы, но и к проблемам с фертильностью после окончания подобного лечения.

В последние годы в связи с появлением новых диагностических приемов исследования клеточных пролиферативных сигнальных путей, обнаружение полиморфизма и изучение стероидных рецепторов, клеточных промоторов, разнообразных киназ и генов, контролирующих митоз и функцию клетки, появилась возможность целенаправленного воздействия на молекулярные таргетные механизмы гиперпролиферации и канцерогенеза. Благодаря этому возникло и новое направление в лечении гиперпролиферативных процессов и опухолевого роста – таргетная их терапия.

Препараты с таргетными свойствами сегодня интенсивно исследуются как в эксперименте, так и в клинике. Особое место среди них занимают растительные препараты с доказанной антипролиферативной активностью, регулирующие кровоснабжение, трофику, метаболизм и функциональное состояние репродуктивной эндокринной системы. Преимуществом таких препаратов является низкая токсичность и возможность длительного применения без риска развития серьезных побочных эффектов. В данном контексте представляет интерес многокомпонентный растительный негормональный препарат Тазалок, представляющий собой настойку (1:10) смеси лекарственного растительного сырья: корня лабазника шестилепесткового, свежего корня петрушки кучерявой, свежего корня сельдерея, травы подмаренника настоящего, травы ленка обыкновенного, цветков календулы.

Приведенные выше растительные средства давно используются в народной медицине и нашли официальное признание в современной фармакотерапии.

Лабазник шестилепестковый (*Filipendula ulmaria* (L) Maxim.) – содержит эфирные масла, салициловую кислоту, флавоноиды, высшие жирные кислоты, фенол-карбоновые кислоты и их производные (кофейная, элаговая), флавоноиды, катехины. При внутреннем применении оказывает антиспастическое и вяжущее действие при заболеваниях пищеварительного тракта, обладает ранозаживляющим, гемостатическим, потогонным, желчегонным и мочегонным эффектами. Широко применяют как болеутоляющее средство. В гинекологической практике отвар корневищ с корнями лабазника используют при эндометриозе, мастопатии, кровотечениях, для спринцевания при белях

Петрушка огородная кудрявая (*Petroselinum Sativum* L. Hoffm.) – содержит аскорбиновую кислоту, каротин, а

также витамины В₁, В₃, К, РР, фолиевую кислоту, соли калия, магния, железа, инулин, флавоноиды, гликозиды. Препараты петрушки оказывают антисептическое, противовоспалительное, обезболивающее, спазмолитическое, мочегонное, дезинтоксикационное, противолихорадочное и потогонное действия. Используют при заболеваниях мочеполовых органов, в частности, при нарушениях менструального цикла, при заболеваниях почек, мочевого пузыря.

Сельдерея корни (*Apium Graveolens L.*) – содержат эфирные масла, крахмал, соли калия, кальция, фосфора, натрия, магния, уксусную, масляную и щавелевую кислоты, витамины С, В₁, В₂, РР. В листьях сельдерея содержатся эфирные масла, витамин С, провитамин А, минеральные вещества (главным образом, фосфор и железо), растительные гормоны. Препараты из сельдерея оказывают мочегонное и противоаллергическое действие, их применяют для повышения общего тонуса организма, усиления умственной и физической работоспособности.

Подмаренник настоящий (*Galium Verum L.*) – обладает мочегонным, противовоспалительным, обезболивающим, кровоостанавливающим, ранозаживляющим и седативным эффектами, что позволяют широко применять его при лечении заболеваний печени, почек и нервной системы.

Ленок обыкновенный (*Linaria Vulgaris Mill.*) – содержит флавоноидные гликозиды, линарин, неолинарин, пектолинарин, фитостерин. В клинической практике широко применяют как мочегонное и слабительное средство

Календула (*Calendula Officinalis L.*) – содержит салициловую и пентадециловую кислоты, которые обладают бактерицидным, ранозаживляющим, противовоспалительным, гипотензивным, кардиотоническим и седативным свойствами, нашла свое применение и в гинекологической практике. Препараты календулы влияют успокаивающе на ЦНС, снижают артериальное давление, вызывают гибель стрептококков и стафилококков.

Показаниями для применения препарата Тазалок™, помимо нарушения менструального цикла, предменструального синдрома, альгодисменореи, дисменореи, являются такие заболевания как кифиформно-кистозная мастопатия, гиперплазия эндометрия, эндометриоз и фибромиома матки.

В реализации клинической эффективности фитокомплекса Тазалок™ у женщин с лейомиомой матки лежит синергический эффект биологически активных веществ, входящих в его состав, нормализующих гормональный фон организма, а именно: ритmicность секреции и соотношение гонадотропных гормонов, течение второй фазы менструального цикла, баланс между эстрадиолом и прогестероном, а также их анальгезирующим, противовоспалительным, спазмолитическим, седативным, мочегонным и антипролиферативным свойствами.

Цель исследования: изучение таргетных антипролиферативных свойств растительного препарата Тазалок™ при лейомиоме матки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 64 пациентки репродуктивного возраста (23–37 лет) с лейомиомой матки, которым планировали проведение операции миомэктомии с сохранением репродуктивной функции. В основную группу вошло 24 пациентки с лейомиомой, которым за 3 мес до операции назначали препарат Тазалок™ в режиме: 30 капель 3 раза в день.

В группе сравнения из 20 больных с миомой матки адъювантную терапию перед операцией проводили одним из агонистов ГнРГ (лейпрорерин).

В контрольной группе, которая также состояла из 20 человек, адъювантную терапию перед операцией не проводили.

У всех пациенток интраоперационные биоптаты получали из трех участков: 1) из центра узла миомы; 2) из ткани

псевдокапсулы; 3) из слоя макроскопически неповрежденного (эутопического) миометрия.

Для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ) операционный материал больных сначала фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина на протяжении 10–12 ч. После фиксации проводки материал заливали в парафин согласно принятым стандартам. Для получения срезов использовали микротом марки Microm HM-340. Парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм наносили на специально обработанные адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus и депарафинировали с последующим проведением тепловой индукции (HIER – heat induction of epitope retrieval). Мы использовали нагревание в цитратном буфере с рН=6,0 в автоклаве (8 мин при температуре +121°C).

В ходе исследования была проведена оценка следующих основных ИГХ клеточных маркеров пролиферативных каскадов: *маркера пролиферации Ki-67* (клон М1В-1, DAKO; клон SP6, LabVision), *рецепторов: эстрогена – ER* (клон 1D5, DAKO; клон SP1, LabVision). Титр антител подбирался индивидуально для каждого маркера с использованием в качестве растворителя специального раствора Antibody diluent (DakoCytomation). Следующий этап ИГХ-исследования проводили с помощью системы визуализации последнего поколения UltraVision LP (LabVision) и LSAB2, EnVision (DAKO).

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 (DAB (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 реакция).

Для дифференцирования структур тканей срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера в течение 1–3 мин. Последующую их дегидратацию и заключение в балзам 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 ×100, ×200, ×400 и ×1000. Для максимальной точности количественной оценки изучаемых ИГХ-маркеров подсчитывали уровень их экспрессии не меньше чем в 1000 клеток.

Для определения Н-индекса (среднего значения) ER оценивали только интрануклеарные реакции в опухолевых клетках не меньше чем в 10 полях зрения при увеличении ×400. При анализе учитывали количество ядер опухолевых клеток, которые прореагировали, а также интенсивность окрашивания, которая варьирует от 0 до 3 баллов, где за 0 принимают отсутствие интрануклеарного окрашивания (негативная реакция), 1 – слабо позитивная реакция, 2 – умеренно выраженная, 3 – интенсивная равномерная внутриядерная реакция. Средние значения (Н-индекс) рассчитывали полуколичественным методом по формуле:

$$H = (\% \text{ клеток, которые слабо прореагировали, } \times 1) + (\% \text{ клеток с умеренно выраженной реакцией } \times 2) + (\% \text{ клеток с интенсивной реакцией } \times 3).$$
 По таким расчетам Н-индекс может принимать значения от 0 до 300 баллов (если все 100 клеток в поле зрения имеют выраженную позитивную реакцию). Показатели от 0 до 50 баллов по Н-индексу считали отсутствием экспрессии ER, от 50 до 100 – экспрессию антигенов к рецепторам считали слабо позитивной; 100 баллов и больше – позитивной.

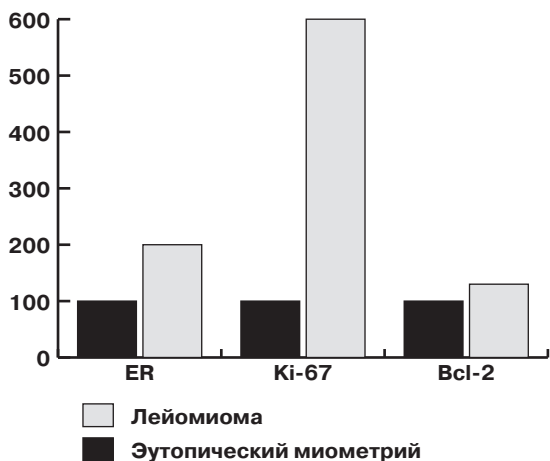


Рис. 1. Динамика ИГХ-маркеров пролиферации в миоматозных узлах (в % по отношению к аналогичным показателям эутопического миометрия, принятым за 100%)

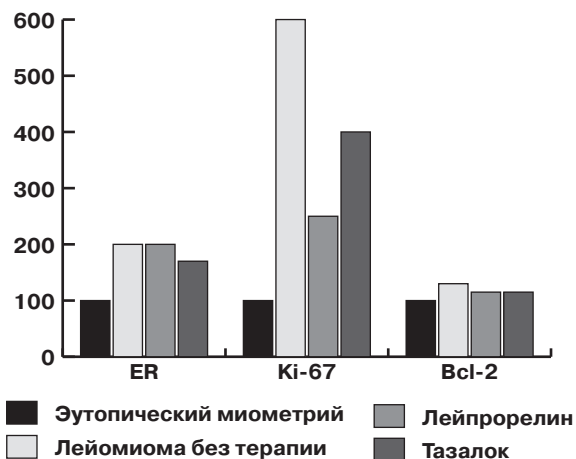


Рис. 2. Динамика ИГХ-маркеров пролиферации в миоматозных узлах после адьювантной терапии препаратом Тазалок™ в сравнении с лейпрорелином (11,25 мл/курс) у женщин с лейомиомой матки (в % по отношению к аналогичным показателям эутопического миометрия, принятым за 100%)

Индекс пролиферации (Ki-67) высчитывали как процент клеток с позитивной интрануклеарной реакцией (поскольку антигенные детерминанты расположены в ядре) к общему среднему количеству клеток при изучении всех участков.

Расчет протеинов bcl-2 проводили согласно рекомендациям D. Dixon и соавторов (2002), по шкале от 0 до 4+: 0 – отсутствует реакция (негативная), 1+ – слабо позитивная реакция (1–25% клеток позитивно окрашены), 2+ – умеренно выраженная позитивная реакция (26–50%), 3+ – интенсивная реакция (51–75%), 4+ – очень интенсивная цитоплазматическая и/или мембранная реакция (76–100%).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эстрогенные рецепторы (ER). Степень экспрессии ER определяет ответ клетки на эстрогены, которые вовлечены

во множество пролиферативных каскадов, в том числе в развитие и рост лейомиомы. В узлах миомы экспрессия ER оказалась в 2 раза выше, чем в соседнем с узлом эутопическом миометрии (рис. 1).

Маркер пролиферирующих клеток (Ki-67). В узлах миомы был значительно выше (в 6 раз) в сравнении с эутопическим миометрием, что свидетельствует о высокой скорости митозов (рис. 1).

B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2, «регулятор смерти»). Протоонкоген Bcl-2, блокирующий апоптоз (естественную смерть клетки), способствует выживанию измененных клеток (апоптотическая устойчивость). Обнаружено умеренное повышение (на 30%) экспрессии Bcl-2 в клетках лейомиомы по сравнению с эутопическими тканями (см. рис. 1).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что лейомиома характеризуется высокой пролиферативной активностью, повышенной устойчивостью к апоптозу, значительной активностью ростовых факторов. Высокая пролиферативная активность клеток в узлах лейомиомы, по видимому, связана с образованием большого количества ядерных комплексов рецептор–эстроген, запускающих репликацию ДНК клетки и ускоряющих митотическое их деление (вследствие двукратного увеличения экспрессии эстрогеновых рецепторов в лейомиоме по сравнению с эутопическим миометрием).

Как следует из рис. 2, при использовании в течение 3 мес агонистов ГнРГ наблюдается уменьшение более чем в 2 раза (на 60%) пролиферативной активности клеток лейомиомы по сравнению с контрольной группой. У женщин, получавших в предоперационный период Тазалок™, маркер пролиферации Ki-67 снизился на 33,3%. Если учесть мягкость и щадящее действие негормональной коррекции, то наличие антипролиферативной активности препарата Тазалок™ открывает перед нами огромные возможности в лечении гиперпластических процессов в матке. Известно, что терапевтический эффект агонистов ГнРГ на пролиферацию в гормонзависимых тканях связан с центральным торможением выработки гонадотропинов в гипофизе и эстрогенов в яичниках (медикаментозная кастрация). Вместе с тем, на фоне терапии лейпрорелином (см. рис. 2) экспрессия эстрогеновых рецепторов в лейомиоме практически не снижается, что дает основание предполагать сохраняющуюся высокую потенциальную готовность клеток лейомиомы к повышенному темпу митозов после прекращения приема препарата. Из этого следует важный вывод, что лечение агонистами ГнРГ имеет клиническое эпизодическое значение только в сочетании с оперативным лечением как в качестве подготовки к операции, так и в послеоперационный период с целью профилактики рецидивов миомы.

Однако как следует из рис. 2, выключение эстрогенов как промоторов из пролиферативных каскадов не сопровождается полным ограничением митотической активности в миоме, что свидетельствует о том, что эстрогены являются лишь одним из многих других опухолевых ростовых факторов.

Любопытно, что как лейпрорелин, так и Тазалок, способствуют уменьшению почти в 2 раза экспрессии протоонкогена Bcl-2, блокирующего апоптоз (см. рис. 2), и таким образом восстанавливают баланс процессов пролиферации и апоптоза в лейомиоме, ограничивая ее быстрый рост. Учитывая, что Тазалок™ входит в группу фитопрепаратов с гормоноподобными свойствами, антипролиферативный его эффект можно связать с двумя механизмами: 1) блокада гормон-независимых сигнальных путей пролиферации, в частности, киназозависимых, лигандами которых является большая группа цитокинов, способных активировать соответствующие рецепторы цитокинов и росто-

вых генов, а следовательно потенцировать пролиферацию. Наличие противовоспалительных свойств у препарата Тазалок™ через механизм блокады цитокинов может ограничивать их влияние на клеточный цикл деления; 2) препарат Тазалок™ относится к селективным модуляторам эстрогеновых рецепторов. Не исключено, что селективное связывание компонентов препарата происходит преимущественно с рецепторами эстрогенов, активация которых, как известно, приводит к торможению пролиферации. С другой стороны, связывание компонентов препарата с α -рецепторами эстрогенов, возможно, не приводит к активации и диссоциации рецепторного комплекса, поскольку не распознается информационными системами клетки по качественному составу, но блокирует рецептор. В этом отношении Тазалок™ может выступать как агонист, так и как антагонист эстрогеновых рецепторов. Согласно данным экспериментальных исследований: флавоноиды, терпеноиды и фитостеролы, содержащиеся в растениях (лабазник, льнянка, петрушка, сельдерей), входящих в состав препарата Тазалок™, обладают низким эстрогенпозитивным потенциалом [3]. В данном контексте Тазалок™ следует рассматривать именно как антагонист эстрогеновых рецепторов, то есть выделить в отдельный класс «природных антиэстрогенов». Подобные механизмы гипотетичны, но достаточно выраженное снижение маркера пролиферации Ki-67 при условии минимального влияния на экспрессию эстрогеновых рецепторов позволяют предположить существование подобного таргетного механизма, который, безусловно, подлежит дальнейшему изучению.

Выводы

1. В дизайне проведенного исследования растительный препарат Тазалок™ показал определенное супрессивное воздействие на процессы пролиферации в матке, а также стабилизирующий эффект на апоптоз лейомиоцитов, а следовательно, является эффективным средством длительного лечения лейомиомы матки у женщины.

2. Растительный препарат Тазалок™ можно с успехом использовать в лечении лейомиомы матки как в режиме монотерапии при наличии противопоказаний или отказе пациентки от гормонального и оперативного вмешательства, так и в составе комплексного лечения с применением гормональных препаратов, уменьшая побочные эффекты последних, за счет нормализующего влияния на метаболические процессы, в том числе в репродуктивной системе.

Сведения об авторах

Потапов Валентин Александрович – ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», 49044, г. Днепропетровск, ул. Дзержинского, 9; ppotapov@i.ua

Польщиков Павел Иванович – ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», 49044, г. Днепропетровск, ул. Дзержинского, 9

Финкова Елена Петровна – ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», 49044, г. Днепропетровск, ул. Дзержинского, 9

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тихомиров А.Л. Новый принцип лечения миомы матки /Тихомиров А.Л., Лубнин Д.М. – М., 2006. – 48 с.
2. Киселев В.И. Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов / Киселев В.И., Ляшенко А.А. – М., 2005. – 348 с.
3. Резников О.Г. Антиэстрогенная активность фитопрепарату Тазалок™: результаты экспериментального дослідження / О.Г. Резников, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин та ін. // Репродуктивная эндокринология. – 2012. – № 1 (3). – С. 90-92

Статья поступила в редакцию 15.10.2013

Таргетні механізми антипроліферативного ефекту рослинного препарату Тазалок™ при лейоміомі матки

В.А. Потапов, П.І. Польщиков, Е.П. Фінкова

Лейомиома матки як доброякісна пухлина характеризується гормоно-залежним характером регуляції, діагностичним критерієм якої виступає відносна або абсолютна гіперестрогенія. Тому основним напрямком у лікуванні міоми матки є зниження естрогенного впливу на клітинну проліферацію, яке досягається шляхом виключення синтезу статевих гормонів в яєчниках або блокадою рецепторів естрогенів в органах-мішенях. Виходячи з концепції таргетного підходу до лікування гіперпластичних процесів в матці і необхідності тривалого застосування без ризику розвитку побічних ефектів, особливий інтерес представляють негормональні препарати з антипроліферативною активністю. Серед фітопрепаратів певним потенціалом в лікуванні лейомиоми матки володіє фітокомплекс Тазалок™ виходячи з його антиестрогенної та антипроліферативної активності. Вивчення імуногістохімічних показників у пацієнток з лейомиомою матки на фоні застосування препарату Тазалок™ показало супресивний вплив на процеси проліферації в матці (\downarrow Ki-67) і стабілізуючий ефект на апоптоз у лейомиоцитах (\downarrow Bcl-2), що підтверджує можливість його застосування для патогенетичної терапії міомної хвороби.

Ключові слова: лейомиома матки, таргетна терапія, Тазалок™.

Targeted mechanisms of antiproliferative effect of herbal drug Tazalok™ on uterine leiomyoma

V.A. Potapov, P.I. Polshchikov, E.P. Finkova

Leiomyoma of the uterus as a benign tumor characterized by hormone-dependent nature of the regulation, a diagnostic criterion of which is the relative or absolute hyperestrogenia. Therefore, the fundamental trend in the treatment of uterine fibroids is to reduce estrogenic effects on cell proliferation, which is achieved by turning off the synthesis of sex hormones in the ovaries or the blockade of estrogen receptors in the target organs. Based on the concept of targeted approach to the treatment of hyperplastic processes in the uterus and the need for long-term use without risk of side effects, particular interest are non-hormonal drugs with anti-proliferative activity. Among the herbal remedies some potential in the treatment of uterine leiomyomas has phytocomplex Tazalok™ based on its anti-estrogen and anti-proliferative activity.

Investigation of immunohistochemical parameters in patients with uterine leiomyoma on the background of drug used, showed that Tazalok™ has suppressive effect on the proliferation in the uterus (\downarrow Ki-67) and a stabilizing effect on apoptosis in leiomyoma tissue (\downarrow Bcl-2), confirming that it is possible to use it as pathogenic therapy miom disease.

Key words: uterine leiomyoma, targeted therapy, Tazalok™.