

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.831.43-006.634-07

©Коллектив авторов

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В КИСТОЗНОЙ ЖИДКОСТИ КРАНИОФАРИНГИОМ

И.А. АРЕФЬЕВА, Ж.Б. СЕМЕНОВА, А.Г. КОРШУНОВ, М.С.
ЗУБАЙРАЕВ, Т.С. КРАСНОВА, С.К. ГОРЕЛЫШЕВ, М.Ш. ПРОМЫСЛОВ

Институт нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко РАМН, 125047 Москва, 4-я
Тверская-Ямская ул., 16. E-mail: iarefyeva@nsi.ru

Сравнение состава содержимого кист, полученного при удалении краниофарингиом, и плазмы крови выявило существенную интенсификацию процессов свободно-радикального окисления липидов и накопление лактата в кистозной жидкости, наиболее выраженные в опухолях эндосупраселлярной локализации. Максимальная интенсивность радикалообразования в сочетании с низким содержанием конечного продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида (МДА) и высокой антиоксидантной активностью наблюдалась в кистах первичных опухолей с относительно высокой пролиферативной активностью. В кистах рецидивных опухолей обнаружено самое низкое радикалообразование и максимальное содержание МДА. Первичные опухоли с низким пролиферативным потенциалом имели промежуточные значения определяемых параметров. Таким образом, измерение интенсивности радикалообразования и концентрации МДА в кистозной жидкости позволяет с определенной долей уверенности оценить уровень пролиферативной активности опухоли и вероятность ее рецидивирования.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, краниофарингиома, кистозная жидкость, рецидивирование опухоли

ВВЕДЕНИЕ. Краниофарингиомы представляют собой дизэмбриогенетические опухоли хиазмально-селлярной локализации кистозного, солидного или смешанного строения и составляют от 1,2 до 3% опухолей головного мозга у взрослых и 9% у детей [1,2]. На сегодняшний день радикальность хирургического лечения краниофарингиом достаточно высока при уровне летальности от 0 до 4% [3,4]. Вместе с тем, по-прежнему высоким остается число рецидивов. Даже при тотальном удалении опухоли, по данным различных авторов, оно составляет до 10 - 17% [4,5]. Неоднозначность результатов лечения, вероятно, связана с

выраженной неоднородностью гистобиологических свойств краниофарингиом. В свою очередь, хирургическое лечение рецидивов представляет большие сложности, сопровождается высокой летальностью и снижением качества жизни больных.

Задачей настоящего исследования является выработка достоверных критериев, позволяющих прогнозировать течение заболевания и вероятность возникновения рецидивов, а также выбирать оптимальные методы лечения. Мы полагаем, что успешному решению данной проблемы может способствовать комплексное изучение краниофарингиом, включающее клинико-морфологический и биохимический анализ. На наш взгляд наиболее информативным и доступным для биохимического анализа является содержимое опухолевых кист, т.к., во-первых, кистообразование отражает интенсивность протекающих в опухоли дегенеративных процессов, а, во-вторых, кистозная жидкость представляет собой достаточно хорошо охарактеризованный гомогенный объект, удобный для исследования.

Известно, что неспецифической реакцией организма на повреждение (в том числе и опухолевое) является активация процессов радикалообразования и перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. Данных о состоянии этих процессов в кистозной жидкости и крови больных с краниофарингиомами в литературе нет. Поэтому мы исследовали интенсивность радикалообразования, концентрацию продуктов ПОЛ, антиоксидантную активность (АОА), содержание лактата и pH в кистозном содержимом и крови больных, чтобы, учитывая локализацию и пролиферативную активность опухоли, выявить корреляцию между определяемыми параметрами и вероятностью рецидивирования опухоли.

МЕТОДИКА. Характеристика клинического материала. Исследованы 55 образцов кистозной жидкости и 38 образцов крови от 55 больных, оперированных по поводу краниофарингиомы (14 повторно). Возраст больных составлял от 3 до 49 лет. В связи с отсутствием возрастных различий в составе кистозного содержимого деление больных по возрастным категориям не проводилось.

Биохимические исследования. В пробах кистозной жидкости и плазмы крови определяли интенсивность радикалообразования, концентрацию продуктов ПОЛ, собственную антиоксидантную активность, концентрацию лактата и, по возможности, pH. Общую антиоксидантную активность оценивали по торможению окисления линоленовой кислоты кислородом воздуха в присутствии ионов Fe^{2+} [7]. Содержание одного из наиболее стабильных продуктов перекисного окисления липидов - малонового диальдегида (МДА) определяли спектрофотометрически по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [8]. Интенсивность процессов радикалообразования оценивали хемилюминесцентным методом на приборе ХЛМ-3 («Бикап», Россия) [9] по максимальной высоте пика хемилюминесценции (макс. ХЛ) и площади под кривой (S ХЛ). Величину максимума ХЛ для удобства графического представления данных выражали в условных единицах: 1 усл. ед. = 10 мВ, площадь под кривой – усл. ед. * мин. Концентрацию лактата определяли с помощью набора фирмы «Bioscop». Измерение pH кистозной жидкости, взятой в шприц без доступа воздуха, проводили на анализаторе кислотно-основного состояния фирмы «Ciba Korning».

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета статистических программ Excel-5.

Иммуногистохимические исследования. Для иммуногистохимического изучения замороженных и залитых в парафин срезов 20 биоптатов

краниофарингиом был применен непрямой пероксидазно-антипероксидазный метод с использованием окрашивающего набора реагентов (DAKO LSAB Kit). Проллиферирующие клетки выявляли с помощью моноклональных антител к ДНК-топоизомеразе II α (клон Ki-S1, 1:70, Dako, Дания) с дополнительным окрашиванием ядер гематоксилином.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Интенсивность радикалообразования (макс. ХЛ и S ХЛ), концентрация малонового диальдегида (МДА) и лактата в кистозной жидкости краниофарингиом существенно повышены по сравнению с аналогичными показателями крови (табл. 1). Общая антиоксидантная активность кистозной жидкости также достоверно превышает АОА крови больных, сниженную по сравнению с показателями донорской крови (100 %). При периодической замене части кистозного содержимого физиологическим раствором наблюдается снижение параметров ХЛ и концентрации МДА при относительно неизменном содержании лактата. Характерная кривая изменения изучаемых параметров в процессе «отмывания» кисты представлена на рис. 1.

Таблица 1. Перекисное окисление липидов и содержание лактата в крови и кистозной жидкости больных с краниофарингиомами ($X \pm m$)

Параметры	Кистозная жидкость	Кровь	p
Макс. ХЛ (усл. ед.)	$2,30 \pm 0,18$ (n=55)	$0,62 \pm 0,03^*$ (n=38)	$< 0,001$
S ХЛ (усл. ед. * мин.)	$48,3 \pm 4,5$ (n=55)	$13,0 \pm 0,8^*$ (n=38)	$< 0,001$
МДА (ммоль/л)	$4,42 \pm 0,6$ (n=47)	$1,10 \pm 0,07^*$ (n=38)	$< 0,001$
АОА (%)	$72,8 \pm 2,8$ (n=50)	$57,0 \pm 4,8^*$ (n=38)	$< 0,001$
Лактат (мг %)	$66,4 \pm 7,0$ (n=15)	$12,0 \pm 2,4^*$ (n=14)	$< 0,001$
РН	7.19 ± 0.06 (n=7)	$7.37 \pm 0.01^* (n=10)$	$< 0,05$

Примечание. Здесь и далее представлены средние величины (\pm ошибка средней). В скобках – количество образцов

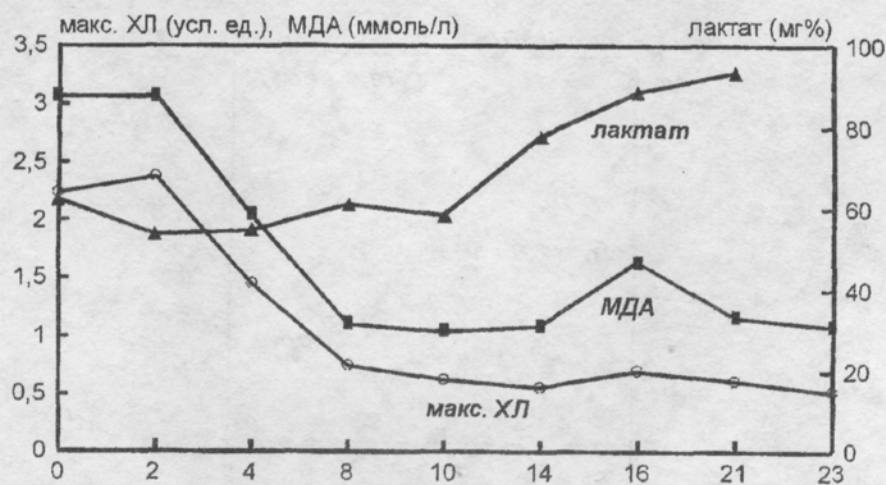


Рисунок 1.

Типичное изменение состава кистозной жидкости при периодическом удалении части кистозного содержимого и замены его эквивалентным объемом физиологического раствора («отмывание кисты»)

Определение индекса мечения ядер пролиферирующих клеток (Ki-S1) в биоптатах, полученных при удалении краниофарингиом, позволило выделить три группы больных: первую группу составили пациенты с первичными опухолями с низкой пролиферативной активностью ($Ki-S1 < 1$), вторую - с первичными краниофарингиомами с элементами злокачественного роста ($Ki-S1 > 1$) и третью - больные с рецидивами опухоли и относительно высоким индексом мечения ($Ki-S1 > 1$). В таблице 2 представлены данные, характеризующие выраженность ПОЛ в кистах больных этих групп. К сожалению, малое количество исследованных биоптатов и большой разброс данных внутри групп не позволили выявить достоверных различий в параметрах ХЛ и ПОЛ между выделенными группами. В то же время из таблицы 2 очевидно, что наиболее интенсивно процессы радикалообразования идут в первичных кистах опухолей с относительно высокой пролиферативной активностью. В этих же кистах обнаруживается минимальное количество конечного продукта перекисного окисления липидов - МДА и наибольшая антиоксидантная активность.

Таблица 2. Показатели перекисного окисления липидов в кистозной жидкости краниофарингиом разной степени злокачественности ($\bar{X} \pm m$)

№	Группы	макс. ХЛ (усл. ед.)	МДА (ммоль/л)	макс.ХЛ МДА	АОА (%)
1	Ki-S1 < 1 (n=13)	$1,76 \pm 0,19$	$3,22 \pm 0,53$	$0,70 \pm 0,09$	$71,4 \pm 5,5$
2	Ki-S1 > 1 перв. (n=3)	$10,24 \pm 4,2$	$2,95 \pm 0,44$	$3,2 \pm 1,2$	$89,0 \pm 4,5$
3	Ki-S1 > 1 рецидив. (n=4)	$1,05 \pm 0,29$	$3,77 \pm 0,9$	$0,31 \pm 0,08^*$	$68,7 \pm 18,4$

Примечание: * - $p < 0.01$ по сравнению с первой группой.

Введение коэффициента, равного отношению макс. ХЛ к концентрации МДА, позволило выявить достоверные различия в уровне ПОЛ у больных 1 и 3 групп. Достоверных отличий по сравнению со второй группой и в этом случае получено не было, хотя все три значения коэффициента с вероятностью 99% не входят в массивы значений, образующих первую и третью группы. Абсолютные значения коэффициента макс. ХЛ/МДА у обследованных больных представлены на рис. 2.

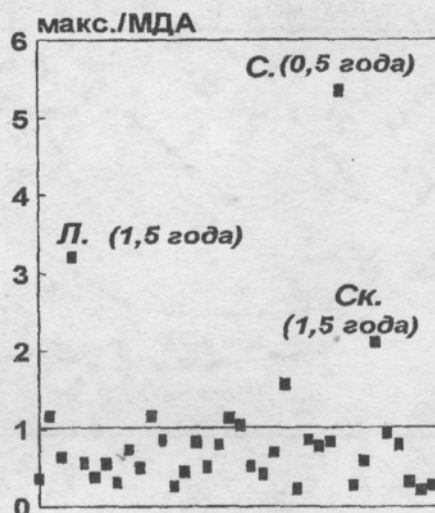


Рисунок 2.

Распределение коэффициента макс.ХЛ/МДА в кистозной жидкости у больных с краниофарингиомами (в скобках указаны сроки возникновения рецидивов)

К сожалению, нам не удалось выявить достоверных различий в содержании продуктов ПОЛ в кистозной жидкости в зависимости от локализации опухоли (табл. 3), т.к., учитывая приведенные выше результаты, при выделении групп необходимо было принимать во внимание пролиферативную активность опухоли, а также ее первичное или рецидивное возникновение. Такие ограничения резко уменьшили количество больных в группах, что позволило получить статистически достоверные результаты только по макс. ХЛ. Тем не менее, существует тенденция к накоплению МДА в кистах опухолей эндосупраселлярной локализации по сравнению со стебельными и экстраинтравентрикулярными краниофарингиомами.

Таблица 3. Перекисное окисление липидов в кистозной жидкости первичных краниофарингиом различной локализации ($X \pm m$)

Локализация	макс. ХЛ (усл. ед.)	МДА (ммоль/л)	АОА (%)
Эндосупраселлярные (n=9)	$2,74 \pm 0,38$	$4,39 \pm 0,68$	$70,3 \pm 6,3$
Стебельные и экстраинтравентрикулярные (n=10)	$1,40 \pm 0,24 *$	$2,42 \pm 0,63$	$74,9 \pm 7,1$

Примечание: * - $p < 0.05$.

В литературе имеется сравнительно небольшое количество работ, посвященных исследованию состава содержимого кист, сопровождающих опухоли ЦНС, в частности, краниофарингиомы. Практически во всех работах отмечено, что по содержанию основных белков (альбумина, иммуноглобулинов и α_2 -макро-глобулина) кистозная жидкость соответствует плазме крови, что свидетельствует в пользу гипотезы, объясняющей образование опухолевых кист нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера [10].

Поскольку кистозная жидкость находится в замкнутом пространстве, ограниченном частично проницаемой капсулой, можно полагать, что ее состав отражает процессы, происходящие в опухолевой ткани. Так, в ряде работ описано повышение активности лактатдегидрогеназы и фосфогексоизомеразы в кистозных жидкостях, находящееся в прямой зависимости от степени злокачественности опухоли [11]. В кистах краниофарингиом обнаруживалась также секреция муцина [10] и хорионического гонадотропина [12]. При изучении состава опухолей супраселлярной локализации у детей методом магнитнорезонансной спектроскопии [13] были обнаружены существенные различия в спектрах краниофарингиом, аденом гипофиза и глиом хиазмы. Глиомы хиазмы демонстрировали профиль холина, N-ацетиласпартата и креатина с аномальным по сравнению со здоровой тканью мозга соотношением холин/N-ацетиласпартат. Аденомам гипофиза соответствовал одиночный пик холина или полное отсутствие метаболитов. Краниофарингиомы давали характерный доминантный пик, соответствующий лактату или липидам с незначительной примесью других метаболитов.

В 1998 году группой голландских исследователей [14] при изучении содержания лактата и рН в 39 кистозных жидкостях у 34 пациентов с кистами первичных и метастатических опухолей ЦНС был обнаружен повышенный уровень лактата, коррелирующий со степенью злокачественности опухоли; при этом уровень рН в кистозных жидкостях был выше нормы ($7,70 \pm 0,29$). Авторы объяснили это парадоксальное явление наличием так называемого «щелочного

окружения», а также активацией процесса оттока протонов из кисты через механизм Na^+/H^+ – антипорта.

В нашей работе при анализе содержимого кист краниофарингиом и образцов крови оперированных больных было отмечено достоверное повышение концентрации лактата в кистозной жидкости при нормальном его содержании в плазме крови, но в отличие от голландских исследователей мы наблюдали соответствующее содержанию лактата снижение рН кистозной жидкости (табл. 1). Интересно отметить, что при периодическом удалении части кистозного содержимого с введением физиологического раствора уровень лактата не снижается (рис. 1), что свидетельствует о высокой интенсивности процессов анаэробного распада глюкозы. Известно, что лактат также продуцируется при жизнедеятельности макрофагов [15], которые в большом количестве присутствуют в кистозной жидкости. Следовательно, измеряемый нами уровень лактата может отражать как вклад гликолиза в метаболизм опухолевых клеток, так и активность макрофагов, т.е. интенсивность дегенеративных процессов. Для выяснения этого вопроса необходимо проведение дополнительного исследования степени активации находящихся в кистозной жидкости макрофагов (зернистых шаров).

В отличие от уровня лактата содержание перекисей липидов и радикалообразование в кистозной жидкости, исходно также существенно повышенные по сравнению с аналогичными показателями плазмы крови (табл. 1), при «отмывании» кисты снижаются до уровня, определяемого в крови (рис 1), что свидетельствует о постепенном накоплении этих продуктов в процессе роста опухоли.

Одной из важнейших задач нашего исследования являлось выявление связи между составом кисты и вероятностью рецидивирования опухоли. Анализируя данные, представленные в таблице 2, можно отметить, что максимальная интенсивность радикалообразования в кистах первичных опухолей с относительно высоким индексом мечения сочетается с низким содержанием МДА и высокой антиоксидантной активностью. Это можно объяснить быстрым ростом опухоли и наличием эффективной системы нейтрализации и удаления токсических продуктов перекисного окисления. Состав кист опухолей с низким пролиферативным потенциалом характеризуется существенно более низким радикалообразованием и соответствующим ему содержанием продуктов ПОЛ. Особый интерес представляют данные, полученные для рецидивных опухолей с высокой пролиферативной активностью. В содержимом их кист обнаружено самое низкое радикалообразование и наиболее высокое содержание МДА, т.е. по составу эти кисты существенно ближе к пролиферативно-неактивным, хотя и достоверно отличаются от них. На рис. 2 показано соотношение макс. ХЛ и МДА у всех обследованных больных. Из графика видно, что у первичных больных с высокой скоростью рецидивирования опухоли (сроки возникновения рецидивов указаны в скобках) определяемый коэффициент существенно больше единицы. У остальных 17 больных (как первичных, так и повторно оперированных) обнаружена достоверная отрицательная корреляция между соотношением макс. ХЛ/МДА и индексом мечения ядер пролиферирующих клеток (Ki-S1) ($r = -0,49$, $p < 0,05$).

Можно предположить, что при проведении операции нарушаются пути удаления продуктов ПОЛ и их накопление по принципу обратной связи тормозит радикалообразование. В качестве примера можно привести изменения, наблюдаемые в составе кистозной жидкости при рецидивировании опухоли у

больной Ск. (рис. 3). На графике видно снижение интенсивности радикалообразования и антиоксидантной активности и увеличение концентрации продуктов ПОЛ. Таким образом, очевидно, что рецидивные кисты по своему составу существенно отличаются от первичных, но, как это сказывается на свойствах опухоли, остается невыясненным.

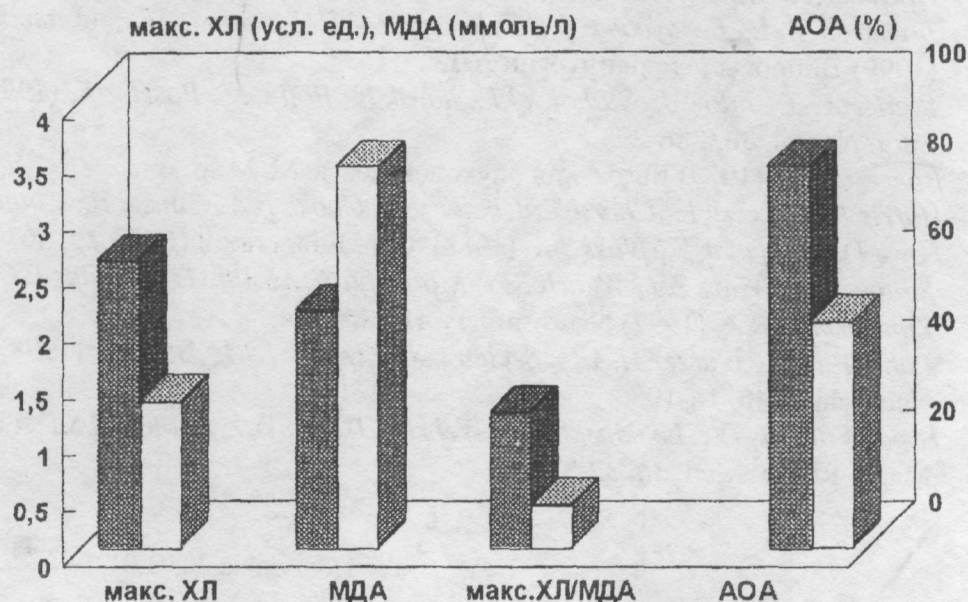


Рисунок 3.
Различия в составе содержимого кисты первичной (□) и рецидивной (■) опухоли у больной Ск.

Проведенное исследование показало, что вероятность возникновения рецидива у первичных больных увеличивается с ростом соотношения макс. ХЛ/МДА, определяемом в кистозной жидкости. Обратная закономерность (рост скорости рецидивирования при снижении коэффициента) наблюдается у повторно оперированных больных. Таким образом, определив интенсивность радикалообразования и концентрацию МДА в кистозной жидкости (без проведения биопсии), можно с определенной долей уверенности оценить уровень пролиферативной активности опухоли и вероятность ее рецидивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арендт А.А.* (1958) *Вопр. нейрохирургии* №5, 11-16.
2. *Banna M.* (1976) *Br. J. Radiol.* 49, 206-223.
3. *Hoffman H.I.* (1994) *Pediatr. Neurosurg.* 21, suppl.1, 44-49.
4. *Symon L., Pell M.F., Habib A.H.* (1991) *Br. J. Neurosurg.* 5, 539-549.
5. *De Vile C.J., Grant D.B., Kendall B.E., Neville B.G., Stanhope R., Watkins K.E., Hayward R.D.* (1996) *J. Neurosurg.* 85, 73-81.

6. Ерин А.Н., Гуляева Н.В., Никушкин Е.В. (1994) Бюлл. эксп. биол. мед. №10 343-348.
7. Промыслов М.Ш., Демчук М.Л. (1990) Вопр. мед.хим. №1, 90-92.
8. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. (1987) Вопр. мед. хим. №1, 118-122.
9. Промыслов М.Ш., Шахнович А.Р., Амчеславский В.Г., Арефьева И.А., Даушева А.А., Белоусова О.Б., Демчук М.Л., Мякота А.Е., Оганесян К.Г. (1999) Вопросы нейрохирургии №1, 11-15.
10. Szeifert G.T., Julow J., Szabolcs M., Slowik F., Bolint K., Posztor E. (1991) Surg. Neurol. 36, 286-293.
11. Воллеман М. (1977) Биохимия опухолей мозга. М. Мир.
12. Harris P.E., Perry L., Chard T., Chaudry L., Cooke B.A., Touzel R., Coates P., Lowe D.G., Afshar F., Wass J.A. (1988), Clin. Endocrinol. (Oxf.) 29, 503-508.
13. Sutton L.N., Wang Z.J., Wehrli S.L., Marwaha S., Molloy P., Phillips P.C., Zimmerman R.A. (1997) Neurosurgery 41, 388-394.
14. Lohle P.N.M., Wurzer H.A.L., Seelen P.J., Kingma L.M., Go K.G. (1998) Acta Neurochir. 140, 14-19.
15. Lypez-Villegas D., Lenkinski R.E., Wehrli S.L., Ho W.Z., Douglas S.D. (1995) Magn. Reson. Med. 34, 32-38.

Поступила 20.01.01.

LIPID PEROXIDATION IN CYSTIC FLUID OF CRANIOPHARYNGIOMAS

I.A Arefyeva, Zh.B Semenova., A.G Korshunov., M.S Zubairae., T.S Krasnova.,
S.K.Gorelyshev, M.Sh Promyslov.

Burdenko Neurosurgical Institute, Russian Academy of Medical Sciences, 4 Tverskaya-Yamskaya str., 16, 125047 Moscow, Russia, e-mail: iarefyeva@nsi.ru

Comparing of the craniopharyngiomas cyst fluid, collected during the surgery, with blood plasma revealed significantly enhanced lipid peroxidation and lactate accumulation in tumour cysts contents. These processes were usually more prominent in endosuprasellar than in suprasellar craniopharyngiomas. The maximum of free radical formation in conjunction with the lowest level of malondialdehyde (MDA) was observed in primary tumours with relatively high proliferation rate. Controversial parameters ratio characterised the recurrent craniopharyngiomas, and in cyst fluids of the primary tumours with low proliferation rate the medium parameter's values were observed. Thus, the estimation of free radical formation level and MDA concentration in cyst fluid of craniopharyngioma seems to be prognostic for the tumour recurrence.

Key words: lipid peroxidation, craniopharyngioma, cyst fluid, tumour recurrence