

В.И. КИСЕЛЕВ¹, д.б.н., чл.-корр. РАН, В.М. ДРУХ¹, к.м.н., И.Н. КУЗНЕЦОВ², к.б.н.,
Е.Л. МУЙЖНЕК³, к.б.н., И.А. АПОЛИХИНА⁴, д.м.н., профессор, Е.А. ГОРБУНОВА⁴, О.И. ПЧЕЛИНЦЕВА¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

³ ЗАО «МираксБиоФарма», Московская обл.

⁴ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Москва

КОНСЕРВАТИВНАЯ ТЕРАПИЯ CIN I–II ВАГИНАЛЬНЫМИ СУППОЗИТОРИЯМИ ЦЕРВИКОН-ДИМ (ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ)

CIN наиболее распространена у женщин репродуктивного возраста. Существующие стандарты лечения CIN I и/или CIN II инвазивны и агрессивны, что порой приводит к нарушению репродуктивной функции.

В то же время длительное динамическое наблюдение и тактика невмешательства могут повлечь за собой дальнейшее прогрессирование процесса. Поэтому поиск консервативного метода лечения CIN I–II остается актуальным. Проведенное нами многоцентровое рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое исследование в параллельных группах показало, что применение вагинальных суппозиториями Цервикон-ДИМ в течение 90 дней в дозе как 200 мг/сут, так и 100 мг/сут сопровождается улучшением гистологической картины течения CIN I–II и даже ее излеченностью.

Ключевые слова: цервикальная интраэпителиальная неоплазия, CIN I, CIN II, ВПЧ, дииндолилметан, ДИМ, Цервикон-ДИМ, клиническое исследование

Для цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) характерна интенсивная пролиферация атипических клеток с нарушением нормального расположения слоев эпителия шейки матки. Эти изменения предшествуют развитию рака шейки матки (РШМ), поэтому цель лечения CIN – предупредить озлокачествление. Персистирующая инфекция онкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ) может привести к развитию CIN, а в 15–20% – к РШМ [1]. Но продуктивная репликация ВПЧ возможна лишь в клетках, находящихся в стадии необратимой дифференцировки, иначе инфекция приобретает abortивный характер. Поэтому в процессе формирования CIN ВПЧ поражает стволовые клетки не под многослойным плоским эпителием, а в переходной зоне, под цилиндрическим эпителием зоны трансформации (ЗТ) и эндоцервикальных крипт. Репликация ДНК ВПЧ начинается с образования онкопротейнов Е6 и Е7, приводящих к трансформации вирус-инфицированных клеток [2]. Онкобелок Е7 выявляется во всех клетках, инфицированных ВПЧ и начавших неопластическую трансформацию вплоть до развития РШМ [3]. Вышеизложенное определяет необходимость терапии CIN и вирусных цервицитов, нацеленной на снижение персистенции ВПЧ как предикции РШМ [4].

Изменения на шейке матки, вызванные ВПЧ, локализуются в эстроген-чувствительных зонах. Постоянство пролиферативной активности клеток в эстроген-чувствительных тка-

нях контролируется механизмами, конвертирующими эстрадиол в его биологически активные производные: 16 α -гидроксистерон (16 α -ОНЕ1) и 2-гидроксистерон (2-ОНЕ1). 16 α -ОНЕ1 является «агрессивным» гормоном с канцерогенным эффектом [5]. 2-ОНЕ1, напротив, нормализует клеточный рост: при повышении его концентрации наблюдается гибель опухолевых клеток и профилактика их образования [6, 7]. В здоровых эпителиальных клетках шейки матки эстрадиол не превращается в 16 α -ОНЕ1. Там же, где активно экспрессируют белки ВПЧ, выявлен высокий уровень 16 α -ОНЕ1 – почти как в клетках рака молочной железы. Таким образом, активная репродукция ВПЧ катализирует синтез «агрессивного» метаболита в инфицированных клетках [8]. При этом онкобелок Е7 и 16 α -ОНЕ1 взаимно усиливают продукцию друг друга, образуя порочный патогенетический круг, что приводит к опухолевой трансформации [8].

3,3'-дииндолилметан (ДИМ) – продукт физиологической конверсии индол-3-карбинола (ИЗК) с широким спектром противоопухолевой активности, что подтверждено в экспериментах на животных моделях и в клинических исследованиях [9]. В опухолевых клетках ДИМ блокирует синтез онкобелка Е7, препятствует конверсии эстрадиола в 16 α -ОНЕ1, индуцирует процессы избирательного апоптоза вирус-инфицированных клеток [10–13], также ДИМ препятствует миграционной, инвазивной и ангиогенной активности опухолевых стволовых клеток [14, 15], которые, согласно современным представлениям, выступают главной причиной рецидивов и метастазов [16].

В настоящее время существуют фармацевтические композиции на основе ДИМ для перорального применения: формуляция BioResponse-DIM (BR-DIM) на основе TPGS [17]; компо-

зияция в виде раствора из 150 мг ДИМ и вспомогательных компонентов органического происхождения [18]; формуляция на основе пльороника. Учитывая особенности размножения и персистенции ВПЧ в эпителии шейки матки, на основе ДИМ разработана композиция для вагинального применения (Цервикон-ДИМ), у которой за счет местного использования достигаются более высокие концентрации ДИМ в пораженной ткани, чем у пероральных лекарственных форм [19].

Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования стала оценка эффективности 90-дневного курса консервативного лечения CIN I и/или CIN II у женщин репродуктивного возраста вагинальными суппозиториями Цервикон-ДИМ, содержащими 100 мг ДИМ в 1 суппозитории, в зависимости от суточной дозы ДИМ и при сравнении с группой плацебо.

Материал и методы исследования. В исследовании участвовало 78 пациенток репродуктивного возраста в соответствии со всеми нижеперечисленными критериями включения:

- женщины от 18 до 39 лет с диагнозом CIN I и/или CIN II, верифицированным гистологически;
- кольпоскопическая картина поражений шейки матки на фоне ЗТ I типа с площадью участков патологического эпителия не менее 1,5 см²;
- информированное согласие пациентки на участие в исследовании и возможность прекратить лечение в случае побочных проявлений или других причин при устном отказе больной;
- согласие использовать барьерный метод контрацепции (презерватив) в течение всего срока исследования.

Критериями не включения служил один из нижеперечисленных признаков:

- беременность или кормление грудью;
- CIN III или cancer *in situ* (CIS);
- злокачественные новообразования любой локализации;
- инфекции мочеполовой системы в фазе активного воспаления;
- заболевания сердечно-сосудистой и нервной системы, сопутствующая почечная или печеночная недостаточность;
- положительные тесты RW или ВИЧ;
- злоупотребление алкоголем, наркотическая или лекарственная зависимость;
- прием любого экспериментального препарата за 30 дней до применения первой дозы исследуемого препарата.

Данное клиническое исследование было многоцентровым рандомизированным плацебо-контролируемым двойным слепым и проводилось в параллельных группах. За 45 дней до его начала выполнялся скрининг, включающий сбор анамнеза, физикальный осмотр, клинический и биохимический анализы крови и мочи, ЭКГ, УЗИ органов малого таза, цитологическое исследование, расширенную кольпоскопию (РКС) с фотофиксацией изображения и биопсию шейки матки. После рандомизации женщин разделили на три группы. 1-я группа (n = 26) получала интравагинально ДИМ по 200 мг/сут, 2-я группа (n = 26) – ДИМ по 100 мг/сут и плацебо, 3-я группа получала 2 раза в сутки только плацебо. Лечение продолжалось 90 дней. Применялись вагинальные суппозитории Цервикон-ДИМ (ЗАО «ИльмикГрупп», Россия), в состав каж-

дого входило активное вещество (химическая субстанция ДИМ 100 мг) и вспомогательные вещества (жир твердый 1,9795 г, кросповидон 0,02 г, краситель кармин красный 0,0005 г). Каждый суппозиторий с плацебо содержал жир твердый 2,0795 г, кросповидон 0,02 г, краситель кармин красный 0,0005 г [19]. Предусматривалось 3 визита: в начале исследования, через 30 и 90 дней от старта исследования, в течение которых проводили обследование: клинические анализы крови и мочи, цитологическое исследование, РКС с фотофиксацией изображения, биопсию выявленных при РКС пораженных участков с гистологическим исследованием. Качественный общий и качественный с типированием ВПЧ-тесты на вирусы 16-го и 18-го типов выполнялись в начале исследования и через 90 дней. Эффективность лечения оценивали по динамике эрадикации ВПЧ (ДНК) и данным РКС и морфологического исследования биоптатов шейки матки.

Забор ткани для гистологической оценки выполнялся под контролем кольпоскопа с помощью конхотомных биопсийных щипцов для исключения коагуляции краев биоптата и лишь при выявлении патологической ЗТ, атипичных сосудов, йоднегативного и ацетобелого эпителия с мозаикой и/или пунктацией. Морфологическое исследование как инвазивный метод было итоговым диагностическим этапом и выполнялось сначала в локальной лаборатории исследовательского центра, затем – в центральной лаборатории на базе ГБОУ ВПО «РМАПО». Эффективность терапии оценивали по доле пациенток с полной регрессией CIN через 90 дней лечения на основании данных гистологического исследования как золотого стандарта в диагностике CIN. Сохранение фокусов CIN в биоптатах считалось отрицательным ответом на лечение. О частичной регрессии CIN сообщалось в случае, если CIN II перешла в CIN I. Окончательный анализ данных будет сделан по окончании 6 мес. терапии.

■ Репликация ДНК ВПЧ начинается с образования онкопротеинов E6 и E7, приводящих к трансформации вирусинфицированных клеток. Онкобелок E7 выявляется во всех клетках, инфицированных ВПЧ и начавших неопластическую трансформацию вплоть до развития РШМ

Исследование было одобрено комитетом по этике при Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития и локальными этическими комитетами исследовательских центров.

Статистическая обработка данных выполнена на компьютере с помощью пакета прикладных программ IBM® SPSS® Statistics версии 20.0.0 (IBM® Corporation). Для определения статистической значимости различий между группами использовались критерий хи-квадрат (с²) и точный критерий Фишера. Уровень значимости принимался не более 0,05 (двусторонний критерий). Оценка 95%-ных доверительных интервалов (ДИ) для показателя с бинарным типом шкалы выполнена по Клопперу – Пирсону.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включили женщин в возрасте от 19 до 39 лет, средний возраст пациенток в 1-й группе составил 26 лет, во 2-й и 3-й – 27 лет. Следовательно, у молодых женщин CIN I-II встречалась чаще всего, что подтверждает результаты отечественных и международных исследований. Группы исследования не различались между собой по основным демографическим показателям: росту, массе тела, индексу массы тела, что позволило объединить их для анализа согласно цели исследования, считая выборку исследования гомогенной.

В соответствии с протоколом лечения исследование завершила 61 пациентка. Из них качественный общий ВПЧ-тест и качественный ВПЧ-тест на 16-й и 18-й типы вирусов были положительными у 49 пациенток (80,33%). Эрадикация ВПЧ через 90 дней лечения, согласно данным общего ВПЧ-теста, произошла в 70,59% в 1-й группе, в 58,82% во 2-й группе и в 46,67% в группе плацебо (95% ДИ). Значимых различий между числом пациентов с положительным ответом на лечение не выявлено между 1-й и 3-й группами: $p = 0,155$ (точный критерий Фишера); $p = 0,169$ (критерий χ^2 -квадрат) и между 2-й и 3-й группами: $p = 0,370$ (точный критерий Фишера); $p = 0,492$ (критерий χ^2 -квадрат).

При контрольном осмотре через 90 дней лечения нормальная кольпоскопическая картина выявлена в 45,83% в 1-й группе, в 36% во 2-й и в 34,78% в группе плацебо (95% ДИ). Несмотря на очевидную благоприятную картину при РКС в 1-й группе, значимых различий между числом пациентов с положительным ответом на лечение между группами не выявлено.

■ Неинвазивный метод является новым и перспективным в консервативном лечении CIN у женщин репродуктивного возраста, демонстрируя бережный и щадящий подход, т. к. исключает коагуляционные повреждения шейки матки, и патогенетическое обоснование, учитывая механизм влияния ДИМ на трансформацию клеток, пораженных ВПЧ, и продукцию белка E7

По данным гистологического исследования, полная регрессия CIN произошла у 17 пациенток 1-й группы (85%) и у 15 из 2-й (68,2%) (95% ДИ). В группе плацебо CIN не выявилась у 10 пациенток (52,6%). После окончания лечения женщины, не имеющие признаков CIN, прекращали применять исследуемый препарат. Во 2-й группе не установлено статистически значимых отличий между числом пациентов с положительным и отрицательным ответами на лечение через 90 дней терапии: $p = 0,181$ (точный критерий Фишера); $p = 0,201$ (критерий χ^2), что связано с небольшим размером выборки. Эффективность лечения во 2-й группе не различалась с 3-й группой (68,20 против 52,60% соответственно), т. к. значимых различий между числом пациен-

тов с положительным ответом на лечение между двумя группами не выявилось: $p = 0,243$ (точный критерий Фишера); $p = 0,309$ (критерий χ^2). Напротив, эффективность терапии в 1-й группе была значимо выше, чем в группе плацебо (85 против 52,6%): $p = 0,032$ (точный критерий Фишера); $p = 0,029$ (критерий χ^2). Таким образом, была очевидна эффективность при лечении CIN I-II вагинальных суппозиторий на основе ДИМ в дозе 200 мг/сут в течение 90 дней.

Из 34 нежелательных явлений в ходе исследования для 4 случаев установлена их связь с приемом препарата (жжение и зуд во влагалище – 2 случая, крапивница – 1 случай, ОРВИ – 1 случай). Наличие у препарата способности приводить к ОРВИ сомнительно из-за отсутствия данных о возможных механизмах этого явления.

В ряде плацебо-контролируемых клинических исследований детально уточнялась эффективность применения пероральных субстанций ИЗК и ДИМ у пациенток с CIN [20–22]. Экспериментальные исследования активной субстанции ДИМ *in vitro* и *in vivo* дают основания для оценки ее клинической эффективности в профилактике и лечении РШМ [10–13, 23, 24]. Поэтому предполагается высокая противоопухолевая и противовирусная активность препарата на основе ДИМ в отношении эпителия шейки матки, пораженного ВПЧ. Цервикон-ДИМ при интравагинальном введении обладает высокой местной биодоступностью – 72–73% от введенной дозы ДИМ распределяется в тканях влагалища, но низкой системной абсорбцией – лишь 3–4% ДИМ выявляется в системном кровотоке. Полученные нами данные продемонстрировали выраженное влияние ДИМ на эрадикацию ВПЧ: при применении ДИМ в дозе 200 мг/сут эрадикация ВПЧ произошла в 70% случаев. Это открывает перспективы в терапии ВПЧ-ассоциированных цервицитов с помощью данной фармакологической композиции.

В доклинических исследованиях при гистологической оценке тканей шейки матки после аппликации Цервикон-ДИМ выявлялась полная эпителизация поверхности эрозии на фоне отсутствия воспалительной инфильтрации в подслизистом слое. Наше исследование продемонстрировало, что эффективность Цервикон-ДИМ напрямую зависит от дозы препарата, т. к. при дозе 200 мг/сут, применяемой в течение 90 дней, происходила значительная нормализация кольпоскопической картины и регрессия CIN по морфологическим данным.

При изучении фармакокинетики Цервикон-ДИМ показано, что после его интравагинального введения в дозе 100 мг в системном кровотоке экспериментальных животных концентрация ДИМ начинает выявляться через 15 мин, достигая максимальной через 1,5 ч. Среднее время присутствия препарата в организме (показатель MRT) составляет около 5,5 ч, период полувыведения ($T_{1/2}$) – до 3,5 ч. Данные о накоплении препарата в организме и возможности его кумуляции в проведенных ранее исследованиях не выявлялись. Таким образом, Цервикон-ДИМ характеризуется высоким уровнем безопасности и переносимости, что объясняется его лекарственной формой и зоной воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Единого подхода к лечению CIN I и/или CIN II у молодых женщин в России пока нет. Деструктивное лечение, несмотря на свою доказанную эффективность, травматично и может нарушать репродуктивные планы пациентки. Напротив, длительное динамическое наблюдение и тактика невмешательства опасны из-за риска дальнейшего прогрессирования процесса. Поэтому поиск консервативного и безопасного способа лечения CIN I-II остается актуальным. Наше исследование показало, что лечение в течение 90 дней препаратом Цервикон-ДИМ в дозе как 200 мг/сут, так и 100 мг/сут при интравагинальном введении приводит к улучшению гистологической картины течения CIN I-II и даже ее излеченности. Статистически значимо выше была эффективность терапии в группе пациенток, принимавших препарат по 200 мг/сут, при сравнении с группой плацебо. Безусловно, такой неинвазивный метод является новым и перспективным в консервативном лечении CIN у женщин репродуктивного возраста, демонстрируя бережный и щадящий подход, т. к. исключает коагуляционные повреждения шейки матки, и патогенетическое обоснование, учитывая механизм влияния ДИМ на трансформацию клеток, пораженных ВПЧ, и продукцию

белка E7. Из-за высокой биодоступности и минимальной абсорбции действующего вещества местная аппликация ДИМ, в отличие от системного применения, характеризуется высоким уровнем безопасности и переносимости.

Необходимо отметить, что представленные здесь данные промежуточные. Для уточнения оптимальной дозировки и длительности курса лечения Цервикон-ДИМ начаты клинические исследования.

Авторы выражают признательность клиническим центрам и исследователям, принимавшим участие в работе: Л.А. Ашрафян (Москва); А.В. Головач (Дзержинский, Московская обл.); Т.Н. Коломойцева (Пермь); В.Е. Радзинский (Москва); С.П. Селиванов (Томск); Л.В. Сутурина (Иркутск); Н.И. Фадеева (Барнаул); Р.Ш. Хасанов (Казань); В.Б. Цхай (Красноярск); И.В. Шамина (Омск).

Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы выполнены в ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» в рамках исполнения комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства «Производство лекарственных средств на основе биотехнологий для лечения социально значимых заболеваний», финансируемого Министерством образования и науки РФ в соответствии с Постановлением Правительства РФ №218.



ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриева Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга, 2006: 76.
2. Маянский А.Н. Патогенетическая микробиология: Руководство. Н. Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2006: 520.
3. Ашгар Б.С., Броцман Г.Л., Шпицер М. Клиническая кольпоскопия. М.: Практическая медицина, 2012: 496.
4. Маянский А.Н. Папилломавирусы человека: Возбудители доброкачественных и злокачественных неоплазий. *Вопросы диагностики в педиатрии*, 2010, 2 (2): 5-11.
5. Schneider J et al. Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79 (9): 3047-51.
6. Chung SH, Wiedmeyer K, Shai A et al. Requirement for estrogen receptor α in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res*, 2008, 68 (23): 9928-9934.
7. Morimoto Y et al. Urinary estrogen metabolites during a randomized soy trial. *Nutr Cancer*, 2012, 64 (2): 307-14.
8. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М.: ДИТ, 2004: 184.
9. Banerjee S. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): from bench to clinic. Banerjee S, Kong D, Wang Z. *Mutat Res*, 2011, 728: 47-66.
10. Zhu J, Li Y, Guan C, Chen Z. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane in human cervical cancer cells. *Oncol Rep*, 2012, 28 (3): 1063-8.
11. Chen DZ, Qi M, Auburn KJ, Carter TH. Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. *J. Nutr.*, 2001, 131 (12): 3294-3302.
12. Sepkovic DW, Stein J, Carlisle AD et al. Diindolylmethane inhibits cervical dysplasia, alters estrogen metabolism, and enhances immune response in the K14-HPV16 transgenic mouse model. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18 (11), 2957-2964.
13. Dalessandri KM, Firestone GL, Fitch MD, Bradlow HL, Bjeldanes LF. Pilot study: effect of 3,3'-diindolylmethane supplements on urinary hormone metabolites in postmenopausal women with a history of early-stage breast cancer. *Nutr Cancer*, 2004, 50 (2): 161-7.
14. Chang, X et al. 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 2005, 26 (4): 771-8.
15. Kim EJ, Shin M, Park H, Hong JE, Shin HK, Kim J et al. Oral administration of 3,3'-diindolylmethane inhibits lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice. *J. Nutr.*, 2009, 139 (12): 2373-9.
16. Semov A, Iourtchenko L, Liu LF, Li S, Xu Y, Su X et al. Diindolylmethane (DIM) selectively inhibits cancer stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 424 (1): 45-51.
17. Zeligs MA et al. US patent 6.416.793, Formulation and use of controlled-release indole alkaloids.
18. Kiselev VI. Diindolylmethane-based drug for the treatment of hyperplastic and inflammatory diseases. WO 2011/136691 A1. 2011.
19. Киселев В.И. Суппозитории вагинальные на основе 3,3'-диндилилметана (метиндола) (RU 2318510).
20. Bell MC et al. Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN. *Gynecol Oncol.*, 2000, 78(2): 123-9.
21. Giuseppe Del Priore, Deleep Kumar Gudipudi, Nadine Montemarano, Antonella M Restivo, Jeanetta Malanowska-Stega, Alan A Arslan. Oral diindolylmethane (DIM): pilot evaluation of a nonsurgical treatment for cervical dysplasia. *Gynecol. Oncol.*, 2010, 116 (3): 464-7.
22. Zeligs MA, Sepkovic DW, Manrique C. Absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane: human use in HPV-related, benign and pre-cancerous conditions. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2003, 44.
23. Carter TH, Liu K, Ralph W et al. Diindolylmethane alters gene expression in human keratinocytes in vitro. *J. Nutr.*, 2002, 132 (11): 3314-3324.
24. Savino JA, Evans JF, Rabinowitz D, Auburn KJ, Carter TH. Multiple, disparate roles for calcium signaling in apoptosis of human prostate and cervical cancer cells exposed to diindolylmethane. *Mol Cancer Ther.*, 2006, 5 (3): 556-63.