

В.Г. Дубинина, А.И. Рыбин, Е.В. Амбросийчук

ОБЩАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИДА АЗОТА И УРОВЕНЬ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ У ПАЦИЕНТОК С ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ

Одесский государственный медицинский университет

Ключові слова: рак яєчників, пухлини яєчників, оксид азоту, нітрити, молекули середньої маси.

Ключевые слова: рак яичников, опухоли яичников, оксид азота, нитриты, молекулы средней массы.

Key words: ovarian cancer, ovarian tumors, nitric oxide, nitrites, middle mass molecules.

У статті проведений порівняльний аналіз концентрації молекул середньої маси у крові та піхвових змивах, а також вивчення стану системи циклу оксиду азоту у жінок репродуктивного віку на різних стадіях розвитку пухлин яєчників. Показано що обмін нітритів у жінок репродуктивного віку, що мають пухлинні процеси яєчників, має зміни у бік вірогідного збільшення ріней нітритів по мірі прогресування пухлинного процесу від доброякісного до злоякісного. На підставі проведеної кореляції між загальним та місцевим вмістом середніх молекул, отриманих даних та порівняння з іншими показниками обміну азоту в організмі автори роблять висновок про те, що підвищення концентрації молекул середньої маси у жінок з пухлинами яєчників має маткове походження.

В статье проведен сравнительный анализ концентрации молекул средней массы в крови и влагалищных смывах, а также изучение состояния системы цикла оксида азота у женщин репродуктивного возраста на разных стадиях развития опухолей яичников. Показано, что обмен нитритов у женщин репродуктивного возраста с наличием опухолевых процессов яичников претерпевает определенные изменения в сторону достоверного повышения уровней нитритов по мере прогрессирования опухолевого процесса от доброкачественного к злокачественному. На основании проведенной корреляции между общим и местным содержанием средних молекул, полученных данных и сравнения с другими показателями обмена азота в организме, авторы делают вывод о том, что повышение концентрации молекул средней массы у женщин с опухолями яичников имеет маточное происхождение.

Comparative analysis of middle mass molecules concentration in blood and vaginal washing liquid and also the nitric oxide cycle system studying in reproductive age women on various stages of the ovarian tumors development was carried out in the article. It was shown that nitrites' metabolism in reproductive age women with the ovarian tumors has some changes like variable increase of nitrites' levels when progressing the tumor process from nonmalignant to malignant. On the grounds of carried out correlation between the general and local middle molecules content, received data and comparison with another indices of nitrous metabolism the authors have made a conclusion about uterine origin of the increased middle mass molecules concentration in women with the ovarian tumors.

Заболєваемість раком яєчників (РЯ) остається стабільно високою во всем мире. В Україні летальність больных РЯ на первом году после установления диагноза составляет 35%. Риск заболеть РЯ на протяжении жизни составляет 1,5%, и 1 из 100 женщин может умереть от данного заболевания. Это обусловлено: а) отсутствием достоверных критериев на этапе дифференциальной диагностики между доброкачественными опухолями яичников и РЯ; б) отсутствием системы скрининга контингента больных с наследственной отягощенностью по РЯ; в) отсутствием систематизированных информационных программ по выявлению достоверных признаков не визуальных форм рака; г) относительно редким использованием лапароскопии для дифференциальной диагностики доброкачественных новообразований и РЯ [1; 2; 5; 7-9; 12].

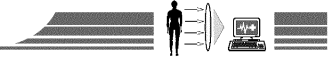
В последние годы возрастает интерес к изучению роли оксида азота в патогенезе различных опухолевых заболеваний. При этом показано, что эндогенный NO обладает двояким действием. С одной стороны, его локальные эффекты рассматриваются как один из механизмов возникновения мутаций в клетках различных органов и тканей человеческого организма. А с другой стороны, оксид азота обладает противоопухолевым действием, индуцируя процесс апоптоза опухолевых клеток, либо участвуя в механизмах их цитотоксического лизиса. Несмотря на безусловный интерес к изучению места и роли оксида азота в канцерогенезе, в настоящее время многие принципиальные вопросы остаются не решенными, что в первую очередь обуславливается методологическими и методическими трудностями изучения этих эффектов на уровне целого организма. Прежде всего, следует отметить, что образование и действие ок-

сида азота имеет четко локальное значение. В последующем в течение 3-10 секунд NO превращается в другие окислы азота: первоначально в NO^2 , который и может быть определен в плазме крови [4; 6; 14; 15].

С учетом актуальности поиска новых прогностических критериев и патогенетических механизмов развития опухолевой патологии яичников, изучение уровня молекул средней массы (МСМ) в крови представляет определенный научный и клинический интерес. К молекулам МСМ относят продукты распада белков и нуклеопротеидов – токсины, имеющие массу от 500 до 5000 Да. В последнее время все большее число отечественных и зарубежных авторов высказывают предположения о том, что МСМ являются продуктами нормального обмена веществ в организме человека, однако увеличение их уровня связывают с усилением их образования в тканях с последующим выходом в кровь. При ряде патологических состояний уровень МСМ коррелирует с тяжестью состояния больных и может быть показателем степени эндотоксикоза [3; 10].

С другой стороны, содержание нитрита натрия в плазме крови, как показано многими исследователями, по-видимому, достаточно точно регулируется на относительно постоянном уровне. В этих процессах регуляции главная роль принадлежит почкам. Вместе с тем, известно, что некоторые авторы при изучении онкогенеза обнаруживали увеличение концентрации NO плазме крови [13].

В связи с этим, **ЦЕЛЮ** нашего **ИССЛЕДОВАНИЯ** явилось проведение сравнительного анализа уровней молекул средней массы в крови и влагалищных смывах, а также изучение состояния системы цикла оксида азота у женщин репродуктивного возраста на разных стадиях раз-



вития опухолей яичников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Материалом исследования явились результаты обследования 40 пациенток репродуктивного возраста с опухолевой патологией яичников, проходивших лечение в отделении инвазивных методов диагностики и лечения Центра реконструктивной и восстановительной медицины (Университетская клиника) Одесского государственного медицинского университета и отделении онкогинекологии Одесского областного онкологического диспансера. Отбор пациенток проходил по методу «случай-контроль» таким образом, что первую группу составили 20 пациенток с доброкачественной опухолевой патологией яичников, а во вторую группу были включены 20 пациенток с гистологически верифицированной аденокарциномой яичников (стадия IC-IIIС). Средний возраст пациенток составил $47 \pm 6,7$ лет и достоверно не различался между группами. Группу контроля (третью группу) составили 70 практически здоровых пациенток аналогичной возрастной группы. У всех женщин в одно и то же время суток (9 часов утра), в одном и том же состоянии (за 1 час до планового оперативного вмешательства) было набрано 5 мл венозной крови и 100 мл мочи, которые в течение 30 минут доставлялись в лабораторию.

Состояние цикла оксида азота оценивали по величинам его основного метаболита – NO_2^- в плазме крови и моче. Определение проводили по методике, в основу которой положен способ определения конечного стабильного продукта неферментативного окисления NO , нитрит – аниона $[\text{NO}_2^-]$, образующегося в результате взаимодействия NO с водой, что дает возможность судить о качестве образованного оксида азота. Сущность методики заключается в спектрофотометрическом (при длине волны 540 нм) определении NO_2^- в исследуемых жидкостях – плазме крови и моче. Для обнаружения $[\text{NO}_2^-]$ использо-

вали реактив Грисса (раствора сульфаниламида и N-нафтил этилендиамин дигидрохлорида в 30% ледяной уксусной кислоте) в качестве цветообразующего реагента (дает малиновое окрашивание при наличии NO_2^- в жидкостях). Полученные результаты соотносили со стандартной калибровочной кривой, полученной на основе серийных разведений растворов нитрита натрия в диапазоне концентраций от 10 до 1000 мкмоль. Содержание NO_2^- в биологических жидкостях рассчитывали по формуле:

$$\text{NO}_2^- (\text{мкмоль/л}) = \text{Еиссл.} \times \text{K}(\text{NaNO}_2) \text{ мкмоль/л} : \text{ЕстNaNO}_2$$

Где, Еиссл. и Ест. – поглощение исследуемой пробы и стандартного образца соответственно;

К – концентрация NaNO_2 , рассчитанная по калибровочной кривой.

Одновременно регистрировали молекулы средней массы в плазме крови и во влагищных смывах. Молекулы средней массы (МСМ) определяли в плазме крови и во влагищных смывах указанных групп женщин по методу В.В. Николайчука и соавт. [11]. Для получения влагищного смыва использовали 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, получая при этом от 7 до 8 мл смыва. Обработка полученных данных проводилась с помощью стандартных статистических методик.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием компьютерной программы “Statistica” 6.0. Вычисление результатов проводилось на ЕОМ Pentium-IV 800.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно морфологической характеристике, распределение пациенток в первой группе было следующим (Рисунок 1).

У 3 (15,0%) пациенток была выявлена эндометриома яичника, у 2 (10,0%) больных – дермоидная киста. Муцинозная и серозная цистаденома имели место в 35,0% (7 женщин) и 40,0% (8 женщин) случаев соответственно.

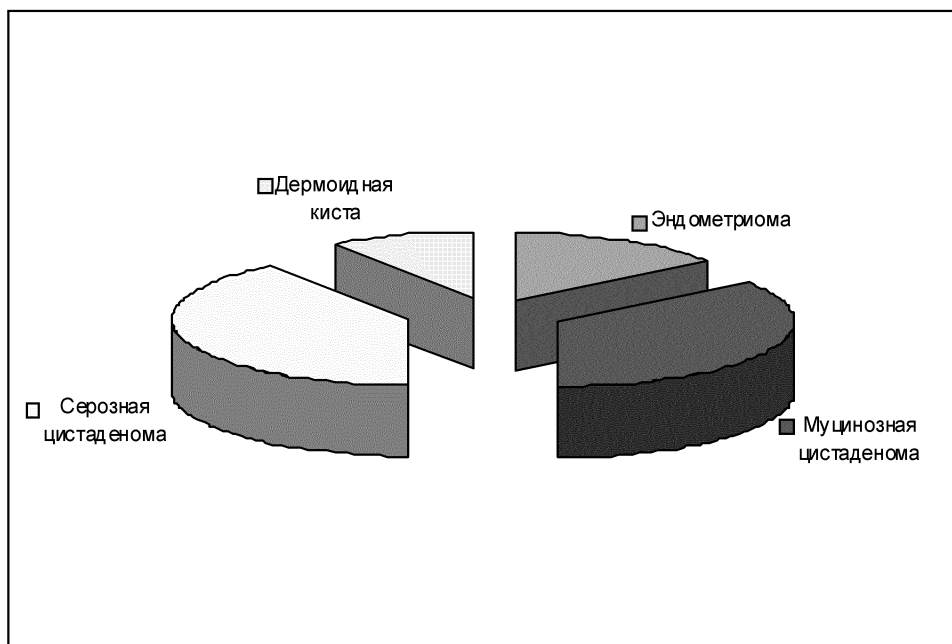


Рисунок 1. Распределение различных вариантов опухолей яичников в первой группе.

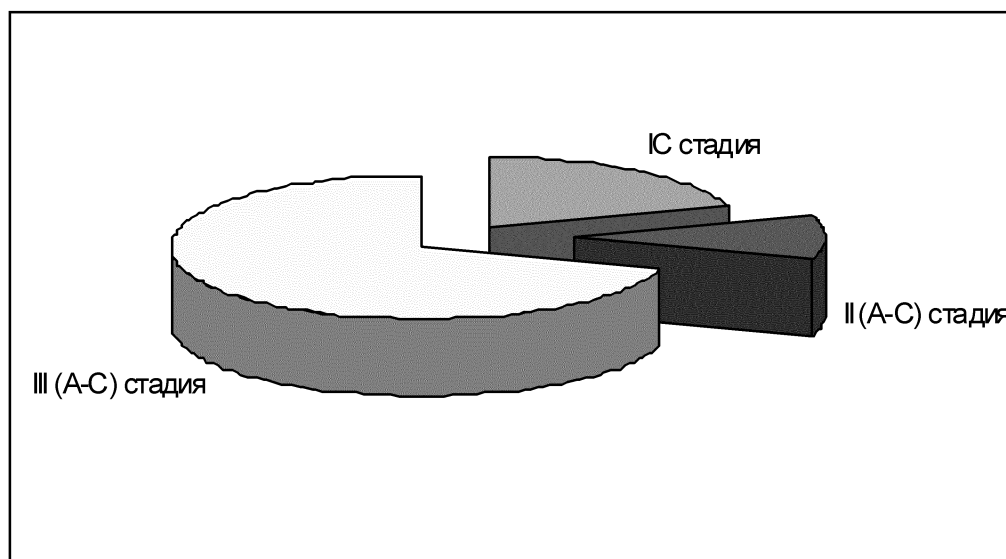


Рисунок 2. Распределение пациенток второй группы согласно стадии заболевания.

Согласно стадии заболевания, распределение больных второй группы было следующим (Рисунок 2).

Среди пациенток с гистологически верифицированным РЯ 14 (70,0%) больных имели III (A-C) стадию заболевания, 4 (20,0%) женщины – IC стадию, и 2 (10,0%) пациентки – II (A-C) стадию заболевания согласно классификации TNM.

Анализ уровней МСМ у пациенток исследуемых групп показал следующее (Таблица 1).

Таблица 1
Концентрация МСМ в плазме крови пациенток с опухолями яичников, М±m

Длина волны	I группа (n = 20)	II группа (n = 20)	III группа (n = 70)
254 нм	201,2±3,2 мг/мл	244,8±4,3 мг/мл	184,1±4,4 мг/мл
280 нм	77,1±5,4 мг/мл	148,4±4,1 мг/мл	51,2±3,9 мг/мл

При длине волны 254 нм средняя концентрация МСМ в плазме крови больных с РЯ составила 244,8±4,3 мг/мл, тогда как в группе пациенток с доброкачественными опухолями яичников она была равна 201,2±3,2 мг/мл, а в контрольной группе данный показатель составил 184,1±4,4 мг/мл. Исследование содержания МСМ в плазме крови пациенток второй группы (пациентки с РЯ) при длине волны 280 нм показало, что средний уровень МСМ был равен 148,4±4,1 мг/мл, достоверно превышая таковой в первой (пациентки с доброкачественными опухолями яичников - 77,1±5,4 мг/мл) и контрольной (практически здоровые пациентки) группах (51,2±3,9 мг/мл).

Сравнив полученные данные с показателями концентрации МСМ во влагалищных смывах женщин исследуемых групп, мы установили, что данные показатели коррелировали с таковыми, полученными при исследовании плазмы крови (Таблица 2).

Таблица 2

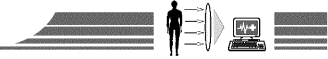
Концентрация МСМ во влагалищных смывах пациенток с опухолями яичников, М±m

Длина волны	I группа (n = 20)	II группа (n = 20)	III группа (n = 70)
254 нм	229,1±4,4 мг/мл	251,7±5,1 мг/мл	167,4±4,2 мг/мл
280 нм	46,1±4,4 мг/мл	48,8±3,7 мг/мл	22,4±4,1 мг/мл

При длине волны 254 нм концентрация МСМ во влагалищных смывах больных с РЯ составляла 251,7±5,1 мг/мл, тогда как в группе практически здоровых женщин данный показатель был равен 167,4±4,2 мг/мл, а в группе женщин с доброкачественными опухолями яичников – 229,1±4,4 мг/мл.

При длине волны 280 нм средний уровень МСМ во второй группе (пациентки с РЯ) составил 48,8±3,7 мг/мл, что не превышает таковой показатель в первой группе (46,1±4,4 мг/мл), но достоверно выше аналогичного показателя в контрольной группе (практически здоровые пациентки) – 22,4±4,1 мг/мл. Следует отметить, что при анализе каждого конкретного случая, наиболее высокий уровень МСМ отмечался у больных с опухолевыми образованиями яичников, имеющих отягощенный генеалогический анамнез. Данное обстоятельство весьма интересно с точки зрения современных взглядов на ведущую роль генетического фактора в развитии данной онкогинекологической патологии.

Таким образом, у больных репродуктивного возраста с наличием опухолей яичников имеет место значительное повышение уровня МСМ как в плазме крови, так и во влагалищных смывах. С одной стороны данный факт может говорить о большей выраженности синдрома метаболической интоксикации, индикатором которого общепризнанно являются МСМ. С другой стороны, учитывая переоценку взглядов на функции МСМ в последнее время, полученные данные наводят на мысль о



заинтересованности МСМ в механизмах развития данной патологии. Несомненно, необходимо дальнейшее более углубленное изучение функциональной активности МСМ в организме, а также возможности их использования в качестве прогностического маркера при опухолевой патологии яичников.

Таким образом, при опухолевых процессах яичников у женщин репродуктивного возраста имеет место возрастание концентрации средних молекул в плазме крови, особенно МСМ280, которые являются продуктами распада белков с высоким содержанием органических аминокислот. Данное обстоятельство, безусловно, указывает на появление признаков эндогенной интоксикации у женщин с гиперпластическими процессами эндометрия.

Однако, изменение их концентрации в плазме крови еще не свидетельствует об источнике их образования и не исключает возможности уменьшения выведения МСМ из организма. В значительной мере на эти вопросы отвечают результаты определения МСМ во влагалищных смывах. Во-первых, аналогично плазме крови, обнаружено повышение их концентрации. Во-вторых, также как и в плазме крови, больше возрастали МСМ280 с сохранением такой же кратности увеличения. Наконец, их абсолютная концентрация во влагалищных смывах существенно превышает таковую, выявляемую в плазме крови, т.к. при получении влагалищных смывов жидкость разводится не меньше, чем в 6-7 раз. Причем, необходимо заметить, что абсолютные величины МСМ особенно значительны, а данная фракция как раз и связана с распадом нуклеопротеидов. О том, что увеличение МСМ имеет скорее всего маточное происхождение свидетельствует и тот факт, что концентрации других конечных продуктов азотистого обмена – мочевины и креатинина у всех больных находились в пределах физиологической нормы и составляли $5,9 \pm 0,1$ ммоль/л и $56,3 \pm 0,1$ мкмоль/л соответственно. Следовательно, повышение уровня средних молекул не связано с изменением функционального состояния печени и почек.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что обмен нитритов в организме женщин репродуктивного возраста с наличием опухолевых процессов яичников претерпевает определенные изменения.

Во-первых, концентрация NO^2 в плазме крови у женщин первой группы имеет нарастающую тенденцию к повышению. При этом достоверное увеличение содержания NO^2 имеет место лишь у больных раком яичников (вторая группа) (Таблица 3). Причем, эти изменения происходили на фоне стабильных показателей NO^2 в моче и, более того, даже с определенной тенденцией к снижению

Таблица 3

Общая активность оксида азота у пациенток с опухолями яичников, $\text{M} \pm \text{m}$

Концентрация NO_2	I группа (n = 20)	II группа (n = 20)	III группа (n = 70)
Плазма крови (мкмоль/мл)	$4,0 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	4,6
Моча (мкмоль/мл)	$2,9 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,1$	1,5-4

Данное обстоятельство свидетельствует о том, что наблюдаемое повышение концентрации нитритов в плазме крови не связано с их ретенцией почками, и, следовательно, является отражением увеличения их образования в организме женщин с исследуемой патологией.

Исходя из того, что основным источником NO_2 является оксид азота, который окисляется до нитритов, можно полагать, что у женщин репродуктивного возраста с опухолевой патологией яичников возрастает продукция оксида азота.

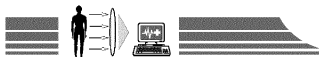
Известно, что оксид азота – это один из основных бактерицидных факторов полиморфноядерных лейкоцитов. После активации Т-лимфоцитами или бактериальными эндотоксинами макрофаги, нейтрофилы, эндотелиальные клетки синтезируют NO , который быстро проникает в микроорганизмы, опухолевые клетки, где ингибирует важные для дыхания и жизнедеятельности клетки ферменты, осуществляя цитотоксическое действие. Можно полагать, что процесс развития опухоли сопровождается увеличением образования NO и значимым оно становится тогда, когда малигнизированные клетки подвергаются атаке макрофагами. Учитывая тот факт, что процесс образования оксида азота ограничен лишь тканью яичника, после чего NO_2 поступает в кровь, то, в результате разведения, значительных изменений в плазме крови не происходит.

Вместе с тем, параллелизм в образовании и изменении содержания в исследуемых группах NO_2 и МСМ позволяет считать, что данные процессы патогенетически взаимосвязаны. А четкое увеличение концентрации МСМ во влагалищных смывах указывает на их образование преимущественно в органах малого таза. Причем, следует обратить внимание на тот факт, что абсолютные величины концентрации молекул средней массы во влагалищном секрете в действительности превышают полученные нами показатели для смывов не менее, чем в 5-6 раз в связи с происходящим разведением при получении влагалищных смывов.

Таким образом, обмен оксида азота и молекул средней массы изменяется при опухолевой патологии яичников, причем еще в период доброкачественной опухолевой трансформации клеток яичника, что указывает на изменения, которые предшествуют онкогенезу и резко возрастают уже при развитии злокачественных опухолей яичников.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. – СПб.: «ООО Издательство Фолиант», 2002. – 542 с.: ил.
2. Вишневецкая Е.Е. Справочник по онкогинекологии. – Мн.: Беларусь, 1994. – 432 с.
3. Гоженко А.И., Дубинина В.Г., Долomatov С.И., Рыбин А.И. Молекулы средней массы у женщин репродуктивного возраста с гиперпластическими процессами эндометрия // Одесский медицинский журнал. – 2003. - №6(80). – С. 59-61.
4. Дубинина В.Г., Рыбин А.И. Біологічна роль оксиду азоту в ендометрії жінок репродуктивного віку // Одеський медичний журнал. - 2002. - №4(72). – С. 112-114.
5. Запорожан В.Н. Акушерство и гинекология. В двух книгах. – К.: Здоров'я, 2001. – 820 с., ил.
6. Запорожан В.Н., Насибуллин Б.А., Дубинина В.Г., Рыбин А.И. NO -синтазная активность при различных видах гиперпластических процессов эндометрия // Вестник морфологии. –



2003. – Т.9. - №1. – С. 17-19.

7. Запорожан В.М., Цегельський М.Р. Акушерство та гінекологія. - К.: Здоров'я, 1996. - 240 с.

8. Запорожан В.М., Цегельський М.Р. Гінекологічна патологія: Атлас: Навч. Посібник. – Одеса: Одес. Держ. Мед. ун-т, 2002. – 308с.

9. Клиническая онкогинекология: Руководство для врачей / Под ред. В.П. Козаченко. – М.: Медицина, 2005. – 376с.: ил.

10. Нагоев Б.С., Габрилович М.И. Значение определения средних молекул в плазме крови при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. - №1. – С. 9-11.

11. Николайчук В.В., Моин В.М., Кирковский В.В. и др. Способ определения «средних молекул» // Лабораторное дело. – 1991. - №10. – С.13-18.

12. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Молекулярная генетика рака яичников // Практическая онкология. – 2000. - №4. – С. 3-6.

13. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицын. – М.: Наука, 1998. – 159с.

14. Cameron I.T., Norman J. Nitric oxide in the human uterus. / Rev. Reprod. – 1997. - Vol.1. – P. 61-68.

15. Lowenstein C., Synder S.H. Nitric oxide: a novel biologic messenger. // Cell. – 1994. – Vol. 70. – P. 705-707.

Сведения про авторов:

Дубинина Владлена Геннадиевна, д.мед.н., профессор, Директор Университетской клиники ОГМУ. 65027, г. Одесса, Валиховский переулок, 2. Одесский государственный медицинский университет.

Рыбин Андрей Игоревич, врач-онкогинеколог, к.мед.н., ассистент кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики, терапии и радиационной медицины ОГМУ, врач-ординатор отделения онкогинекологии Одесского областного онкологического диспансера. 65055, г. Одесса, ул. Неждановой 32, Одесский областной онкологический диспансер.

Тел. 720-26-17. +38-067-785-25-49

Амбросийчук Елена Витальевна, врач акушер-гинеколог, заведующая отделением гинекологии Родильного дома №7 г. Одессы.
