

На правах рукописи

ДРУХ

Вадим Михайлович

**СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ РАННИХ МЕХАНИЗМОВ КАНЦЕРОГЕНЕЗА В
ОРГАНАХ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ**

14.03.03 - патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва - 2017

Работа выполнена на кафедре общей патологии и патологической физиологии имени В. А. Фролова медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Научные консультанты:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН

Фролов Виктор Алексеевич

Пальцев Михаил Александрович

Официальные оппоненты:

Блохин Дмитрий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией фармакоцитокинетики ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Кучеряну Валериан Григорьевич – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Долгов Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится «13» сентября 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.06,
к.м.н.

Горячев Вячеслав Александрович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Развитие молекулярно-генетических подходов позволило изменить ряд принципиальных позиций в диагностике и лечении злокачественных новообразований и наметить конкретные перспективы по их предотвращению. Однако успехам в лечении и профилактике одних видов опухолей сопутствовал рост заболеваемости и смертности от других. Особенно это касается рака репродуктивных органов. За последние десять лет в Российской Федерации летальность в течение первого года после постановки диагноза различных видов рака органов репродуктивной системы возросла на 12-36 %.

Для значительной части онкологических заболеваний репродуктивных органов существуют эффективные методики доклинического выявления. Одновременно с этим необходимо совершенствовать существующие и разрабатывать новые подходы к адекватной (селективной и безопасной) молекулярной противоопухолевой терапии, а также шире внедрять методы патогенетической профилактики. Именно с активной онкохимиопрофилактикой, как и с ранней доклинической диагностикой, связаны надежды по преодолению этого грозного недуга в будущем. Имеющаяся научная и практическая информация однозначно свидетельствует о том, что онкологическое заболевание может быть излечено только на ранних стадиях образования опухоли, когда неоплазия еще не стала необратимой и с болезнью можно справиться без использования тяжелых (с точки зрения их переносимости и влияния на организм больного) методов терапии.

Таким образом, решение научных и научно-технологических проблем должно базироваться на альтернативных способах лечения, методиках ранней диагностики, а также на профилактических программах для различных слоев населения.

Лекарственные средства, применяемые с целью онкохимиопрофилактики, должны подавлять неоплазию и гиперплазию в органах-мишенях и предотвращать тем самым появление злокачественных новообразований. Еще одна особенность онкохимиопрофилактики заключается в том, что препарат, назначаемый с профилактической целью, как правило, предусматривает очень длительные (иногда даже пожизненные) курсы лечения. А это возлагает определенные требования к самим химиопрофилактическим средствам (минимальная токсичность и т.д.).

Таким образом, актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки новых лекарственных препаратов для проведения специфической химиопрофилактики.

Цель исследования

Определение новых молекулярных маркеров и ключевых механизмов раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы человека и способов их коррекции.

Задачи исследования

1. Определить природные соединения, обладающие фармакологической активностью в отношении механизмов раннего канцерогенеза.
2. Предложить перспективные прототипы лекарственных форм дииндолилметана (DIM) и эпигаллокатехина 3-галлата (EGCG) и определить их общую и специфическую токсичность.
3. Изучить механизмы влияния отобранных соединений на процессы раннего канцерогенеза (гормональный канцерогенез, эпигенетические нарушения и баланс факторов роста).

4. Определить активность соединений-кандидатов в отношении клеток линий злокачественных опухолей *in vitro*, а также на моделях канцерогенеза в органах репродуктивной системы *in vivo*.
5. Определить значимость различных механизмов раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы человека.
6. Установить терапевтическую эффективность перспективных прототипов лекарственных форм DIM и EGCG в отношении предраковых и фоновых заболеваний органов репродуктивной системы человека.
7. Обосновать применение перспективных мультитаргетных препаратов для онкохимиопрофилактики злокачественных опухолей репродуктивной системы человека.

Положения, выносимые на защиту

1. Перспективные прототипы лекарственных форм DIM и EGCG обладают низкой общей и специфической токсичностью при применении как у лабораторных животных, так и у человека.
2. DIM *in vitro* проявляет сходную подавляющую активность в отношении как гормон-зависимых, так и гормон-независимых клеточных линий рака простаты.
3. DIM *in vivo* проявляет ингибирующий эффект в отношении гистондеацетилазы, нормализует метаболизм эстрогенов, снижает туморогенность и тормозит рост ксенографтов опухолей линий рака простаты человека.
4. EGCG *in vivo* способствует деметилированию генов-онкосупрессоров.
5. Перспективный прототип лекарственной формы DIM обладает терапевтической эффективностью на ранних стадиях канцерогенеза

в предстательной железе и способствует обратному развитию гиперпластических и предраковых процессов.

6. Лекарственная форма ИЗС обладает терапевтической эффективностью в отношении диспластических заболеваний молочной железы и состояний, ассоциированных с повышенным риском рака молочной железы.
7. Гиперпластические процессы и ранние стадии канцерогенеза в органах репродуктивной системы характеризуются комплексом молекулярно-генетических изменений, включающих в себя гормональную гиперстимуляцию, эпигенетическую блокаду генов-онкосупрессоров и активацию протоонкогенов, а также сдвиг баланса ростовых факторов и цитокинов в сторону стимулирующих пролиферацию, со снижением активности факторов, подавляющих пролиферацию.

Научная новизна

Роль механизмов гормонального канцерогенеза, метилирования генов-онкосупрессоров и факторов роста в патогенезе гиперпластических заболеваний и раннего канцерогенеза изучена и подтверждена на моделях их подавления *in vitro* и *in vivo*. Выбраны природные соединения, обладающие наибольшим потенциалом для создания лекарственных средств, направленных на подавление гормонального канцерогенеза, метилирования генов-онкосупрессоров и дисбаланса ростовых факторов. Получены данные, доказывающие эффективность соединений индольного ряда и эпигаллокатехинов в отношении ранних стадий канцерогенеза у животных (на моделях с использованием эндометрия и шейки матки, а также на моделях перевиваемых опухолей линий рака простаты). Детально описана общая и специфическая токсичность перспективных прототипов лекарственных форм DIM и EGCG на лабораторных животных. Оценено влияние указанных соединений на ряд молекулярных

маркеров раннего канцерогенеза у человека (ростовые факторы в тканях предстательной железы, метилирование генов-онкосупрессоров в эндометрии и шейке матки, канцерогенные метаболиты эстрогенов при дисплазии молочной железы). Получены данные о влиянии перспективных прототипов лекарственных форм DIM и EGCG на гиперпластические процессы и ранние стадии канцерогенеза в репродуктивных органах человека - при простатической интраэпителиальной неоплазии, доброкачественной дисплазии молочной железы, гиперплазии эндометрия и цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Сформулирована концепция раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы и на ее основе предложены принципы онкохимиопрофилактики.

Практическая значимость

Предложенная концепция раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы может быть использована для проведения научных исследований канцерогенеза и в других органах и тканях. Разработанные в рамках работы принципы воздействия на патогенетические механизмы процессов раннего канцерогенеза могут быть положены в основу выбора будущих соединений-кандидатов в лекарственные средства. Результаты исследования способов коррекции данных патогенетических механизмов могут быть использованы для обоснования возможности онкохимиопрофилактики и лечения гиперпластических процессов в органах репродуктивной системы. Отобранные соединения-кандидаты и их лекарственные формы могут быть использованы для создания лекарственных средств для лечения гиперпластических и неопластических заболеваний органов репродуктивной системы.

Методология и методы диссертационного исследования

Для решения поставленных задач был использован комплекс экспериментальных и клинических методов исследования. В экспериментальных исследованиях *in vitro* применены методы культивирования

клеточных культур. В экспериментальных исследованиях *in vivo* применены токсикологические методы исследования на органном, системном и организменном уровнях, и методы моделирования патологических процессов канцерогенеза у лабораторных животных. В клинических исследованиях применены лабораторные и инструментальные методы для изучения изменений эпигенетической регуляции, метаболизма, тканевого гомеостаза и морфологического строения тканей на фоне интервенционных воздействий на патогенетические механизмы канцерогенеза.

Апробация работы

Результаты работы изложены на Юбилейном Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь – в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2014) и Всероссийской Байкальской Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2014), XIII молодёжной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука XXI века: новый подход» (Санкт-Петербург, 2015) и на Международной научной конференции «Клиническая и профилактическая медицина: опыт и новые открытия» (Москва, 2015), на заседании кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института РУДН, 2017 г.

Публикации

По тематике диссертации опубликовано 36 научных работ, в том числе 27 статей в периодических изданиях, рекомендуемых ВАК министерства образования и науки РФ для публикации основных результатов диссертаций на соискание учёной степени доктора наук. 6 статей опубликовано в международных изданиях, индексируемых в библиографических базах данных Scopus и Medline. Получены патенты Российской Федерации: 2 патента на изобретения и 1 патент на полезную модель.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты исследований включены в учебный процесс на кафедре общей патологии патологической физиологии имени В.А. Фролова Медицинского института РУДН. Данные, полученные при проведении доклинических исследований безопасности и эффективности препаратов Инфемин (дииндолилметан) и Каспазол (эпигаллокатехин), включены в соответствующие разделы досье препаратов. Данные клинического исследования препарата ИндинолФорто (индолкарбинол) включены в отчет о клинических исследованиях. Получено разрешение на использование лекарственного средства в медицинской практике: ИндинолФорто, Регистрационное удостоверение Минздрава РФ № ЛП-002010 от 20.02.2013 г.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 218 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований и их обсуждения, представленных в 6 главах, выводов, практических рекомендаций, библиографического указателя литературы, включающего 44 отечественных и 283 иностранных научных источников. Диссертация иллюстрирована 61 таблицей и 6 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Для экспериментов использованы активные вещества и фармацевтические препараты: эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG), 3,3'-диндолилметан (DIM); прототипы пероральных лекарственных форм DIM «Инфемин» и EGCG «Каспазол»; лекарственное средство «Индинол Форто» (индолкарбинол) («МираксБиоФарма», Россия).

Токсикологические исследования были проведены на белых нелинейных мышах и крысах (самцы и самки). Исследования включали токсикометрию,

оценку детоксицирующей функции печени по продолжительности гексеналового сна, офтальмологическое исследование, регистрацию ЭКГ, артериального давления, ректальной температуры, гематологические и биохимические исследования. Патоморфологические исследования включали некропсию и макроскопическое исследование внутренних органов.

В исследованиях алергизирующего действия препаратов 3 группы морских свинок (по 6 животных) получали две дозы препарата или воду. Введение препарата осуществлялось внутрижелудочно в течение 5 дней. Проводилось изучение реакции иммунных комплексов, конъюнктивальная проба, реакции общей анафилаксии, реакции непрямо́й дегрануляции тучных клеток.

Исследования препаратов *in vitro* проводились на опухолевых клетках линий рака простаты крысы CRL-2376 (MAT-Ly-Lu) и рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) и CRL-1435 (PC-3), а также рака эндометрия человека CRL-1622 (KLE) и HTB-113 (HEC-1-B). МТТ-тест был применен для оценки выживаемости опухолевых клеток. Величину IC₅₀ определяли по графику зависимости выживаемости клеток от концентрации DIM. Исследование активности гистондеацетилазы проводили на 40 крысах-самцах (по 20 в группе). Интегральная активность HDAC изучалась колориметрическим методом. Исследование метилирования генов проводили на 40 нелинейных крысах-самках (по 20 в экспериментальной и контрольной группах) с индуцированным гиперметилированием генов внутримышечной инъекцией суспензии Ni₃S₂. В исследованиях гормональных механизмов канцерогенеза были использованы 50 мышей линии Balb/c-nude с перевитыми клетками линии CRL-1622 (рака эндометрия человека). Определяли соотношение метаболитов эстрогенов 2-OHE1/16 α -OHE1 в моче с помощью иммуноферментного анализа.

Клиническое исследование баланса факторов роста в канцерогенезе в предстательной железе проводилось на базе НИИ урологии (г. Москва) как двойное слепое плацебо-контролируемое. Под наблюдением находилось 34

пациента с простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН), которые были разделены на 2 группы. Группа 1 (18 пациентов) принимала индол-3-карбинол (400 мг/сут) и EGCG (160 мг/сут), группа 2 (16 пациентов) принимала плацебо. Уровень экспрессии ростовых факторов IGF, EGF и TGF- β определялся в процентах экспрессирующих клеток и вычислялись его изменения к концу курса применения препарата.

Клиническое исследование метилирования генов-онкосупрессоров в эпителии шейки матки проводилось на базе кафедры акушерства и гинекологии №1 ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М.Сеченова (г. Москва), и включало в себя 102 пациентки с доброкачественными процессами шейки матки и CIN. Исследование проведено как открытое когортное в 3 параллельных группах. EGCG назначался всем пациенткам в дозировке 180 мг/сут в течение 6 месяцев. Частота метилирования генов-онкосупрессоров в эпителии шейки матки определялась до лечения и через 6 месяцев после его окончания. Для обнаружения CpG-островков метилированных генов использовался метод метилчувствительной ПЦР.

Клиническое исследование метилирования генов-онкосупрессоров в эндометрии проводилось на базе кафедры акушерства и гинекологии №1 ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М.Сеченова (г. Москва). В исследование было включено 153 пациентки с различной степенью неопластических изменений эндометрия. Исследование проведено как открытое когортное в 3 параллельных группах. EGCG назначался в дозировке 180 мг/сут в течение 6 месяцев. Использовался метод метилчувствительной ПЦР.

Клиническое исследование метаболизма эстрогенов при фоновых и предраковых процессах в молочной железе проведено как многоцентровое двойное слепое плацебо-контролируемое исследование в двух параллельных группах. Был использован метаболический предшественник DIM – индол-3-карбинол. В исследование включено 44 пациентки в возрасте 20-45 лет. Группы наблюдения: группа 1 – прием индолкарбинола по 200 мг 2 раза в сутки (22

пациентки); группа 2 – прием плацебо по 1 капсуле 2 раза в сутки (22 пациентки). Проводился анализ мочи на метаболиты эстрогенов – 2-ОНЕ1 и 16 α -ОНЕ1.

При анализе интервальных показателей с нормальным распределением использовались параметрические методы (двусторонний t-критерий Стьюдента). Сравнение для показателей с бинарным типом шкалы проводили с помощью критерия χ^2 , расчет 95% доверительных интервалов для них произведен по Клопперу-Пирсону.

Результаты собственных исследований

Отбор соединений для последующего изучения процессов раннего канцерогенеза и создания средств их коррекции

Как показал анализ доступной медицинской литературы, наиболее перспективными в настоящее время для целей химиопрофилактики можно признать соединения индольного ряда (индол-3-карбинол и DIM) и катехинового ряда (эпигаллокатехин-3-галлат). При этом известно, что индол-3-карбинол метаболизируется в организме человека, преимущественно образуя DIM, обладающий сходным спектром биологической активности. В большинстве случаев DIM более активен, за исключением способности индуцировать ферменты цитохромоксидазной системы печени, осуществляющие, в частности, метаболизм эстрогенов. В связи с этим, в исследованиях гормонального канцерогенеза оптимально использование индол-3-карбинола, тогда как для целей практического применения более приемлемым может оказаться DIM, обладающий большей удельной активностью. Изучение процессов раннего канцерогенеза в настоящее время практически полностью проводится на животных моделях, причем в большинстве случаев *in vitro*. Между тем, перенос полученных данных на человека сопряжен с трудностями, поскольку процессы канцерогенеза могут отличаться у людей рядом особенностей. В соответствии с поставленными задачами исследования, был запланирован отбор соединений,

перспективных с точки зрения возможности их применения как на лабораторных животных, так и в ходе клинических исследований на людях.

Кроме того, детальное изучение общей и специфической токсичности перспективных лекарственных средств является необходимым элементом их разработки. Поскольку в клинических исследованиях допустимо использование только готовых лекарственных форм, первым этапом подтверждения приемлемости прототипов лекарственных форм явилось изучение их токсических свойств.

Токсикологические исследования прототипов лекарственных форм DIM и EGCG

Объем токсикологических исследований определялся необходимостью последующего применения прототипов лекарственных форм в ходе клинических исследований.

Исследованный диапазон доз прототипа лекарственной формы DIM при токсикометрии составил от 100 мг/кг до 5000 мг/кг на крысах, на мышах – до 1000 мг/кг. Гибели животных при внутрижелудочном введении в дозах до 5000 мг/кг не отмечалось. Животные, получавшие препарат, по данным осмотра не отличались от здоровых животных. Половых различий в ходе исследования не зарегистрировано. Исследование хронической токсичности: препарат вводился внутрижелудочно ежедневно на протяжении 90 дней в дозах 10, 100 и 1000 мг/кг. Вес животных постепенно нарастал, а потребление корма и воды практически не изменялось в течение эксперимента. Значимых различий по исследуемым показателям в по сравнению с контролем не отмечалось. Ректальная температура не отличалась между группами. Также было показано, что прототип лекарственной формы DIM не изменяет продолжительность гексеналового сна, то есть не подавляет детоксицирующую функцию печени. Влияние препарата на состояние почек определялось по результатам анализа мочи. Значимых отклонений обнаружено не было. Измерения величины зрачка и ширины глазной

щели показали, что эти параметры значимо не менялись в группах. Также было установлено, что у крыс отсутствовало изменение артериального давления, ЧСС, характера ЭКГ, гематологических показателей и биохимического статуса. Некропсия была проведена после окончания эксперимента и показала отсутствие отклонений в состоянии внутренних органов. Значимых отличий массовых коэффициентов органов (отношение массы органа к массе тела) крыс между группами не было. При изучении возможного аллергенного действия прототипа лекарственной формы DIM у морских свинок было доказано, что он не провоцирует анафилактического шока. Конъюнктивальные пробы, реакции иммунных комплексов и реакции дегрануляции тучных клеток были также отрицательными.

Эксперименты по токсикометрии прототипа лекарственной формы EGCG проводились на мышах и крысах в дозе от 500 мг/кг до 8000 мг/кг. Гибель животных при введении препарата в дозе свыше 5000 мг/кг наблюдалась в течение 5 часов после введения препарата. У животных, получивших дозы до 5000 мг/кг, отмечались заторможенность, вялость, атаксия, падение потребления воды и корма в течение суток. В последующие дни их состояние было таким же, как у животных из контрольной группы. По результатам некропсии у выживших особей не было макроскопических изменений внутренних органов и изменений слизистых желудочно-кишечного тракта. Исследование хронической токсичности: препарат вводился внутривентрикулярно ежедневно на протяжении 90 дней в дозах 150, 750 и 1500 мг/кг. Вес животных постепенно нарастал, а потребление корма и воды практически не изменялось в течение эксперимента. Значимых различий по исследуемым показателям в по сравнению с контролем не отмечалось. Ректальная температура не отличалась между группами. Также было показано, что прототип лекарственной формы EGCG не изменяет продолжительность гексеналового сна, то есть не подавляет детоксицирующую функцию печени. Влияние препарата на состояние почек определялось по результатам анализа мочи. Значимых отклонений обнаружено не было.

Измерения величины зрачка и ширины глазной щели показали, что эти параметры значимо не менялись. В течение периода наблюдения у животных не отмечалось отечности или гиперемии слизистых. Также было установлено, что исследуемый препарат вызывал достоверные снижения уровня АД и величины ЧСС, особенно на максимальной дозе. На 30-е и 90-е сутки исследования у подопытных животных отмечались достоверные изменения в крови, выходящие на максимальной дозе за пределы физиологического варьирования: снижение уровня гемоглобина, содержания эритроцитов, лейкоцитоз, лимфопения и ускорение СОЭ. У животных опытных групп с максимальными дозами отмечено значимое повышение уровня трансаминаз плазмы крови на дозе 1500 мг/кг через 90 дней применения препарата. Некропсия после окончания эксперимента показала отсутствие отклонений в состоянии внутренних органов и тканей. Значимых отличий в массовых коэффициентах органов не было. Следовательно, прототип лекарственной формы EGCG имеет удовлетворительный профиль доклинической безопасности.

При изучении возможного аллергенного действия прототипа лекарственной формы EGCG у морских свинок было доказано, что он не провоцирует анафилактического шока. Конъюнктивальные пробы, реакции иммунных комплексов и реакции дегрануляции тучных клеток были также отрицательными. Полученные данные позволяют сделать вывод, что он не обладает аллергизирующим действием.

Исследование влияния соединений-кандидатов на механизмы раннего канцерогенеза на животных моделях

Эпигенетическая активность дииндолилметана

Исследование проводили на 40 крысах-самцах (по 20 в группе). Опытная группа получала прототип лекарственной формы DIM в дозе 133 мг/кг, контрольная – плацебо. У экспериментальных животных после 1 месяца воздействия удаляли простату и гомогенизировали участок ткани. Данный

дизайн эксперимента был избран, исходя из важности изучения активности HDAC и влияния на нее DIM в здоровой ткани простаты, поскольку процессы канцерогенеза исходно протекают в здоровых клетках. У экспериментальных животных экспрессия HDAC была заметно снижена (таблица 1). Таким образом, снижение активности HDAC под влиянием DIM имеет место *in vivo* в ткани нормальной предстательной железы.

Таблица 1. Результаты исследования активности HDAC в ткани простаты крыс после лечения (относительно среднего уровня в контроле)

Группы	Активность HDAC в расчете на общее содержание белка	Значимость отличий
Группа 1 (опыт, n=20)	0,72±0,42	0,0215
Группа 2 (контроль, n=20)	1,00±0,31	

К настоящему моменту различными исследователями в экспериментах *in vivo* было установлено, что DIM подавляет активность HDAC I класса [Li Y., 2010; Busbee P.B., 2014]. Подавление HDAC I класса без затрагивания активности HDAC II класса является преимуществом DIM по сравнению с другими известными ингибиторами HDAC [Balasubramanian S., 2009; Kramer O.H., 2003; Vashisht Gopal Y.N., 2006]. Это связано с тем, что экспрессия HDAC II класса связывается с относительно благоприятным прогнозом для пациента.

Поскольку известно, что ингибирующий эффект DIM связан в первую очередь с HDAC класса I, можно ожидать, что данное действие будет способствовать профилактике развития рака простаты. Этот эффект наиболее важен в ситуации, когда происходит активация протоонкогенов, связанная с чрезмерной активностью HDAC, на ранних стадиях канцерогенеза в простате.

Эпигенетическая активность EGCG

Исследование проводили на 40 крысах-самках (по 20 в группе) с индуцированным гиперметилированием генов инъекцией суспензии Ni₃S₂. Опытная группа получала прототип лекарственной формы EGCG в дозе 133 мг/кг, контрольная – плацебо. У экспериментальных животных после 3 месяцев воздействия удаляли матку и выполняли соскобы эндометрия и эпителия шейки матки из нескольких точек, после чего проводили исследование методом метил-чувствительной ПЦР. Применение экспериментального препарата приводило к деметилированию (в объеме ткани в целом) генов RASSF1 и MLH1 после 3 месяцев применения (таблица 2).

Таблица 2. Частота метилирования генов-онкосупрессоров у крыс после терапии

Ген	опыт	контроль	значимость отличий
шейка матки			
RASSF1	6,7%	33,3%	0,035
MLH1	0	13,3%	0,091
эндометрий			
RASSF1	6,7%	26,7%	0,089
MLH1	0	20,0%	0,035

Полученные данные подтверждают ранее известную способность катехинов к снижению метилирования генов *in vitro* [Lee W. J., 2005; Fang M., 2003]. Полученные нами данные продемонстрировали значимость данного механизма действия EGCG и на модели лабораторных животных *in vivo*.

Влияние соединений индольного ряда на гормональные механизмы раннего канцерогенеза

Исследование проведено на модели мышей линии Balb/c-nude с перевитыми клетками линии рака эндометрия (50 животных). Прототип

лекарственной формы DIM вводился животным экспериментальной группы в дозе 133 мг/кг/сут на протяжении 30 дней. Контрольная группа получала плацебо. У животных определялось соотношение метаболитов эстрогенов 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в моче в ходе эксперимента (рисунок 1).

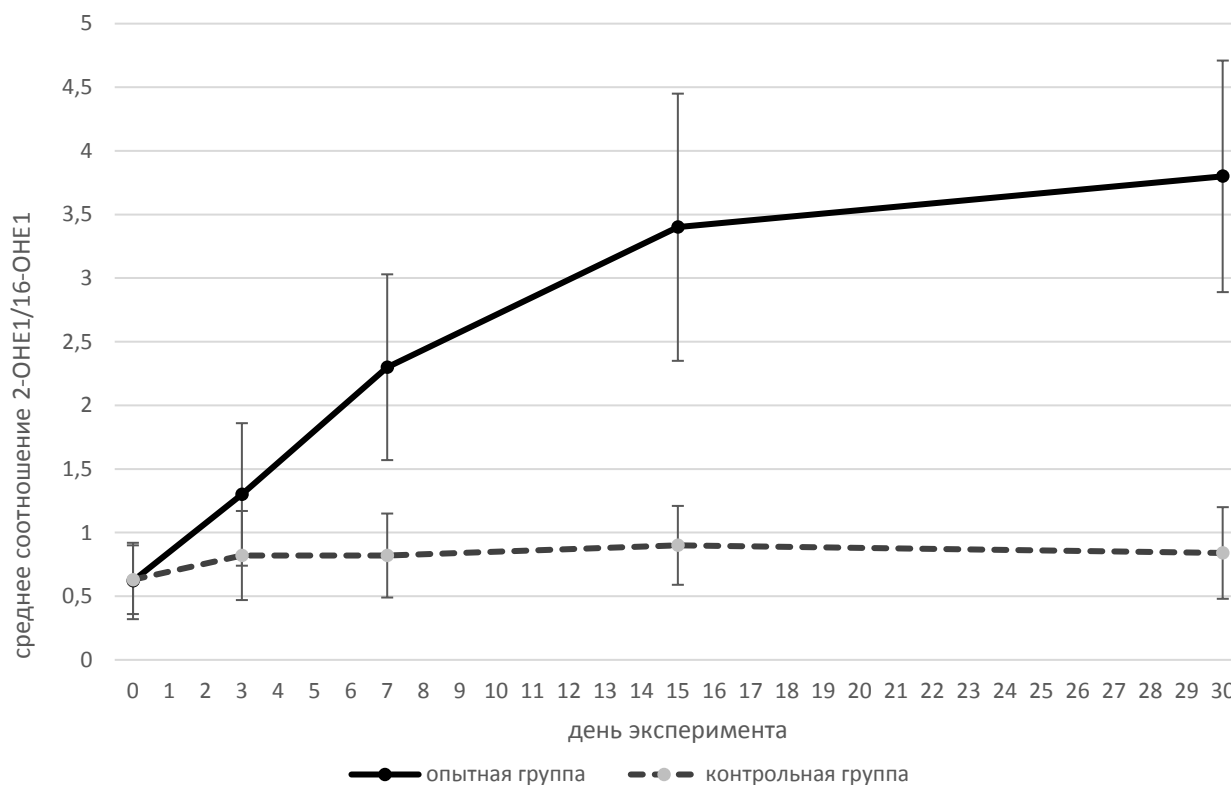


Рисунок 1. Соотношение 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в моче у мышей, получающих DIM.

У мышей в опытной группе наблюдается увеличение соотношения 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1, тогда как в контрольной группе оно не меняется. По окончании эксперимента соотношение 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 в экспериментальной группе выросло до $3,8 \pm 0,91$, тогда как в контрольной оно осталось столь же низким, как и до начала эксперимента – $0,84 \pm 0,36$. Данное изменение в группе мышей, получающих DIM, свидетельствует о благоприятном изменении метаболизма эстрогенов. Полученные нами результаты позволяют доказать в качестве значимого механизма действия DIM в отношении торможения роста ксенографтов опухолей влияние на метаболизм эстрогенов и эстрогеновую

регуляцию пролиферации путем стимуляции преимущественного образования 2-ОНЕ1, обладающего антипролиферативным действием.

Влияние дииндолилметана на туморогенность клеток линий злокачественных опухолей и раннее развитие опухоли

Эксперименты состояли из проверки прямого противоопухолевого действия на ранних стадиях развития злокачественного новообразования и проверки влияния на туморогенность опухолевых клеток линии рака простаты человека. В работе использовались клетки рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) и CRL-1435 (PC-3). В исследовании влияния DIM на ксенографты опухолей через 3 дня после имплантации раковых клеток животных разделяли на 4 экспериментальных группы, по 30 животных в каждой, и начинали лечение исследуемым препаратом (контрольные группы получали плацебо).

Как было установлено, с 31-го по 42-й дни после перевивки опухоли прототип лекарственной формы DIM оказывал подавляющий эффект на развитие рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP); значение торможения роста опухоли составляло 55,5% и 16,9% (таблица 3).

Таблица 3. Влияние прототипа лекарственной формы DIM на размер опухоли рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) в различные дни после перевивки

День исследования	Средний объем опухолей, мм ³		Т/С	Значимость отличий (p<0,05)
	Плацебо	Инфемин	%	
12	0	11		
14	22.7	25.8	113.4%	
17	26.3	24.4	92.8%	
19	26.3	22,9	87.1%	
20	23.4	25.9	110.8%	
22	25.3	21.8	86.0%	
25	26.2	18.7	71.3%	
28	32.7	23.5	71.9%	

31	51.1	28.3	55.5%	*
33	90.9	30.1	33.1%	*
37	180.9	36.3	20.1%	*
39	330.6	55.5	16.8%	*
42	572.3	96.7	16.9%	*

* — значимые отличия от контроля

В эксперименте с линией CRL-1435 (PC-3) также было установлено (таблица 4), что с 33-го по 42-й дни после перевивки DIM проявлял значимый подавляющий эффект на рост ксенографтов рака простаты человека CRL-1435 (PC-3); значение торможения роста опухоли составляло 69,3% и 26,0%.

Таблица 4. Влияние прототипа лекарственной формы DIM на размер опухоли рака простаты человека CRL-1435 (PC-3) в различные дни после перевивки

День исследования	Средний объем опухолей, мм ³		Т/С	Значимость отличий (p<0,05)
	Плацебо	Инфемин	%	
12	9	8	88,9%	
14	23.5	21.2	90,2%	
17	29.6	26.8	90,5%	
19	30.1	29.2	97,0%	
20	32.2	30.4	94,4%	
22	29.9	31.0	103,7%	
25	33.4	29.7	88,9%	
28	36.9	38.3	103,8%	
31	58.8	44.9	76,4%	
33	130.1	90.1	69,3%	*
37	198.5	120.2	60,6%	*
39	446.4	199.3	44,6%	*
42	848.5	220.6	26,0%	*

* — значимые отличия от контроля

Противоопухолевое воздействие препарата отразилось также на продолжительности жизни экспериментальных животных. Средняя

продолжительность жизни животных в контрольной группе с ксенографтами рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) составила 30,4 дня. Применение прототипа лекарственной формы DIM значительно увеличило продолжительность жизни мышей до 67,8 дня, на 123% по сравнению с контрольной группой. Средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы с ксенографтами рака простаты человека CRL-1435 (PC-3) составила 30,1 дня. Применение препарата увеличило продолжительность жизни мышей до 64,8 дня, на 115% по сравнению с контрольной группой.

Для изучения влияния прототипа лекарственной формы DIM на туморогенность клеток опухолей в день имплантации животных разделяли на аналогичные 4 экспериментальных группы, но при этом использовалась в два раза меньшая прививочная доза – $2,5 \times 10^6$ клеток. Частота образования опухолей в опытной и контрольной группах представлена в таблице 5.

Таблица 5. Влияние прототипа лекарственной формы DIM на частоту имплантации опухолей рака простаты человека при перевивке у мышей

Линия клеток	Прививочная доза	Воздействие	К-во мышей с пальпируемой опухолью	Частота перевивки опухолей, %
CRL-1740 (LNCaP)	$2,5 \times 10^6$ клеток	растворитель	18	90,0
	$2,5 \times 10^6$ клеток	DIM, 133 мг/кг	11	55,0*
CRL-1435 (PC-3)	$2,5 \times 10^6$ клеток	растворитель	19	95,0
	$2,5 \times 10^6$ клеток	DIM, 133 мг/кг	13	65,0*

* — значимые отличия от контроля

Полученные результаты указывают на способность препарата снижать туморогенность клеток линий рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) и CRL-1435 (PC-3). Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать следующие основные выводы:

1. DIM обладает способностью снижать туморогенность клеток линий рака простаты человека.
2. DIM *in vivo* подавляет рост ксенографтов рака простаты человека у мышей.
3. Данные эффекты не зависят от наличия либо отсутствия гормончувствительности клеток, что свидетельствует о том, что в подавлении туморогенности не задействованы гормональные механизмы.

Механизмы противоопухолевой активности дииндолилметана *in vitro*

Для экспериментов были использованы клетки линий рака простаты крысы CRL-2376 (MAT-Ly-Lu) и рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) и CRL-1435 (PC-3). Выживаемость опухолевых клеток после 48 часов инкубации с DIM оценивали с помощью МТТ-теста, выражая в процентах от контроля. Графики выживаемости клеток представлены на рисунках 2-4. Экспоненциальный регрессионный анализ позволил определить зависимость выживаемости клеток (в %) от концентрации препарата, которая составила для клеток CRL-1740 (LNCaP), CRL-1435 (PC-3) и CRL-2376 (MAT-Ly-Lu) соответственно:

$$\text{выживаемость} = 115,39e^{-0,025C}$$

$$\text{выживаемость} = 101,5e^{-0,018C}$$

$$\text{выживаемость} = 100,35e^{-0,011C}$$

где С – концентрация препарата.

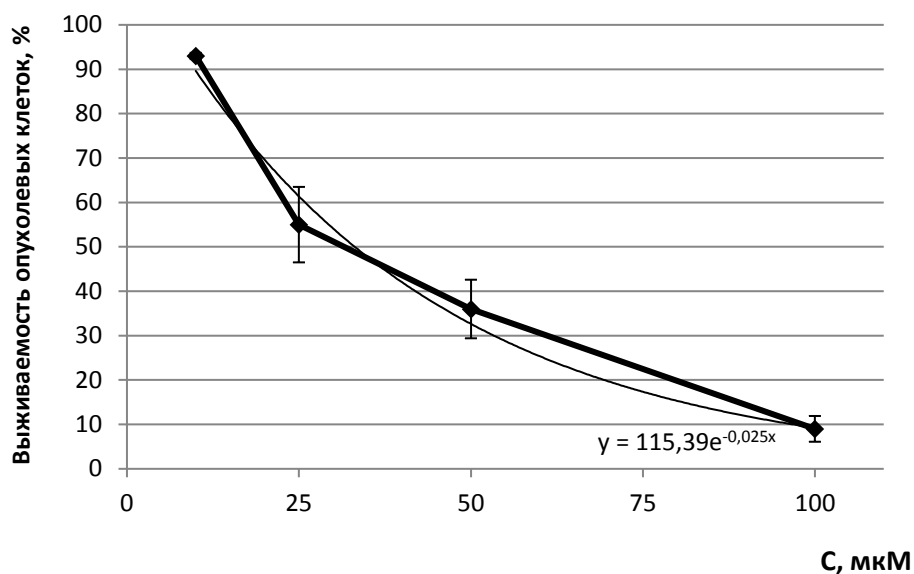


Рисунок 2. Влияние DIM на выживаемость клеток рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP).

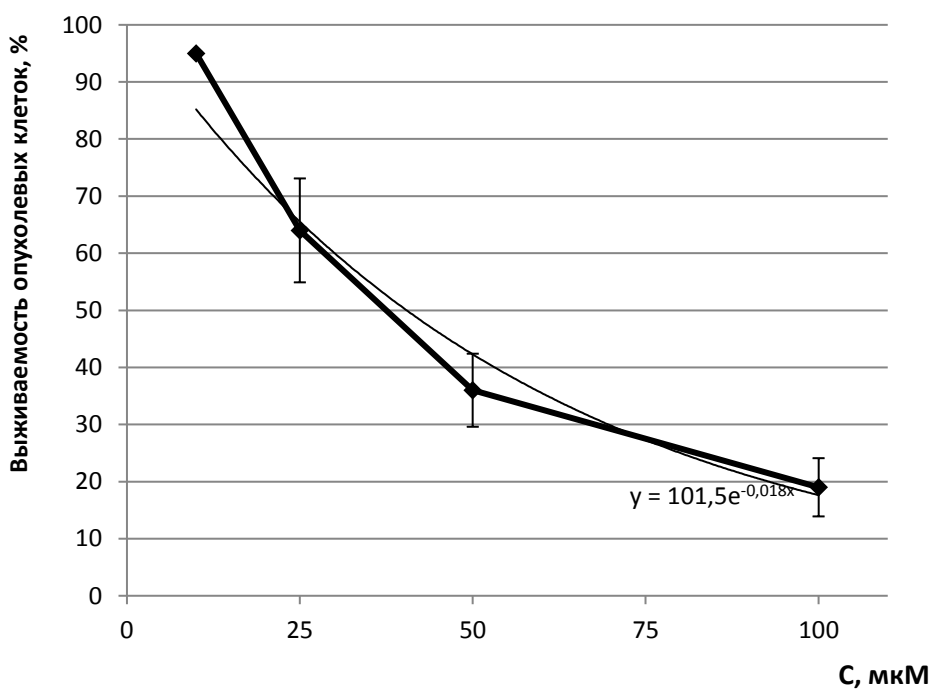


Рисунок 3. Влияние DIM на выживаемость клеток рака простаты человека CRL-1435 (PC-3).

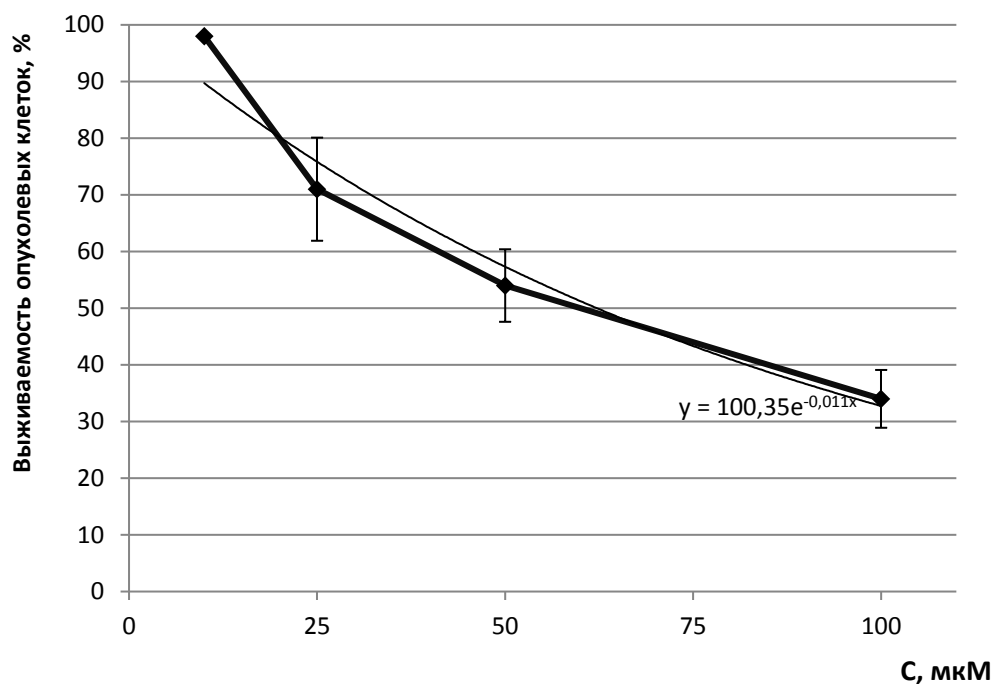


Рисунок 4. Влияние DIM на выживаемость клеток рака простаты крысы CRL-2376 (MAT-Ly-Lu).

Определенная по данным формулам IC50 для опухолевых клеток рака простаты человека CRL-1740 (LNCaP) составила 33,5 мкМ, CRL-1435 (PC-3) – 39,3 мкМ, и для опухолевых клеток рака простаты крысы CRL-2376 (MAT-Ly-Lu) – 63,3 мкМ.

Для исключения влияния цитотоксического воздействия препарата на клеточные линии в аликвотах внеклеточной жидкости определялась степень некроза клеток по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Некроз клеток не наблюдался ни в одном из экспериментов. Поэтому можно сделать предположение о том, что препарат подавляет выживаемость опухолевых клеток путем стимуляции апоптоза.

По данным литературы [Chen D., 2012] известна способность DIM вызывать апоптоз линий клеток рака простаты. Была зарегистрирована гибель путем апоптоза 80-90% клеток при обработке клеток DIM в концентрации 25 мкМ. Также цитостатические эффекты DIM были показаны на эндометриальных клетках человека [Leong H., 2001]. В концентрации до 50 мкМ

DIM проявляет антипролиферативные эффекты путем подавления роста клеток. В концентрации свыше 50 мкМ уже наблюдалась индукция апоптоза. Таким образом, наши данные подтверждают на примере новой фармкомпозиции известные ранее данные о том, что DIM может вызывать апоптоз клеток рака простаты [Nachshon-Kedmi M., 2003].

Таким образом, изучаемые активные субстанции обладают возможностью подавлять ряд механизмов раннего канцерогенеза, что делает их перспективными для последующего создания средств химиопрофилактики. Однако, изученные на животных моделях механизмы, и, соответственно, способы их коррекции, требуют подтверждения их значимости у человека.

Исследование механизмов раннего канцерогенеза и способов их коррекции у человека

Для целей определения роли изучаемых механизмов раннего канцерогенеза в развитии онкологических заболеваний был изучен ряд молекулярных маркеров этого процесса у пациентов (при фоновых и предраковых заболеваниях). При этом критерием значимости вклада конкретного механизма в канцерогенез была реверсия предраковых изменений в ткани при подавлении данного механизма (факторы роста в тканях предстательной железы, метилирование генов-онкосупрессоров в эндометрии и шейке матки, канцерогенные метаболиты эстрогенов при дисплазии молочной железы). Данные органы и ткани – предстательная железа, эндометрий, шейка матки, молочная железа – характеризуются наличием хорошо изученных нозологических форм, отражающих последовательное прогрессирование процессов раннего канцерогенеза. Поэтому гиперпластические и неопластические процессы в них могут служить оптимальной моделью для изучения раннего канцерогенеза у человека.

Роль баланса факторов роста в канцерогенезе в предстательной железе

Для оценки влияния DIM на баланс факторов роста был использован метаболический предшественник DIM – индол-3-карбинол (I3C). По имеющимся данным, при попадании в желудок он практически полностью метаболизируется в кислой среде до дииндолилметана [Reed G.A., 2006]. Под наблюдением находилось 34 пациента с простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН), которые были разделены на 2 группы. Группа 1 (18 пациентов) принимала индол-3-карбинол (400 мг/сут) и EGCG (160 мг/сут), группа 2 (16 пациентов) принимала плацебо. С помощью иммуногистохимического анализа изучалась экспрессия факторов роста – IGF (инсулиноподобного фактора роста), EGF (эпидермального фактора роста), а также регулирующего фактора TGF- β (трансформирующий ростовой фактор-бета). Уровень экспрессии изучаемых ростовых факторов определялся в процентах, и вычислялись его изменения после 12 месяцев терапии (рисунок 5).

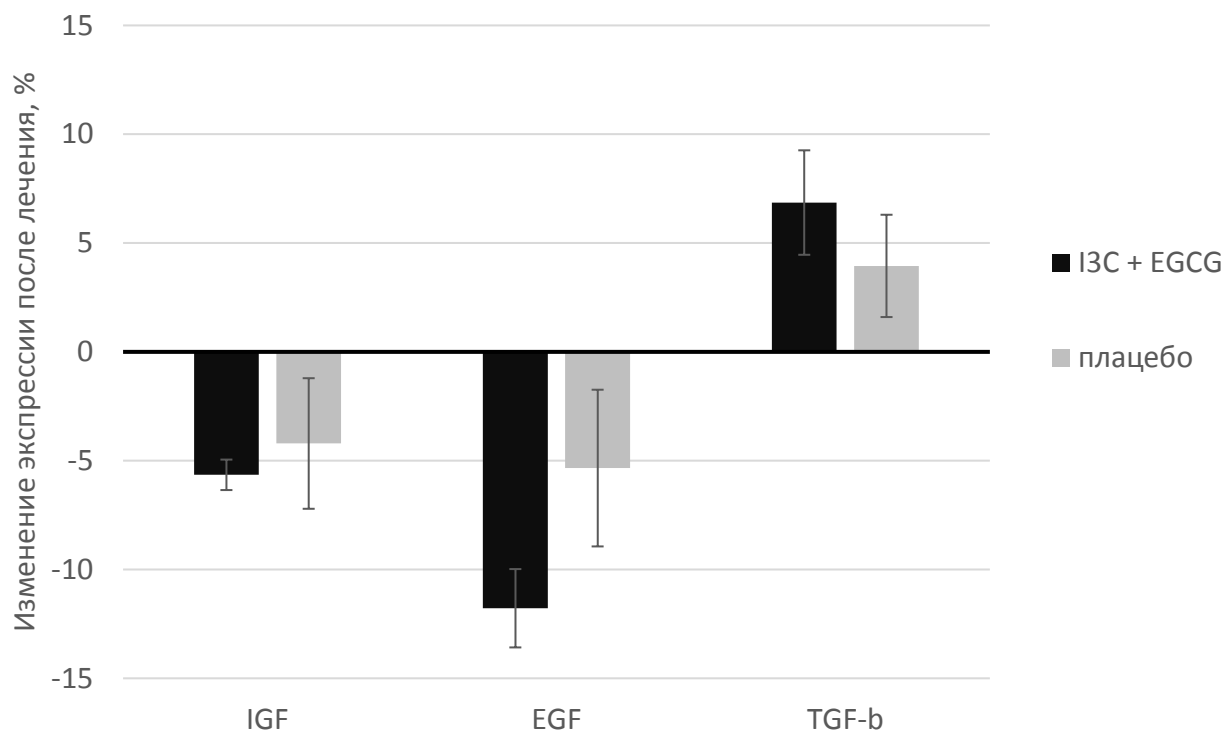


Рисунок 5. Данные изменения экспрессии факторов роста по данным иммуногистохимического анализа после терапии у пациентов с ПИН.

Было выявлено значимое снижение экспрессии IGF на 5,7% ($p=0,004$) и EGF на 11,8% ($p=0,002$), а также повышение уровня экспрессии TGF- β на 6,9% ($p=0,047$) в группе пациентов, принимавших активный препарат. При этом в группе контроля значимых изменений экспрессии не проявлялось. Полученные данные значимых изменений экспрессии ростовых факторов IGF, EGF и TGF- β в ходе терапии IЗС и EGCG свидетельствуют об их влиянии на значимые сигнальные механизмы регуляции клеточной пролиферации. Выявленные изменения, по-видимому, являются существенным механизмом антинеопластического действия IЗС и EGCG у больных с ПИН.

Роль метилирования генов-онкосупрессоров в предраковых процессах в эндометрии и шейке матки

Исследование включало в себя 102 пациентки в репродуктивном возрасте с фоновыми и предраковыми заболеваниями шейки матки (CIN I-II) [Сидорова И.С., 2014]. Данные пациентки входили также в более крупное исследование влияния метилирования генов на риск развития рака шейки матки [Евтина И.П., 2011; Сидорова И.С., 2011]. Все женщины были распределены на 3 группы в зависимости от вида патологии шейки матки (таблица 6).

Таблица 6. Число пациенток в группах

Группа	К-во пациенток
Группа 1 - Доброкачественные процессы	42
Группа 2 - CIN I	33
Группа 3 - CIN II	27

Все пациентки в процессе комплексной терапии, после применения деструктивных методов лечения, принимали EGCG в дозировке 180 мг/сут на протяжении 6 месяцев. Уровень метилирования генов-онкосупрессоров

определялся до начала лечения и через 6 месяцев после окончания терапии EGCG (таблицы 7-9).

Таблица 7. Частота выявления метилирования генов-онкосупрессоров у больных группы 1 (через 1 год после начала терапии).

Ген	До лечения (n=42) [Евтина И.П., 2011]	После лечения (n=42)
MLH1	1 2,4%	-
hIC1	3 7,1%	1 2,4%
RASSF1A	2 4,8%	-
MGMT	1 2,4%	-
N 33	-	-
CDH1	-	-

Значимых отличий в доле пациенток с метилированием генов-онкосупрессоров при сравнении с величиной до лечения в первой группе не выявлено. Данный факт представляется очевидным, учитывая низкий уровень исходного метилирования.

Таблица 8. Частота выявления метилирования генов-онкосупрессоров у больных группы 2 (через 1 год после начала терапии).

Ген	До лечения (n=33) [Евтина И.П., 2011]	После лечения (n=33)
MLH1	3 9,1%	-
hIC1	6 18,2%	1* 3,0%

RASSF1A	11 33,3%	1* 3,0%
MGMT	1 3,0%	-
N 33	-	-
CDH1	-	-

* - различие значимое

Таблица 9. Частота выявления метилирования генов-онкосупрессоров у больных группы 3 (через 1 год после начала терапии).

Ген	До лечения (n=27) [Евтина И.П., 2011]	После лечения (n=27)
MLH1	9 33,3%	2* 6,1%
hIC1	16 59,3%	2* 6,1%
RASSF1A	12 44,4%	2* 6,1%
MGMT	2 6,1%	-
N 33	4 14,8%	_*
CDH1	-	-

* - различие значимое

У пациенток групп 2 и 3 выявлено значимое снижение уровня метилирования генов hIC1, RASSF1A и N33 после проведения лечения. Важно подчеркнуть, что оно имело место спустя 6 месяцев после окончания терапии EGCG, что указывает на стабильный характер достигнутого эффекта.

Данные о значимом снижении частоты метилирования генов-онкосупрессоров после терапии с применением EGCG у пациенток с CIN поддерживают использование данного препарата для подавления

онкологической трансформации у больных с доброкачественными и предраковыми процессами шейки матки. При этом спустя 12 месяцев после начала лечения с применением EGCG ни у одной пациентки не наблюдалось рецидива CIN, что подтверждает высокую значимость деметилирования генов-онкосупрессоров для достижения устойчивого положительного эффекта лечения. С другой стороны, полученные данные обосновывают патогенетическую значимость метилирования генов-онкосупрессоров в патогенезе раннего канцерогенеза в шейке матки.

В исследование влияния EGCG на метилирование генов в эндометрии была включена 21 пациентка с различной степенью неопластических изменений эндометрия, из числа больных, входивших в состав более крупного исследования уровня метилирования генов при различных заболеваниях эндометрия [Власов Р.С., 2011; Сидорова И.С., 2011]. Они были разделены на три группы: группа 1 (с простой гиперплазией эндометрия без атипии, n=9), группа 2 (с комплексной гиперплазией эндометрия без атипии, n=5), и группа 3 (с комплексной гиперплазией эндометрия с атипией, n=7). Все пациентки получали терапию гестагенами или агонистами ГнРГ и дополнительно EGCG в дозировке 180 мг/сут в течение 6 месяцев. Была проведена оценка уровня метилирования генов MLH1, RASSF1, p16, GSTP1, RAR-b и CDX1 до и после лечения (таблицы 10-12).

Таблица 10. Частота метилирования генов-онкосупрессоров у больных 1 группы.

Ген	До лечения (n=43) [Власов Р.С., 2011]		После лечения с применением EGCG (n=9)	
	n	%	n	%
RASSF1	1	2,33	-	-
MLH1	1	2,33	-	-
p16	2	4,65	1	11,1

RAR-b	2	4,65	-	-
GSTP1	1	2,33	-	-
CDX1	1	2,33	-	-

Таблица 11. Частота метилирования генов-онкосупрессоров у больных 2 группы.

Ген	До лечения (n=46) [Власов Р.С., 2011]		После лечения с применением EGCG (n=5)	
	n	%	n	%
RASSF1	3	6,52	-	-
MLH1	4	8,70	-	-
p16	1	2,17	-	-
RAR-b	3	6,52	-	-
GSTP1	7	15,22	1	20,0
CDX1	5	10,87	-	-

Таблица 12. Частота метилирования генов-онкосупрессоров у больных 3 группы.

Ген	До лечения (n=42) [Власов Р.С., 2011]		После лечения с применением EGCG (n=7)	
	n	%	n	%
RASSF1	11	26,19	-	-
MLH1	9	21,43	2	28,6
p16	7	16,67	-	-
RAR-b	8	19,05	-	-
GSTP1	11	26,19	-	-
CDX1	13	30,95	-	-

Полученные результаты оценки частоты метилирования после лечения свидетельствуют о выраженной тенденции к понижению частоты случаев метилирования генов-онкосупрессоров после комбинированной терапии с использованием EGCG (хотя и не достигшей уровня статистической значимости на данном небольшом числе пациентов).

Таким образом, было установлено, что аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста, происходящее уже на ранних стадиях развития процессов канцерогенеза в шейке матки [Евтина И.П., 2011; Сидорова И.С., 2011] и эндометрии [Власов Р.С., 2011; Сидорова И.С., 2011], может быть скорректировано с помощью препарата, содержащего EGCG.

Роль канцерогенных метаболитов эстрогенов при диспластических заболеваниях молочной железы и предстательной железы

Для оценки влияния дииндолилметана на соотношение метаболитов эстрогенов у женщин с доброкачественной дисплазией молочной железы был использован метаболический предшественник DIM – индол-3-карбинол. Было проведено двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование лекарственного препарата на основе индол-3-карбинола. Продолжительность периода лечения составила 6 менструальных циклов. В исследование были включены 44 пациентки с циклической масталгией на фоне доброкачественной дисплазии молочной железы (мастопатии), в возрасте 20-45 лет. Группы наблюдения: группа 1 – прием индол-3-карбинола по 200 мг 2 раза в сутки (22 пациентки); группа 2 – прием плацебо (22 пациентки). Определяли динамику соотношения 2-гидроксиэстрон (2-OHE1) / 16 α -гидроксиэстрон (16 α -OHE1) в моче (рисунок 6).

В группе приема активного препарата установлено увеличение соотношения 2-OHE1 / 16 α -OHE1. Такие же результаты ранее были получены у здоровых женщин [Terry P., 2001; Reed G.A., 2005; Reed G.A., 2006]. Увеличение

соотношения 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 обуславливает сдвиг метаболизма эстрогенов в сторону 2-гидроксиэстрона, практически не стимулирующего пролиферативные процессы в эстроген-чувствительных тканях (в отличие от 16 α -ОНЕ1 – метаболита с высокой пролиферативной активностью [Серов В. Н., 2008]). Происходящий у пациенток сдвиг соотношения метаболитов эстрогенов привел к положительному лечебному эффекту в отношении циклической масталгии и мастопатии. Боль в молочных железах в группе терапии активным препаратом была значимо слабее по сравнению с плацебо (84,4% против 53,3%, $p=0,002$, критерий хи-квадрат). В группе с активным препаратом произошло уменьшение размеров кист у 18% пациенток, стабилизация размеров у 71% пациенток, а рост – у 11% пациенток. В группе, получавшей плацебо, имела место в основном стабилизация размеров кист – у 75% пациенток, при этом рост кист произошел у 25% пациенток; уменьшение размеров кист отмечено не было.

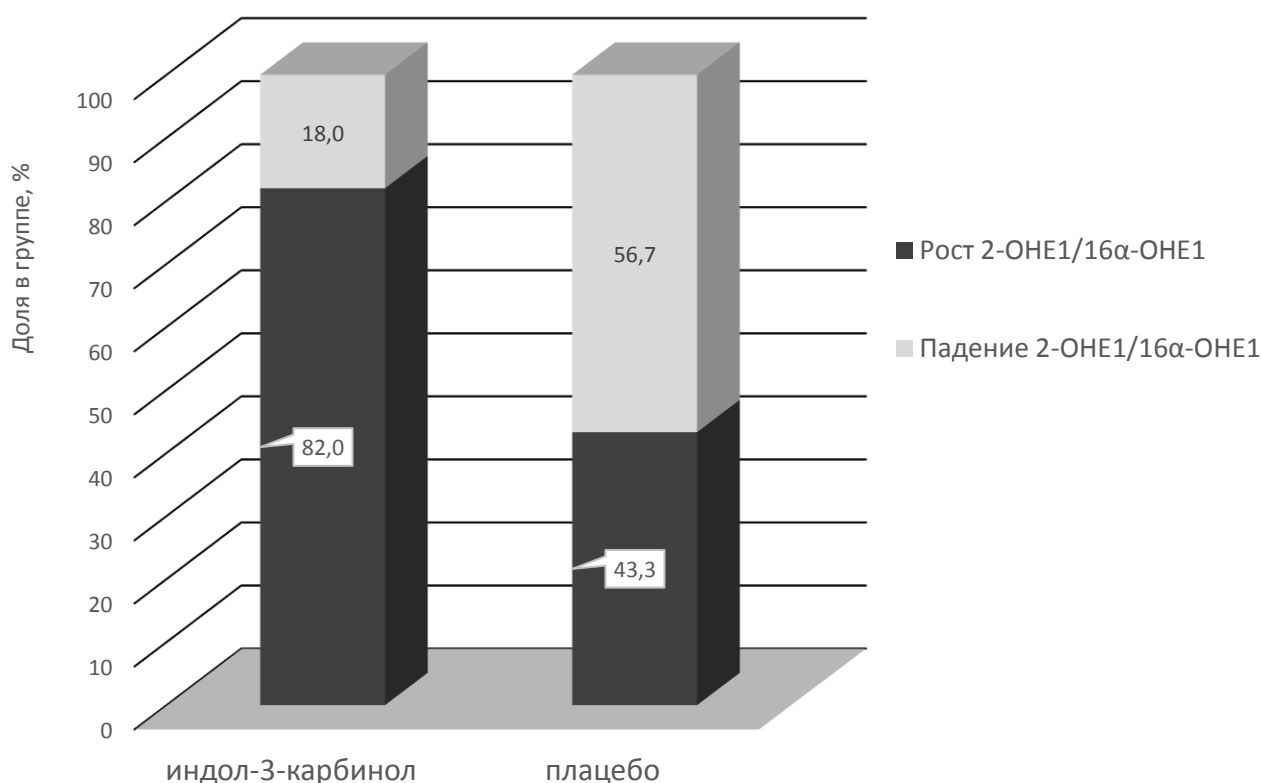


Рисунок 6. Динамика отношения 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 к концу терапии

В литературе описано также влияние индол-3-карбинола на соотношение метаболитов эстрогенов у мужчин с ПИН. Его применение ведет к значимому росту соотношения 2-ОНЕ1 / 16 α -ОНЕ1 также значимо растет [Абоян И.А., 2011]. В контрольной группе пациентов, принимавших финастерид, данного эффекта не было. Дополнительный анализ метаболизма эстрогенов был предпринят в подгруппах пациентов в зависимости от морфологического диагноза после терапии. Было установлено, что в подгруппах с различным исходом лечения соотношение метаболитов эстрогенов различалось: в первой группе соотношение 2ОНЕ1/16 α ОНЕ1 было одинаково у больных как с наличием, так и с отсутствием ПИН к окончанию лечения. Во 2-й группе больных в подгруппе пациентов с сохраняющейся к концу терапии ПИН соотношение 2ОНЕ1/16 α ОНЕ1 было ниже, чем у пациентов в подгруппе с излеченной ПИН. Больные с регрессией ПИН характеризовались более благоприятным соотношением 2ОНЕ1/16 α ОНЕ1. Этот факт подтверждает значимость нормализации баланса эстрогенов в ткани простаты для целей онкопрофилактики.

Итак, роль механизмов гормонального канцерогенеза, метилирования генов-онкосупрессоров и провоспалительных цитокинов в патогенезе гиперпластических заболеваний и раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы человека была подтверждена *in vivo* в ходе клинических исследований. Полученные данные дают возможность сформулировать общую концепцию ключевых факторов малигнизации в репродуктивной системе человека и создают предпосылки для проведения химиопрофилактики.

Обсуждение результатов исследований

Полученные данные об активности изучаемых соединений-кандидатов – DIM и EGCG – позволили определить значимость конкретных механизмов раннего канцерогенеза в развитии онкологических заболеваний органов

репродуктивной системы. Впервые эти данные были получены в процессе терапии предраковых процессов у человека. Значение процессов гормонального канцерогенеза при развитии рака органов женской репродуктивной системы было изучено у животных с перевитым раком эндометрия – типичной эстрогензависимой опухолью. Было установлено, что прототип лекарственной формы DIM изменяет соотношение метаболитов эстрогенов 2ОНЕ1/16αОНЕ1 в сторону увеличения антипролиферативного метаболита 2-ОНЕ1. Данный эффект может проявляться как при проведении экспериментов на животных моделях, так и у человека, что и стало предметом наших последующих клинических исследований.

Были проведены клинические исследования IЗС – метаболического предшественника DIM, обладающего более выраженным влиянием на метаболизм эстрогенов. В исследовании участвовали женщины с повышенным риском развития рака молочной железы (на фоне доброкачественной дисплазии молочной железы). Установлено увеличение соотношения метаболитов эстрогенов 2-ОНЕ1/16α-ОНЕ1 в моче. Увеличение соотношения было обусловлено сдвигом метаболизма в сторону 2-гидроксиэстрогена, практически не стимулирующего пролиферативные процессы (в отличие от 16α-ОНЕ1 [Серов В. Н., 2008]). Учитывая, что прочие известные механизмы действия IЗС и DIM характеризуют их как вещества, обладающие онкопротекторным эффектом, данный результат особенно важен в плане профилактики рака молочной железы у пациенток из групп высокого риска, связанного с фоновыми и предраковыми процессами в молочной железе.

Значимость эпигенетических механизмов была продемонстрирована на лабораторных животных (в эпителии шейки матки и эндометрии крыс). Применение прототипа лекарственной формы EGCG позволило добиться деметилирования (в объеме ткани в целом) двух важных генов-онкосупрессоров – RASSF1 и MLH1, которые были гиперметилированы в процессе экспериментального канцерогенеза. Демонстрация данного эффекта на

животных позволила перейти далее к расширенному изучению роли метилирования генов-онкосупрессоров в процессах канцерогенеза у человека. Прогрессирование процессов канцерогенеза в эндометрии и эпителии шейки матки, проявляющееся углублением степени дисплазии и клеточной атипии, ассоциировано с возрастающим уровнем метилирования генов-онкосупрессоров RASSF1, MLH1, p16, RAR-b, GSTP1 и CDX1 [Сидорова И.С., 2011]. Полученные результаты оценки частоты метилирования у больных с предраковыми процессами шейки матки и эндометрия свидетельствуют о снижении частоты метилирования генов-онкосупрессоров роста в течение 6 месяцев после терапии с использованием прототипа лекарственной формы EGCG [Сидорова И.С., 2014]. Важно подчеркнуть, что реверсия гиперметилирования генов под влиянием катехинов сопровождалась также регрессией неопластического процесса, что указывает на критическую роль гиперметилирования в раннем канцерогенезе в эпителии шейки матки и эндометрия.

Клинические исследования, проведенные на пациентах с ПИН, показали, что применение I3C и EGCG подавляет экспрессию ростовых факторов, подстегивающих пролиферативные процессы в ткани простаты – IGF и EGF. При этом стимулируется экспрессия TGF- β . Роль EGF и IGF в ранних процессах канцерогенеза, как известно, заключается в сдвиге равновесия между пролиферацией и апоптозом в сторону усиления пролиферации, что в целом способствует прогрессии предраковых изменений. Влияние же TGF- β является более сложным и его направление зависит от текущей стадии канцерогенеза: на ранних стадиях (до появления массива ткани злокачественной опухоли) он оказывает тормозящее канцерогенез воздействие, подавляя пролиферацию и стимулируя апоптоз. В дальнейшем при промоции опухолевого роста и появлении ранних эпителиальных опухолей TGF- β начинает стимулировать эпителиально-мезенхимальный переход ткани злокачественной опухоли, а также ее инвазию и метастазирование [Бабышкина Н.Н., 2010]. У пациентов с ПИН массива собственно злокачественной ткани еще нет, и тот факт, что рост

экспрессии TGF ассоциирован с обратным развитием неоплазии, подтверждает его роль в подавлении ранних стадий канцерогенеза в простате. Данные изменения, по-видимому, являются одним из основных механизмов, связанных с терапевтическим воздействием DIM и EGCG у больных с ПИН. По данным медицинской литературы, такие эффекты были обнаружены как у DIM [Bhowmik A., 2013; Kandala P.K., 2012], так и у катехинов [Lin J.K., 2002; Bao S., 2015]. Результаты клинического исследования, показавшие наличие профилактического эффекта катехинов в отношении РПЖ у пациентов с ПИН, были получены впервые в 2006 году [Bettuzzi S., 2006]. По данным наших исследований, терапевтический эффект DIM в отношении ПИН также имеет место [Paltsev M., 2016; Киселев В.И., 2015].

Изменения баланса тканевых факторов роста и цитокинов, таким образом, связаны с ранними стадиями канцерогенеза в предстательной железе. Однако, данное положение было бы корректно распространить также и на ткани органов женской репродуктивной системы, а именно, молочной железы, шейки матки и эндометрия, поскольку данные сдвиги были обнаружены в ряде исследований на ранних стадиях канцерогенеза и в этих органах. В частности, в эпителии шейки матки отмечены усиление экспрессии TNF [Tavares-Murta B.M., 2008], IL-1 β и IL-8 [Iwata T., 2015] и, на более поздних стадиях дисплазии, – усиление экспрессии TGF [Guimarães M.V., 2014]. Гиперплазия эндометрия также ассоциирована с усилением продукции TNF [Zupi E., 2000], EGF [Pungal A., 2010]. Кроме того, было установлено, что по мере прогрессии канцерогенеза в эндометрии его клетки теряют чувствительность к антипролиферативному эффекту TGF [Parekh T.V., 2002], несмотря на его усиливающуюся продукцию [Gold L.I., 1994]. В молочной железе предраковые и фоновые изменения также ассоциированы с гиперэкспрессией EGF [Torrìsi R., 1995; Sieja K., 2003] и IGF [Chen C., 2006], также установлена положительная роль TGF в подавлении ранних стадий канцерогенеза [Бабышкина Н.Н., 2010; Lai L.C., 1996]. Таким образом, для ранних стадий канцерогенеза в органах как мужской, так и женской

репродуктивной системы человека одну из ключевых ролей играет нарастающий дисбаланс между цитокинами и факторами роста, стимулирующими пролиферацию, и подавляющими ее.

Проведенные нами эксперименты с андрогенчувствительными и андрогеннечувствительными линиями клеток подтвердили, с одной стороны, положение о том, что противоопухолевая эффективность DIM обусловлена не только гормональными механизмами действия, а с другой стороны, положение о том, что в процессах канцерогенеза в органах мужской репродуктивной системы имеет значение комплекс факторов, только часть из которых являются гормональными.

Аналогично андрогенам эстрогены вовлечены в процессы пролиферации и канцерогенеза в предстательной железе, но их роль все же существенно отличается от роли андрогенов. Исследования подтверждают, что и андрогены, и эстрогены могут вызывать изменения в простате независимо друг от друга, но их индивидуальное действие не приводит к малигнизации [Risbridger G.P., 2003]. Действие эстрогенов на предстательную железу опосредовано двумя типами эстрогеновых рецепторов ($ER\alpha$ и $ER\beta$) и имеет противоположные эффекты. Аномальная клеточная пролиферация, воспаление и малигнизация связаны с активацией $ER\alpha$, а активация $ER\beta$ приводит к предотвращению гиперплазии и подавлению воспаления и канцерогенеза. Поэтому применение агонистов $ER\beta$ может быть обосновано для лечения ПИН и профилактики РПЖ. Известно, что DIM является специфическим активатором $ER\beta$ -сигнального пути и при этом не стимулирует функцию $ER\alpha$ [Vivar O.I., 2010]. Таким образом, собственная эндокринная активность DIM имеет спектр, благоприятствующий профилактике рака предстательной железы. Однако, как показали эксперименты на клеточных линиях, проведенные нами, этот эффект является далеко не основным. Тем не менее, в случае ранних стадий канцерогенеза в простате влияние DIM на его гормональную составляющую может иметь значение среди прочих, более существенных его механизмов действия.

Как было установлено, эпигенетической активностью обладают и DIM, и катехины, однако, ее спектр существенно различается в каждом случае. В наших экспериментах было показано, что снижение активности HDAC под влиянием DIM имеет место *in vivo* в ткани нормальной предстательной железы крыс. Поскольку известно, что ингибирующий эффект DIM связан, в первую очередь, с HDAC класса I, можно ожидать, что данное действие DIM будет способствовать профилактике развития рака простаты. Этот эффект наиболее важен в ситуации, когда происходит активация протоонкогенов, связанная с чрезмерной активностью HDAC, что важно на ранних стадиях канцерогенеза в простате [Halkidou K., 2004; Abbas A., 2008].

Видимо, ранний канцерогенез в предстательной железе инициируется как гормональными, так и негормональными механизмами, причем роль первых уменьшается по мере промоции канцерогенеза. На это указывают, в частности, и результаты наших экспериментов, продемонстрировавших практически одинаковую активность DIM в подавлении пролиферации и туморогенности *in vivo* клеточных линий РПЖ независимо от их гормональной чувствительности.

Таким образом, проведенные нами исследования показали значение нескольких механизмов раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы человека. Теоретическое осмысление совокупности имеющихся в нашем распоряжении знаний об этапе раннего канцерогенеза позволяет сформулировать гипотезу о том, какие именно нарушения имеют ключевое значение при развитии рака органов репродуктивной системы у человека. К ним относятся:

1. нарушение метаболизма эстрогенов и андрогенов, приводящее к усилению гормональной стимуляции пролиферации соответствующих чувствительных тканей в организме женщины и мужчины;
2. блокада генов-онкосупрессоров и активация протоонкогенов вследствие эпигенетических нарушений (гиперметилирование и

активация HDAC), а также, в случае рака шейки матки – вследствие действия онкобелков ВПЧ, что в целом ведет к подавлению процессов апоптоза и стимуляции пролиферации;

3. нарушения баланса ростовых факторов в соответствующих тканях, со сдвигом в сторону стимулирующих пролиферацию факторов.

Данные три группы нарушений являются, с одной стороны, наиболее ранними патогенетическими событиями процесса канцерогенеза, а с другой стороны – наиболее доказанными его механизмами. Последнее было продемонстрировано проведенными нами клиническими исследованиями, что позволило в итоге сформулировать гипотезу о том, что **патофизиология раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы заключается в комплексе молекулярно-генетических изменений, включающих в себя гормональную гиперстимуляцию, эпигенетическую блокаду генов-онкосупрессоров и активацию протоонкогенов, а также сдвиг баланса ростовых факторов в сторону стимулирующих пролиферацию со снижением активности факторов, подавляющих пролиферацию.** Наличие всех трех компонентов этого комплекса изменений приводит к сдвигу в регуировке пролиферации/апоптоза и дестабилизации генома с развитием впоследствии неоплазии.

Препарат, назначаемый с химиопрофилактической целью, как правило, предполагает очень длительные (иногда даже пожизненные) курсы приема. А это создает определенные требования к самим химиопрофилактическим средствам (минимальная токсичность и т.д.). Многочисленные свидетельства того, что клетки злокачественных опухолей обладают способностью приспосабливаться к воздействиям таргетных химиотерапевтических препаратов [Lovly С.М.,2015; Daga А., 2015; Shi А.-М., 2015], дают основание для поиска таких режимов химиотерапии и химиопрофилактики, которые охватывали бы максимально возможное число не только патогенетических механизмов и мишеней, с которыми взаимодействует препарат в организме человека. С этой точки зрения

изученные нами субстанции представляются весьма перспективными кандидатами на роль мультитаргетных лекарственных средств. Успешное завершение их клинических исследований в будущем позволит внедрить их в практику здравоохранения.

Выводы

1. Разработанные прототипы готовых лекарственных форм на основе субстанций дииндолилметан (DIM) и эпигаллокатехин (EGCG) имеют достаточно низкую токсичность (как общую, так и специфическую), приемлемую для проведения клинических исследований.
2. Соединения индольного ряда (DIM и I3C) обладают способностью *in vivo* подавлять синтез стимулирующих пролиферацию факторов роста, играющих роль в патогенезе гиперпластических и неопластических процессов в органах репродуктивной системы, а также подавлять гормональные факторы канцерогенеза в органах репродуктивной системы.
3. Соединения катехинового ряда (EGCG) обладают способностью *in vivo* деметилировать гены-онкосупрессоры, играющие роль в патогенезе гиперпластических и неопластических процессов в органах репродуктивной системы.
4. Применение у человека метаболитического предшественника DIM (индол-3-карбинола) и EGCG приводит к снижению экспрессии ростовых факторов, стимулирующих пролиферативные процессы в ткани предстательной железы – IGF (инсулиноподобного фактора роста) и EGF (эпидермального фактора роста). При этом происходит стимуляция экспрессии TGF- β (трансформирующего ростового фактора бета). Данные эффекты сопровождаются регрессом неопластических изменений в простате, что указывает на их значимость в процессах раннего канцерогенеза.
5. Гиперметилирование генов-супрессоров опухолевого роста происходит на ранних стадиях канцерогенеза и часто обнаруживается при предраковых состояниях эндометрия и шейки матки.

6. Терапия с применением EGCG приводит к деметилированию генов-онкосупрессоров при предраковых заболеваниях эндометрия и шейки матки, обеспечивая их стабильный регресс, что подтверждает значимость метилирования генов-онкосупрессоров в патогенезе процессов раннего канцерогенеза в этих тканях.
7. Применение у человека метаболитического предшественника DIM (индол-3-карбинола) ведет к нормализации нарушенного оксидативного метаболизма эстрогенов как у женщин, так и у мужчин. Нормализация соотношения 2-гидроксиэстрон / 16 α -гидроксиэстрон коррелирует с регрессией диспластических и неопластических процессов в ткани молочной железы и простаты, что подтверждает значимость гормональных факторов в патогенезе процессов раннего канцерогенеза в этих тканях.
8. Ранний канцерогенез в органах репродуктивной системы заключается в комплексе молекулярно-генетических изменений, включающем в себя гормональную гиперстимуляцию, эпигенетическую блокаду генов-онкосупрессоров и активацию протоонкогенов, а также сдвиг баланса ростовых факторов и цитокинов в сторону стимулирующих пролиферацию со снижением активности факторов, подавляющих пролиферацию.
9. Разработанные с использованием принципа мультитаргетного воздействия на процессы раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы прототипы лекарственных препаратов на основе DIM и EGCG обладают низкой токсичностью и достаточной эффективностью для применения в клинике.

Практические рекомендации

1. Предложенная концепция механизма раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы может быть использована для проведения научных исследований канцерогенеза в других органах и тканях.
2. Разработанные в рамках работы принципы мультитаргетного воздействия на патогенетические механизмы процессов раннего канцерогенеза должны быть положены в основу выбора будущих лекарственных кандидатов для проведения химиопрофилактики.
3. Результаты исследования способов коррекции данных патогенетических механизмов могут быть использованы для обоснования возможности онкохимиопрофилактики и лечения гиперпластических процессов.
4. Отобранные соединения-кандидаты и их лекарственные формы рекомендуется использовать для лечения гиперпластических и неопластических заболеваний органов репродуктивной системы.

Перечень публикаций по теме диссертации

1. Аполихин О.И., Сивков А.В., Кудрявцев Ю.В., Киселев В.И., Ощепков В.Н., Кешишев Н.Г., Костин И.Е., Шкабко О.В., Муйжнек Е.Л., Друх В.М. Применение индол-3-карбинола и эпигаллокатехин-3-галлата при простатической интраэпителиальной неоплазии для профилактики рака предстательной железы. Эффективная фармакотерапия в урологии. – 2009. - № 3. – с. 40-45.
2. Сметник В. П., Гависова А. А., Билак Н.П., Друх В. М. Эффективность Индолкарбинола (Индинола Форто) при циклической мастодинии. Проблемы репродукции. – 2013. - № 5. – С. 49-53.
3. 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 – метод мультитаргетной терапии при циклической мастодинии. Акушерство и гинекология. – 2013. - № 7. – С. 56-62.
4. Друх В.М., Пальцев М.А., Киселев В.И., Кузнецов И.Н. Ашрафян Л.А., Сухих Г.Т., Аполихина И.А., Муйжнек Е.Л. Изучение токсических и аллергизирующих свойств новой фармацевтической композиции дииндолилметана. Молекулярная медицина. - 2013, №6, С. 60-63.
5. Кузнецов И.Н., Ашрафян Л.А., Киселев В.И., Друх В.М., Муйжнек Е.Л., Пчелинцева О.И. Доклиническое исследование влияния новой фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана на репродуктивную функцию и иммунную систему. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2013. – Т. 13. - № 3.
6. Paltsev M., Kiselev V., Muizhnek E., Drukh V., Kuznetsov I., Pchelintseva O. Comparative preclinical pharmacokinetics study of 3,3'-diindolylmethane formulations: is personalized treatment and targeted chemoprevention in the horizon? The EPMA Journal. 2013; 4(1):25.
7. Киселев В.И., Ашрафян Л.А., Друх В.М., Муйжнек Е.Л., Кузнецов И.Н., Пчелинцева О.И., Андрианова Е.А., Барановский П.М. Клиническое исследование по изучению эффективности суппозиторий «Цервикон-ДИМ» при лечении цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой и средней степени. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2014. – Т. 14. -№ 3.
8. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Аполихина И.А., Горбунова Е.А., Пчелинцева О.И. Оценка эффективности медикаментозной терапии цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой и средней степени тяжести суппозиториями Цервикон-ДИМ (промежуточные результаты клинического исследования). Гинекология. - 2014. – Т. 16. - №6. – С. 58-62.
9. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Аполихина И.А., Горбунова Е.А., Пчелинцева О.И. Консервативная терапия CIN I–II

- вагинальными суппозиториями Цервикон-ДИМ. Медицинский совет – 2014. - № 17. – 140-143.
10. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Пчелинцева О.И. Изучение эффективности новой фармацевтической композиции дииндолилметана в отношении подавления ксенографтов опухолей эндометрия. Медицина и образование в Сибири. - 2014 г. - № 5.
 11. Киселев В.И., Друх В.М., Пчелинцева О.И., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Горбунова Е.А. Изучение эффективности новой фармацевтической композиции дииндолилметана в подавлении выживаемости опухолевых клеток *in vitro*. Вестник РУДН. – 2014. – №2. – С. 95-101.
 12. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Пчелинцева О.И. Безопасность и фармакокинетика новой фармацевтической композиции на основе дииндолилметана в виде суппозитория. Современные проблемы науки и образования. 2014. - № 6.
 13. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Горбунова Е.А., Пчелинцева О.И. Изучение репродуктивной токсичности новой фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана. Медицина и образование в Сибири. - 2014 г. - № 2.
 14. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Друх В.М., Муйжнек Е.Л. Влияние новой фармацевтической композиции, содержащей эпигаллокатехин-3-галлат, на метилирование генов-онкосупрессоров у пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией. Вестник РУДН. – 2014. – №3. – С. 82-87.
 15. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н. Капсула для фармакологического состава. Патент РФ № 149067, 07.07.2014. Патент России на полезную модель № 149067. 2014. Бюл. № 35.
 16. Kiselev V.I., Drukh V.M., Pchelintseva O.I., Muzyhnek E.L., Kuznetsov I.N., Paltsev M.A. Preclinical antitumor activity of the diindolylmethane formulation in xenograft mouse model of prostate cancer. *Experimental Oncology*. - 2014. - Т. 36. - № 2. - P. 90-93.
 17. Paltsev M., Kiselev V., Muzyhnek E., Drukh V., Kuznetsov I., Pchelintseva O. Safety and tolerability of DIM-based therapy designed as personalized approach to reverse prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *The EPMA Journal*. 2014; 5(1): 18.
 18. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н. Способ лечения плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки. Патент РФ № 2552332, 07.07.2014. Патент России на изобретение № 2552332. 2015. Бюл. № 16.
 19. Киселев В.И., Друх В.М., Муйжнек Е.Л., Кузнецов И.Н., Андрианова Е.А., Барановский П.М. Эффективность применения препарата Инфемин у пациентов с PIN низкой степени с сопутствующей доброкачественной гиперплазией предстательной железы. *Экспериментальная и клиническая урология*, 2015, №3, с. 55-60.
 20. Друх В. М., Пальцев М. А., Кузнецов И. Н., Андрианова Е. А., Барановский П. М. Результаты исследования безопасности и переносимости новой

- формуляции дииндолилметана у пациенток с гиперплазией эндометрия без атипии. Медицина и образование в Сибири. - 2015 г. - № 5.
21. Ашрафян Л.А., Сухих Г.Т., Киселев В.И., Аполихина И.А., Пальцев М.А., Друх В.М., Муйжнек Е.Л., Кузнецов И.Н. Эффективность и безопасность дииндолилметана (суппозитории вагинальные) в лечении цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Молекулярная медицина, - 2015, №6, С. 20-25.
 22. Киселев В.И., Ашрафян Л.А., Друх В.М., Муйжнек Е.Л., Кузнецов И.Н., Андрианова Е.А., Барановский П.М. Безопасность фармацевтической композиции на основе дииндолилметана в виде суппозитория у пациенток с CIN 1-2 (II фаза). Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2015. – Т. 15. - № 2.
 23. Друх В.М., Кузнецов И.Н., Андрианова Е.А., Барановский П.М. Исследование безопасности применения препарата Цервикон-ДИМ у пациенток с диагнозом CIN 1-2. Современные проблемы науки и образования. - 2015. - №6.
 24. Друх В.М., Кузнецов И.Н., Андрианова Е.А., Барановский П.М. Оценка переносимости и безопасности новой формуляции дииндолилметана у пациенток с гиперплазией эндометрия. Современные проблемы науки и образования. - 2015. - №5.
 25. Киселев В.И., Пальцев М.А., Друх В.М., Муйжнек Е.Л., Кузнецов И.Н., Андрианова Е.А., Барановский П.М. Промежуточные результаты исследования безопасности и переносимости фармацевтической композиции на основе дииндолилметана у пациенток с гиперплазией эндометрия без атипии. ЭНИ Забайкальский медицинский вестник. - 2015, №4, с. 50-56.
 26. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Андрианова Е.А., Андреева Ю.Ю., Аллина Д.О., Лоран О.Б., Франк Г.А. Морфологические изменения в ткани предстательной железы у пациентов с простатической интраэпителиальной неоплазией в процессе химиопрофилактики с помощью новой фармацевтической композиции дииндолилметана. Экспериментальная и клиническая урология. - 2015, №4, с. 54-58.
 27. Ашрафян Л.А., Сухих Г.Т., Киселев В.И., Пальцев М.А., Аполихина И.А., Друх В.М., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Андрианова Е.А. Исследование эффективности препарата Цервикон-ДИМ у пациенток с диагнозом CIN1-2 степени. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2015. – Т. 15. - № 4.
 28. Киселев В.И., Друх В.М., Кузнецов И.Н. Способ лечения простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН). Патент России на изобретение № 2564438. 2015. Бюл. № 27.
 29. Друх В.М., Кузнецов И.Н., Киселев В.И., Муйжнек Е.Л., Пчелинцева О.И. Исследование влияния новой фармацевтической композиции 3,3-дииндолилметана на соотношение метаболитов 2-ОНЕ1/16 α -ОНЕ1 у мышей с раком эндометрия. В сборнике: Наука 21 века: новый подход

- Материалы 13 молодежной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных. Научно-издательский центр «Открытие». - 2015. - С. 103-106.
30. Друх В.М., Кузнецов И.Н., Пчелинцева О.И. Исследование противоопухолевой активности фармацевтической формуляции на основе 3,3-дииндолилметана в отношении ксенографтов рака эндометрия. В сборнике: Клиническая и профилактическая медицина: опыт и новые открытия. Сборник материалов международной научной конференции [Электронный ресурс]. - 2015. - С. 68-71.
31. Ашрафян Л.А., Киселев В.И., Кузнецов И.Н., Муйжнек Е.Л., Друх В.М. Ранний канцерогенез, как хроническое и системное заболевание. В сборнике: Юбилейный Всероссийский Конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь – в эпицентре женского здоровья». Сборник тезисов. М., 2014. - С 161.
32. Пчелинцева О. И., Киселев В. И., Друх В. М., Кузнецов И. Н., Муйжнек Е. Л. Влияние новой формуляции дииндолилметана на иммунную систему животных. В сборнике: Материалы 81-ой Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (81-ой итоговой научно-практической конференции НОМУС им. И.И. Мечникова ИГМУ). Иркутск; 2014. - С. 282.
33. Andrianova E., Paltsev M., Kiselev V., Drukh V., Muizhnek E., Kuznetsov I. Study to Assess Safety and Tolerability of the Pharmaceutical Composition Based on Diindolylmethane in Patients with Endometrial Hyperplasia without Atypia. *Biology and Medicine*. 2015, 7:4.
34. Ashrafian L., Sukhikh G., Kiselev V., Paltsev M., Drukh V., Kuznetsov I., Muizhnek E., Apolikhina I., Andrianova E. Double-blind randomized placebo-controlled multicenter clinical trial (phase IIa) on diindolylmethane's efficacy and safety in the treatment of CIN: implications for cervical cancer prevention. *The EPMA Journal* 2015, 6:25.
35. Paltsev M, Kiselev V, Drukh V, Muizhnek E, Kuznetsov I, Andrianova E, Baranovskiy P. First results of the double-blind randomized placebo-controlled multicenter clinical trial of DIM-based therapy designed as personalized approach to reverse prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *The EPMA Journal* 2016, 7:5.
36. Киселев В.И., Кузнецов И.Н., Друх В.М., Муйжнек Е.Л. Лекарственная регуляция активности генов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. Т. 19. № 9. С. 28-35.

РЕЗЮМЕ

Цель работы - определение новых молекулярных маркеров и ключевых механизмов раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы человека и способов их коррекции. Были отобраны природные соединения, обладающие наибольшим потенциалом для создания лекарственных средств, направленных на подавление гормонального канцерогенеза, метилирования генов-онкосупрессоров и дисбаланса ростовых факторов. При проведении токсикологических исследований созданных на их основе прототипов лекарственных форм дииндолилметана (DIM) и эпигаллокатехин 3-галлата (EGCG) установлено, что они обладают низкой общей и специфической токсичностью.

Показано, что прототип лекарственной формы DIM в дозе 133 мг/кг через 1 месяц воздействия у крыс снижает активность HDAC на 28%. Применение прототипа лекарственной формы EGCG в дозе 133 мг/кг приводило к деметилированию генов RASSF1 и MLH1 после 3 месяцев введения. Прототип лекарственной формы DIM в дозе 133 мг/кг/сут в пересчете на DIM через 1 месяц воздействия у крыс с перевитыми клетками линии рака эндометрия увеличивает соотношение 2-гидроксиэстрон (2-OHE1) / 16 α -гидроксиэстрон (16 α -OHE1) в экспериментальной группе до $3,8 \pm 0,91$, тогда как в контрольной оно остается на уровне $0,84 \pm 0,36$. У мышей прототип лекарственной формы DIM оказывал противоопухолевый эффект на ксенографты рака простаты человека CRL-1740 и CRL-1435; значение торможения роста опухоли в опытной группе по сравнению с контрольной группой составляло до 55,5% и 69,3% соответственно. Показано, что он также подавляет туморогенность клеток линий CRL-1740 и CRL-1435 на 30-35%.

Для оценки влияния препаратов на баланс факторов роста в ткани простаты у человека был использован метаболический предшественник DIM – индол-3-карбинол (I3C). Под наблюдением находилось 34 пациента с простатической интраэпителиальной неоплазией, экспериментальная группа принимала индол-3-карбинол (400 мг/сут) и EGCG (160 мг/сут), контрольная - плацебо. После 12 месяцев терапии выявлено снижение экспрессии IGF на 5,7% ($p=0,004$) и EGF на 11,8% ($p=0,002$), а также повышение уровня экспрессии TGF- β на 6,9% ($p=0,047$). При этом в группе контроля значимых изменений не было.

Клиническое исследование роли метилирования генов-онкосупрессоров в предраковых процессах в шейке матки включало 102 пациентки с фоновыми заболеваниями шейки матки и CIN I-II, принимавших EGCG в дозе 180 мг/сут 6 месяцев. Уровень метилирования определялся до лечения и через 6 месяцев после окончания терапии. Выявлено значимое снижение уровня метилирования генов NIC1, RASSF1A и N33. В исследование влияния EGCG на метилирование генов в эндометрии была включена 21 пациентка с различной степенью неопластических изменений эндометрия; все они получали терапию гестагенами или агонистами ГнРГ и дополнительно EGCG в дозировке 180 мг/сут в течение 6 месяцев. Установлена выраженная тенденция к понижению частоты случаев метилирования генов-онкосупрессоров после комбинированной терапии с использованием EGCG.

Было проведено плацебо-контролируемое исследование препарата индол-3-карбинола (44 пациентки с циклической масталгией на фоне доброкачественной дисплазии молочной железы) в дозе 200 мг 2 раза в сутки. Соотношение 2-OHE1 / 16 α -OHE1 в моче в группе приема активного препарата выросло у 82% пациентов, а в контрольной только у 43%, что коррелировало с клиническим улучшением.

Сформулирована гипотеза о том, что патофизиология раннего канцерогенеза в органах репродуктивной системы заключается в комплексе молекулярно-генетических изменений, включающих в себя гормональную гиперстимуляцию, эпигенетическую блокаду генов-онкосупрессоров и активацию протоонкогенов, а также сдвиг баланса ростовых факторов и цитокинов в сторону стимулирующих пролиферацию со снижением активности факторов, подавляющих пролиферацию.

ABSTRACT

The aim of the work is to identify new molecular markers and key mechanisms of early carcinogenesis in the organs of the human reproductive system and the ways of their correction. Natural compounds with the greatest potential for the creation of drugs aimed at suppressing hormonal carcinogenesis, methylation of oncosuppressor genes and imbalance of growth factors were selected. Toxicological studies of pharmaceutical prototypes based on diindolymethane (DIM) and epigallocatechin 3-gallate (EGCG) revealed their low total and specific toxicity.

It was shown that DIM pharmaceutical prototype at a dose of 133 mg / kg after 1 month of exposure in rats reduced the activity of HDAC by 28%. The use of EGCG pharmaceutical prototype at a dose of 133 mg/kg resulted in the demethylation of the RASSF1 and MLH1 genes after 3 months of administration. DIM pharmaceutical prototype at a dose of 133 mg/kg/day after 1 month of exposure in rats with endometrial cancer xenografts, increased the ratio of 2-hydroxyestrone (2-OHE1) / 16 α -hydroxyestrone (16 α -OHE1) in the experimental group to 3.8 \pm 0.91, while in the control it remains at the level of 0.84 \pm 0.36. The DIM prototype had an antitumor effect on human prostate cancer xenografts CRL-1740 and CRL-1435. The value of inhibition of tumor growth in the experimental group as compared with the control group was up to 55.5% and 69.3%, respectively. It was shown that it also suppresses the tumorigenicity of the CRL-1740 and CRL-1435 cell lines by 30-35%.

To assess the effect of drugs on the balance of growth factors in prostate tissue, a metabolic precursor of DIM indole-3-carbinol (I3C) was used in humans. 34 patients with prostatic intraepithelial neoplasia were enrolled, the experimental group was administered with indole-3-carbinol (400 mg/day) and EGCG (160 mg/day), control group - placebo. After 12 months of therapy, a decrease in the expression of IGF by 5.7% (p=0.004) and EGF by 11.8% (p=0.002) and an increase in the expression level of TGF- β by 6.9% (p=0.047) was determined. At the same time, there were no significant changes in the control group.

A clinical study of the role of methylation of oncosuppressor genes in precancerous processes in the cervix uteri included 102 patients with background diseases of the cervix and CIN I-II who received EGCG at a dose of 180 mg/day for 6 months. The level of methylation was determined before the treatment and 6 months after the end of therapy. A significant decrease in the methylation level of the HIC1, RASSF1A and N33 genes was revealed. In the study of the EGCG effect on the methylation of genes in the endometrium, 21 patients with various degrees of neoplastic changes in the endometrium were included. All of them received therapy with gestagens or GnRH agonists and additionally EGCG at a dose of 180 mg/day for 6 months. A pronounced tendency to decrease the incidence of methylation of oncosuppressor genes after combined therapy with EGCG was revealed.

A placebo-controlled study of an indole-3-carbinol drug (44 patients with cyclic mastalgia and benign mammary dysplasia) was performed at a dose of 200 mg twice a day. The ratio of 2-OHE1 / 16 α -OHE1 in the urine in the active drug group increased in 82% of patients, and in the control group only in 43%, which correlated with clinical improvement.

A hypothesis has been formulated that the pathophysiology of early carcinogenesis in the reproductive system consists of a complex of molecular and genetic changes that include hormonal hyperstimulation, epigenetic blockade of oncosuppressor genes and activation of proto-oncogenes, and a shift in the balance of growth factors and cytokines to stimulate proliferation with a decrease activity of factors that inhibit proliferation.

ООО «Хорошая типография»

Подписано в печать 01.06.17, тираж 150 экз.

г. Москва, ул. Валовая, д. 14, стр. 8

Тел.: 8(495) 940-70-17

e-mail: 2202758@mail.ru

www.avantaira.com

