

УДК 615.256.5:547.752]:618.14-006.2

Н.Ф. ЗАХАРЕНКО, к. мед. н., Т.Д. ЗАДОРОЖНЯ, д. мед. н., Л.В. КАЛУГІНА, д. мед. н.
/ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМНУ», Київ/

Індол-3-карбінол у терапії аденоміозу

Резюме

Індол-3-карбінол в терапії аденоміоза

Н.Ф. Захаренко, Т.Д. Задорожня, Л.В. Калугіна

Изучены маркеры апоптоза и пролиферативной активности в эндометриодных гетеротопиях у 35 пациенток с аденомиозом. Проведена оценка эффективности препарата индол-3-карбинол в комплексной схеме лечения аденомиоза.

Ключевые слова: аденомиоз, лечение, апоптоз

Summary

Indole-3-carbinol in Therapy of Adenomyosis

N.F. Zakharenko, T.D. Zadorozhnaya, L.V. Kalugina

In this paper results of investigation of apoptosis markers and proliferation activity in endometrioid lesions in 35 patients with adenomyosis are reported. The efficacy of indole-3 carbinol in complex treatment regimen of adenomyosis was evaluated.

Key words: adenomyosis, treatment, apoptosis

Аденоміоз є однією з основних причин альгодисменореї, синдрому хронічного тазового болю та безпліддя, що значно погіршує якість життя пацієнок [1, 2]. Загальновідомо, що ендометріоз супроводжується широким спектром клінічних симптомів, серед яких больовий синдром є провідною ознакою. Біль перед місячними та альгодисменорея, біль під час статевого акту, хронічний міжменструальний больовий синдром, біль у спині, відчуття важкості внизу живота, надмірні та/або нерегулярні місячні, болісна перистальтика кишечника, особливо під час менструації, болісне сечовиділення, діарея або запори, безпліддя, хронічна втома – таким може бути перелік скарг пацієнок з ендометріодними гетеротопіями. Актуальність проблеми аденоміозу обумовлена також його поширенням серед населення (серед усіх причин жіночого безпліддя на долю аденоміозу припадає біля 20%), складністю його діагностики на початковому етапі розвитку, тривалістю та прогресуючим перебігом, що супроводжується стійким порушенням не тільки фертильності, але й якості життя жіночого населення [3, 4].

Невирішеною залишається проблема лікування захворювання, зокрема органозберігаюче лікування хворих аденоміозом. Існуючі на даний час схеми лікування аденоміозу мають ряд суттєвих недоліків, одним з яких є те, що після припинення гормонального лікування у більшості пацієнок виникає рецидив клінічної симптоматики.

На даний час доведена роль інших, раніше невідомих факторів у розвитку аденоміозу, а саме: порушення процесів апоптозу, проліферації, неангіогенезу, стромоутворення [3, 10, 13]. Встановлено, що у багатьох ендометріодних гетеротопіях кількість естрогенних і прогестеронових рецепторів є вірогідно нижчою порівняно з ендометрієм, а також рівень рецепції зменшується при віддаленні ендометріодного вогнища від матки [7]. Крім того, виявлено, що вплив гормонів на клітинні елементи ендометрія є вторинним і обумовлений проліферативним потенціалом та диференціюванням самої клітини, отже, рівень рецепції не залежить від впливу гормонотерапії [7].

У літературі описані речовини, що володіють антипроліферативною, антиангіогенною та проапоптотичною дією. Численні дослідження останніх років присвячені фітонутрієнтам – речовинам рослинного походження, які мають здатність блокувати проліферативну активність на рівні мембран, цитоплазми і ядра клітин-мішеней, тим самим модулюючи сигнальні каскади як на білковому, так і на транскрипційному рівні [6]. Серед фітонутрієнтів заслуговує на увагу індол-3-карбінол (рис. 1), що міститься у рослинах родини хрестоцвітних (сruciferae).

За даними рандомізованих досліджень [6, 12], індол-3-карбінол і його основний метаболіт дііндоїлметан (ДІМ) модулюють декілька факторів ядерної транскрипції та спричиняють різноманітні біологічні і біохімічні ефекти, а саме: антиоксидантні, хіміопреventивні, антипроліферативні та антиагрегантні. Індол-3-карбінол є потужним антиоксидантом, що захищає ДНК та інші клітинні структури, а також володіє вираженою хіміопреventивною активністю, стимулює продукцію ферментів детоксикації, які захищають від канцерогенного ефекту пестицидів та інших токсинів. Протипухлинний ефект індол-3-карбінолу та його метаболіту дііндоїлметану реалізується шляхом індукції ферментів, що метаболізують канцерогени, стимулюють відновлення ДНК, індукцію клітинного «арешту» G1 і апоптозу. Індол-3-карбінол блокує естрогенні рецептори на мембранах молочних залоз та інших клітин, зменшуючи ризик розвитку онкопатології [8, 11]. Індол-3-карбінол збільшує співвідношення 2-гідроксіестрона до 16 альфа-гідроксіестрона та інгібує утворення 4-гідроксіестрона (шляхом 4-гідроксилування естрадіола), що є сприятливим ефектом, так як дані сполуки

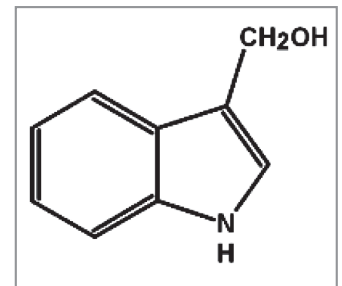


Рис. 1. Хімічна структура індол-3-карбінолу

мають канцерогенні властивості. Індол-3-карбінол та його метаболіт ДІМ регулюють функцію генів, що контролюють клітинний цикл, клітинну проліферацію і сигнальну трансдукцію [6]. Крім того, декілька досліджень продемонстрували позитивний вплив індол-3-карбінола на синтез ліпідів і агрегацію тромбоцитів [9]. Отже, індол-3-карбінол володіє протипухлинною активністю, патогенетично впливає на основні ланки розвитку гіперпластичних процесів в організмі, однак механізм його впливу на ендометріозні гетеротопії, зокрема при аденоміозі, залишається недостатньо вивченим.

Враховуючи недостатню ефективність гормонального лікування гіперпроліферативних процесів у певного контингенту пацієнток, а також протипоказання та несприятливі побічні ефекти гормонотерапії, перспективним є пошук препаратів, що мають цілеспрямовану дію на молекулярні механізми розвитку даної патології та водночас позбавлені негативних ефектів. У зв'язку з цим метою нашого дослідження було проведення оцінки ефективності гормональної терапії аденоміозу у порівнянні із застосуванням препаратів, що містять індол-3-карбінол.

Метою роботи стало підвищення антипроліферативного ефекту лікування аденоміозу з урахуванням клініко-морфологічних та імуногістохімічних маркерів.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні брали участь 35 пацієнток репродуктивного віку з аденоміозом та вираженим больовим синдромом: першу групу склали 19 жінок, які отримували базову терапію (агоністи гонадотропін-релізінг гормонів протягом 3 менструальних циклів, а також комбінований препарат, що містив етинілестрадіол + гестаген протягом першого циклу) з метою профілактики спалаху. Другу групу склали 16 пацієнток, яким на фоні базової терапії (агоністи гонадотропін-релізінг гормону і комбінований препарат, що містив етинілестрадіол + гестаген в першому циклі) призначався індол-3-карбінол в дозі 400 мг на добу протягом 6 місяців.

Аналізуючи наявність, характер, регулярність та циклічність болю, ми отримали такі дані. Хронічний міжменструальний біль відмічали 47,3% пацієнток першої та 50% пацієнток другої групи. В обох групах пацієнток з аденоміозом була високою частка тих, що скаржились на альгодисменорею.

З метою оцінки проліферативної активності досліджували експресію біомолекулярних маркерів в ендометрії та в ендометріюїдних гетеротопіях, а саме: маркер проліферації PCNA (proliferating cell nuclear antigen), маркер канцерогенезу CEA (carcinoembryonic antigen), маркер мітотичної активності Ki-67, маркер апоптозу P53, компоненти екстрацелюлярного матриксу (MMP) та фактори росту і цитокіни (TNF, IL-2, IL-6).

Експресію біомолекулярних маркерів визначали непрямим стрептавідин-пероксидазним методом. Принцип методу ґрунтується на виявленні експресії антигенів до маркерів у клітинах ендометрія, за допомогою первинних і вторинних Kiт-моноклональних антитіл (фірма «ДАКО», Данія). Протокол забарвлення: депарафінізація шматочків тканини на склі, блокування ендогенної пероксидази 3% розчином пероксида водню, обробка предметного скла водою, блокування неспецифічних протеїнових сполук двома краплями 1% BSA, у фосфатному буфері (PBS) рН 7,4, (для PCNA – додаткова обробка зрізів у цитратному буфері рН – 6,0 в мікрохвильовий печі, промивка в PBS-буфері), нанесення первинних антитіл до відповідного антигену (фірма ДАКО, Данія) на одну годину.

Поширеність та інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом в балах, від 0 до 3. Оцінка поширеності: 0 – немає забарв-

лення; 1 – менше 10% позитивно забарвлених клітин; 2 – більше 10% і менше 50% позитивно забарвлених клітин; 3 – гомогенне забарвлення більше 50% клітин; оцінка інтенсивності реакції: 0 балів – немає видимого забарвлення; 1 бал – слабке забарвлення; 2 бали – помірне забарвлення; 3 бали – виражене забарвлення.

Дослідження препаратів у прохідному світлі проводили на дослідницькому мікроскопі Olympus AX70 (Японія) із цифровою відеокамерою Olympus DP50, з'єднаною з персональним комп'ютером. Мікрофотографування та морфометричне вивчення препаратів здійснено з використанням програми Analysis Pro 3.2 (фірма Soft Imaging, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника програмного забезпечення. Всі мікрофотографії виконані за допомогою апаратури Olympus DP50 і зберігаються в базі даних комп'ютера. Морфологічні, електронномікроскопічні та імуногістохімічні дослідження проведені на базі лабораторії патоморфології ДУ «Інститут ПАГ НАМН України».

Використання методу багатомірної семантичної дескрипції з використанням Мак-Гілловського опитувальника дозволило нам не лише визначити інтенсивність больового синдрому у досліджуваних жінок, а й виявити характерні ознаки болю, які притаманні пацієнткам з ендометріозом.

Проведено попередню перевірку даних на нормальність розподілу за допомогою критерія Уїлкі – Шапіро, згідно з яким гіпотеза про нормальність розподілу не відхилялася (при $p=0,05$), у такому випадку використовувалися параметричні методи статистичного аналізу, непарний та парний двосторонній критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення

Виходячи з виявлених нами змін активності біомолекулярних маркерів при ендометріозі [5], нами був апробований препарат-регулятор

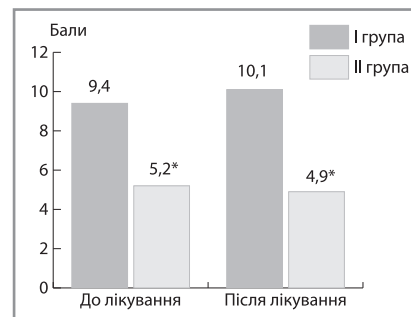


Рис. 2. Середній показник кількості обраних дескрипторів у обстежених жінок за опитувальником Мак-Гілла

Примітки: *різниця вірогідна відносно показника II групи ($p<0,05$).

Таблиця 1. Імуногістохімічні особливості маркерів проліферації Ki-67 та апоптозу P53 в ендометріюїдних гетеротопіях жінок обстежених груп

Групи	Оцінка експресії	Ki-67		P 53	
		залози	строма	залози	строма
До лікування					
I група (n=19)	Поширення (%)	3,86	0,71	–	–
	Інтенсивність (бали)	0,69±0,1	0,81±0,4	–	–
II група (n=16)	Поширення (%)	3,61	1,31	–	–
	Інтенсивність (бали)	0,77±0,4	1,0	–	–
Після лікування					
I група (n=19)	Поширення (%)	0,98	10,53 #	13,26	19,79
	Інтенсивність (бали)	0,84±0,3	1,0	1,74±0,2	1,0
II група (n=16)	Поширення (%)	0,1*	5,56 *, #	38,1*	48,5
	Інтенсивність (бали)	0,70±0,3	0,1±0,4 #	2,71±0,3	3,0

Примітки: * – різниця вірогідна відносно показника в I групі ($p<0,05$); # – різниця вірогідна відносно показника до лікування ($p<0,05$).

Таблиця 2. Імуногістохімія ендометрію гетеротопій у пацієнок з аденоміозом, в динаміці лікування

Групи	PCNA		CEA		MMP		TNF		IL-2		IL-6	
	з	с	з	с	з	с	з	с	з	с	з	с
I N=19 до лікування	12,5% 2–3 бали	2% 1 бал	0–1	0	0–1 бал	1 бал	80% 2–3 бали	0–1	80% 3 бали	30–40% 3 бали	0	0–1
II N=16 до лікування	13% 2–3 бали	4% 1 бал	0–1	0	0–1 бал	50% 1 бал	75% 2–3 бали	0–1	80% 3 бали	35–40% 3 бали	0	0–1
I N=19 після лікування	4,5% 0–1 бал	1% 0–1 бал	0	0	0–1 бал	0–1 бал	20% 1 бал	0	12% 0–1 бал	0–1 бал	0	0
II N=16 після лікування	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

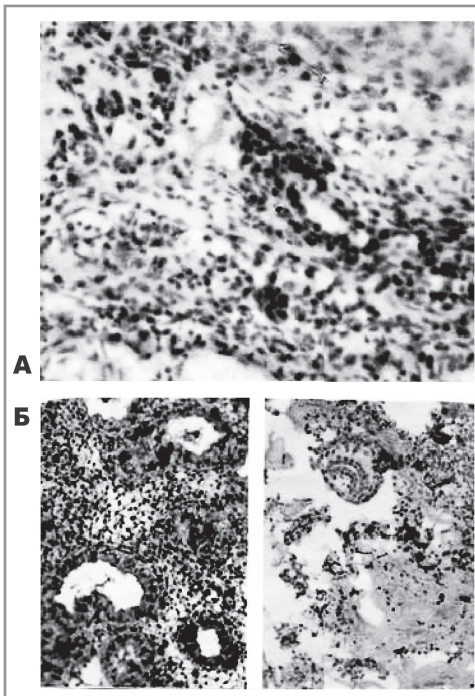


Рис. 3. Експресія моноклональних антитіл (МКАТ) до Ki-67 при аденоміозі пацієнтки М. I групи: А) до лікування; Б) після лікування. Непрямий стрептовидин-пероксидазний метод виявлення інтенсивності і поширеності реакції з МКАТ до Ki-67 (імуногістохімічне дослідження). Мікрофотографія. Ок. 10. Об.10.

проліферативних процесів в органах репродуктивної системи – індол-3-карбінол.

Отримані результати показали, що у пацієнок з аденоміозом обох груп спостерігалось вірогідне зменшення вираженості болювого синдрому, так, середній показник обраних дескрипторів болю зменшився з $9,4 \pm 1,5$ до лікування до $5,2 \pm 1,3$ через 3 місяці лікування в I групі та з $10,1 \pm 1,3$ до $4,9 \pm 1,7$ в II групі, а середній ранговий індекс болю відповідно з $40,3 \pm 4,3$ бала до лікування до $14,1 \pm 2,4$ через 3 місяці в I групі, та з $39,2 \pm 5,1$ бала до $12,5 \pm 2,7$ в II групі ($p < 0,05$). Нами не було виявлено вірогідної різниці між групами, що підтверджує ефективність обох схем лікування для подолання болювого синдрому (рис. 2).

При імуногістохімічному дослідженні рівня експресії маркерів проліферації та апоптозу виявлені певні відмінності між показниками обох груп (табл. 1). Порівняння морфологічної характеристики ендометрія пацієнок після проведення лікування виявило вірогідне зниження активності реакції маркерів проліферації (PCNA, CEA, Ki-67) як в залозах, так і в стромі у пацієнок I групи (експресія PCNA становила 0–1 бал в залозах та 0–1 бал в стромі), та повну відсутність

експресії цих факторів у пацієнок II групи (експресія вищезазначених маркерів була нульовою) (табл. 2).

Визначення ступеня апоптозу виявило значне відновлення цієї функції у пацієнок II групи, які приймали індол-3-карбінол (кількість p53-позитивних клітин становила 30–40% в залозах та до 45–50% в стромі); при цьому ступінь відновлення

апоптозу у жінок I групи, які отримували лише гормонотерапію, була вірогідно нижчою: кількість p53-позитивних клітин становила 10–15% в залозах та до 20% в стромі.

В II групі пацієнок також спостерігалось повне пригнічення активності факторів росту та цитокінів (TNF, IL-2, IL-6).

Виявлений в II групі низький рівень експресії факторів проліферації в сукупності з відновленою функцією апоптозу обумовлює фізіологічну трофіку ендометрія та його морфофункціональну повноцінність та забезпечує стійкий протирецидивний ефект терапії (рис. 3 А,Б).

Висновки

Таким чином, застосування індол-3-карбінолу дозволяє контролювати проліферативний потенціал клітин ендометрію гетеротопій, що підтверджується результатами імуногістохімічних досліджень.

Отримані результати доводять, що включення індол-3-карбінолу у схему терапії аденоміозу є патогенетично обґрунтованим, особливо для лікування болювого синдрому.

Список використаної літератури

1. Арутюнян А.Ф., Кустаров В.Н. Применение индинола и эпигаллата при аденомиозе // Вестник хирургии Армении им. Г.С.Тамазяна. – 2010. – №3. – С. 61–66.
2. Адаман Л.В., Кулаков В.И. Эндометриозы. – М.: Медицина. – 1998. – 317 с.
3. Кудрина Е.А., Ищенко А.И., Гадаева И.В., Шадьев А.Х., Коган Е.А. Молекулярно-биологические характеристики наружного генитального эндометриоза // Акушерство и гинекология. – 2000. – №6. – С. 24–27.
4. Сидорова И.С., Коган Е.А., Зайратьянц О.В., Унянц А.Л., Леваков С.А. Новый взгляд на природу эндометриоза (аденомиоза) // Акушерство и гинекология. – 2002. – №3. – С. 32–38.
5. Захаренко Н.Ф., Задорожна Т.Д., Колупіна Л.В. Імуногістохімічні маркери проліферації та апоптозу ендометрія у жінок з ендометріозом різної локалізації // Здоров'я жінчини. – 2012. – №10 (78). – С. 98–100.
6. Ashok B.T., Chen Y.G., Liu X., Garikapaty V.P., Sepulowitz R., Tschorn J., Roy K. 5 Mittelman A., Tiwari R.K. Multiple molecular targets of indole-3-carbinol, a chemopreventive anti-estrogen in breast cancer // Eur. J. Cancer. Prev. – 2002. – Vol.11. – P. 86–93.
7. Auburn K.L., Fan S., Rosen E.M., Goodwin L., Chandrasekaran A., Williams D.E., Chen D.5 Carter T.H. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen // J. Nutr. – 2003. – Vol.133. – P. 2470–2475.
8. Chatterji U., Riby J.E., Taniguchi T., Bjeldanes E.X., Bjeldanes L.F., Firestone G.L. Indole-3-carbinol stimulates transcription of the interferon gamma receptor 1 gene and augments interferon responsiveness in human breast cancer cells // Carcinogenesis. – 2004. – Vol. 25. – P. 1119–1128.
9. Darai E., Detchev R., Hugol D., Quang N. T. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18. – P. 1681–1685.
10. Dmowski W.P., Ding J., Shen J., Rana N., Fernandez B.B., Braun D.P. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16. – P. 1802–1808.
11. Firestone G.L., Bjeldanes L.F. Indole-3-carbinol and 3-3-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter-Sp 1 transcription factor interactions // J. Nutr. – 2003. – Vol.133. – P. 2448S–2455S.
12. Reed GA, Peterson KS, Smith HJ, Gray JC, Sullivan DK, Mayo MS, Crowell JA, Hurwitz A. A phase I study of indole-3-carbinol in women: tolerability and effects // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2005. – Aug;14(8).
13. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown // J. Cell. Physiol. – 2000. – Vol.3. – P. 311–312.