

© Д. Л. Оводенко, Е. Г. Шварев,
Л. В. Дикарева

Астраханская государственная медицинская академия Росздрава: кафедра акушерства и гинекологии ФПО

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ

УДК 618.11-006-07

■ Представлены сведения о содержании карбонильных групп белков в сыворотке крови, эндометриальных смывах и менструальных выделениях больных эпителиальными опухолями яичников; дано клиничко-патогенетическое обоснование возможности использования этого биохимического маркера для ранней диагностики опухолей яичников у женщин «групп риска».

■ **Ключевые слова:** опухоли яичников; миома матки; эндометриальные смывы; менструальные выделения; перекисное окисление белков; карбонильные группы белков

Проблема ранней диагностики доброкачественных опухолей яичников в практическом отношении важна не только из-за высокой частоты их возникновения, но и в связи с реальной возможностью их малигнизации [6, 8]. Опухоли яичников представляют собой одну из наиболее разнородных групп новообразований человека, отличающихся на начальных этапах развития, как правило, скудностью клинических проявлений. С этим связана сложность ранней диагностики и не всегда удовлетворительные результаты лечения данной патологии [3, 12].

Считается, что доброкачественные эпителиальные опухоли яичников следует расценивать как промежуточный этап в ряду патологических изменений, приводящих затем при определенных условиях к развитию рака данной локализации [12, 19]. Поэтому «активный» поиск больных с доклиническими формами развития опухолевого процесса (т. е. выявление доброкачественных новообразований яичников у женщин «групп риска») на сегодняшний день следует рассматривать как один из наиболее эффективных способов профилактики злокачественных новообразований гонад [3, 11].

Считается, что вторичная профилактика опухолей может быть успешной, если проводимые мероприятия начинаются своевременно, с использованием патогенетически обоснованных методик [1, 3]. Однако до настоящего времени остаются недостаточно изученными многие стороны пато- и гистогенеза новообразований яичников, неясны причины прогрессии доброкачественной опухоли в пограничную, а той, в свою очередь, в инвазивную карциному. С этим связана низкая эффективность существующих подходов к ранней диагностике опухолей этой локализации, о чем свидетельствуют тревожные статистические показатели заболеваемости и смертности [4, 6, 14].

На сегодняшний день в патогенезе опухолевого роста существенное место занимает концепция, основанная на представлениях о важной роли процессов свободнорадикального окисления макромолекул, протекающих на фоне повышенного образования активных форм кислорода. При этом развивается состояние «оксидативного стресса», результатом которого является накопление высокотоксичных соединений, приводящих к нарушению функционального статуса клеток и тканей [5, 9].

В литературе накоплены многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов перекисного окисления липидов, их участия в нормальном и патологическом функционировании клеток [2, 18, 20]. Между тем, в процессе оксидативного стресса атаке активных форм кислорода подвергаются не только липиды, но и белки клеток и биологических жидкостей организма [2, 17].

Считается, что процесс окислительной деструкции белков и образования при этом т. н. «карбонильных групп» белков

является одним из ранних индикаторов повреждения ткани, что обосновывает целесообразность изучения динамики их накопления при различных патологических состояниях как в экспериментальных, так и клинических условиях [10, 13]. Этот процесс может лежать и в основе структурно-функциональных нарушений репродуктивной системы при развитии неопластической трансформации яичников.

В качестве изучаемого объекта использовались сыворотка периферической крови, эндометриальные смывы и менструальные выделения больных эпителиальными опухолями яичников. При выборе исследуемого материала мы исходили из того, что эндометрий, характеризующийся выраженной гормонозависимостью, чутко реагирует на изменение функционального и структурного состояния половых органов, в том числе и на формирование опухолей гонад. Учитывалось и биологическое своеобразие эндометрия, испытывающего на себе влияние не только половых гормонов, но и продуктов перекисного окисления липидов и белков.

Ранее нами была показана способность ряда ферментов и их изоформ при гормонозависимой патологии тела матки накапливаться в апикальных отделах железистых клеток эндометрия, а затем выделяться в эндометриальную слизь [15]. Следовательно, в сыворотке крови, а также в эндометриальных смывах и менструальных выделениях больных опухолями яичников задолго до развития клинических признаков заболевания можно ожидать появления маркеров «оксидативного стресса», среди которых, как уже было сказано, наиболее ранними являются карбонильные группы белков.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось усовершенствование подхода к ранней диагностике эпителиальных опухолей яичников путем идентификации карбонильных групп белков в сыворотке крови, эндометриальных смывах и менструальных выделениях женщин «групп риска» по развитию данной патологии.

Проведен комплексный клинико-лабораторный анализ особенностей течения заболевания у 236 пациенток, среди них 80 больных с гистологически подтвержденными доброкачественными и 36 — злокачественными эпителиальными опухолями яичников; группы сравнения составили 36 больных хроническим воспалением придатков матки в стадии ремиссии, 28 — обострением хронического аднексита и 21 больная миомой матки. Контрольная группа была представлена 35 женщинами, не имевшими патологии репродук-

тивных органов. Пациентки во всех исследуемых группах были сопоставимы по возрасту и характеру экстрагенитальной патологии.

У всех больных диагноз был установлен при комплексном клинико-инструментальном обследовании, включавшем, помимо традиционного общего и гинекологического осмотра, ультразвуковое исследование органов малого таза, молочных желез, определение содержания в крови онкомаркера Ca-125, по показаниям — компьютерную томографию, лапароскопию и другие методы исследования. Всем больным опухолями яичников были выполнены различные по объему операции на органах малого таза.

В сыворотке крови, супернатантах эндометриальных смывов и менструальных выделений обследованных пациенток определяли концентрацию белка биуретовым методом Кингслея–Вейксельбаума. Интенсивность окислительной деструкции белков оценивали по уровню их карбонильных производных, регистрируемых в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. В своей работе мы использовали метод, предложенный С. N. Oliver (1987) [16] в модификации Е. Е. Дубининой (1993) [2]. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали при длине волны 363 нм. При расчете уровня карбонильных производных использовали коэффициент молярной экстинкции — $22\,000\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$. Результаты выражали в нмоль/мг белка. Полученный показатель анализировали с учетом результата гистологического исследования удаленных опухолей яичников.

Статистическая обработка включала выборку и группировку данных, вычисление относительных, средних величин и их ошибок. Определение достоверности различий величин проводили по критерию Стьюдента, при этом различия считались достоверными при $t \geq 2$, что соответствовало вероятности безошибочного прогноза 95 % и более, а также уровню значимости $p < 0,05$.

Установлено, что содержание карбонильных групп белков в сыворотке крови женщин контрольной группы составляло $0,9 \pm 0,06$ нмоль/мг независимо от возраста и фазы менструального цикла. У пациенток с доброкачественными опухолями яичников всех возрастных периодов, а также больных раком яичников репродуктивного возраста изучаемый показатель был достоверно выше, чем в контроле и составил $1,3 \pm 0,05$ нмоль/мг и $1,3 \pm 0,15$ нмоль/мг соответственно ($p < 0,05$). Снижение содержания рассматриваемого маркера до $0,7 \pm 0,17$ нмоль/мг было отмечено у больных раком яичников менопаузального возраста, показатель при этом практически не превышал таковой у женщин контрольной группы (табл. 1).

Таблица 1

Содержание карбонильных групп белков в сыворотке крови больных доброкачественными и злокачественными опухолями яичников ($M \pm m$, нмоль/мг)

Группы обследованных пациенток	Репродуктивный возраст	Период менопаузы
Контрольная группа (n=35)	1	0,9 ± 0,09
Больные доброкачественными опухолями яичников (n = 80)	2	1,3 ± 0,05
Больные раком яичников (n = 36)	3	1,3 ± 0,15
p		$p_{1-2} < 0,05;$ $p_{1-3} < 0,05;$ $p_{2-3} > 0,05$

Тенденция к повышению уровня изучаемого маркера в сыворотке крови до $1,3 \pm 0,12$ нмоль/мг отмечена у больных доброкачественными опухолями яичников диаметром более 10,0 см ($p > 0,05$). При раке яичников размер новообразования практически не влиял на значение показателя.

Содержание карбонильных групп белков в сыворотке крови больных хроническим аднекситом в стадии ремиссии составило $0,90 \pm 0,09$ нмоль/мг, не превышая такового у женщин контрольной группы. При обострении хронического воспалительного процесса придатков матки уровень маркера увеличился до $1,2 \pm 0,1$ нмоль/мг, практически соответствуя аналогичным показателям больных доброкачественными и злокачественными опухолями яичников ($p > 0,05$).

В сыворотке крови больных миомой матки наблюдалась тенденция к повышению уровня карбонильных групп белков до $1,00 \pm 0,04$ нмоль/мг, однако статистически значимого различия по сравнению с показателем женщин контрольной группы выявлено не было ($p > 0,05$).

Таким образом, показатель содержания карбонильных групп белков в сыворотке крови больных доброкачественными и злокачественными опухолями яичников оказался достоверно выше по сравнению с таковым в контрольной группе, но как при доброкачественных, так и при злокачественных новообразованиях значения показателя были очень близкими.

При изучении содержания карбонильных групп белков в эндометриальных смывах больных доброкачественными и злокачественными опухолями яичников удалось установить четкие границы показателя в соответствии с характером изучаемой патологии. Так, в эндометриальных смывах женщин контрольной группы уровень маркера находился в пределах $0-1,9$ ($0,90 \pm 0,14$) нмоль/мг. При повышении его до $2,0-3,5$ ($2,50 \pm 0,24$) нмоль/мг

в большинстве случаев (во всех возрастных группах) определялись доброкачественные ($p < 0,05$), а при достижении величины $3,6-4,9$ ($4,30 \pm 0,26$) нмоль/мг — злокачественные опухоли яичников ($p < 0,01$) (табл. 2).

Таблица 2

Содержание карбонильных групп белков в эндометриальных смывах больных доброкачественными и злокачественными опухолями яичников ($M \pm m$, нмоль/мг)

Группы обследованных пациенток	Репродуктивный возраст	Период менопаузы
Контрольная группа (n=35)	1	0,90 ± 0,14
Больные доброкачественными опухолями яичников (n = 80)	2	2,50 ± 0,24
Больные раком яичников (n = 36)	3	4,30 ± 0,26
p		$p_{1-2} < 0,05;$ $p_{1-3} < 0,01;$ $p_{2-3} < 0,05$

У больных доброкачественными опухолями яичников при диаметре новообразования более 10,0 см содержание карбонильных групп белков в эндометриальных смывах было значительно выше, чем при опухолях меньшего размера, однако статистически значимых различий получено не было. У больных раком яичников уровень маркера не зависел от размеров новообразования, составляя в среднем $4,30 \pm 0,26$ нмоль/мг.

У больных хроническим воспалением придатков матки в стадии ремиссии, и особенно при обострении процесса, уровень карбонильных групп белков в эндометриальных смывах увеличивался ($p > 0,05$) по сравнению с контролем, составляя $1,10 \pm 0,17$ и $1,30 \pm 0,19$ нмоль/мг соответственно. Данный показатель статистически достоверно отличался от такового больных доброкачественными и злокачественными опухолями яичников ($p < 0,05$).

В эндометриальных смывах больных миомой матки, хотя и наблюдалась тенденция к повышению уровня исследуемого маркера до $1,30 \pm 0,14$ нмоль/мг, однако по сравнению с показателем в контрольной группе женщин и здесь не было отмечено статистически значимого отличия ($p > 0,05$). Достоверная разница была установлена между показателем содержания карбонильных групп белков в эндометриальных смывах больных миомой матки по сравнению с таковым у пациенток с доброкачественными и злокачественными опухолями яичников.

Таким образом, содержание карбонильных групп белков в эндометриальных смывах, превышающее $2,0$ нмоль/мг, может свидетельствовать о наличии

у больной доброкачественных опухолей придатков матки, а увеличение показателя до 4,0 нмоль/мг и выше — о риске развития злокачественного новообразования. Наличие сопутствующей гинекологической и экстрагенитальной патологии практически не влияло на уровень изучаемого показателя в эндометриальных смывах.

Определение карбонильных групп белков было проведено в 44 образцах менструальных выделений женщин контрольной группы и больных доброкачественными опухолями яичников репродуктивного возраста с нормальным менструальным циклом. У больных раком яичников это исследование не проводилось из-за небольшого количества пациентов, имевших сохраненный менструальный цикл.

Среди женщин контрольной группы содержание карбонильных групп белков в менструальных выделениях составляло $1,20 \pm 0,20$ нмоль/мг, а в группе больных доброкачественными опухолями яичников соответствовало значениям $2,70 \pm 0,25$ нмоль/мг ($p < 0,05$) (табл. 3). Размеры опухоли лишь незначительно влияли на величину исследуемого показателя.

Таблица 3

Содержание карбонильных групп белков в менструальных выделениях больных доброкачественными опухолями яичников ($M \pm m$, нмоль/мг)

Группы обследованных пациенток	Показатель
Больные доброкачественными опухолями яичников (n = 23)	$2,70 \pm 0,25$ *
Контрольная группа (n = 12)	$1,2 \pm 0,2$
* — $p < 0,05$	

У больных хроническим воспалением придатков матки в стадии ремиссии содержание карбонильных групп белков в менструальных выделениях не превышало 1,2 нмоль/мг, не отличаясь от такового в контрольной группе. При обострении процесса показатель увеличивался до $1,70 \pm 0,14$ нмоль/мг и имел статистически достоверное различие с аналогичным показателем в контроле и группе больных доброкачественными опухолями яичников ($p < 0,05$).

У больных миомой матки уровень рассматриваемого маркера в указанной биологической жидкости практически не отличался от такового в контрольной группе женщин.

Представленные данные свидетельствуют о заметной роли процессов перекисного окисления белков и формирующегося при этом состояния «оксидативного стресса» в патогенезе опухолей яичников. Развитие рассматриваемой патологии сопровождается нарастанием свободнорадикальных процессов (более выраженное при злокачественных новообразованиях), приводя к структурно-функциональным нарушениям на всех уровнях репродуктивной сис-

темы и накоплению модифицированных форм белков, не разрушенных ферментами антиоксидантной защиты. Следствием этого являются глубокие нарушения окислительно-восстановительных процессов в тканях (в том числе появление карбонильных групп белков), переход организма на другой метаболический уровень существования.

Определение карбонильных групп белков в сыворотке крови больных эпителиальными опухолями яичников соответствовало диагностическому показателю чувствительности 84,7 % и специфичности — 28,2 %. В то время как идентификация этого маркера в эндометриальных смывах и менструальных выделениях у больных с рассматриваемой патологией показала чувствительность 82,3 % при специфичности — 71,5 %. Скорее всего, это можно объяснить тем, что именно в этих биологических жидкостях концентрация карбонильных групп белков была значительно выше, особенно на начальных стадиях развития опухоли, и не зависела от возраста больных и наличия сопутствующей патологии.

Выводы

1. Нарастание содержания карбонильных групп белков в сыворотке крови, эндометриальных смывах и менструальных выделениях является ранним лабораторным маркером развития опухолей яичников.
2. Идентификация карбонильных групп белков в эндометриальных смывах и менструальных выделениях женщин «групп риска» является более информативной для диагностики опухолей яичников, чем в сыворотке крови.
3. Указанный диагностический способ является неинвазивным, простым по технике выполнения и может использоваться (наряду с общепринятыми) при обследовании женщин в амбулаторных условиях, повышая своевременность и точность выявления опухолей яичников.

Литература

1. Бохман Я. В. Руководство по онкогинекологии / Бохман Я. В. — М.: Медицина, 1989 — 463 с.
2. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов Г. Е. // Вопросы мед. химии. — 1995. — Т. 41, № 1. — С. 24–26.
3. Жордания К. И. Злокачественные эпителиальные опухоли яичников / Жордания К. И. // Современная онкология. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 51–55.
4. Имятинов Е. Н. Молекулярная генетика рака яичников / Имятинов Е. Н. // Практическая онкология. — 2000. — № 4. — С. 3–7.
5. Кашиulina А. П. Особенности свободнорадикальных процессов при первично-множественных злокачественных забо-

- леваниях у людей / Кашулина А. П. // Мед. консультация. — 2000. — № 3. — С. 4–7.
6. Комплексное применение магнитно-резонансной томографии и определения опухолевых маркеров в диагностике злокачественных опухолей яичников / Солопова А. Г., Афанасьева Э. А., Пустовитова Т. С. [и др.] // Мед. визуализация. — 2004. — № 1. — С. 112–116.
 7. *Новикова Е. Г.* Пограничные опухоли яичников / Новикова Е. Г., Батталова Г. Ю. — М.: МИА, 2007.
 8. *Серов В. Н.* Доброкачественные опухоли и опухолевидные образования яичников / Серов В. Н., Кудрявцева Л. И. — М.: Триада-Х, 1999.
 9. Сравнительное исследование активности ферментов обмена глутатиона и антиоксидантных ферментов в злокачественных и доброкачественных опухолях легких человека / Короткина Р. Н., Мацкевич Г. Н., Давлеканова А. Ш. [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2002. — Т. 133, № 6. — С. 97–700.
 10. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Левицкий Е. Л. [и др.] // Современные проблемы токсикологии. — 2005. — № 3. — С. 20–27.
 11. *Трапезников, Н. Н.* Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ (состояние онкологической помощи, заболеваемости и смертность) / Трапезников Н. Н., Аксель Е. М. — М., 2001. — 58 с.
 12. *Урманчеева А. Ф.* Диагностика и лечение рака яичников: метод. реком. / Урманчеева А. Ф., Кутушева Г. Ф. — СПб.: Н-Л, 2001. — 48 с.
 13. *Фролова М. Ю.* Возможности метода определения карбонильных групп белков сыворотки крови для оценки состояния «окислительного стресса» в клинической практике: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2003. — 25 с.
 14. *Харитоновна Т. В.* Современные стандарты лечения рака яичников / Харитоновна Т. В. // Современная онкология. — 2003. — Т. 5, № 2. — С. 44–47.
 15. *Шварев Е. Г.* Опухолевые маркеры в диагностике и оценке эффективности гормонотерапии рака эндометрия: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1993. — 34 с.
 16. Age-related changes in oxidized proteins / Oliver C. N., Ahn B-W. [et al.] // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 5488–5491.
 17. *Dean R. T.* Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation / Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J. // Biochem. J. — 1997. — Vol. 324. — P. 1–18.
 18. *Packer L.* Free Radicals in the Brain. Aging / Packer L., Prilipko L., Christen Y. // Neurological and Mental Disorders. — Berlin: Springer-Verlag, 1992. — P. 21–41.
 19. *Powel D. E.* Current concept in epithelial ovarian tumors: does benign to malignant transformation occur? / Powel D. E., Puls L., Ragel I. // Human Pathol. — 1992. — Vol. 23. — P. 846–847.
 20. *Zaidi A.* Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca²⁺-ATPase-I. Selectivity of protection against oxidative stress / Zaidi A., Michaelis M. L. // Free Rad. Biol. — 1999. — Vol. 27. — P. 810–821.

Статья представлена А. В. Арутюняном
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

DETERMINATION DIAGNOSTIC VALUE OF CARBONYL PROTEINS IN THE BIOLOGICAL LIQUIDS OF PATIENTS WITH OVARIAN TUMORS

Ovodenko D. L., Svarev E. G., Dikareva L. V.

■ **Summary:** The paper discusses the possibilities of early diagnosis of ovarian tumors. It briefly outlines principles of the diagnosis of benign and malignant ovarian tumors with using of biochemical research of blood's serum, endometrial washes and menstrual blood. Our data shows participation of protein oxidation in the pathogenesis of ovarian tumors. The results of the investigation allow considering high level of carbonyl proteins in these biological liquors as a possible marker of ovarian tumor pathology.

■ **Key words:** ovarian tumors; endometrial washes; menstruation blood; peroxide protein oxidation; carbonyl proteins; hystero-myoma