

© Коллектив авторов, 2020

В.И. КИСЕЛЕВ¹, Л.А. АШРАФЯН¹, С.М. ПРОНИН¹, Е.В. ГЕРФАНОВА¹,
И.Н. КУЗНЕЦОВ¹, В.М. ДРУХ², В.В. УДУТ³, А.А. ЧУРИН³, О.И. ПЧЕЛИНЦЕВА²**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНДОЛ-3-КАРБИНОЛА
НА МОДЕЛИ ЭНДОМЕТРИОЗА У КРЫС
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия²АО «МираксБиоФарма», Москва; Россия³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»
Томского НИМЦ, Томск, Россия

Цель. Изучение фармакологической активности лекарственного средства с действующим веществом индолкарбинол на модели эндометриоза у крыс.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на половозрелых самках крыс (60 животных). Животные были разделены на группы в соответствии с моделированием патологии и терапией. Группа 1 – ложнооперированные животные, получавшие раствор крахмала, группа 2 – ложнооперированные животные, получавшие индолкарбинол в дозировке 111 мг/кг. В группах 3–5 проводилось моделирование эндометриоза путем аутологичной трансплантации эндометриальной ткани в брюшную полость. Животные 3-й группы получали 1% раствор крахмала, 4-й группы – активный препарат в дозировке 37 мг/кг, животные 5-й группы – активный препарат в дозировке 111 мг/кг. Изучали болевую реакцию животных, а также на 30-й и 60-й день проводили гистологическую оценку имплантатов.

Результаты. У животных с индуцированной патологией, не получавших лечения, наблюдалась более выраженная болевая реакция по сравнению с ложнооперированными животными. По результатам гистологической оценки выявлена тенденция к снижению степени гиперплазии эндометрия в группах самок, получавших активный препарат, по сравнению с контрольными группами.

Выводы. Исследование показало, что индолкарбинол при введении животным эффективно снижал размер эндометриоидного очага и выраженность эндометриоидных гетеротопий, за счет чего было показано терапевтическое действие в отношении болевого синдрома, вызванного развитием эндометриоза.

Ключевые слова: эндометриоз, доклинические исследования, индол-3-карбинол.

Вклад авторов. Киселев В.И., Ашрафян Л.А.: концепция и дизайн исследования; Пронин С.М., Герфанова Е.В.: обзор литературных источников; Кузнецов И.Н., Друх В.М.: анализ полученных результатов; Друх В.М., Пчелинцева О.И.: статистическая обработка данных; Удут В.В., Чурин А.А., Пчелинцева О.И.: написание и редактирование текста.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР № 0036-ДФ/2017 от 28 июля 2017 г.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам НПО «Дом Фармации» за помощь в проведении исследования.

Для цитирования: Киселев В.И., Ашрафян Л.А., Пронин С.М., Герфанова Е.В.,
Кузнецов И.Н., Друх В.М., Удут В.В., Чурин А.А., Пчелинцева О.И.
Изучение эффективности индол-3-карбинола на модели эндометриоза у крыс
(экспериментальное исследование).
Акушерство и гинекология. 2020; 5: 122-30
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.5.122-30>

©A group of authors, 2020

V.I. KISELEV¹, L.A. ASHRAFYAN¹, S.M. PRONIN¹, E.V. GERFANOVA¹,
I.N. KUZNETSOV¹, V.M. DRUKH², V.V. UDUT³, A.A. CHURIN³, O.I. PCHELINTSEVA²**INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF INDOLE-3-CARBINOL
ON A RAT MODEL OF ENDOMETRIOSIS
(EXPERIMENTAL STUDY)**¹Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology,
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia²АО «MiraxBioPharma», Moscow, Russia³E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

Objective. To investigate the pharmacological activity of a drug with the active substance indole-3-carbinol on a rat model of endometriosis.

Materials and methods. An experiment was carried out on on pubertal female rats ($n = 60$). According to pathology modeling and therapy, the animals were divided into groups. Group 1 consisted of falsely operated animals receiving starch solution. Group 2 included falsely operated ones given indole-3-carbinol at a dose of 111 mg/kg. In Groups 3 to 5, endometriosis was modelled by autologous transplantation of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Group 3 animals received 1% starch solution; Groups 4 and 5 had the active substance at doses of 37 and 111 mg/kg, respectively. Reactions to pain were studied in the animals and implants were also histologically assessed at 30 and 60 days.

Results. The untreated animals with induced pathology showed a more pronounced pain response than falsely operated animals. Histological estimation revealed that endometrial hyperplasia tended to reduce in the groups of females that had received the active substance compared with that in the control groups.

Conclusion. The investigation showed that indole-3-carbinol administered to the animals effectively decreased the size of an endometrioid focus and the degree of endometrioid heterotopies, thereby indicating the therapeutic effect on endometriosis-induced pain syndrome.

Keywords: endometriosis, preclinical trials, indole-3-carbinol.

Author contributions. Kiselev V.I., Ashrafyan L.A.: concept and design of the investigation; Pronin S.M., Gerfanova E.V.: review of literary sources; Kuznetsov I.N., Drukh V.M.: analysis of the findings; Drukh V.M., Pchelintseva O.I.: statistical data processing; Udut V.V., Churin A.A., Pchelintseva O.I.: writing and editing the text.

Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financing. The investigation has been conducted within the framework of researches under No. 0036-DF/2017 dated July 28, 2017.

Acknowledgement. The authors are grateful to the staff of the Research and Production Association "House of Pharmacy" for their assistance in the investigation.

For reference: Kiselev V.I., Ashrafyan L.A., Pronin S.M., Gerfanova E.V., Kuznetsov I.N., Drukh V.M., Udut V.V., Churin A.A., Pchelintseva O.I. Investigation of the efficacy of indole-3-carbinol on a rat model of endometriosis (experimental study). Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology. 2020; 5: 122-30 (In Russian). <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.5.122-30>

Эндометриоз является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Широкая распространенность эндометриоза, а также высокая (до 50%) частота встречаемости у женщин репродуктивного возраста обуславливают интерес врачей к его изучению и поиску эффективных методов лечения [1]. В основе причин развития эндометриоза лежит множество фундаментальных биологических механизмов, однако до конца этот вопрос не изучен [2]. Воспаление, изменения гормонального фона, гормональных рецепторов, генетические и эпигенетические факторы являются предпосылками для развития эндометриозного процесса [3–6]. Многофакторность течения эндометриоза осложняет поиск эффективных методов терапии [2].

Особое место в развитии эндометриоза играют процессы снижения апоптоза, пролиферации, инвазии и неоангиогенеза. Течение заболевания и клинические проявления напрямую зависят от происходящих молекулярных процессов [7].

Принимая во внимание пролиферативные, а также инвазивные процессы, наблюдаемые при эндометриозных поражениях, особое внимание стоит уделить изучению фармакологических соединений негормонального происхождения, влияющих на несколько патогенетических звеньев эндометриоза: нормализацию баланса эстрогенов, патологическую клеточную пролиферацию, ингибирование неоангиогенеза, а также способность стимулировать избирательный апоптоз клеток [8]. Одним из таких терапевтических средств является индол-3-карбинол.

Индол-3-карбинол (ИЗК) — хорошо известная молекула растительного происхождения, обладающая широким спектром биологической активности в отношении активно пролиферирующих клеток млекопитающих. Особый интерес представляет про-

тивоопухолева активность ИЗК, которая детально исследована на различных экспериментальных моделях, что послужило основанием для включения этой молекулы в перечень соединений для лекарственной профилактики злокачественных новообразований различной локализации [9].

Так, в исследовании ИЗК при раке молочной железы отмечена высокая эффективность терапии при совместном применении с тамоксифеном, вне зависимости от эстрогенового статуса заболевания. Благодаря воздействию на различные сигнальные пути достигается синергетический эффект терапии [10]. Выраженный терапевтический потенциал ИЗК обусловлен его мультифакторным действием в отношении пролиферирующих клеток. В частности, ИЗК ингибирует основные сигнальные пути, поддерживающие агрессивное клеточное деление [11], индуцирует апоптоз клеток, находящихся в состоянии метаболического стресса, ингибирует патологический ангиогенез [12, 13], обладает эпигенетической активностью, модулируя экспрессию гистондеацетилаз, ДНК-метилтрансфераз и синтез микроРНК в клетках-мишенях [14–16]. На системном уровне ИЗК регулирует метаболизм эстрогенов, восстанавливая физиологическое соотношение 16-альфа и 2-гидроксиметаболитов, нормализуя, таким образом, клеточное деление в гормончувствительных тканях женской репродуктивной системы [9].

Следует отметить, что ИЗК склонен к олигомеризации и под воздействием кислой среды желудка быстро превращается в дииндолилметан (DIM). Некоторые авторы приписывают терапевтические эффекты ИЗК именно DIM, как продукту его биоконверсии [17].

Следует особо отметить тот факт, что для DIM убедительно доказана способность ингибировать актив-

ность гипоксия-индуцибельного фактора (HIF)-1 α , который, наряду с сосудисто-эндотелиальным фактором роста (VEGF), является ключевой молекулярной мишенью, участвующей в патологическом росте новых сосудов. Показано, что *in vitro* в опухолевых клетках, находящихся в условиях гипоксии, в присутствии DIM снижается уровень HIF-1 α , а также его транскрипционная активность. Более того, DIM подавлял экспрессию HIF-1 α -респонсивных эндогенных генов, что приводило к ингибированию экспрессии ключевых гипоксия-респонсивных факторов, таких как фактор VEGF, енолаза-1, глюкозный транспортер-1, фосфофруктокиназа и др. Уменьшение уровня HIF-1 α в гипоксичных опухолевых клетках сопровождалось увеличением скорости его ферментативной и протеосомной деградации, а также снижением скорости генной транскрипции [18].

Все перечисленные механизмы действия ИЗК и DIM с высокой вероятностью могут быть реализованы и в лечении эндометриоза, исходя из современных представлений о его патогенезе [19]. На основе ИЗК разработано и зарегистрировано лекарственное средство для лечения гиперпластических процессов в молочной железе [20]. Вышеперечисленными факторами была продиктована цель данного исследования, в котором изучался терапевтический эффект ИЗК на экспериментальной модели эндометриоза.

Целью нашего исследования явилось изучение фармакологической активности лекарственного средства с действующим веществом индолкарбинол на модели эндометриоза у крыс.

Данное исследование направлено на изучение возможности применения препарата для лечения эндометриоза, а также болевого синдрома, вызванного данной патологией.

Исследуемые препараты

В качестве тестируемого использовали препарат производства АО «МираксБиоФарма», содержащий в качестве активного вещества субстанцию индолкарбинол (ИЗК) по 200 мг в капсуле, контрольный препарат – 1% раствор крахмала.

Животные и их содержание

Для проведения эксперимента использованы 60 самок аутбредных крыс, полученных из питомника АО «НПО «Дом Фармации», г. Санкт-Петербург. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики, в стандартных прозрачных пластиковых клетках, группами по 6 особей одного пола, со свободным доступом к корму и воде.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (19–25°C и относительной влажности воздуха 30–70%). Световой режим составил 12 ч света и 12 ч темноты. Был установлен режим воздухообмена, обеспечивающий смену около 15 объемов помещения в час.

Этическое сопровождение

Исследование рассмотрено на биоэтической комиссии АО «НПО «Дом Фармации» и одобрено для проведения № БЭК 4.61/17 от 06 октября 2017 г.

Материалы и методы

Перед началом исследования животные случайным образом были распределены на 5 групп, по 12 особей в каждой группе. Животным 1-й и 2-й групп была проведена ложная операция, в ходе которой выполнялись разрез брюшной стенки, экспозиция рога матки (в течение 2 мин), послойное ушивание раны, обработка шва антисептиком. Животные группы 1 получали 1% раствор крахмала, животные группы 2 получали активный препарат в дозировке 111 мг/кг в сутки. Животным групп 3, 4, 5 выполнялось оперативное вмешательство с моделированием эндометриоза путем аутологичной трансплантации эндометриальной ткани в брюшную полость. В группе 3 животные получали 1% раствор крахмала, в группе 4 – активный препарат в дозировке 37 мг/кг в сутки, животные группы 5 получали активный препарат в дозировке 111 мг/кг в сутки. Терапия началась после выхода животных из наркоза. В послеоперационном периоде для облегчения болевого синдрома животным внутримышечно вводили Кетонал в дозе 5 мг/кг, 1 раз в день, 5 дней [21].

Курс терапии для 50% животных составил 30 дней, для 50% – 60 дней. Препарат или контрольное вещество вводили ежедневно, один раз в день, внутривенно.

Болевую чувствительность оценивали через 2, 4 и 8 недель от начала терапии по давлению (в граммах), необходимому для индукции болевой реакции (отдергивание/избегание) при приложении датчика к брюшной стенке. Давление на брюшную стенку осуществлялось с помощью электронного анальгезиметра (Electronic von Frey anesthesiometer, ITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA). Проводили пять повторных измерений с интервалом 5 с. При анализе данных рассчитывали среднее за 5 измерений.

На 30-й и на 60-й день терапии осуществляли эвтаназию животных с помощью CO₂-камеры, без учета эстрального цикла. Эвтаназированные животные подвергались вскрытию, с последующей морфометрической оценкой размера имплантата: проводили измерение длины, ширины, высоты и площади очага эндометриоза, а далее определяли объем образования. Выделенные имплантаты с прилегающей тканью и интактный рог матки фиксировали в 10% формалине для последующего гистологического исследования.

Гистологические признаки эндометриоза оценивались по следующим критериям полуколичественной балльной оценки:

- выраженность кисты: 0 – отсутствие кисты; 1 – незначительная киста; 2 – киста умеренной степени выраженности; 3 – крупная киста;
- воспалительная инфильтрация: 0 – отсутствие; 1 – незначительная; 2 – умеренная; 3 – выраженная;
- васкуляризация: 0 – отсутствие; 1 – незначительная; 2 – умеренная; 3 – выраженная;
- наличие железистых структур: 0 – отсутствие; 1 – небольшое количество желез; 2 – умеренное

количество желез; 3 – значительное количество желез;

- тип эпителия: 0 – отсутствие эпителия; 1 – плохо сохранившийся эпителиальный слой; клетки небольшие, уплощенной формы; 2 – умеренно сохранившийся эпителиальный слой, преобладают клетки кубической формы; 3 – хорошо сохранившийся эпителиальный слой; клетки крупные, призматической формы;
- гиперплазия эндометрия/внутренней стенки эндометриоидного очага: 0 – отсутствие; 1 – незначительная; 2 – умеренная; 3 – выраженная.

Статистический анализ

С помощью программного обеспечения Statistica 10.0. (StatSoft, США) выполнялся анализ полученных данных. Использованы непараметрические критерии для оценки показателей.

Морфометрическая характеристика эндометриоза представлена в работе в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD). Тип данных – количественные, распределение не соответствует нормальному. Парное сравнение групп проводилось с помощью критерия Манна–Уитни (уровень значимости $p < 0,05$).

Показатели гистологической оценки в баллах анализировались с помощью рангового анализа вариаций по Краскелу–Уоллису. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3). Статистически значимые различия между группами оценивались процедурами апостериорного сравнения с помощью критерия Манна–Уитни (уровень значимости $p < 0,05$).

Результаты

Гибель животных в экспериментальных группах в ходе исследования не зарегистрирована.

Результаты, полученные при проведении оценки висцеральной болевой чувствительности, показали, что в группе с индуцированной патологией болевая реакция в ответ на механическое воздействие была значимо выше, чем у ложнопериоперированных животных: крысы реагировали на меньшее давление. Терапия уже через 4 недели привела к снижению выраженности болевой реакции, эффект наблюдался в обеих группах, получавших препарат, но статистической значимости достиг только в группе, получавшей препарат в максимальной дозе 111 мг/кг ($p < 0,05$). При анализе данных, полученных через 8 недель терапии, получены схожие результаты, с той разницей, что уже при использовании минимальной исследованной дозы 37 мг/кг наблюдался статистически значимый обезболивающий эффект.

Таким образом, в группе животных с индуцированной патологией, не получавших лечения, на всем протяжении эксперимента наблюдалась более выраженная болевая реакция по сравнению с ложнопериоперированными животными. На фоне терапии исследуемым препаратом уже через две недели лечения у животных, получавших препарат в максимальной дозе, болевая чувствительность не отличалась от показателей животных ложнопери-

розированных групп. Через 4 и 8 недель терапии обезболивающий эффект отмечен у всех групп животных с индуцированной патологией, получавших активный препарат.

Данные патоморфологического исследования

Патологоанатомическому и гистологическому исследованию были подвергнуты интактный рог матки и участок брюшины с имплантатом (очаг эндометриоза). Патологоанатомическое исследование включало в себя макроскопическую оценку эндометриоза с морфометрией.

При гистологическом исследовании состояние эндометрия интактного рога матки и степень развития эндометриоза оценивали полуколичественно в баллах, от 0 до 3: где 0 – отсутствие изменений; 1 – незначительные изменения; 2 – умеренные изменения; 3 – выраженные изменения.

Оценка состояния эндометрия интактного рога матки экспериментальных животных

При патологоанатомическом исследовании маток ложнопериоперированных крыс патологических изменений не выявлено. У крыс, получавших тестируемый препарат в дозе 111 мг/кг, при макроскопическом исследовании отмечалось уменьшение толщины рогов матки и степени полнокровия органа, что было особенно заметно на 60-й день эксперимента.

Гистологическое строение эндометрия интактного рога матки животных с индукцией патологии также соответствовало норме. Эндометрий представлен однослойным призматическим мерцательным эпителием, состоящим из секреторных и реснитчатых клеток и собственной пластинки, образованной рыхлой соединительной тканью, содержащей многочисленные маточные железы. На фоне применения активного препарата на 30-й день эксперимента у группы ложнопериоперированных животных, получавших активный препарат в дозе 111 мг/кг (группа 2), отмечалось значительное снижение степени пролиферации эндометрия, что проявлялось в уменьшении количества железистых структур, снижении высоты эпителия и степени гиперплазии эндометрия (рис. 1) по сравнению с ложнопериоперированными животными, получавшими контрольное вещество (группа 1) (рис. 2). На 60-й день эксперимента сохранялась такая же тенденция, но признаки снижения пролиферации эндометрия у ложнопериоперированных животных, получавших активный препарат в дозе 111 мг/кг, были менее выражены.

Оценка развития эндометриоидных гетеротопий

При макроскопическом исследовании самок крыс экспериментальных групп с индукцией патологии у большинства животных отмечались успешное разрастание гетеротопии и образование кист разного размера на месте имплантатов. Размеры кист варьировали в пределах 2–4×2–6×2–10 мм, превышая исходные размеры имплантатов. Четко визуализировалась густая сосудистая сеть.

Морфометрическая характеристика очагов эндометриоза приведена в таблице 1.

У животных, получавших активный препарат, отмечалось статистически значимое снижение объемов эндометриоза на 30-й день эксперимента ($p < 0,05$). На 60-й день также отмечалась тенденция к снижению объема очага эндометриоза в группах, получавших тестируемый препарат, но не достигшая статистической значимости ($p = 0,07$). В целом результаты морфометрии свидетельствуют о наличии терапевтического эффекта препарата в отношении снижения объема эндометриоза как через 30, так и через 60 дней после начала терапии.

Гистологически очаги эндометриоза в большинстве случаев характеризовались кистозным строением. Отмечалась разной степени выраженности мононуклеарная инфильтрация с преобладанием лимфоцитов, макрофагов и гистиоцитарных клеток. Стенка кист была образована соединительнотканскими элементами с небольшим количеством слабо дифференцированных миофибробластоподобных клеток. В некоторых случаях выявлялась гиперплазия внутренней стенки эндометриозного очага. Содержимое кист представлено неструктурированным слабобазофильным компонентом с небольшим количеством мононуклеаров и десквамированных эпителиальных клеток. В стенке кисты также выявлялись немногочисленные железистые структуры по типу трубчатых желез эндометрия. Внутренняя стенка эндометриозного очага была выстлана однослойным эпителием различной степени сохранности и дифференцировки. У самок, получавших контрольное вещество, преобладал призматический эпителий, схожий по строению с эутопическим эпителием эндометрия интактного рога матки (рис. 3 и 4). У животных, получавших активный препарат в дозах 37 мг/кг и 111 мг/кг, отмечалось заметное снижение высоты эпителия, в большинстве случаев кисты были выстланы плохо сохранившимся уплощенным эпителием, практически не наблюдалась гиперплазия стенки кисты, отмечалось значительное снижение объемов и степени васкуляризации эндометриозного очага (рис. 5–8).

В некоторых случаях отмечались признаки полной резорбции эндометриоза с выявлением в небольших количествах слабодифференцированных клеток, а

также элементов рыхлой соединительной и грануляционной ткани в месте прикрепления импланта, что чаще наблюдалось у животных, получавших индолкарбинол в дозах 37 мг/кг и 111 мг/кг на 60-й день эксперимента.

Данные по гистологической оценке эндометриозных гетеротопий в баллах (0–3) приведены в таблице 2. Успешность формирования патологии и эффективность лечения оценивались в баллах, по состоянию эпителиального слоя эндометрия имплантов по модифицированной шкале Keenan [22]:

0 баллов – отсутствие эпителиальных клеток;

1 балл – единичные эпителиальные клетки;

2 балла – умеренно выраженный эпителиальный слой;

3 балла – хорошо выраженный эпителиальный слой.

При межгрупповом сравнении установлено статистически значимое снижение баллов по данным показателям в группе самок крыс, получавших индолкарбинол в дозе 37 мг/кг, по отношению к группе животных, получавших контрольное вещество ($p < 0,05$, см. табл. 2).

На 60-й день эксперимента при межгрупповом сравнении установлено статистически значимое снижение баллов по оцениваемым показателям в группе животных, получавших индолкарбинол в дозе 111 мг/кг, по отношению к группе получавших контрольное вещество.

Таким образом, по результатам гистологической оценки интактного рога матки выявлена тенденция к снижению степени гиперплазии эндометрия в группах самок, получавших активный препарат, по сравнению с контрольными группами.

Результаты морфометрии эндометриозных очагов свидетельствуют о наличии терапевтического эффекта индолкарбинола при введении в дозах 37 мг/кг и 111 мг/кг: снижение объема эндометриозного очага отмечалось как через 30, так и через 60 дней после начала терапии. Терапевтическая эффективность препарата также подтверждается результатами гистологической оценки эндометриозных гетеротопий: сумма баллов по оцениваемым показателям была меньше в группах, получавших терапию.

Таблица 1. Морфометрическая характеристика (объем, мм³) эндометриоза, M (SD)

Группа	Объем очага эндометриоза, мм ³			
	30-й день эксперимента	Значимость различий	60-й день эксперимента	Значимость различий
Группа 3 (1% раствор крахмала)	9,6 (3,91) (n=6)		16,6 (15,36) (n=6)	
Группа 4 (индолкарбинол 37 мг/кг)	3,8 (2,91)** (n=6)	$p=0,04$	6,6 (5,59) (n=5)*	$p=0,07$
Группа 5 (индолкарбинол 111 мг/кг)	3,7 (1,58)** (n=5)*	$p=0,04$	1,6 (1,45) (n=5)*	$p=0,07$

Примечания:

* данные самок №4.40 и №5.45 не включены в обработку в связи с отсутствием гистологических признаков развития эндометриоза; данные самки №5.29 выявлены как выскакивающие значения и не были включены в обработку;

** различия статистически значимы в сравнении с группой, получавшей контрольное вещество (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$).

Обсуждение

Эндометриоз является многофакторным заболеванием. Сегодня в основе его консервативного лечения лежит длительная гормональная терапия, которая предотвращает дальнейшее его развитие за счет снижения влияния эстрогенов. Применяются для этой цели комбинированные синтетические эстроген-гестагенные препараты, прогестины, препараты без эстрогенного компонента, антигестагены, антигонадотропины, агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона, антиэстрогены, ингибиторы ароматазы [23].

Поскольку эстрогены являются ключевыми факторами поддержания гомеостаза эндометрия, любое

нарушение процесса синтеза и метаболизма эстрогенов ведет к развитию патологических изменений эндометрия. Изменения функциональной активности эстрогеновых рецепторов β (ЭР) β рассматриваются как важное звено патогенеза эндометриоза. Показано, что при эндометриозе, независимо от локализации гетеротопии (яичники или брюшная полость), наблюдается увеличение экспрессии ЭР β [24]. Поэтому одним из возможных механизмов терапевтической активности препарата может быть его антиэстрогеновое действие [25].

Известно, что, кроме антиэстрогенового эффекта, индолкарбинол обладает антипролиферативным действием. Показана эффективность применения

Таблица 2. Гистологическая оценка эндометриоза в баллах (0–3) на 30-й день эксперимента, Me (Q1;Q3)

Группа	n	Оцениваемые показатели						Сумма баллов
		Степень выраженности кисты	Воспалительная инфильтрация	Наличие желез	Состояние эпителия	Гиперплазия эндометриальной ткани	Васкуляризация	
Группа 3 (1% раствор крахмала)	6	2,0 (2,0;3,0)	2,0 (2,0;2,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (1,0;2,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (2,0;2,0)	10,5 (7,0;11,0)
Группа 4 (индолкарбинол 37 мг/кг)	6	1,0 (0,0;3,0)	1,0** (1,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,5 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;0,0)	1,0 (1,0;1,0)	4,0** (2,0;7,0)
Группа 5 (индолкарбинол 111 мг/кг)	5*	3,0 (2,0;3,0)	1,0 (1,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (1,0;2,0)	0,0 (0,0;0,0)	1,0 (1,0;2,0)	7,0 (7,0;7,0)

Примечания:

*данные самки №29 из группы 5 выявлены как выскакивающие значения и не были включены в обработку;

**различия статистически значимы в сравнении с группой, получавшей контрольное вещество (критерий Манна–Уитни, $p=0,04$).

Рис. 1. Срез рога матки самки крысы второй группы. 30-й день. Отмечается отсутствие признаков пролиферации эндометрия. Количество железистых структур снижено (стрелки). Эндометрий выстлан кубическим эпителием. Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. 100

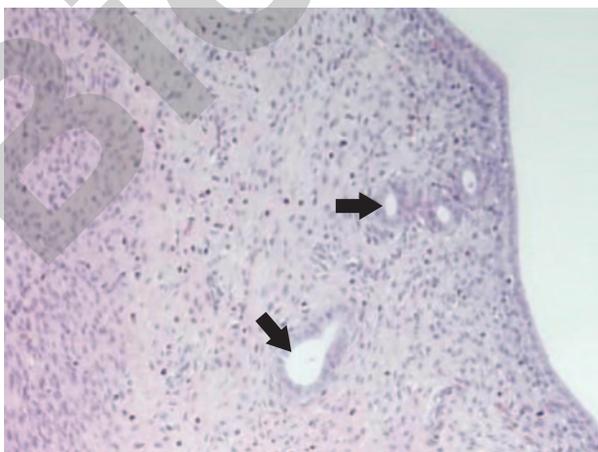


Рис. 2. Срез рога матки самки крысы первой группы. 30-й день. Стрелками отмечена выраженная гиперплазия эндометрия с большим количеством железистых структур. Эндометрий выстлан высоким призматическим эпителием. Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. 100

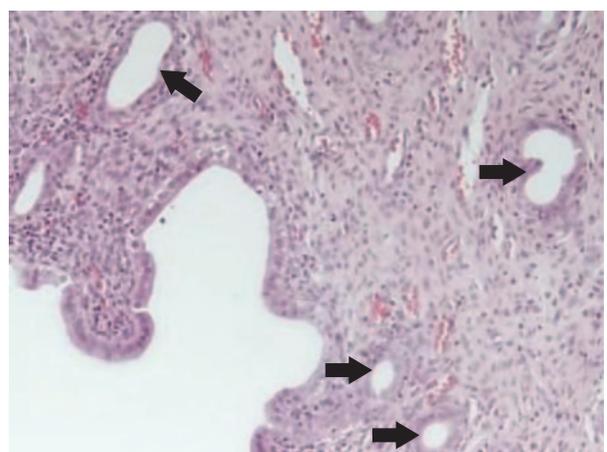


Рис. 3. Самка крысы, третья группа. 30-й день. Очаг эндометриоза отмечен белой стрелкой, интактный рог матки - черной

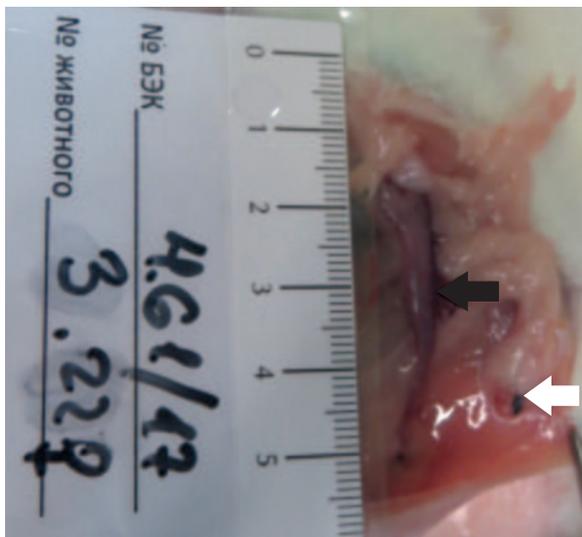


Рис. 6. Срез очага эндометриоза самки крысы, четвертая группа. Опухоль в виде небольшой кисты, выстланной однослойным кубическим и уплощенным эпителием (стрелка). Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. 100

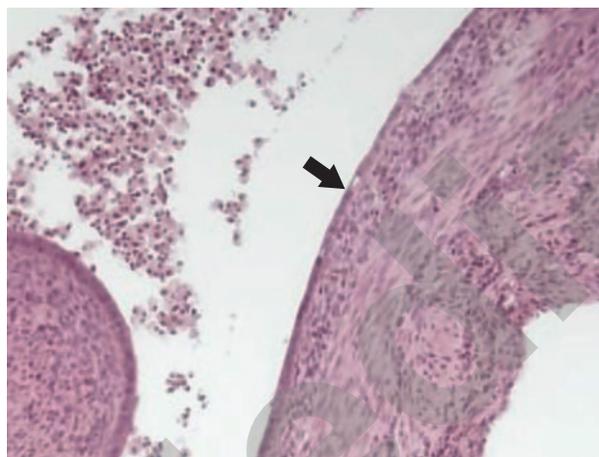


Рис. 4. Срез очага эндометриоза самки крысы, третья группа. Опухоль в виде крупной кисты, выстланной однослойным призматическим эпителием. Железистые структуры отмечены стрелками. Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. 100

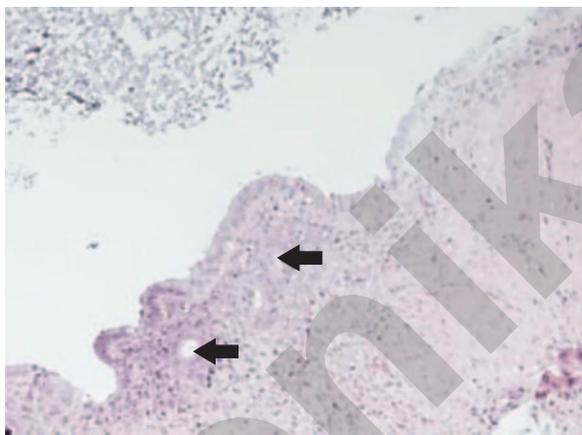


Рис. 7. Самка крысы, пятая группа. 30-й день. Очаг эндометриоза отмечен белой стрелкой, интактный рог матки - черной.

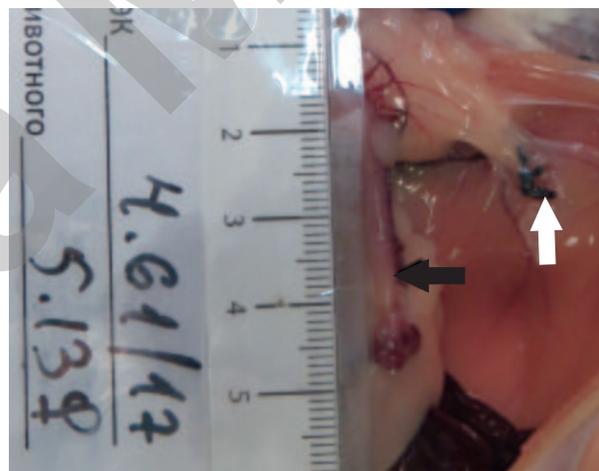


Рис. 5. Самка крысы, четвертая группа. 30-й день. Очаг эндометриоза отмечен белой стрелкой, интактный рог матки - черной

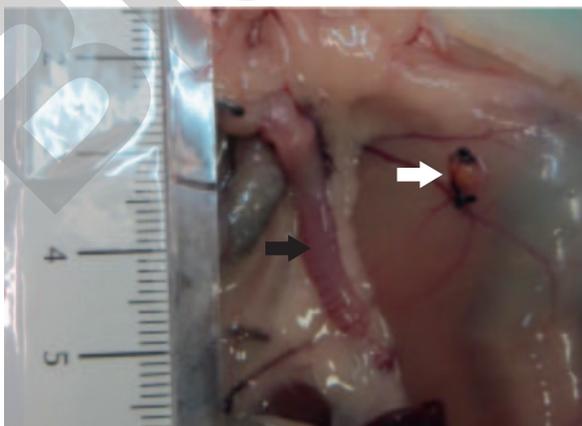


Рис. 8. Срез очага эндометриоза самки крысы, пятая группа. Опухоль в виде небольшой кисты, выстланной однослойным кубическим и плоским эпителием (стрелка). Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. 100



ИЗК (действующего вещества препарата) для профилактики рака молочной железы, рака тела и шейки матки [26, 27]. Развитие очагов эндометриоза связано с функционированием системы инсулиноподобных факторов роста, индуцирующих пролиферативную активность клеток [28, 29]. В очагах эндометриоза любой локализации отмечается высокая экспрессия инсулиноподобных факторов роста (IGF1 и IGF2). С использованием культур различных линий раковых клеток установлено, что ИЗК снижает пролиферативную активность путем подавления различных звеньев каскадов внутриклеточных посредников, в том числе IGF [30–32]. Антипролиферативное действие ИЗК также может быть одним из ведущих факторов, обуславливающих эффективность препарата, выявленную на модели развития эндометриоза у крыс. Однако определение точных механизмов, опосредующих выявленную терапевтическую активность препарата, требует дальнейшего изучения.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что индолкарбинол при введении животным в двух дозах (37 мг/кг и 111 мг/кг) эффективно снижал размер очага эндометриоза, а также выраженность эндометриозидных гетеротопий. За счет уменьшения объемов патологической ткани у животных наблюдалось также снижение болевого синдрома, вызванного эндометриозом.

Литература/References

1. Маржевская В.В., Присяжная Т.С., Жамойдик В.И., Берлев И.В., Малек А.В. Молекулярно-генетические основы эндометриоза: диагностический потенциал наследуемых и экспрессируемых факторов. Журнал акушерства и женских болезней. 2018; 67(3): 64–73. [Marzhevskaya V.V., Prisyazhnaya T.S., Zhamoidik V.I., Berlev I.V., Malek A.V. Molecular genetic bases of endometriosis: the diagnostic potential of inheritable and expressed factors. Zhurnal Akusherstva i Zhenskikh Bolezney (Journal of Obstetrics and Women's Diseases). 2018; 67 (3): 64–73. (in Russian)].
2. Адамян Л.В., ред. Клинические рекомендации по ведению больных. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. М.; 2013. [Adamyan L.V. (ed.). Clinical practice guidelines for the management of patients. Endometriosis: diagnosis, treatment, and rehabilitation. Moscow; 2013. (in Russian)].
3. Zhou W.J., Yang H.L., Shao J., Mei J., Chang K.K., Zhu R., Li M.Q. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. Cell. Mol. Life Sci. 2019; 76(11): 2111–32. <https://dx.doi.org/10.1007/s00018-019-03056-x>.
4. Bulun S.E., Monsivais D., Kakinuma T., Furukawa Y., Bernardi L., Pavone M.E., Dyon M. Molecular biology of endometriosis: from aromatase to genomic abnormalities. Semin. Reprod. Med. 2015; 33(3): 220–4. <https://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1554053>.
5. Donnez J. Introduction: From pathogenesis to therapy, deep endometriosis remains a source of controversy. Fertil. Steril. 2017; 108(6): 869–71. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.10.015>.
6. Киселев В.И., Пальцев М.А. Регуляция активности генов и новые лекарственные средства. Вестник Российской академии наук. 2016; 86(6): 512–8. [Kiselev V.I., Paltsev M.A. Gene activity regulation and new drugs. Vestnik Rossiyskoi Akademii Nauk (Bulletin of the Russian Academy of Sciences). 2016; 86 (6): 512–8. (in Russian)].
7. Clemenza S., Sorbi F., Noci I., Capezuoli T., Turrini I., Carriero C. et al. From pathogenesis to clinical practice: Emerging medical treatments for endometriosis. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2018; 51: 92–101. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.021>.
8. Aggarwal B.B., Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. Cell Cycle. 2005; 4(9): 1201–15. <https://dx.doi.org/10.4161/cc.4.9.1993>.
9. Fujioka N., Fritz V., Upadhyaya P., Kassie F., Hecht S.S. Research on cruciferous vegetables, indole-3-carbinol, and cancer prevention: A tribute to Lee W. Wattenberg. Mol. Nutr. Food Res. 2016; 60(6): 1228–38. <https://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201500889>.
10. Cover C.M., Hsieh S.J., Cram E.J., Hong C., Riby J.E., Bjeldanes L.F., Firestone G.L. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. Cancer Res. 1999; 59(6): 1244–51.
11. Ampofo E., Schmitt B.M., Menger M.D., Laschke M.W. Targeting the Microcirculation by indole-3-carbinol and its main derivate 3,3',-diindolylmethane: effects on angiogenesis, thrombosis and inflammation. Mini Rev. Med. Chem. 2018; 18(11): 962–8. <https://dx.doi.org/10.2174/1389557518666180313100144>.
12. Rahman K.M., Aranha O., Sarkar F.H. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. Nutr. Cancer. 2003; 45(1): 101–12.
13. Feitelson M.A., Arzumanyan A., Kulathinal R.J., Blain S.W., Holcombe R.F., Mahajna J. et al. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. Semin. Cancer Biol. 2015; 35(Suppl.): S25–54. <https://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>.
14. Fuentes F., Paredes-Gonzalez X., Kong A.N. Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: anti-oxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and in vivo cancer chemopreventive efficacy. Curr. Pharmacol. Rep. 2015; 1(3): 179–96. <https://dx.doi.org/10.1007/s40495-015-0017-y>.
15. Ahmad A., Sakr W.A., Rahman K.W. Mechanisms and therapeutic implications of cell death induction by indole compounds. Cancers (Basel). 2011; 3(3): 2955–74. <https://dx.doi.org/10.3390/cancers3032955>.
16. Maruthanila V.L., Poornima J., Mirunalini S. Attenuation of carcinogenesis and the mechanism underlying by the influence of indole-3-carbinol and its metabolite 3,3'-diindolylmethane: a therapeutic marvel. Adv. Pharmacol. Sci. 2014; 2014:832161. <https://dx.doi.org/10.1155/2014/832161>.
17. Wang S.Q., Cheng L.S., Liu Y., Wang J.Y., Jiang W. Indole-3-carbinol (I3C) and its major derivatives: their pharmacokinetics and important roles in hepatic protection. Curr. Drug Metab. 2016; 17(4): 401–9. <https://dx.doi.org/10.2174/1389200217666151210125105>.
18. Riby J.E., Firestone G.L., Bjeldanes L.F. 3,3'-diindolylmethane reduces levels of HIF-1alpha and HIF-1 activity in hypoxic cultured human cancer cells. Biochem. Pharmacol. 2008; 75(9): 1858–67. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.01.017>.
19. Augoulea A., Alexandrou A., Creatsa M., Vrachnis N., Lambrinouadaki I. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. Arch. Gynecol. Obstet. 2012; 286(1): 99–103. <https://dx.doi.org/10.1007/s00404-012-2357-8>.
20. Киселев В.И., Сметник В.П., Сутурина Л.В., Селиванов С.П., Рудакова Е.Б., Рахматуллина И.Р., Андреева Е.Н., Фадеева Н.И., Хасанов Р.Ш., Кулагина Н.В., Рожкова Н.И., Артымук Н.В., Гависова А.А., Муйжнек Е.Л., Кузнецов И.Н., Друх В.М. Индолкарбинол (Индинол Форто) – метод мультитаргетной терапии при циклической мастодинии. Акушерство и гинекология. 2013; 7: 56–62. [Kiselev V.I., Smetnik V.P., Suturina L.V., Selivanov S.P., Rudakova E.B., Rakhmatullina I.R., Andreeva E.N., Fadeeva N.I., Khasanov R.Sh., Kulagina N.V., Rozhkova N.I., Artyumuk N.V., Gavisova A.A., Muizhnek E.L., Kuznetsov I.N., Drukh V.M. Indole carbinol (Indinol Forto) is a multitargeted therapy option for cyclic mastodynia. Akusherstvo i Ginekologiya (Obstetrics and Gynecology). 2013; 7: 56–62. (in Russian)].

21. Anesthesia and analgesia in laboratory animals at UCSF. The Regents of the University of California. Электронный ресурс: Available at: <http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awRbtFrm.asp> Accessed 01.2019.
22. Keenan J.A., Williams-Boyce P.K., Massey P.J., Chen T.T., Caudle M.R., Bukovsky A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertil. Steril.* 1999; 72(1): 135-41. [https://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00157-0](https://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00157-0).
23. Tosti C., Biscione A., Morgante G., Bifulco G., Luisi S., Petraglia F. Hormonal therapy for endometriosis: from molecular research to bedside. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2017; 209: 61-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.05.032>.
24. Simmen R.C., Kelley A.S. Reversal of fortune: estrogen receptor- β in endometriosis. *J. Mol. Endocrinol.* 2016; 57(2): F23-7. <https://dx.doi.org/10.1530/JME-16-0080>.
25. ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology. ACOG practice bulletin. Medical management of endometriosis. Number 11, December 1999 (replaces Technical Bulletin Number 184, September 1993). Clinical management guidelines for obstetrician gynecologists. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2000; 71(2): 183-96. [https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7292\(00\)80034-x](https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7292(00)80034-x).
26. Shertzer H.G., Senft A.P. The micronutrient indole-3-carbinol: implications for disease and chemoprevention. *Drug Metabol. Drug Interact.* 2000; 17(1-4): 159-88. <https://dx.doi.org/10.1515/dmdi.2000.17.1-4.159>.
27. Rogan E.G. The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *In Vivo.* 2006; 20(2): 221-8.
28. Тихончук Е.Ю., Асатурова А.В., Адамьян Л.В. Частота выявления и структура патологических изменений эндометрия у женщин репродуктивного возраста с генитальным эндометриозом. *Акушерство и гинекология.* 2016; 12: 87-95. [Tikhonchuk E.Yu., Asaturova A.V., Adamyan L.V. The detection rate and pattern of endometrial pathological changes in reproductive-aged women with genital endometriosis. *Akusherstvo i Ginekologiya (Obstetrics and Gynecology).* 2016; 12: 87-95. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.12.87-95>.
29. Ищенко А.И., Кудрина Е.А. Эндометриоз: диагностика и лечение. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2002. 104 с. [Ishchenko A.I., Kudrina E.A. Endometriosis: diagnosis and treatment. Moscow: GEOTAR-MED; 2002.104 p. (in Russian)].
30. Ahmad A., Biersack B., Li Y., Kong D., Bao B., Schobert R. et al. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2013; 13(7): 1002-13. <https://dx.doi.org/10.2174/18715206113139990078>.
31. Wang X., He H., Lu Y., Ren W., Teng K.Y., Chiang C.L. et al. Indole-3-carbinol inhibits tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells via suppression of microRNA-21 and upregulation of phosphatase and tensin homolog. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1853(1): 244-53. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbamc.2014.10.017>.
32. Marconett C.N., Singhal A.K., Sundar S.N., Firestone G.L. Indole-3-carbinol disrupts estrogen receptor- α dependent expression of insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 and proliferation of human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012; 363(1-2): 74-84. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.07.008>.

Поступила 21.11.2019

Принята в печать 29.11.2019

Received 21.11.2019

Accepted 29.11.2019

Сведения об авторах:

Киселев Всеволод Иванович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». E-mail: vkis10@mail.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Ашрафян Левон Андреевич, д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный врач РФ, заместитель директора ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», директор Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». E-mail: levaa2004@yahoo.com. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Пронин Станислав Михайлович, к.м.н., врач-онколог, старший научный сотрудник Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». E-mail: s_pronin@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Герфанова Евгения Викторовна, врач-онколог Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». E-mail: e_gerfanova@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Кузнецов Игорь Николаевич, к.б.н., заместитель директора Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». E-mail: i_kuznetsov@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Друх Вадим Михайлович, д.м.н., генеральный директор АО «МираксБиоФарма». E-mail: info@mbpharma.ru. 121059, Москва, ул. Брянская, д. 5.

Удут Владимир Васильевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной и лечебной работе, заведующий лабораторией физиологии, молекулярной и клинической фармакологии НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. E-mail: udutv@mail.ru. 634028, Россия, Томск, пр-т Ленина, д. 3.

Чурин Алексей Александрович, д.м.н., заведующий отделом лекарственной токсикологии НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. E-mail: churin_aa@pharmso.ru. 634028, Россия, Томск, пр-т Ленина, д. 3.

Пчелинцева Ольга Игоревна, менеджер по клиническим исследованиям АО «МираксБиоФарма». E-mail: pchelintseva87@mail.ru. 121059, Москва, ул. Брянская, д. 5.

About the authors:

Vsevolod I. Kiselev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of RAS Professor, Deputy Director of the Institute of Oncogynecology and Mammology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. E-mail: vkis10@mail.ru. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Levon A. Ashrafyan, DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Oncogynecology and Mammology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. E-mail: levaa2004@yahoo.com. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Stanislav M. Pronin, MD, PhD, Oncologist, Senior scientific researcher at the Institute of Oncogynecology and Mammology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. E-mail: s_pronin@oparina4.ru. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Evgeniya V. Gerfanova, MD, Oncologist at the Institute of Oncogynecology and Mammology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. E-mail: e_gerfanova@oparina4.ru. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Igor N. Kuznetsov, PhD, Deputy Director of the Institute of Oncogynecology and Mammology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. E-mail: i_kuznetsov@oparina4.ru. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Vadim M. Druk, DM, General Director of JSC «MiraxBioFarma». E-mail: info@mbpharma.ru. 5 Bryanskaja str., Moscow, 121059, Moscow, Russian Federation.

Vladimir V. Udut, DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director of Scientific and Medical Work, Head of the Laboratory of Physiology, Molecular and Clinical Pharmacology Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg, Tomsk National Research Medical Center of RAS. E-mail: udutv@mail.ru. 3 Lenina Ave., Tomsk, 634028, Russian Federation.

Alexey A. Churin, DM, Head of the Department of Drug Toxicology, Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg, Tomsk National Research Medical Center of RAS. E-mail: churin_aa@pharmso.ru. 3 Lenina Ave., Tomsk, 634028, Russian Federation.

Olga I. Pchelintseva, MSc, Clinical trial manager of JSC «MiraxBioFarma». E-mail: pchelintseva87@mail.ru. 5 Bryanskaja str., Moscow, 121059, Moscow, Russian Federation.