

## ОСОБЕННОСТИ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКИХ И ОКСИДАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ СЛИЗИСТОЙ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ

Боровиков И.О., Сторожук А.П., Томина О.В., Назаренко Е.И., Данилова Н.Р.,  
Потапова И.А., Эль-Мусауи Н.Н.

*ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: bio2302@mail.ru*

В результате проведенных цитобиохимических исследований шейки матки при ВПЧ-ассоциированной цервикальной интраэпителиальной неоплазии легкой степени выявлено угнетение макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-1 девиации с интенсификацией образования реактивных форм азота и кислорода, которые становятся причиной изменений молекулярных, субклеточных и клеточных структур. Кроме того, в эпителиоцитах усиливается образование реактивных форм кислорода и азота, что вызывает пероксидативные процессы липидов и интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода. Имеющиеся иммунологические и цитобиохимические изменения при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки легкой степени становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, а изменение метаболических процессов играет значительную роль в патогенезе и переходе процесса в более тяжелые формы. Изменения показателей оксидативного статуса цервикальной зоны у больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазией легкой степени показывают необходимость дифференцированного подхода при коррекции метаболических нарушений, что определяет целесообразность в дополнение к традиционной терапии использование местных препаратов с антиоксидантной направленностью.

Ключевые слова: шейка матки, цервикальная интраэпителиальная неоплазия легкой степени, цитобиохимия макрофагов, оксидативная система.

## FEATURES OF CITOBIOCHEMICAL AND OXYIDANTS PROCESSES OF CERVICAL MUCOSA WITH MILD CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

Borovikov I.O., Storojuk A.P., Tomina L.A., Nazarenko E.I., Danilova N.R.,  
Potapova I.A., El-Musaui N.N.

*Kuban state medical university, Krasnodar, Russia (350063, M. Sedina street, 4), e-mail: bio2302@mail.ru*

As a result of the spent cytobiochemical researches of a neck of cervical HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia easy degree oppression macrophages link of the local immunity promoting Th-1 deviation with an intensification of formation of jet forms of nitrogen and oxygen which become the reason of changes of molecular, subcellular and cellular structures is revealed. Besides, in epithelian cell formation of jet forms of oxygen and nitrogen that causes peroksidativnye processes of the lipids and intensive formation free-radical oxygen forms amplifies. Available immunological and cytobiochemical changes at HPV-associated defeats of cervics of easy degree become the factors breaking structures of cellular membranes, and change of metabolic processes plays a considerable role in pathogenesis and process transition in heavier forms. Changes of indicators the oxidants status cervical zones at patients HPV-associated cervical intraepithelial neoplasia show to easy degree necessity of the differentiated approach at correction of metabolic infringements that defines expediency in addition to traditional therapy use of local preparations with antyoxidants orientation.

Keywords: cervix, cervical intraepithelial neoplasia, mild citobiochemistry macrophages, oxidants system.

### Ведение

Папилломавирусная инфекция (ПВИ) – одна из самых распространенных инфекций в мире, инфицированность вирусом папилломы человека (ВПЧ), по данным различных авторов, составляет от 38 до 82% [1, 2, 5]. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) – наиболее частые заболевания, ассоциированные с ПВИ, являются предраковыми поражениями шейки матки [3, 6]. Персистенция вируса с длительной активной экспрессией

вирусных онкогенов инициирует многостадийный процесс, в результате которого клетки эпителия шейки матки претерпевают изменения, способствующие опухолевой прогрессии [1, 3, 8]. За последние десятилетия отмечены существенные достижения в проблеме изучения патогенеза заболеваний шейки матки [1, 5]. При этом именно ранние стадии поражения шейки матки, а именно CIN легкой степени, представляет наибольшую актуальность в начальном аспекте патогенеза, поскольку именно понимание механизма возникновения и прогрессирования процесса на данной стадии дает нам возможность в последующем разработать наиболее эффективную и «щадящую» терапию без применения деструктивных методов. При этом многие авторы приходят к выводу, что инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ – необходимое, но недостаточное событие для возникновения цервикальных неоплазий [1, 2, 3, 6]. В настоящее время в литературе обсуждаются различные иммунные и оксидативные нарушения в генезе предраковых заболеваний шейки матки [2, 7, 9].

В некоторых работах по онкоцитобиохимии доказана способность метаболитов перекисного окисления липидов вызывать повреждение ДНК клетки, что послужило открытию оригинальной концепции генотоксического типа оксидативного канцерогенеза [4, 9, 10]. В эпителиальных клетках с интегрированной формой ВПЧ отмечается повышенная экспрессия генов E6 и E7, кодирующих эти онкобелки. Было установлено, что там, где наблюдается активная экспрессия белков ВПЧ, отмечен высокий уровень NO. Репродукция ВПЧ индуцирует образование агрессивного метаболита LOO в инфицированных клетках, который является самостоятельным повреждающим фактором и создает дополнительные условия для прогрессирования процесса.

В патогенезе каждого паранеопластического процесса значительную роль играет молекулярные и субклеточные механизмы: нарушение транспорта электронов, усиление образования генераторов свободных форм кислорода и пероксидрадикалов, понижение антиоксидантной активности крови. Пероксидазы с функциональной точки зрения являются ферментами, катализирующими в присутствии перекиси водорода окисление различных субстратов [4, 6, 9]. МПО и перекись водорода значительно усиливают бактерицидную активность ряда фенолов посредством перевода их в соответствующие хиноны [6, 8]. Кроме того, МПО в присутствии перекиси водорода и окисляемого кофактора действует против различных микроорганизмов, вирусов, микоплазм, патогенных грибов и участвует в обезвреживании их токсинов [4, 10]. Миелопероксидазная система является основной бактерицидной системой макрофагов, дифференцирующихся из моноцитов при эмиграции последних из крови в очаг воспаления. По количеству пероксидазоположительных макрофагов и по содержанию в них активного фермента можно судить о потенциальной защитной активности слизистой, в том числе и при воспалении урогенитальной системы,

вызванной инвазией папилломавирусов [10]. Многие авторы отмечают тесную корреляционную зависимость между активностью лизосомальной кислой фосфатазы и функциональной активностью макрофагов, в особенности их бактерицидной функцией. Руководствуясь этим фактором, а также тем, что, с одной стороны, сенсibilизированные лимфоциты в присутствии антигена могут выделять лимфокины, активирующие макрофаги, в результате чего изменяется их ферментативная активность [4, 7, 9], с другой – сами папилломавирусы и сопутствующая им микрофлора могут оказывать прямые иммунодепрессивные либо активирующие эффекты, изменяя функциональную активность фагоцитов, мы исследовали в соскобах из уретры активность кислой фосфатазы макрофагов.

Таким образом, изучение иммуноцитобиохимических дисфункций позволит определить патогенетические особенности ВПЧ-ассоциированных CIN и совершенствовать методы лечения данной патологии.

Целью настоящего исследования явилась оценка состояния макрофагального и оксидативного статуса цервикальной зоны у больных с цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой степени.

#### **Материалы и методы**

В ходе выполнения работы было обследовано 200 человек с цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой степени (CIN I), находившихся на обследовании и лечении в базовой акушерско-гинекологической клинике КубГМУ, женских консультациях №4 и №5 г. Краснодара, ГБУЗ ККБ №2, Краевом перинатальном центре ГБУЗ ДККБ, а также лаборатории ООО «ВИП КЛИНИК ГРУПП» г. Краснодара, и 30 условно здоровых женщин (биохимический контроль). Проведено клиническое, кольпоскопическое, цитогистологическое и микробиологическое исследование. С целью исключения потенциального влияния сопутствующих урогенитальных инфекций на исследуемые параметры в группы исследования были включены пациентки с отсутствием или пролеченными не менее, чем за месяц до исследования, урогенитальными инфекциями. Диагноз ПВИ устанавливался на основании клинико-микробиологического и цитологического обследования (жидкостная цитология – технология ThinPrep®, Pap-smear test). Диагностику инфицированности различными типами ВПЧ проводили с помощью ВПЧ Digene-теста (система «HPV Digene-test®»).

Исследование цитохимических показателей клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы слизистой цервикального канала включало определение активности миелопероксидазы, кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы в макрофагах соскобов матки. МПО исследовали ультрацитохимическим методом по Gracham and Karnovsky, КФ методом одновременного азосочетания по Burstone в модификации Zeya Н. с

использованием в качестве субстрата нафтол-AS-BI-фосфата при pH 5,0 и в качестве диазосоставляющей прочного гранатового GBC. Мазки фиксировали в парах формалина, докрасивали гематоксилином по Mowry R., НЭ по Burgess A. с использованием в качестве диазосоставляющей прочного синего ВВ с докраской ядерным красным [9]. Активность исследованных ферментов, регистрировали по проценту клеток с выявленной активностью фермента, а также визуальным полуколичественным методом с использованием принципа Karlow [10].

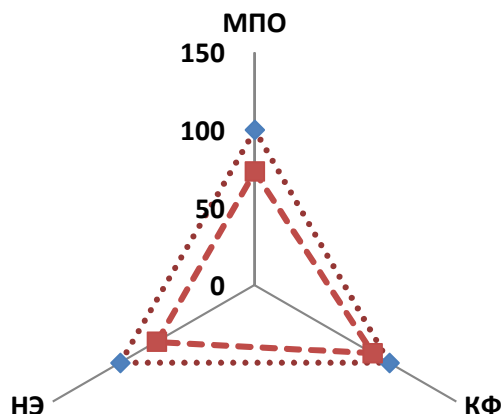
Состояние окислительных процессов в слизистой шейки матки на фоне CIN I включало определение NO, реактивных форм кислорода (супероксидрадикалы, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и липидов (пероксидрадикалы, LOO<sup>-</sup>). В основе метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) лежит феномен поглощения микроволнового излучения сверхвысоких частот частицами, обладающими некомпенсированным магнитным моментом. Образцы цервикального смыва помещали в полиэтиленовые трубочки диаметром 0,5 см и длиной 1-1,5 см и замораживали при температуре жидкого азота (-196°C). ЭПР – спектры регистрировались на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), снабженном компьютерной программой накопления сигналов. Для определения содержания свободного оксида азота в образцах цервикального смыва использовали спин-метку-диэтилдитиокарбамат натрия (DETC) (SIGMA) в дозе 1,75 мг на мл жидкости. С целью определения содержания супероксидрадикалов применялась спин-ловушка 5,5диметил-1пирилин-N-оксид (DETC) (SIGMA) дозой 5 мМ DMPO на 1 мл жидкости. С целью определения содержания пероксидрадикалов использовали спин-ловушку α-фенил-tert-бутилнитрон (PBN) (SIGMA) дозой 50 мг PBN на 1 мл жидкости.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с методами, принятыми в вариационной статистике, с использованием свободного программного обеспечения – системы статистического анализа R (R Development Core Team, 2008, достоверным считали различие при  $p < 0,05$ ). Для оценки корреляционных взаимосвязей отдельных изучаемых параметров использовали коэффициент Пирсона (r).

### **Результаты и обсуждение**

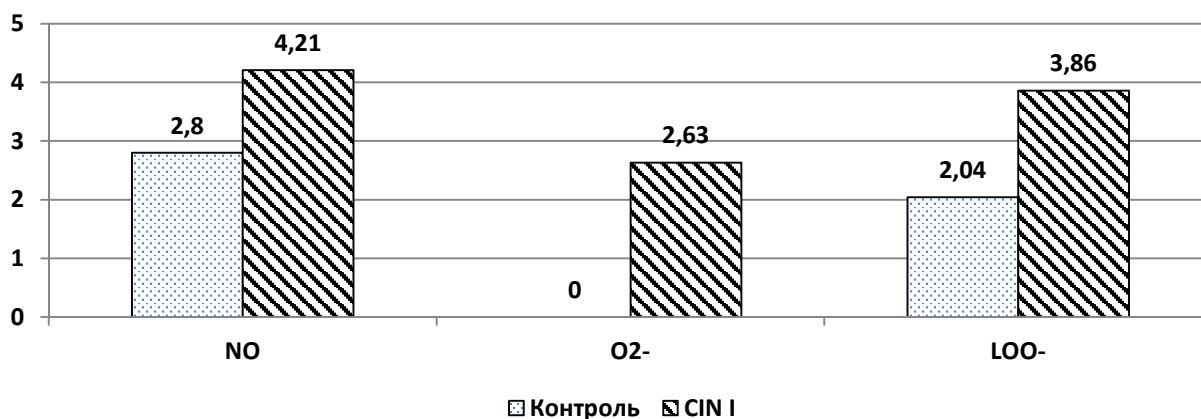
В ходе проведенного исследования выявляемая активность миелопероксидазы, отражающей один из компонентов кислородзависимой бактерицидной системы макрофагов цервикальной зоны у больных CIN I, была более чем на треть ( $P < 0,05$ ) ниже таковой определенной у здоровых лиц контрольной группы (рис. 1). Активность КФ встречается в мелкогранулярной форме с преимущественно цитоплазматической локализацией. Активность кислой фосфатазы у ВПЧ-инфицированных пациенток практически не отличалась от соответствующего параметра контроля, тогда как выявляемая активность

неспецифической эстеразы, коррелирующая с субактивационными характеристиками макрофагов, до лечения у женщин, страдающих CIN, находилась на достоверно ( $P < 0,05$ ) более низком уровне.



**Рисунок 1.** Активность ферментов (СЦП) макрофагов цервикальной зоны больных CIN I (% от контроля)

Также в ходе проведенных исследований выявлено, что при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки легкой степени интенсивность ЭПР сигнала спинмеченных пероксидрадикалов ( $LOO^-$ ) увеличивается на 60,8% ( $p < 0,05$ ), также регистрируются сигналы супероксидрадикалов ( $O_2^-$ ), которые в контрольной группе не регистрируются, увеличение интенсивности сигнала ЭПР спинмеченого оксида азота ( $NO$ ) возрастает на 50,1% по сравнению с контролем (рис. 2).



**Рисунок 2.** Содержание свободного оксида азота ( $NO$ ), реактивных форм кислорода ( $O_2^-$ ) и липидов ( $LOO^-$ ) в слизистой шейки матки

Таким образом, исходя из анализа результатов исследований, можно заключить, что в случае ВПЧ-ассоциированного поражения шейки матки легкой степени имеет место угнетение макрофагального звена локального иммунитета, способствующего Th-1 девиации с интенсификацией образования реактивных форм азота и кислорода, которые становятся причиной изменений молекулярных, субклеточных и клеточных структур. Кроме того, в эпителиоцитах усиливается образование реактивных форм кислорода и азота ( $O^{2-}$  и NO), что вызывает пероксидативные процессы липидов ( $LOO^{\cdot}$ ) и интенсивное образование свободнорадикальных форм кислорода. Имеющиеся иммунологические и цитобиохимические изменения при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки легкой степени становятся факторами, нарушающими структуры клеточных мембран, а изменение метаболических процессов играет значительную роль в патогенезе и переходе процесса в более тяжелые формы. Изменения показателей оксидативного статуса цервикальной зоны у больных ВПЧ-ассоциированной цервикальной неоплазией легкой степени показывают необходимость дифференцированного подхода при коррекции метаболических нарушений, что определяет целесообразность в дополнение к традиционной терапии, использование местных препаратов с антиоксидантной направленностью.

### Список литературы

1. Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 32 с.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. Рекомендации.– СПб.: Фолиант, 2000. – 104 с.
3. Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Папилломавирусная инфекция и патология шейки матки // Гинекология. – 2009. – Т.3. - №3. – С. 77-81.
4. Павлюченко И.И., Басов А.А., Быков И.М., Орлова С.В. Интегральные уровни оценки эндогенной интоксикации и перекисного окисления биомолекул при острых и хронических заболеваниях // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т.5. - №4. – С. 551-554.
5. Патология шейки матки и генитальные инфекции / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 383 с.
6. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: (руководство практикующего врача). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 144 с.

7. Топуриа М., Маисурадзе Н.З., Саникидзе Т.В., Мусеридзе Н.Г. Окислительные процессы в слизистой ткани влагалища и шейки матки при папилломавирусной инфекции // *Georgian Medical News.* – 2005. - №3. – С. 30-33.
8. Axline S. Functional biochemistry of macrophages. – *Seminars Hemat.* – 1970. – V.7. – P. 1239-1260.
9. Bosch F., Manos M., Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst* 87:796-802, 2009.
10. Kaplow L. Clinical significance of leucocyte alkaline phosphatase determinations. *Rev. Roum. Med. Int.* –1973. – V.10. - №5. – P. 365-372.

**Рецензенты:**

Куценко И.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.

Быков И.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.