

© Д.А. Ниаури, С.В. Чепур,
Э.Н. Попов, К.П. Харитонов,
И.В. Кузнецова

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

УЧАСТИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ СОЧЕТАННЫХ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ЖЕНЩИН

■ Обследован интактный миометрий, полученный у 56 женщин репродуктивного возраста в процессе хирургического лечения. У 30 женщин имели место сочетанные гиперпластические процессы органов репродуктивной системы (миома матки, гиперплазия эндометрия, аденомиоз, доброкачественные опухоли яичников, мастопатия, фоновые заболевания шейки матки), и у 26 женщин на момент обследования обнаружена солитарная миома матки. При инфракрасной спектроскопии лиофилизированного миометрия пациенток с сочетанными очагами пролиферации определяется стойкий пик сволновым числом 3500 см^{-1} , отражающий накопление молекул с окисленными с ОН-фрагментами и изменение их соотношения с NH-содержащими соединениями. При исследовании миометрия женщин с единичным миоматозным узлом подобный пик отсутствовал. Полученные данные дают основание предположить, что сочетанные доброкачественные гиперплазии органов репродуктивной системы сопровождаются развитием каскадных реакций оксидативного стресса в тканях, характеризующегося неконтролируемой продукцией свободных радикалов и/или несостоятельностью антирадикальной защиты.

■ **Ключевые слова:** оксидативный стресс; множественные гиперплазии

В гинекологической практике достаточно часто встречаются случаи сочетания нескольких доброкачественных гиперпластических процессов различной локализации. Так, по данным различных авторов, сочетание миомы матки с гиперпластическими процессами в эндометрии встречается в 23–42 % случаев, с доброкачественными опухолями яичников в 8–12 %, с внутренним эндометриозом в 11–18 %. Синдром поликистозных яичников в 24–74 % случаев сопровождается железистой гиперплазией эндометрия и в 3 % — его атипической гиперплазией. При аденомиозе патологические процессы эндометрия определяются у 31,4 % больных, а различные патологические процессы яичников обнаруживаются у 72,7 %, чаще всего по типу очаговой стромальной гиперплазии. При гиперпластических процессах эндометрия в 36,8 % наблюдений обнаружена мастопатия.

Особенную актуальность проблема сочетанных гиперпластических процессов приобрела в последнее время в связи с развитием профилактического направления медицины. Широкое внедрение в повседневную клиническую практику органосохраняющих, консервативно-пластических оперативных вмешательств определяет необходимость раннего выявления множественности патологии, надежного прогнозирования благоприятных исходов при лечении локальных доброкачественных гиперплазий в органах репродуктивной системы, прогнозирование риска развития гиперпластических процессов в других органах, определение маркеров, являющихся предикторами развития патологической пролиферации.

Несомненно, развитие сочетанных гиперпластических процессов в органах репродуктивной системы гетерогенно по этиологии. В настоящее время рассматривается две основные теории, объясняющие развитие множественных повреждений органов репродуктивной системы у женщин. Эти теории к числу факторов, синхронизирующих развитие гиперплазий, относят гормональный дисбаланс и наличие хронической инфекции, прежде всего вирусной. Кроме того, определенное место занимают исследования, демонстрирующие наследственную предрасположенность индивидумов.

Признавая многофакторность развития опухолей, целесообразно представить этот процесс в виде воронки Шерингтона, горловину которой составляют метаболические реакции, универсальные для развития различных деструктивных и гиперпластических процессов в тканях. К числу таких процессов относятся свободнорадикальные реакции, которые в условиях нормального функционирования организма выступают в качестве регуляторных факторов, регулирующих структурную кинетику тканей, а в патологических условиях способны определять повреждение тканей [2–4, 7, 9–11].

Классификация свободных радикалов и активных кислородных метаболитов в настоящее время достаточно разработана [3]. Сформировалось понимание того, что субстратами свободнора-

дикального окисления могут быть не только липиды клеточных мембран, но и белковые ферментные системы, факторы транскрипции и свободные от гистонов участки молекулы ДНК.

Таким образом, признавая за свободнорадикальным неферментативным окислением способность повреждать метаболические системы клеток и геном (что может быть инициирующим моментом в развитии доброкачественных и злокачественных опухолей), остается выяснить — могут ли свободнорадикальные реакции определять мультифокальность патологических изменений.

Материалы и методы

Исследования выполнены на операционном материале, полученном при хирургическом лечении 56 женщин репродуктивного возраста с гиперпластическими процессами органов репродуктивной системы. У 30 женщин определены множественные очаги пролиферации, у 26 — диагностирована только миома матки. Из 30 пациенток с первично множественными гиперпластическими процессами у 14 (46,7 %) обнаружено сочетание миомы матки с доброкачественной гиперплазией эндометрия и фоновыми заболеваниями шейки матки, у 9 (30 %) пациенток — сочетание миомы матки с аденомиозом и гиперпластическими процессами эндометрия, у 7 (23,3 %) пациенток — сочетание миомы матки с генитальным эндометриозом (эндометриоидные кисты яичников) и фоновыми заболеваниями шейки матки. Во всех случаях диагноз подтвержден при гистологическом исследовании. Для анализа использованы ткани из очагов доброкачественного опухолевого роста на границе с неизмененными структурами и плазма крови.

Ткани замораживали жидким азотом и готовили криостатные срезы толщиной до 7 мкм. Один из срезов после монтирования на стекло и фиксации этанолом окрашивали гематоксилин-эозином для верификации структур. Остальные срезы кисточкой переносили в соответствующие среды для инкубации. Погружая срезы в 0,2 %-й водный раствор нитросинего тетразолия, в тканях оценивали нестимулированный НСТ-тест, позволяющий косвенно оценить продукцию свободных радикалов. Для определения источников образования радикалов срезы перед проведением НСТ-теста инкубировали в течение 15 минут в следующих растворах:

- хлорид кобальта (0,004 мг/мл), использован для разрушения гемсодержащих структур;
- нифедипин (0,01 мг/мл) — блокатор медленных кальциевых каналов;
- цианид калия (0,002 мг/мл) — необратимый ингибитор цитохромоксидазы;

- аллопуринол (0,01 мг/мл) — ингибитор ксантиноксидазы;

- диклофенак натрия (0,004 мг/мл) — ингибитор циклооксигеназы.

Фотометрию срезов осуществляли точечным методом при помощи приставки ФМЭЛ-1 при длине волны $\lambda = 540$ нм.

Для определения изменений метаболизма у больных с множественными и одиночными очагами гиперплазий выполняли инфракрасное (ИК) спектроскопическое исследование¹. Для его выполнения навеску лиофильно высушенных тканей перетирали в агатовой ступке с 250 мг монокристалла КВг и прессовали в таблетки. ИК-спектры поглощения записывали относительно стандартной таблетки КВг в канале сравнения в спектральном диапазоне 400–4000 см⁻¹.

Результаты исследования и их обсуждение

Для доказательства роли свободнорадикальных реакций в развитии множественных гиперплазий органов репродуктивной системы у женщин можно привести данные биохимических исследований у пациенток с одиночными и множественными гиперпластическими процессами. Инфракрасная спектроскопия лиофилизированных тканей и плазмы больных (при сочетанных гиперплазиях органов репродуктивной системы) во всех наблюдениях выявляла наличие стойкого пика с волновым числом более 3500 см⁻¹, отражающего накопление молекул с окисленными ОН-фрагментами и изменение их соотношения с NH-содержащими соединениями. Сравнение данных инфракрасной спектрометрии интактного миометрия при множественных гиперплазиях и солитарном миоматозном узле подтвердило отсутствие этого пика, характеризующего накопление продуктов дегградации длинноцепочечных алифатических соединений и изменение соотношения между альдегидным и кислотным пиками в пользу более окисленных соединений при одиночной миоме матки (рис. 1). Все это указывало на то, что в тканях органов репродуктивной системы женщин с множественными гиперпластическими процессами развиваются каскадные реакции оксидативного стресса, характеризующегося неконтролируемой продукцией свободных радикалов и/или несостоятельностью антирадикальной защиты. Эти наблюдения позволили предположить, что активные формы кислорода имеют значение в инициации множественных очагов ги-

¹ Авторы выражают искреннюю признательность А.В. Кокушкиной за помощь в регистрации данных спектроскопии.

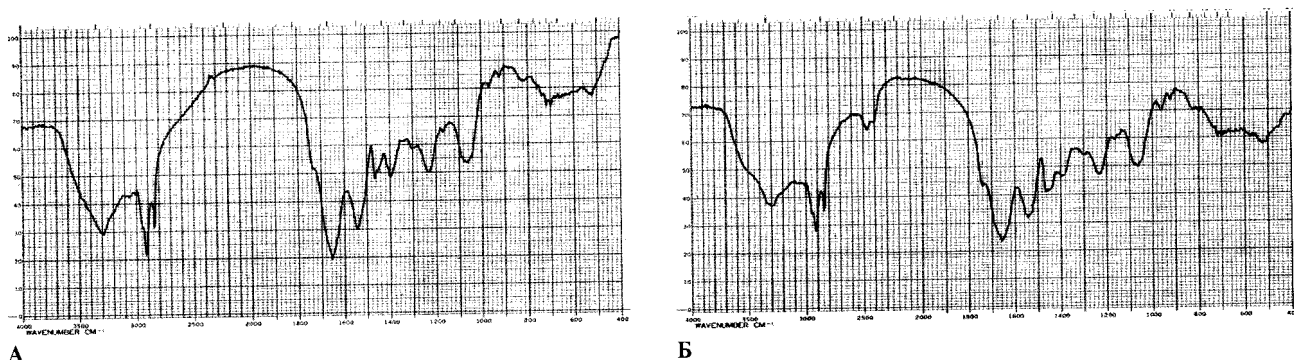


Рис. 1. Различия в ИК-спектре лиофильно высушенных тканей миометрия больной с одиночным миоматозным узлом (А) и больной с сочетанием миомы матки с наружным генитальным эндометриозом и эндометриоидной кистой яичника (Б). Изменение спектра отражает накопление ОН-групп и фрагментов деградации длинноцепочечных алифатических молекул, а также снижение относительного количества менее окисленных альдегидных фрагментов по сравнению с кислотными группами — COOH . ИК-спектрофотометр Hitachi-300

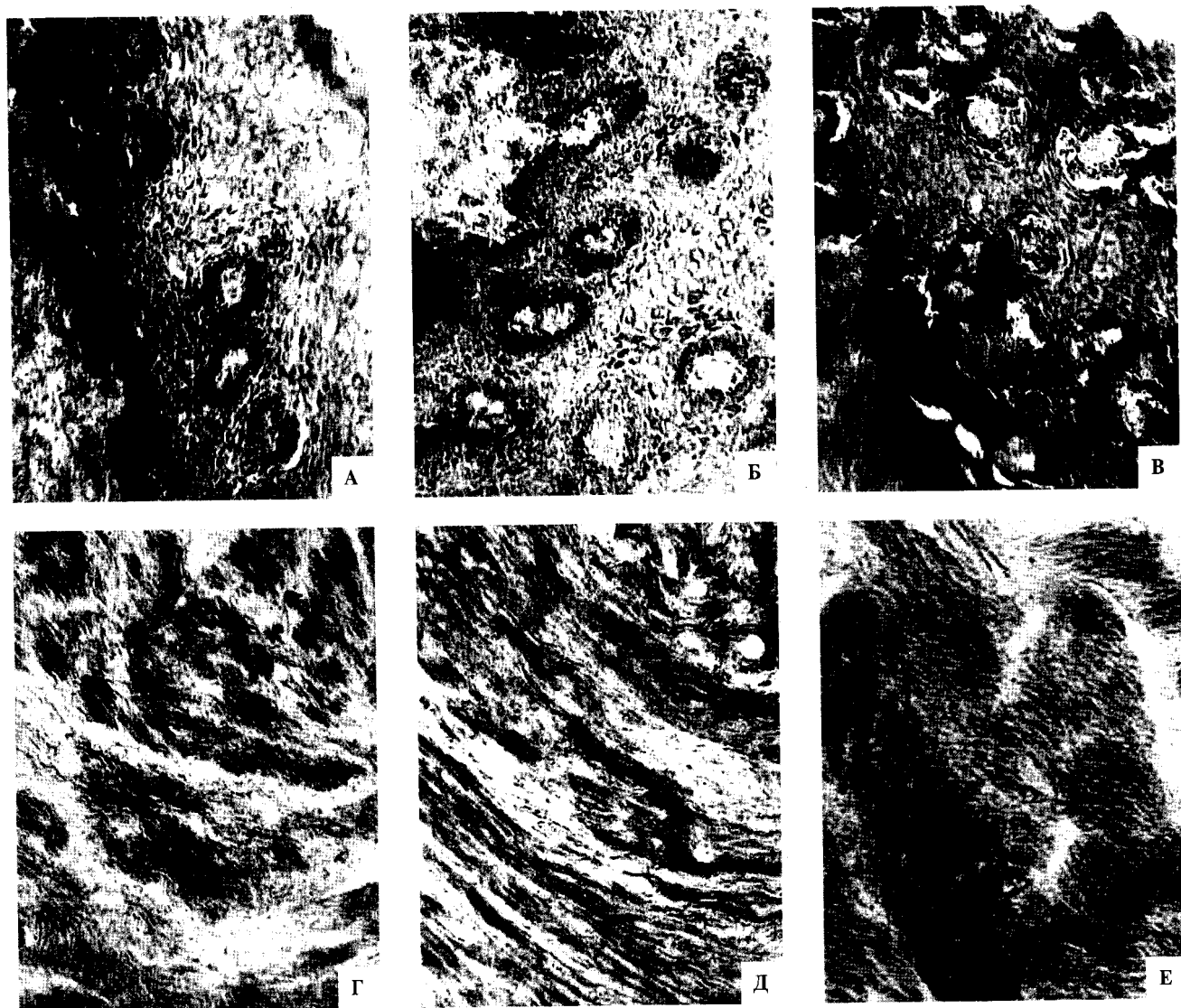


Рис. 2. Изменение интенсивности окрашивания тканей при проведении НСТ-теста на срезах слизистой цервикального канала (А–В) и миометрия (Г–Е) у больной с сочетанием миомы матки и эндометриоза слизистой цервикального канала. Показано снижение окрашивания тканей по сравнению с контролем (изотонический раствор NaCl — А, Г) при предварительной обработке срезов — ингибитором ксантиноксидазы алопуринолом (Б), ингибитором цитохромоксидазы цианистым калием (Д), блокатором медленных кальциевых каналов нифедипином (Е), — тогда как при обработке срезов хлоридом кобальта (В) интенсивность окрашивания не снижалась. Polyvar, ув. $\times 150$

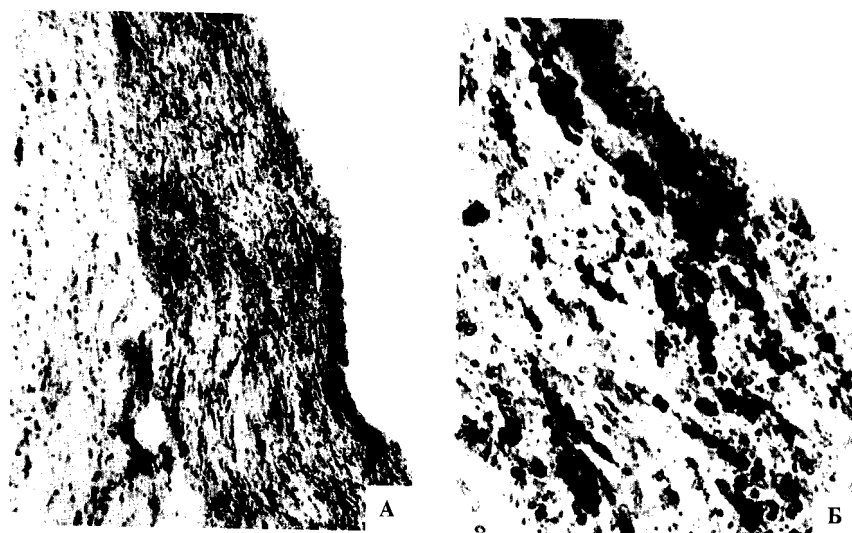


Рис. 3. Отложение продуктов реакции диазосочетания нитритов с реактивом Грисса в стенке эндометриоидной кисты яичника. Прослежена гиперпродукция конечных метаболитов оксида азота как в паравазально расположенных клетках инфильтрата, так и в измененных клетках эпителия. Polyvar, ув. $\times 150$ (А) и $\times 375$ (Б)

перплазий органов репродуктивной системы у женщин.

Высказанное предположение было подтверждено в ходе проведения ингибиторного анализа на срезах тканей, иссеченных во время операций у больных с множественными доброкачественными гиперплазиями. Для косвенной оценки продукции свободных радикалов, в первую очередь супероксидного аниона-радикала, был применен нестимулированный НСТ-тест. Степень окрашивания срезов диформазами указывала на содержание в них прооксидантов. Для выявления источников свободных радикалов срезы предварительно обрабатывали фармакологическими агентами — ингибиторами метаболических реакций, в которых продуцируются свободные радикалы. Результаты исследований приведены на рис. 2.

Установлено, что при обработке срезов тканей ингибитором ксантиноксидазы — аллопуринолом — степень накопления диформаза в клетках слизистой шейки матки канала снижается, тогда как разрушение гемсодержащих структур хлоридом кобальта достоверно не изменяет интенсивность окраски. Продукция прооксидантов, по-видимому, связана с нарушениями функционирования дыхательной цепи, длительное блокирование которой высокими концентрациями цианидов приводит к снижению накопления прооксидантов в тканях. Вероятно, эти свободнорадикальные процессы в гиперплазированном миометрии являются Ca^{2+} -зависимыми, что определяет антиоксидантный эффект нифедипина.

Особую роль в формировании повреждений структур клеток имеет оксид азота (NO). В услови-

ях его повышенной продукции на фоне развивающихся реакций оксидативного стресса он может терять свои физиологические регулирующие свойства в результате конъюгации с супероксидным анион-радикалом в пероксинитрит. NOOO^- обладает большой проникающей способностью и достаточной стабильностью по сравнению с другими свободными радикалами, но в кислой среде (условия метаболического ацидоза, межмембранное пространство митохондрий, кариоплазма) способна вступать в реакции образования самого сильного биологического окислителя — OH -радикала [6]. Вследствие этого, метаболизм оксида азота, продуцируемого как клетками доброкачественных опухолей, так и клетками воспалительного инфильтрата, стал предметом особого анализа в ходе проведения данного исследования (рис. 3).

Было показано, что содержание нитритов — конечных метаболитов оксида азота как в паравазально расположенных клетках инфильтрата, так и в измененных клетках эпителия эндометриоидных кист яичников резко увеличено по сравнению с прилежащей соединительной тканью, что позволяет предположить большое значение оксида азота в развитии повреждений клеточных структур.

Приведенные наблюдения позволяют считать, что свободнорадикальные реакции имеют существенное значение в развитии полифокальных гиперплазий.

По-видимому, решающее значение имеет способность свободных радикалов изменять окислительно-восстановительный потенциал тканей и крови [4], что приводит посредством окислительно-восстановительных модификаций, сенсорами которых являются обратимые из-

менения тиол-дисульфидного равновесия [4, 7, 11, 12], к активации факторов транскрипции (NF- κ B и AP-1) [5, 10, 13–15] с последующей активацией генома [7]. Именно в таком варианте свободные радикалы можно представить себе не только как повреждающие агенты, определяющие развитие локальных воспалительных реакций, но и как факторы регуляции, определяющие многоочаговые эффекты локальных повреждений в виде развития пролиферативного процесса. Немаловажную роль, вероятно, имеют особенности кровоснабжения органов репродуктивной системы, обуславливающие за счет множества анастомозов возможность осуществления эффектов свободных радикалов.

Данные суждения не являются бесспорными и не ограничивают возможность исследования патогенетических факторов, индуцирующих развитие сочетанных гиперпластических процессов в органах репродуктивной системы женщин. Вместе с тем, анализ свободнорадикальных реакций позволяет прогнозировать развитие множественных гиперплазий и может служить надежным лабораторным критерием для определения адекватности объемов хирургических вмешательств.

Литература

1. Ванин А.Ф. Оксид азота: регуляция клеточного метаболизма без участия системы клеточных рецепторов // Биофизика. — 2001. — Т. 46, Вып. 4. — С. 631–641.
2. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. — 2000. — Т. 65, Вып. 4. — С. 485–503.
3. Плужников Н.Н., Чиж С.И., Юзвинкевич Л.С. и др. Оксидативный стресс. Фундаментальные и прикладные проблемы // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины: науч. тр. / НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ. — СПб., 2000. — Т. 2. — С. 193–223.
4. Плужников Н.Н., Гайдар Б.В., Ченур С.В. Редокс-регуляция: фундаментальные и прикладные проблемы // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины: научн. тр. / НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ. — СПб., 2003. — Т. 4. — С. 139–173.
5. Adler V., Yin Z., Funch S.Y. et al. Regulation of JNK signaling by GSTp // EMBO J. — 1999. — Vol. 18, N 5. — P. 1321–1334.
6. Beckman J.S., Beckman K.M., Chen J., Marshall P.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 1620–1624.
7. Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 1999. — Vol. 39. — P. 67–101.
8. Dery O., Corvesa C.U., Steinoff M., Bunnnett N.W. Proteinase-activated receptors: novel mechanism of signaling by serine proteases // Am. J. Physiol. — 1998. — Vol. 274, N 6. — P. 1429–1452.
9. Flohe L., Brigelius-Flohe R., Saliou C. et al. Redox regulation of NF- κ B activation // Free Radic. Biol. Med. — 1997. — Vol. 22. — P. 1115–1126.
10. Guis D., Botero A., Shah S., Curry H.A. // Toxicol. Lett. — 1999. — Vol. 106. — P. 93–106.
11. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signaling // Cell. Signal. — 1999. — Vol. 11. — P. 1–14.
12. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // FASEB J. — 1997. — Vol. 11. — P. 118–124.
13. Lee F.S., Hagler J., Chen Z.J., Maniatis T. Activation of the I- κ B kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway // Cell. — 1997. — Vol. 88. — P. 213–222.
14. Muller J., Rupee R.A., Baeuerle P.A. Study of the gene regulation by NF- κ B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates // Methods. — 1997. — Vol. 11. — P. 301–312.
15. Xanthoudakis S., Curran T. Redox regulation of AP-1: a link between transcription factor signaling and DNA repair // Adv. Exp. Med. Biol. — 1996. — Vol. 387. — P. 69–75.

FREE RADICAL REACTIONS IN THE DEVELOPMENT OF COMBINED HYPERPLASTIC PROCESSES IN FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM ORGANS

Niauri D.A., Chepur S.V., Popov E.N., Charitonov K.P., Kuznetsova I.V.

■ **Summary:** Intact myometrium specimen, received from 56 women of reproductive age during surgical interventions. There were 30 women with combined hyperplastic processes in the reproductive system organs (uterine myoma, endometrium hyperplasia, adenomyosis, benign ovarian tumors, mastopathy, background cervical pathology), and in 26 cases solitary uterine myoma was found. At infrared spectrometry of the lyophilized myometrium, taken from patients with combined proliferation foci, a stable peak with wave number 3500 cm^{-1} was found, which reflects the accumulation of molecules with oxidized OH-groups and a change in proportion of OH-/NH-containing molecules. At the study of the myometrium of patients with single myoma focus the described peak was absent. The acquired data suggests, that combined benign hyperplasias in the reproductive system organs are accompanied by the oxidative stress cascade reactions, characterized by uncontrollable production of free radicals and/or insufficiency of antiradical protection mechanisms.

■ **Key words:** oxidative stress; combined hyperplastic processes