

Маркеры эндометриальных биологических жидкостей в диагностике опухолей придатков матки

Е. Г. Шварёв¹, Л. В. Дикарёва¹, Д. Л. Оводенко², А. К. Аюпова³, Г. Е. Шварёв⁴

¹Кафедра акушерства и гинекологии педиатрического факультета с курсом последипломного образования
ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Россия, 414000, Астрахань, ул. Бакинская, 121;

²отделение комбинированных и комплексных методов лечения ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4;

³лаборатория физики конденсированного состояния ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет»;
Россия, 414056, Астрахань, ул. Татищева, 20а;

⁴ГБУЗ АО «Областной онкологический диспансер»; Россия, 414041, Астрахань, ул. Алексеева, 57

Контакты: Евгений Григорьевич Шварёв geshvarev09@rambler.ru

Как известно, проблемы интенсификации и оптимизации догоспитальной диагностики во многом определяют успех лечения и являются одними из наиболее важных его разделов. Именно такой подход позволяет рассчитывать на проведение эффективного органосохраняющего лечения и тем самым максимально сохранить репродуктивные возможности женщин. Нерешенной в наши дни остается проблема скрининга увеличивающихся в популяции предраковых и раковых заболеваний тела и придатков матки. Между тем необходимость регулярных мер профилактики в аспекте формирования рассматриваемых болезней заключается в высоких шансах их ликвидации именно при раннем выявлении. В работе проанализированы и представлены клиничко-лабораторные данные о 176 пациентках, из которых 45 (25,6 %) — женщины контрольной группы, не имевшие заболеваний репродуктивных органов, 87 (49,4 %) — пациентки с опухолями придатков матки различного гистологического строения и 44 (25,0 %) — больные с воспалительными процессами придатков матки.

Цель исследования — усовершенствовать диагностику опухолей придатков матки путем выявления структурных и биохимических маркеров заболевания в менструальных выделениях и эндометриальных смывах.

В исследовании использовались клинический, патогистологический, цитологический, биохимический, статистический методы, а также методы клиновидной дегидратации биологических жидкостей и трансвагинальной эхографии.

Ключевые слова: опухоли придатков матки, эндометриальные смывы, менструальные выделения, структуры фаций, окислительная модификация белков (карбонильные группы белков)

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-4-76-80

Markers of endometrial biological fluids in the diagnosis of uterine adnexal tumors

E. G. Shvarev¹, L. V. Dikaryova¹, D. L. Ovodenko², A. K. Ayupova³, G. E. Shvarev⁴

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Pediatrics with Course of Postgraduate Education, Astrakhan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia;

²Department of Combined and Complex Treatments, Acad. V. I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia; 4 Academician Oparin St., Moscow, 117997, Russia;

³Laboratory of Condensed State Physics, Astrakhan State University; 20a Tatishchev St., Astrakhan, 414056, Russia;

⁴Regional Oncology Dispensary; 57 Alekseev St., Astrakhan, 414041, Russia

As it is known, the problem of intensification and optimization of pre-hospital diagnostics largely determines the success of treatment and is one of its most important items. It is this approach that gives an opportunity for effective, preserving organs, treatment and thus at most saves reproductive abilities of women. Nowadays the problem of screening precancerous and cancerous diseases of uterine body and appendages, which are increasing in population, is still unsolved. It is the necessity of regular prophylactic measures, in the aspect of forming the considered diseases, that consists in high chances of their elimination just when they are early revealed. The object of research is clinico-laboratory data of 176 patients consisted of 45 (25.6 %) women control group without tumors of reproductive organs, all the rest were divided into two groups: the first one consisted of 87 (49.4 %) patients with ovarian tumors (benignant and malignant) and the second group included 44 (25.0 %) patients with adnexitis.

Objective: to improve the diagnostics of the adnexitis tumors by identification structural and biochemical markers in menstrual discharges and endometrial washes.

The study used clinical, pathohistological, cytological, biochemical, statistical methods and the methods wedge-shaped dehydration of biological liquids, transvaginal echography.

Key words: adnexitis tumors, endometrial washes, menstrual discharges, structural peculiarities of facies, oxidative modification of proteins (carbonyl groups of proteins)

Введение

Не будет преувеличением считать, что ранняя, а тем более дифференциальная диагностика заболеваний внутренних гениталий остается одной из наиболее сложных проблем гинекологии. Особое значение она приобретает при формировании концепции раннего выявления опухолей придатков матки, когда отсутствует или крайне скудна симптоматика, размеры патологических образований минимальны и нет распространения на другие органы (как известно, в этих случаях лечебные мероприятия оказываются наиболее щадящими и эффективными, а репродуктивный прогноз — максимально благоприятным). Внутренняя анатомическая локализация, сложность микроскопической структуры новообразований женских гонад, нечеткие границы между опухолями различной степени зрелости и многообразие их сочетаний — все это существенно усложняет раннее выявление опухолей яичников (ОЯ) и создает препятствия для рационального планирования лечения больных [1, 2]. Следует упомянуть и мнение экспертов Всемирной организации здравоохранения об отсутствии до сих пор надежных программ скрининга предопухолевой и опухолевой патологии тела матки и яичников.

Между тем статистические данные отечественных и зарубежных ученых убедительно свидетельствуют не только о неуклонном росте заболеваемости, но и об «омоложении» контингента больных доброкачественными и злокачественными гормонозависимыми опухолями репродуктивных органов [3]. Этот факт объясняется не только ростом средней продолжительности жизни, но и существенным увеличением в популяции таких «болезней цивилизации», как ожирение, ановуляция, хроническая гиперэстрогения, бесплодие, возросшей частотой воспалительных заболеваний матки и придатков, а также многократными «агрессивными» акушерско-гинекологическими манипуляциями [4, 5]. Поэтому необходимость формирования нового подхода к «активному поиску» пациенток с предопухолевыми и ранними опухолевыми заболеваниями внутренних гениталий следует рассматривать прежде всего с позиции разработки нового скринирующего теста как одного из наиболее перспективных способов их вторичной профилактики [6].

Известно, что при опухолевом росте митохондриальное окисление вытесняется гликолизом — более примитивным способом энергообеспечения. Это сопровождается образованием активных форм кислорода и лежит в основе стимуляции свободнорадикального окисления в организме (состояние, получившее название оксидативного стресса (ОС)). Свободные радикалы поражают все виды биологических макромолекул, в первую очередь белки клеток и биологических жидкостей (БЖ) организма [7]. Этот процесс может лежать и в основе структурно-функциональных

нарушений органов репродуктивной системы, в том числе при развитии предопухолевой и опухолевой трансформации яичниковой ткани. Однако для окончательного формирования опухоли нужен значительный объем патологически деформированных молекулярных составляющих клетки, а следовательно, и длительный временной интервал, на завершающем этапе которого становится уже возможным использование традиционных цитологических и гистологических методов исследования. В этом одна из причин смещения формирующейся клинической картины и, соответственно, инициации диагностических мероприятий заболевания на более позднее время.

Важно отметить, что структурные изменения эндометрия, как гормонозависимой ткани, во многом зависят от функционального состояния яичников. Именно ткань эндометрия наиболее чутко реагирует на изменения гомеостаза органов репродуктивной системы, в том числе и на функциональные нарушения при формировании опухолей гонад. В этой связи следует указать на описанную М.А. Володиным и соавт. (1987) способность ряда ферментов и их изоформ накапливаться в апикальных отделах железистых клеток, а затем выделяться в состав эндометриального секрета при гиперпластических процессах и раке эндометрия [7].

Как известно, в состав менструальных выделений (МВ) кроме собственно крови и фрагментов отторгающегося эндометрия также входят эндометриальный и эндоцервикальный секрет. С учетом сказанного можно предположить, что и маркеры ОС, среди которых наиболее ранними являются карбонильные группы белков (КГБ), могут быть выявлены в МВ и эндометриальных смывах (ЭС) обследуемых пациенток при формировании ОЯ задолго до появления манифестных признаков заболевания [8–11].

Традиционно морфологические исследования в медицине сосредоточены главным образом на тканях и клеточных элементах, в то время как особенности строения БЖ остаются малоизученными. Перспективным в этом отношении является микроскопическое исследование структур сухой капли (фации), образующихся в БЖ при ее переходе в твердую фазу в результате процесса дегидратации. Это новое научное направление получило название морфологии БЖ. Суть нового метода диагностики состоит в том, что в норме микроскопическая картина исследуемой капли БЖ имеет более или менее однородную структуру, а при малейшем воздействии различных повреждающих факторов (окислительных, токсичных) гидратная оболочка белков изменяется и начинаются процессы агрегации молекул.

По мнению профессоров В.Н. Шабалина и С.Н. Шатохиной (2001), фация — это структурный портрет молекулярных взаимосвязей в БЖ, позволяющий вывести глубинные микропроцессы на макроуровень [11]. Микроскопическая картина фации отли-

чается структурами, характерными для каждого вида БЖ человека, связанными с особенностями течения физиологических и патологических процессов в организме [12]. При использовании технологии морфологического анализа БЖ «литос-система» даже самые начальные патологические изменения молекулярных структур можно наблюдать сразу же, без «инкубационного периода», необходимого для оценки изменений на клеточном, органном и/или системном уровнях. Следовательно, морфологический анализ БЖ открывает возможности для наиболее ранней диагностики развивающегося патологического процесса.

Таким образом, количественный анализ содержания маркеров ОС с одновременным определением структурных микроскопических особенностей твердой фазы МВ и ЭС предлагается нами в качестве нового диагностического (и прогностического) подхода для оценки состояния внутренних гениталий у женщин репродуктивного и (это особенно важно!) перименопаузального возраста.

Материалы и методы

Проанализированы клиничко-лабораторные данные 176 пациенток, из них 87 (49,4 %) — больные эпителиальными ОЯ (59 — с доброкачественными ОЯ и 28 — с раком яичников), 44 (25,0 %) — пациентки с хроническими воспалительными процессами придатков матки, 45 (25,6 %) — женщины, не имевшие заболеваний репродуктивных органов (контрольная группа). По возрасту и характеру экстрагенитальной патологии пациентки указанных групп были сопоставимы.

Для получения ЭС использовали специальные одноразовые катетеры диаметром 1,4 мм. Стерильным одноразовым шприцем в полость матки вводили (а затем аспирировали) 0,9 % раствор натрия хлорида в количестве 4–5 мл, который затем центрифугировали. Супернатант использовали для дальнейшей работы по оценке биохимических и структурных показателей, а из осадка готовили препараты для цитологического анализа.

Оценка содержания КГБ. В супернатантах ЭС обследованных пациенток определяли концентрацию белка биуретовым методом Кингслея—Вейксельбаума. Интенсивность окислительной деструкции белков оценивали по уровню их карбонильных производных с использованием метода, основанного на реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [2, 8].

Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразинов регистрировали при длине волны 363 нм. При расчете уровня карбонильных производных использовали коэффициент молярной экстинкции — $22000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Результаты выражали в нмоль/мг белка. Полученный показатель анализировали с учетом результатов патогистологического исследования удаленных новообразований придатков матки.

Метод клиновидной дегидратации заключается в микроскопическом исследовании структур, образующихся при высыхании капли БЖ на твердой подложке [13]. Для этого стандартные предметные стекла размером 75×25 мм предварительно замачивали на 24–48 ч в растворе детергента, затем промывали в проточной воде в течение 10 мин и помещали в смесь Никифорова, состоящую из равных частей спирта и эфира, на 30 мин. Стекла вытирали сухой безворсовой тканью, после чего на их поверхность наносили 0,2 мл исследуемой БЖ и высушивали при комнатной температуре. Через 18–24 ч полученную пленку — фацию — исследовали под микроскопом в проходящем свете.

Фации БЖ описывали по следующему плану:

- наличие зон, ширина периферической зоны (узкая, средняя, широкая — половина длины радиуса фации и более), четкость ее границы;
- наличие трещин, их количество, расположение (радиальное, циркулярное, в виде беспорядочной сети) по зонам и форма (аркообразные, прямые, трехлучевые);
- наличие и форма конкреций;
- наличие аномальных структур (языковых полей, складчатости, структур листа и др.).

Фотографирование фации проводилось с использованием CCD-камеры, соединенной с персональным компьютером. С помощью программы ASUS формировали компьютерную базу изображений.

Для объективизации оценки сформировавшихся структур в исследуемых ЭС нами были рассчитаны специальные коэффициенты.

Окончательное уточнение гистотипа исследуемого образования проводилось путем сопоставления результатов цитологического и гистологического исследований операционного материала с данными строения фации.

Результаты

Выбор МВ (и ЭС) в качестве исследуемого объекта объясняется не только научным любопытством (из-за их малоизученности), но также и тем, что раз в месяц в достаточном для исследования объеме (от 10 до 80 мл у здоровых женщин) эта БЖ спонтанно выделяется из полости матки и может быть самостоятельно собрана пациентками (в прокладки или специальные колпачки) для проведения лабораторного анализа.

Как уже было сказано, ткань эндометрия очень чутко реагирует на изменения гомеостаза органов репродуктивной системы, в том числе увеличением содержания маркеров ОС в ЭС, в частности КГБ, при формировании ОЯ. Так, у женщин контрольной группы с нормальным строением яичников содержание КГБ в ЭС находилось в пределах $0-1,9 (0,9 \pm 0,14)$ нмоль/мг. При увеличении показателя до $2,0-3,5 (2,8 \pm 0,28)$ нмоль/мг в большинстве случаев были вы-

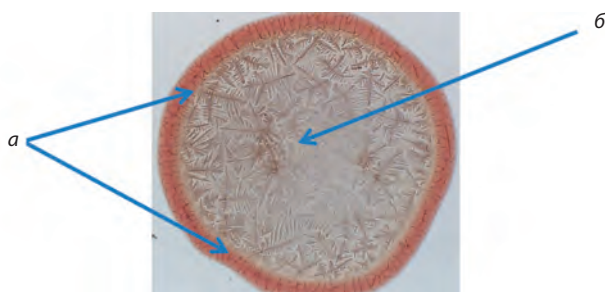


Рис. 1. Фация ЭС пациентки контрольной группы, $\times 10$: а — периферическая зона с радиальными трещинами; б — солевая зона

явлены доброкачественные ($p < 0,05$), а при $3,6-4,9$ ($4,8 \pm 0,25$) нмоль/мг — злокачественные ОЯ ($p < 0,01$).

Содержание КГБ в МВ больных доброкачественными ОЯ также было достоверно выше, чем у больных хроническими воспалительными процессами придатков матки и у пациенток контрольной группы ($p < 0,01$).

Микроскопическая картина фации ЭС у женщин контрольной группы в репродуктивном возрасте характеризовалась четкой зональностью. В большинстве случаев регистрировались 2 зоны: периферическая — с радиальными трещинами и центральная, содержащая кристаллы солей, реже трещины — прямые, радиальные, как продолжение трещин периферической зоны (рис. 1).

Кроме того, в 24,8 % случаев в фации ЭС женщин этой группы появлялась третья промежуточная зона, расположенная между 2 вышеописанными, содержащая трехлучевые трещины.

У пациенток с хроническими воспалительными процессами придатков матки и при обострении процесса величины площадей трехлучевых и радиальных трещин достоверно не отличались от аналогичных показателей женщин контрольной группы. Однако в этих случаях в картине фации появлялись «языковые» структуры (маркеры воспаления), «закрутки» и жгуты (маркеры гипоксии).

Фации ЭС больных доброкачественными ОЯ и раком яичников заметно отличались по своему строению от таковых у женщин контрольной группы. Зональность фации ЭС сохранялась у больных доброкачественными ОЯ всех возрастных периодов, причем в 68,4 % случаев уже присутствовала зона трехлучевых трещин (рис. 2).

У больных раком яичников площадь зоны трехлучевых трещин на поверхности фации заметно увеличилась — до $2,2 \pm 0,10$ мм² (рис. 3), достоверно отличаясь от таковой в контроле ($p < 0,01$) и в группе больных доброкачественными ОЯ ($p < 0,05$). Пло-

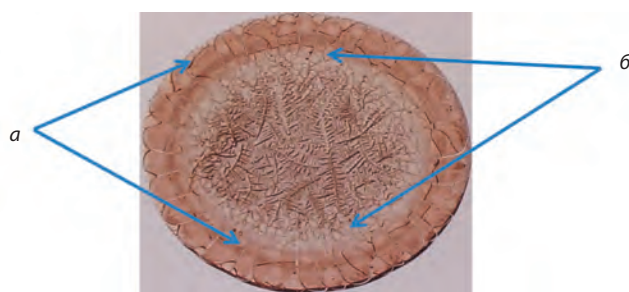


Рис. 2. Фация ЭС больной доброкачественной ОЯ, $\times 10$: а — периферическая зона с радиальными трещинами; б — трехлучевые трещины

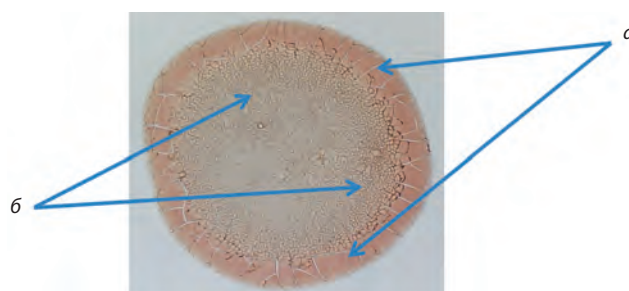


Рис. 3. Фация ЭС больной злокачественной ОЯ, $\times 10$: а — периферическая зона с радиальными трещинами; б — трехлучевые трещины

щадь периферической зоны с радиальными трещинами находилась в пределах $6,1 \pm 0,42$ мм² и не отличалась от таковой у женщин контрольной группы.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что микроскопическая картина фации ЭС и МВ имеет четкие отличительные особенности у больных доброкачественными, пограничными и злокачественными ОЯ. Включение методов структурного и биохимического анализа ЭС и МВ в диагностический комплекс у пациенток из групп риска по развитию ОЯ позволит увеличить чувствительность и повысить специфичность проводимого обследования.

Важными преимуществами предлагаемого способа диагностики являются неинвазивность и атравматичность забора изучаемого материала, возможность многократного повторения исследования в условиях женских консультаций, проведения анализов силами лабораторий лечебно-профилактических учреждений. Полученные результаты подтверждают возможность выявления заболевания ОЯ на начальных этапах его развития, когда наиболее реальным становится выполнение органосберегающих операций и тем самым сохранение репродуктивного здоровья женщин.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ашрафян Л.А., Киселёв В.И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). М., 2007. 216 с. [Ashrafyan L.A., Kiselyov V.I. Tumors of genital organs (etiology and pathogenesis). Moscow, 2007. 216 p. (In Russ.)].
2. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков. Успехи современной биологии 1993;113(1):71–81. [Dubinina E.E., Shugaley I.I. Oxidative modification of albumens. Uspekhi sovremennoy biologii = Successes of Modern Biology 1993;113(1):71–81. (In Russ.)].
3. Радзинский В.Е. Акушерская агрессия. М., 2011. 92 с. [Padzinsky V.E. Obstetric aggression. Moscow, 2011. 92 p. (In Russ.)].
4. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. Л., 1989. 398 с. [Bohman Ya.V. Guidance on oncogynecology. Leningrad, 1989. 398 p. (In Russ.)].
5. Оводенко Д.Л., Шварёв Е.Г., Дикарёва Л.В. Диагностическое значение идентификации карбонильных групп белков в биологических жидкостях больных опухолями яичников. Журнал акушерства и женских болезней 2008;57(3):50–5. [Ovodenko D.L., Svaryov E.G., Dikaryova L.V. Diagnostic value of the identification of the carbonyl group of albumens in biologic liquids of patients with ovaries' tumors. Zhurnal akusherstva i zhenskih bolezney = Obstetrics and Gynecopathies Journal 2008;57(3):50–5. (In Russ.)].
6. Оводенко Д.Л. Биохимические и морфоструктурные маркеры биологических жидкостей в диагностике заболеваний придатков матки. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. [Ovodenko D.L. Biochemical and morphostructural markers of biologic liquids in the diagnosis of diseases of uterine appendages. Author's abstract of thesis ... of candidate of medical sciences. Moscow, 2009. (In Russ.)].
7. Володин М.А., Шварёв Е.Г., Бохман Я.В., Сафронникова Н.Р. Способ диагностики аденокарциномы эндометрия. Патент на изобретение. 1987. [Volodin M.A., Shvaryov E.G., Bohman Ya.V., Safronnikova N.R. Method of diagnosis of the endometrium acinic cell carcinoma. The patent issuing № 1319354. 1987. (In Russ.)].
8. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинко-биохимические процессы. СПб., 2006. 394 с. [Dubinina E.E. Products of oxygen metabolism in cells' functional activities (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical and biochemical processes. Saint-Petersburg, 2006. 394 p. (In Russ.)].
9. Карселадзе А.И. Некоторые проблемы клинической морфологии эпителиальных опухолей яичников. Практическая онкология 2000;(4):14–8. [Karseladze A.I. Some problems of the clinical morphology of ovaries' epithelial tumors. Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology 2000;(4):14–8. (In Russ.)].
10. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 г. М., 2012. 260 с. [Chissov V.I., Starinsky V.V., Petrova G.V. Malignancies in Russia in 2010. Moscow, 2012. 260 p. (In Russ.)].
11. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М., 2001. 304 с. [Shabalin V.N., Shatokhina S.N. Morphology of human biologic liquids. Moscow, 2001. 304 p. (In Russ.)].
12. Урманчеева А.Ф., Кутушева Г.Ф., Ульрих Е.А. Опухоли яичника. СПб.: Н-Л, 2012. 28 с. [Urmancheeva A.F., Kutusheva G.F., Ulrich E.A. Ovarial tumors. Saint-Petersburg: N-L, 2012. 28 p. (In Russ.)].
13. Шатохина С.Н., Шабалин В.Н. Диагностика различных патологических состояний по морфологической картине биологических жидкостей (литос-система): медицинская технология. М., 2009. 79 с. [Shatokhina A.N., Shabalin V.N. Diagnosis of different pathologic statuses by the morphologic picture of biologic liquids (lithos-system): medical technology. Moscow, 2009. 79 p. (In Russ.)].