

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт химической физики им. Н.Н. Семенова» Российской академии наук

На правах рукописи

Ткачев Николай Анатольевич

**ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА
ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ У КРЫС**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03.01.02 — Биофизика

03.01.04 — Биохимия

Научные руководители:

доктор биологических наук,

доктор химических наук

профессор **С.Ю. Зайцев**

кандидат биологических наук

В.А. Сереженков

СОДЕРЖАНИЕ

1 Введение	5
2 Результаты собственных исследований	
2.1 Обзор литературных данных	
2.1.1 Эндометриоз	10
2.1.1.1 Понятие эндометриоза	10
2.1.1.2 Клинические особенности эндометриоза	11
2.1.1.3 Этиология эндометриоза	12
2.1.1.4 Онкологические аспекты эндометриоза	15
2.1.1.5 Особенности межклеточных взаимодействий при эндометриозе	15
2.1.1.6 Окислительный стресс и эндометриоз	17
2.1.1.7 Диагностика эндометриоза	19
2.1.1.8 Терапия эндометриоза	20
2.1.2 Гормон ингибин и его мишени	22
2.1.2.1. Общие свойства ингибина	22
2.1.2.2 Диагностическое значение ингибина	23
2.1.2.3 Молекулярные механизмы действия TGF β	24
2.1.2.4 Транскрипционный фактор kB	27
2.1.3 Оксид азота NO	28
2.1.3.1 Оксид азота в организме	28
2.1.3.2 NO-синтазы	29
2.1.3.3 Антимикробное действие	29
2.1.3.4 Аутоксическое действие	30
2.1.3.5 Эндотелиальный фактор релаксации	31
2.1.3.6 Оксид азота как нейромедиатор	31
2.1.3.7 Оксид азота как внутриклеточный мессенджер	32
2.1.3.8 Структура и механизмы образования ДНКЖ с тиолатными лигандами ..	33
2.1.3.9 Методы регистрации оксида азота	34

2.2 Материалы и методы исследования

2.2.1 Экспериментальная модель эндометриоза	37
2.2.2 Приготовление динитрозильного комплекса железа	39
2.2.3 Образование нитрозильных комплексов NO с ингибином	40
2.2.4 Наблюдение поведенческих реакций	42
2.2.5 Исследования методом ЭПР спектроскопии	43
2.2.6 Статистическая обработка данных	43

2.3 Результаты экспериментов

2.3.1. Воздействие на течение экспериментального эндометриоза гормона ингибина	45
2.3.1.1 Патологоанатомические данные	45
2.3.1.2 Гистохимическое исследование	49
2.3.1.3 Оценка дозировки ингибина при терапии эндометриоза	55
2.3.2 Воздействие на течение экспериментального эндометриоза ДНКЖ с глутатионом	58
2.3.2.1 Патологоанатомические данные	58
2.3.2.2 Гистохимическое исследование	64
2.3.2.3 Наблюдение болевых приступов у животных с экспериментальным эндометриозом	68
2.3.3 Исследования методом ЭПР-спектроскопии	70
2.3.3.1 Содержание оксида азота в тканях и органах животных с эндометриозом	70
2.3.3.2 Структура комплекса NO с ингибином	77

2.4 Обсуждение полученных результатов

2.4.1 Исследование влияния гормона ингибина на модельный эндометриоз	81
2.4.2 Исследование влияния на модельный эндометриоз низкомолекулярных ДНКЖ	86

2.4.3 Механизмы биологического действия ДНКЖ	89
2.4.3.1 Оксидативный стресс	89
2.4.3.2 Цитотоксичность оксида азота, высвобождаемого из ДНКЖ	89
2.4.3.3 Модификация эффекторов	90
2.4.3.4 Механизм биологического действия ингибина	93
2.4.3.5 Ингибирование ангиогенеза	94
3 Заключение	96
Выводы	100
Список используемой литературы	101
Список используемых сокращений	119

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Оксид азота — высокоактивное низкомолекулярное соединение, вырабатываемое в живых организмах ферментативным путём. Это важный универсальный фактор регуляции биохимических и физиологических процессов: служащий нейромедиатором, управляющий релаксацией сосудов, деятельностью иммунных клеток и регулирующий активность множества сигнальных путей в различных клетках. Причём обусловленные им эффекты могут быть весьма многообразны, а зачастую противоположны для разных концентраций, типов клеток и других параметров. Согласно современным представлениям оксид азота участвует в регуляции биохимических процессов в клетке в виде нескольких форм: непосредственно радикальная свободная форма монооксида азота, нитрозотиолы, нитрозильные комплексы железа и нитрит. В настоящее время все большее число исследователей приходят к пониманию регуляторной функции оксида азота не через низко- и высокомолекулярные нитрозотиолы [Stamler, 2013] или нитрит (группа во главе с Марком Глэдвином) [Kim-Shapiro, 2014], восстанавливаемый в кислых зонах клетки или ишемизированных тканях до NO, а посредством более стабильных димерных нитрозильных комплексов железа с тиоловыми лигандами (Б-ДНКЖ) и их мономерных форм (М-ДНКЖ) [Vanin, 2009]. При этом ДНКЖ в одних тканях способны стимулировать регенерацию (показано на моделях кожных ран, инфаркта миокарда, ишемии сетчатки), а в культурах клеток HeLa, Jurkat они оказывают цитотоксическое действие. ДНКЖ действуют как фактор релаксации сосудов, что показано при купировании гипертонического криза на людях [Chazov, 2012]; предотвращают фиброзные изменения при денервации пениса [Велиев, 2008]. Таким образом многочисленные экспериментальные данные подтверждают принципиальную возможность как аутентичного оксида азота, так и его стабильных форм (Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ), вводимых в клетки и ткани, выступать регуляторами биохимических процессов.

Эндометриоз является широко распространённым и социально значимым заболеванием. Несмотря на большое число исследований, посвящённых проблеме эндометриоза, до сих пор остаются невыясненными многие вопросы происхождения, патологии, клинических особенностей, диагностики и лечения этого заболевания. В настоящее время единственным методом лечения является хирургический, комбинируемый с терапией гормональными препаратами. Однако эти методы дают много осложнений, оставляют высокую вероятность рецидива заболевания (до 60% случаев). Гормональные лекарственные средства дорогостоящи, обеспечивают лишь временные клинические эффекты и обладают нежелательными побочными действиями [Адамян, 2003, Стрижаков, 2006].

Проблема эндометриоза является актуальной и для ветеринарии. У крупного рогатого скота эндометриозом часто осложняется хронический эндометрит (инфекционное воспаление эндометрия) [Katkiewicz, 2011]. Если в крупных хозяйствах животное предпочитают не лечить, а сразу выбраковывать, то в случае заболевания ценного производителя бесплодие или смерть могут быть недопустимы. Также постоянный стресс и болевой синдром приводят к значительному снижению продуктивности, в этом случае лечение становится необходимым. Для домашних и экзотических животных (особенно эндометриозом страдают обезьяны [D'Hooghe, 1996]) убой также, как правило, неприемлем.

Из вышеизложенного следует необходимость разработки принципиально новых подходов к терапии эндометриоза. Одним из таких подходов может быть применение эндогенных универсальных регуляторов, в частности, монооксида азота (NO) и его стабильных комплексов с железом.

Цель и задачи работы. Цель работы: изучение влияния экзогенных динитрозильных комплексов железа с глутатионом на модель эндометриоза у крыс с оценкой возможности применения этих комплексов для терапии эндометриоза, и сопоставлением их действия с влиянием естественного гормонального регулятора — фолликулярного гормона ингибина.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. оценить концентрацию эндогенных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и оксида азота в органах и тканях крыс с модельным эндометриозом;
2. исследовать воздействие низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами на течение экспериментального эндометриоза на разных стадиях;
3. определить количество восстановленных тиоловых групп в белке ингибине, для оценки степени его нативности и использования его в качестве гормонального лечебного средства.
4. исследовать воздействие гормона ингибина на течение экспериментального эндометриоза у крыс.

Положения, выносимые на защиту:

1. Терапия низкомолекулярными ДНКЖ с глутатионом в дозе 12 мкмоль/кг вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму, соотношению железистых и стромальных клеток и интенсивности воспалительного процесса;
2. Методом ЭПР-спектроскопии по интенсивности сигналов нитрозильных комплексов гемовых белков впервые оценили уровни NO в эндометриоидном очаге и тканях крысы с эндометриозом;
3. В печени, стенке эндометриоидного очага и брюшине крыс с модельным эндометриозом присутствуют эндогенные белковые ДНКЖ;
4. Количество доступных тиоловых групп в белке ингибине равно 4, что свидетельствует о высокой нативности белка, применяемого для воздействия на эндометриозный процесс;
5. Гормональная терапия ингибином вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму и соотношению железистых и стромальных клеток в эндометриоидном очаге под действием гормона ингибина.

Научная новизна.

1. Впервые в содержимом эндометриоидного очага и в печени обнаружены эндогенные белковые ДНКЖ, что свидетельствует об избыточном присутствии оксида азота и свободного железа (II). Последнее способствует усиленной

продукции высокоактивных свободных радикалов при воспалении.

2. Методом ЭПР-спектроскопии впервые оценили уровни нитрозильных комплексов гемовых белков в эндометриоидных очагах и тканях крысы с эндометриозом.
3. Показано, что фолликулярный гормон ингибин — регулятор процессов репродуктивной системы, относящийся к сверхсемейству трансформирующих ростовых факторов бета — в супрафизиологических дозах вызывает регресс эндометриоидных очагов.
4. Показано, что низкомолекулярные ДНКЖ вызывают регресс эндометриоидных очагов. Более выражено это воздействие на ранней стадии образования эндометриоидных очагов.

Практическая значимость. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном терапевтическом действии гормона ингибина на течение эндометриоза у крыс. Они послужили основой для последующих клинических испытаний этого гормона и дальнейшего утверждения его как лекарственного средства (препарат «Эндоферин®», свидетельство № 451371) для лечения эндометриоза в медицинской практике.

Результаты данной работы используются в учебном процессе ФГБОУ ВПО МГАВМиБ по дисциплинам «Биохимия», «Биохимия мембран».

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 09-04-00868аа, 12-04-00346а, также программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2012, 2014).

Личный вклад диссертанта состоял в проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, а также подготовке статей и тезисов к опубликованию. Все изложенные в диссертации новые результаты получены автором лично или при его непосредственном участии в подготовке и проведении экспериментов.

Апробация результатов. Материалы диссертации докладывались на следующих конференциях:

6-я национальная научно-практическая конференция с международным участием "Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека" (г. Смоленск, 2009 г.);

Международная научно-методическая конференция «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (г. Воронеж, 2013 г.);

"К 90-летию со дня рождения В.И. Гольданского: химическая физика и строение вещества" (г. Москва, 2013 г.);

XXII юбилейные ениколоповские чтения, посвященные 90-летию со дня рождения академика Н.С. Ениколопова (г. Москва, 2014 г.);

Международная учебно-методическая и научно-практическая конференция «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», посвященная 95-летию со дня основания ФГБОУ ВПО МГАВМиБ (г. Москва, 2014 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных журналах (в том числе 5 – в журналах, рекомендованных ВАК, и 2 – в зарубежном журнале) и 4 тезиса докладов на международных конференциях.

Структура и объём работы. Работа изложена на 119 страницах, включает 41 рисунок, 6 таблиц, список литературы включает 142 источника. Диссертация состоит из введения, результатов собственных исследований (литературный обзор, материалы и методы, результаты экспериментов и обсуждение результатов), заключения, списка использованной литературы, списка используемых сокращений.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

2.1.1 Эндометриоз

2.1.1.1 Понятие эндометриоза

Эндометриоз – хроническое, рецидивирующее заболевание, формирующееся на фоне гормональных и иммунных нарушений, состоящее в разрастании очагов, сходных по строению с эндометрием, за пределами нормальной локализации слизистой оболочки тела матки [Стрижаков, 1996]. Эндометриозидные очаги могут возникать на брюшине, кишечнике, мочевом пузыре, в легких и других органах. Так называемый «внутренний эндометриоз», или аденомиоз, в последнее время стал считаться отдельным заболеванием, ввиду существенных отличий в клинической картине, диагностике, лечении и профилактике.

В структуре гинекологической заболеваемости эндометриоз занимает третье место после воспалительных процессов и миомы матки, поражая, по разным оценкам, до 50 % женщин с сохраненной менструальной функцией. Эндометриоз приводит к функциональным и структурным изменениям в репродуктивной системе, нередко отрицательно влияя на психоэмоциональное состояние женщин, существенно снижая качество жизни.

В настоящее время многие клиницисты свидетельствуют, что эндометриозидные поражения встречаются в любом возрасте независимо от этнической принадлежности и социально-экономических условий. Эпидемиологические исследования указывают, что у 90 - 99% больных эндометриозидные поражения выявляются в возрасте от 20 до 50 лет, причем наиболее часто в репродуктивном периоде.

Проблема эндометриоза является актуальной и для ветеринарии. У крупного рогатого скота эндометриозом часто осложняется хронический эндометрит (инфекционное воспаление эндометрия) [Katkiewicz, 2011]. Если в крупных хозяйствах животное предпочитают не лечить, а сразу выбраковывать, то в случае

заболевания ценного производителя бесплодие или смерть могут быть недопустимы. Также постоянный стресс и болевой синдром приводят к значительному снижению продуктивности, в этом случае лечение становится необходимым. Для домашних и экзотических животных (особенно эндометриозом страдают обезьяны [D'Hooghe, 1996]) убой, как правило, также неприемлем.

2.1.1.2 Клинические особенности эндометриоза

Эндометриоз – доброкачественный патологический процесс, который характеризуется разрастанием ткани, сходной по структуре и функции с эндометрием. Эндометриоидные очаги обладают способностью к диссеминации и метастазированию, по кровеносным и лимфатическим сосудам проникая в другие органы и ткани. Макроскопически они представляют собой узлы, инфильтраты и кистозные образования, наполненные геморрагическим содержимым (т. н. «шоколадные кисты»). Деструктивное действие эндометриоза обусловлено разрастанием стромы, она может сдавливать нервные окончания, вызывая боль; спаечные процессы в матке и образование кист в яичниках может привести к бесплодию. Другой причиной бесплодия может стать активная секреторная деятельность эндометриоидных образований, в частности, простагландина F2 α .

Однако эндометриоз не обладает свойствами истинных опухолей, как то: атипизм клеток, прогрессивный автономный рост, отсутствие связи клинических проявлений с состоянием гормональной функции. Таким образом, эндометриоз является дисгормональным опухолевидным процессом, обладающим способностью к инфильтративному росту и, в редких случаях, метастазированию [Стрижаков, 2006].

За последние полвека предложено более десяти различных классификаций эндометриоза. В настоящее время наиболее распространена классификация Американского общества фертильности, пересмотренная в 1985г., которая основана на оценке лапароскопических данных. Очевидно, что накопление новых сведений об этиологии и патогенезе эндометриоза, клинических, структурных,

функциональных, иммунологических, биологических, генетических вариантах этого заболевания позволит предложить новые классификации. Согласно классификации J.F. Brosens (1993), выделяют 3 типа гистологической структуры эндометриоидных поражений:

1) слизистый (с жидкостным содержимым), представленный в виде эндометриоидных кист или поверхностных поражений яичника;

2) перитонеальный, диагностируемый микроскопически по активным эндометриоидным очагам (красные, железистые или пузырьковидные, прорастающие в глубь тканей, черные, складчатые и регрессирующие — белые, фиброзные), которые чаще выявляются в репродуктивном возрасте;

3) узловой — аденома, локализованная между гладкомышечными волокнами и фиброзной тканью, как правило, выявляемая в связочном аппарате матки и ректовагинальной перегородке.

Многие авторы связывают особенности клинических проявлений заболевания с глубиной прорастания эндометриоидных имплантатов в подлежащие ткани (миометрий, брюшину, яичники, параметрий, стенки кишки, мочевого пузыря и др.). Глубоким эндометриозом считают очаги, инфильтрирующие пораженную ткань на глубину 5 мм и более. Глубокоинфильтрирующий эндометриоз диагностируют у 20-50% больных [Адамян, 1998].

Гистологически эндометриоидные очаги весьма сходны по строению с нормальным эндометрием: состоят из железистого эпителия и цитогенной стромы. Однако соотношение железистого эпителия и стромы в эндометриоидных гетеротопиях различной локализации неодинаково. Независимо от локализации и размеров эндометриоидных очагов гистологически эндометриоз характеризуется доброкачественной пролиферацией железистого эпителия, напоминающего функционирующие железы стромы эндометрия.

2.1.1.3 Этиология эндометриоза

Многообразие локализаций эндометриоза обусловило большое число гипотез о его происхождении. Значительное количество концепций пытаются объяснить с различных позиций возникновение и развитие этого заболевания.

1) Наиболее спорной является теория целомической метаплазии R. Meyer (1903 г.). Она предполагает, что эмбриональные клеточные элементы, расположенные между зрелыми клетками серозного покрова брюшины, могут трансформироваться в эпителий маточно-трубного типа, образуя фокусы эндометриоидоподобных желёз и стромы. Другими словами, очаги эндометриоза могут возникать из мультипотентных клеток мезотелия брюшины.

2) Нарушение эмбриогенеза с аномальными остатками. Эмбриональная теория происхождения эндометриоза предполагает его развитие из остатков мюллеровых протоков и первичной почки. В подтверждение дизонтогенетической гипотезы исследователи приводят случаи сочетания эндометриоза с врожденными аномалиями половой системы, желудочно-кишечного тракта. Однако отсутствуют факты обнаружения в постнатальном периоде мюллеровских пороков.

3) Имплантиционная теория, предложенная J.F. Sampson в 1921 г. Предполагается, что формирование очагов эндометриоза происходит в результате ретроградного заброса в брюшную полость жизнеспособных клеток эндометрия, отторгнувшихся во время менструации, и дальнейшей их имплантации на брюшину и окружающие органы. Частными аспектами транспортной концепции являются лимфогенная и гематогенная теории, акцентирующие внимание на метастазировании очагов по кровеносным и лимфатическим сосудам, что приводит к экстрагенитальному эндометриозу лёгких, кожи, мышц. Также не вызывает сомнений и возможность ятрогенной этиологии, когда диссеминация имеет место при хирургических манипуляциях, связанных со вскрытием полости матки.

4) Нарушение гормонального гомеостаза, а именно расстройство гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы. В ряде работ отмечено, что синдром

неовулировавшего фолликула (ЛЮФ-синдром) способствует возникновению эндометриоза. Опосредованную роль в развитии эндометриоидных очагов могут играть и дисфункции щитовидной железы.

5) Нарушение иммунного равновесия. Клетки эндометрия, попадая в кровь и другие органы, представляют собой аутоантигены. Пролиферация эндометриоидных клеток в других тканях возможна в результате повышения уровня эстрогенов, которые стимулируют секрецию кортикостероидов. Последние в свою очередь, являясь депрессантами, подавляют местный клеточный и гуморальный иммунитет, тем самым обеспечивая благоприятные условия для инвазии и развития жизнеспособных клеток эндометрия. У больных эндометриозом наблюдается иммунодефицит, а именно снижение функций Т-лимфоцитов и NK-клеток.

6) Концепция межклеточного взаимодействия, предложенная W.P. Damski, 1988, с видоизменением R.W. Shaw, 1993. Данная гипотеза, в сущности, представляет собой комбинацию имплантационной, гормональной и иммунологических теорий, каждая из которых взаимно объясняет слабые места других. Эта концепция утверждает, что жизнеспособные эндометриоидные фрагменты ретроградно перемещаются через маточные трубы у всех женщин, их имплантация или отторжение определяется функцией иммунной системы. В брюшной полости они перераспределяются иммунной системой, представленной главным образом перитонеальными макрофагами. Эндометриоз может развиваться тогда, когда брюшинная распределительная система переполняется из-за возрастающего ретроградного перемещения эндометриоидных элементов. Эндометриоз возникает и тогда, когда брюшинная распределительная система имеет дефект или несовершенна. Эктопическая эндометриальная пролиферация заканчивается образованием аутоантител.

Хотя среди известных факторов риска по возникновению эндометриоза ведущая роль принадлежит гормональным и иммунологическим нарушениям, к менее важным этиологическим факторам можно отнести ожирение, позднее

начало половой жизни и поздние роды, осложненные роды, аборты, позднее наступление менархе, использование оральных контрацептивов [Стрижаков, 2006].

2.1.1.4 Онкологические аспекты эндометриоза

Онкологический аспект эндометриоза остаётся одним из наиболее спорных и неоднозначных. Сама возможность злокачественной трансформации несомненна, однако частота её вызывает разногласия. В первую очередь, отсутствует точная оценка частоты самого эндометриоза. С одной точки зрения, эндометриоз проявляет довольно высокую степень малигнизации — 11-24%, а заниженные оценки в литературе вызваны тем, что раковая опухоль поглощает предшествующие тканевые структуры и, следовательно, препятствует диагностике поэтапных изменений малигнизированных очагов эндометриоза. Сторонники противоположной точки зрения указывают на неточности в терминологии: так, диагноз «эндометриоидная карцинома» (наиболее частое злокачественное образование эндометриоидного происхождения, встречается в 70% случаев эндометриоидного рака яичников и в 66% при внеяичниковой локализации) вовсе не означает, что возникновению данной опухоли обязательно предшествовал эндометриоз или эндометриоидная киста яичника, а стромальная эндометриоидная саркома имеет предшественником эндометриальную строму, а не эндометриоз. Таким образом, по их мнению, степень малигнизации эндометриоза не превышает 1%. По-видимому, не стоит излишне преувеличивать вероятность злокачественного перерождения эндометриоза [Стрижаков, 2006].

2.1.1.5 Особенности межклеточных взаимодействий при эндометриозе

Распространено мнение, что эндометриоидные процессы являются нормальным физиологическим явлением. Из этого вытекает вопрос, что служит границей между этим состоянием и эндометриозом как болезнью, и что приводит к патологической степени процесса. Кроме того, широко распространено явление «доброкачественного», бессимптомного эндометриоза, когда образование эндометриоидных очагов не приводит к болевому синдрому, бесплодию и другим

выраженным последствиям. Таким образом, отнесение этого бессимптомного процесса к патологии или нормальному явлению неоднозначно [Стрижаков, 2006]. Кроме общих признаков иммунодефицита и аутоиммунизации, существуют и другие факторы, определяющие возможность инфильтрации эндометриоидных фрагментов. Установлена важная роль в возникновении и анатомической локализации эндометриоза генетических факторов [Адамян, 1998]. На основе экспрессии биохимических генетических маркеров можно установить наличие или отсутствие предрасположенности к эндометриозу или уже развившемуся заболеванию [Kobayashi, 2009].

Распределение и перемещение повреждённых тканевых фрагментов, в т. ч. эндометриальных клеток, осуществляется тканевыми макрофагами. Известно, что, кроме фагоцитарной деятельности, брюшинные макрофаги регулируют местные процессы, в том числе относящиеся к репродукции, путем высвобождения простагландинов, протеаз, цитокинов, факторов роста, инициирующих воспалительный ответ и повреждения тканей. Повышение концентрации простагландинов в плазме крови предрасполагает к формированию заболевания, влияя на пролиферацию и дифференциацию клеток эндометриоидной ткани. Простагландины, возможно, стимулируют рост эндометрия, манифестируют основные клинические симптомы — дисменорею и бесплодие. Другими факторами, влияющими на эндометрий, являются цитокины и факторы роста. При эндометриозе в перитонеальной жидкости увеличивается концентрация таких цитокинов, как интерлейкин-1, интерлейкин-6, основными продуцентами которых являются макрофаги [Ищенко, 2002]. Также цитокины замыкают цепь обратной связи, вовлекая в процесс новые медиаторы. Так, интерлейкин-1 индуцирует синтез простагландинов, стимулирует пролиферацию фибробластов, накопление коллагена и образование фибриногена, т. е. процессы, которые могут способствовать образованию спаек и фиброзу, сопутствующих эндометриозу. Он также стимулирует пролиферацию В-клеток и индукцию образования аутоантител. Высвобождение факторов роста дополняет эффект

других действующих агентов, способствуя не только пролиферации, но и дистрофическим изменениям в тканях. Также имеет место интракринное действие факторов роста, когда они не секретированы, а остаются в клетке и регулируют внутриклеточные процессы. Процессу накопления факторов роста и цитокинов способствует то, что они также вырабатываются в атакуемых макрофагами клетках тканей [Piva, 2001], прежде всего в эпителиальных клетках, фибробластах и др.

Уровень рецепции исследованных тканей показал снижение рецепторной активности по мере удаления эндометриоидного очага от матки. Таким образом, влияние гормонов на клеточные элементы очагов эндометриоза не прямое, а опосредованное активацией факторов роста и других веществ паракринной системы [Стрижаков, 1996].

Процессы пролиферации эндометриоидных очагов и образования спаек регулируются с одной стороны цитокинами (IL-1, IL-6), факторами роста (TGF β , IGF, HGF) и белками-протоонкогенами (c-myc, c-fos, c-bcl). С другой стороны выступают антионкогены и проапоптотические факторы, к примеру, p53.

2.1.1.6 Окислительный стресс и эндометриоз

Кроме врождённых генетических дефектов, причиной гормонального дисбаланса и недостаточности иммунитета, дающих возможность развитию эндометриоза, всё чаще называют окислительный стресс [S. Gupta, 2008]. Факторами, его обуславливающими, могут быть неправильное питание, неблагоприятная экологическая обстановка, хронические воспалительные процессы.

Активные кислородные метаболиты, такие как перекись водорода, гидроксильный радикал, супероксидный анион-радикал и другие, играют важную роль в метаболизме. В низких концентрациях они играют роль сигнальных молекул, регуляторов физиологических процессов. Однако при недостаточности или перегруженности сдерживающих их антиоксидантных систем организма, при повышении концентрации АКМ, на первый план выходит их деструктивная роль.

Являясь нестабильными и сильными окислителями, АКМ атакуют большинство биомолекул, включая липиды, белки, нуклеиновые кислоты и др., вызывая разнообразные формы повреждения клеток. Такое состояние ткани организма и называется окислительным стрессом [Зентов, 2001]. Ключевая роль в генерации АКМ отводится реакции Фентона — разложению перекисей в присутствии металлов переменной валентности с образованием высокореакционных гидроксильных радикалов. Таким образом, причиной окислительного стресса и последующей воспалительной реакции может быть нарушение метаболизма и депонирования железа [Адамян, 2008, Kobayashi, 2009]. Предполагается, что дальнейшее злокачественное перерождение опухоли также обусловлено окислительным стрессом вследствие избытка свободного железа [Yamaguchi, 2008].

В условиях окислительного стресса в тканях инициируется воспалительный ответ, что приводит к искажению функции систем иммунитета и ещё большему ухудшению антиоксидантного статуса ткани. Вследствие этого повышается выживаемость и способность к росту спонтанно возникающих эндометриоидных очагов [S. Gupta, 2008].

Иммунный ответ выражается в активации прежде всего брюшинных макрофагов и В-лимфоцитов. В макрофагах и полиморфноядерных лейкоцитах инициируется т. н. «окислительный взрыв»: секреция в больших количествах супероксид-аниона и монооксида азота, служащих основой цитотоксической функции этих клеток [Van Langendonck, 2002]. Показана повышенная экспрессия при эндометриозе основных продуцентов этих радикалов: ксантиноксидазы [Ota, 2002] и индуцибельной NO-синтазы [Ye, 2013], соответственно. В-лимфоциты же продуцируют аутоантитела к тканям эндометрия [Muse, 1982, Wilson, 1982]. Подобное усугубление окислительного стресса чрезмерной активностью макрофагов и аутоиммунная реакция вредит прежде всего нормальному эндометрию и другим элементам репродуктивной системы, что опосредованно может приводить к бесплодию [Wang, 1997]. Также отмечается

иммунодефицит Т-клеток и естественных киллеров [Ota, 2002], что облегчает имплантацию и разрастание эндометриоидных фрагментов [Ищенко, 2002].

Однако на имплантирующиеся эндометриоидные очаги столь активный воспалительный ответ действует скорее положительно. Активированные макрофаги и сами эндометриоидные клетки генерируют цитокины, простагландины и факторы роста, что посредством срабатывания внутриклеточных сигнальных каскадов приводит в действие транскрипционные факторы (к примеру, NF-κB и AP-1), регулирующие метаболизм клетки. Экспрессия управляемых ими генов приводит к повышению выживаемости, пролиферации, роста, эндометриоидных клеток, противодействия апоптозу, стимуляции ангиогенеза [Kobayashi, 2009].

2.1.1.7 Диагностика эндометриоза

«Золотым стандартом» в диагностике эндометриоза по-прежнему остается лапароскопия. Лапароскопия – это сложный метод диагностики, во время которого специальный инструмент (лапароскоп) через небольшой надрез на передней брюшной стенке вводят в брюшную полость и исследуют ее на наличие островков эндометрия. При эндометриозе участки разрастания эндометрия на брюшине выглядят как плоские островки темно-красного цвета. Для подтверждения диагноза эндометриоза берется участок подозрительного островка (биопсия) и проводится его гистохимическое исследование. Гистологическая диагностика эндометриоза основывается на идентификации цилиндрического эпителия и подэпителиальной стромы, имеющих сходство с подобными составляющими слизистой оболочки матки.

Другие инструментальные исследования, например УЗИ, компьютерная томография, гистеросальпингография, МРТ, магнитно-ядерный резонанс могут быть использованы в диагностике эндометриоза, однако не всегда позволяют установить точный диагноз. УЗИ при эндометриозе может выявить наличие кист в яичнике, однако их природа подтверждается только при биопсии. Гинекологический осмотр в некоторых случаях позволяет заподозрить

эндометриоз, особенно, если болезнь развилась на влагалищной части шейки матки или в самом влагалище. Также производится исследование крови на специальные опухолевые маркеры (онкомаркеры) [Адамян, 1998, Ищенко, 2002, Стрижаков, 1996].

2.1.1.8 Терапия эндометриоза

Единственным методом терапии эндометриоза до сих пор является хирургическое вмешательство, а именно хирургическое удаление очагов эндометриоза путём традиционной лапароскопии, а в специфических случаях — ультразвуковой микрохирургии или электродеструкции. Однако микроскопические очаги хирургически удалить невозможно. Кроме того, как уже упоминалось выше, эндометриоз скорее является «болезнью образа жизни», и ничто не исключает образования новых очагов. По этим причинам заболевание отличается весьма высокой частотой рецидивов, и требует комплексного послеоперационного курса лечения. Так, при лапароскопическом (хирургическом) методе лечения в 60% случаев наблюдается повторяемость заболевания, в 40% — бесплодие. Прямое воздействие гормональных препаратов — ингибиторов гонадотропина и прогестагенов (даназола, гестринона и т. п.) малоэффективно, в связи с малым количеством соответствующих рецепторов в эндометриоидных клетках; агонисты гонадолиберина (например, Диферелин) несколько более эффективны. В то же время применение гормональных препаратов связано со значительными побочными эффектами и осложнениями [Адамян, 1998, Стрижаков, 1996]. Другой аспект терапии — нормализация воспалительной реакции, что достигается применением иммуномодуляторов (пентоксифиллина). Также предлагается прямое введение антиоксидантов [Portz, 1991].

Для оценки терапии по литературным данным составлена сравнительная таблица воздействия средств, применявшихся на аналогичной модификации модели эндометриоза, и вычислены отношения средних размеров имплантатов, приводящихся для контрольной и опытной групп. Здесь, правда, следует отметить, что в части статей вместо средних объемов приводятся измерения отношения веса

имплантатов на 1 кг веса животного [Hong, 2003] и процентное соотношение [Itil, 2006], но на величины отношения средних размеров по группам эти отклонения влияют незначительно. Названия применяемых лекарственных средств и вакцины приводятся в транскрипции авторов.

Таблица 1 Сравнение воздействия применяемых лечебных препаратов на модели эндометриоза на крысах.

Применяемое средство	Средний размер имплантатов в контрольной группе	Средний размер имплантатов в опытной группе	Отношение средних размеров	Источник цитирования
Cetrorelix, агонист GnRH	103,06 ± 45,95 мм ³	7,80±8,75мм ³	13,2*	Altintas, 2008
Leuprolide, агонист GnRH	103,06 ± 45,95 мм ³	13,60± 19,93 мм ³	7,58*	Altintas, 2008
Rofecoxib, агонист GnRH, ингибитор COX-2			1,6	Dogan, 2004
Leuprolide, агонист GnRH			1,56	Dogan, 2004
TCTS	22,5 г/кг	11,2 г/кг	2,01	Hong, 2003
Leflunomide	139 ± 92,8 мм ³	33,5±12,5мм ³	4,15	Uygun, 2006
Caffeic Acid Phenethyl Ester	147,5 ± 41,2 мм ³	37,4±14,7мм ³	3,94	Guney, 2007
Raloxifene	269,17 ± 31,39 мм ³	118,9±26,0мм ³	2,26	Yao, 2005

BCG vaccine	67,6%	26,5%	2,55	Itil, 2006
Rosglitasonе	64 мм ³	41,6 мм ³	1,54	Demirturk, 2006
Pentoxifylline	12,83 мм ³	8,59 мм ³	1,49	Mohammadzadeh, 2008
Onapristone (ZK 98 299)	100%	50%	2	Stoeckemann, 1995
COX-2 inhibitor	35,8 мм ³	0,35 мм ³	102,29*	Matsuzaki, 2004
Lipoxine A4	23,20 ± 7,49	13,58 ± 4,01	1,71	Xu, 2012
15-R-LXA4	68,89±7,2	21,22±4,89	3,25	Chen, 2009

*Введение препарата продолжалось более 20 дней

Следует отметить, что значительные уменьшения отношений средних размеров имплантатов по группам были зафиксированы в работах [Altintas, 2008, Matsuzaki, 2004], где введение препаратов продолжалось непрерывно три и четыре недели. Для дальнейшего использования препарата в клинической практике следует принять во внимание разницу в физиологии и длительности жизни лабораторных животных и людей. Известно, что длительное лечение пациентов гормональными средствами может вызвать снижение плотности костей и малоэффективно, например, при ретроцервикальном расположении эндометриoidных очагов. Кроме того, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, сердечнососудистые заболевания, а также заболевания крови являются противопоказаниями к гормональному лечению эндометриоза.

2.1.2 Гормон ингибин и его мишени

2.1.2.1. Общие свойства ингибина

Ингибин и активин — сигнальные молекулы пептидной природы, относящиеся к обширному сверхсемейству трансформирующих ростовых

факторов бета (TGF β). Эти молекулы были открыты в экстракте бычьей и свиной фолликулярной жидкости в 1985 Ling, Robertson, и в 1986 Vale, соответственно [Tong, 2003]. Структурно они представляют собой димерные гликопротеиды, состоящие из двух субъединиц. Ингибин состоит из α -субъединицы весом 18кДа и одной или двух β -субъединиц весом 13 кДа, связанных дисульфидными мостиками. Субъединицы β представлены двумя типами (А и В). Таким образом, различают ингибин А (состоящий из α - и β А субъединиц) и ингибин В (α - β В). Активин же представляет собой димер двух субъединиц β , и бывает трёх типов: β А- β А, β А- β В, β В- β В. Родство с другими представителями семейства TGF β выражается, в частности, в аналогичном расположении большого числа близко расположенных остатков цистеина [McPherron, 2003]. У женщин гормон синтезируется в фолликулах, а у мужчин – в семенных канальцах яичек (клетками Сертоли). Во время беременности основным продуцирующим органом ингибина А является плацента. Если ингибин А обнаруживают в основном у женщин (функция его у мужчин неизвестна), то главной формой циркулирующего в крови ингибина у мужчин является ингибин В. В клинической практике используются только диагностические наборы для выявления в сыворотке крови димерных форм ингибина А и В, так как только димерные формы ингибина являются биологически активными. Ингибин селективно ингибирует освобождение фолликулостимулирующего гормона из передней доли гипофиза и обладает паракринным действием в гонадах [Moog, 2008].

Уровень ингибина А остается низким в начале фолликулярной фазы, затем начинает повышаться к концу фолликулиновой фазы и достигает максимума в середине лютеиновой фазы [Flogio, 1998]. Уровни эстрадиола и ингибина А очень сильно коррелируют друг с другом в течение фолликулярной фазы (с –14 дня по 2 день менструального цикла). Приблизительно через неделю с момента образования желтого тела начинается его обратное развитие, при этом секретируется меньше эстрадиола, прогестерона и ингибина А. Падение уровня ингибина А устраняет его блокирующий эффект на гипофиз и секрецию ФСГ. В

ответ на повышение уровня ФСГ окончательно формируется пул антральных фолликулов, из которых в дальнейшем разовьётся доминантный фолликул. У женщин по мере старения отмечается снижение концентрации ингибинов А и В. Когда число созревающих фолликулов в яичниках становится ниже определенного порога, наблюдается снижение концентрации ингибина, что ведет к повышению уровня ФСГ.

2.1.2.2 Диагностическое значение ингибина

За последние два года в процедурах ЭКО для оценки овариального резерва стал использоваться новый маркер – ингибин В. Овариальный резерв – способность яичников отвечать на стимуляцию гонадотропинами достаточным числом зрелых яйцеклеток, пригодных для оплодотворения в процедуре ЭКО. Концентрация ингибина В, измеренная на 3-й день цикла, прогнозирует ответ яичников на стимуляцию гонадотропинами в циклах ЭКО. У женщин со сниженным уровнем ингибина В необходимо увеличивать дозу экзогенного ХГЧ в цикле стимуляции суперовуляции, меньше число получаемых ооцитов, меньше число переносимых эмбрионов на цикл, меньше частота наступления беременности и в 11 раз выше частота преждевременных выкидышей по сравнению с женщинами, у которых ингибин В был в норме. Измерение ингибина В позволяет напрямую более точно оценить овариальную функцию, чем ФСГ.

Повышение ингибина в плаценте может быть маркером синдрома Дауна, также его уровень повышен при гипертензивных расстройствах беременности, в т. ч. преэклампсии. Ингибин значительно и явно повышен при гранулематозной опухоли, может служить для диагностики и как маркер рецидива. При других онкологических патологиях колебания уровня ингибина не столь однозначны.

Ингибин В является маркером функции клеток Сертоли и экзокринной тестикулярной функции (состояния сперматогенеза). Ингибин В является прямым маркером и сперматогенеза. Его концентрация у здоровых мужчин обычно меньше 480 пг/мл, и, в отличие от женщин, она постоянна (не носит циклических

колебаний). Однако, в патологических ситуациях (бесплодие), уровень ингибина В может быть снижен [Nagler, 2006, Tong, 2003].

2.1.2.3 Молекулярные механизмы действия TGF β

Суперсемейство TGF β включает в себя более двадцати различных цитокинов, в том числе собственно трансформирующие ростовые факторы (TGF), морфогенетические протеины кости (BMP), различные изоформы ингибина, активина, факторов Nodal и lefty [Tabibzadeh, 2002]. Взаимодействие этих факторов с целевыми клетками обеспечивается семейством рецепторов, общих для всего семейства TGF β [McCarthy, 1993]. Рецептор представляет собой трансмембранную серин/треонинкиназу и состоит из трёх элементов. Их называют рецепторами I, II и III типа, каждый из которых насчитывает множество разновидностей и изоформ [Derinck, 2003]. Разновидности факторов различаются как сродством к различным рецепторам, так и механизмом взаимодействия. Одни сперва связываются с корецептором III типа (бетагликаном, эндоглином и др.) [Esparza-Lopez, 2001], затем с внеклеточным доменом рецептора II типа; либо напрямую с рецептором II типа, либо напрямую с рецептором I типа, либо с комплексом I и II — в зависимости от разновидности и изоформы фактора [Derinck, 2003, Wiater, 2006]. В конечном счете, взаимодействие приводит к фосфорилированию последовательности SGSGSG внутриклеточного домена в рецепторе I типа. Активированный рецептор I модифицирует внутриклеточные мессенджеры, в первую очередь, из группы Smad (рисунок 1). При этом форма и функции рецепторного комплекса меняются в зависимости от типа фактора. Так, активин А стимулирует экспрессию эстрогеновых рецепторов, ингибина и с-тус, чего TGF β I не делает [Kipp, 2007], он также активирует Smad2, но не Smad3 [Schmierer, 2003]. Таким образом, представители суперсемейства TGF β по-разному взаимодействуют с рецепторами и вызывают активацию различных эффекторов и путей передачи. Их действие приводит к активации различных процессов в тканях [McCarthy, 1993, Whitman, 2005]. Ингибин также связывается с бетагликаном и T β RII, но так изменяет их изоформу, что объединение с T β RI

становится невозможным [Wiater, 2006]. Таким образом, ингибин сам не вызывает дальнейшего ответа внутриклеточных мессенджеров, но составляет активную конкуренцию другим разновидностям TGF β .

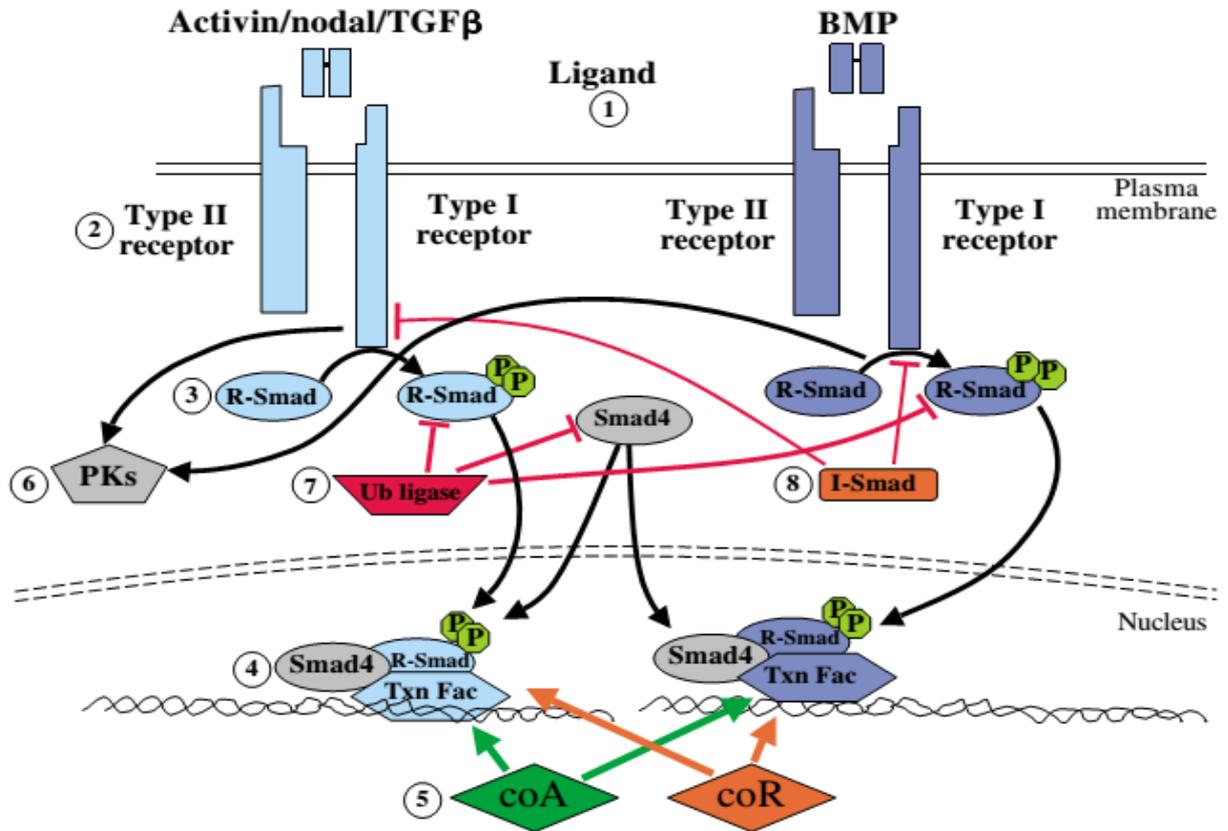


Рисунок 1. Схема передачи сигналов TGF β . Сокращения: BMP – морфогенетический протеин кости; co-A - коактиватор; co-R - корепрессор; I-Smad – ингибирующий Smad; P - фосфат; PKs - протеинкиназы; R-Smad – регулирующий Smad; Txn Fac – фактор транскрипции; Ub ligase – убиквитинлигаза. Чёрные и зелёные линии показывают положительные взаимодействия, красные линии – ингибирование [Whitman, 2005].

Главным из путей сигнализации рецепторов семейства TGF β является путь активации белков Smad. Фосфорилированный рецептор I типа модифицирует регуляторные белки (R-Smad). Так, T β RI взаимодействует со Smad2 и Smad3, BMPRI — со Smad1 и Smad5. R-Smad образует комплекс с кофактором (C-Smad) — Smad4, после чего перемещается в ядро клетки и инициирует экспрессию определённых генов. Ингибирующие факторы (I-Smad) — Smad6 и Smad7 —

блокируют соответственно модификацию R-Smad и фосфорилирование рецептора I типа, таким образом останавливая передачу сигнала на уровне рецептора.

Другой путь сигнализации рецепторов TGF β — каскад фосфорилирующих друг друга факторов, начинающийся с TGF β -активируемой киназы (ТАК), за которым следует последовательность митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), включая c-Jun N-концевые киназы (JNK). В конечном счете, этот каскад приводит к формированию гетеродимерного транскрипционного фактора, известного как активирующий протеин-1 (AP-1).

Через каскад протеинкиназ ТАК-1/МЕК/JNK TGF β могут инициировать и другие пути, в том числе активировать нуклеарные факторы NF- κ B [Gingery, 2008]. Впрочем, главным инициатором активации NF- κ B остаётся рецептор фактора некроза опухоли альфа (TNF α).

2.1.2.4 Транскрипционный фактор κ B

Семейство NF- κ B состоит из 5 белков: NF- κ B1 (или p50), NF- κ B2 (или p52), RelA (или p65), RelB и c-Rel, образующих 15 комбинаций димеров. Все белки семейства объединяет наличие домена гомологии Rel, который обеспечивает образование белковых димеров, связывание NF- κ B с ДНК и с цитозольным ингибиторным белком I κ B. Фактор NF- κ B проявляет активность только в димерной форме, причём наиболее распространённые формы — димер субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65. В цитоплазме клетки NF- κ B находится в неактивном состоянии в комплексе с ингибиторным белком I κ B. Стимулирующий агент приводит к тому, что I κ B фосфорилируется под действием киназы IKK (I κ B-киназа), что приводит к деградации I κ B в результате действия протеосомы 26S. При этом NF- κ B высвобождается от ингибирующего комплекса, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию контролируемых генов. Влияние этих факторов на клеточный цикл двояко. В здоровых клетках активация NF- κ B (комбинация субъединиц p52 и RelB) вызывает иммунный ответ и процессы апоптоза и ангиогенеза (за счёт экспрессии генов белков p53 и bcl-X_s). В быстрорастущих тканях, в том числе опухолевых, NF- κ B (комбинация

субъединиц p50 и RelA) стимулируют пролиферацию, рост, ангиогенез и ингибируют апоптоз [Tabruin, 2007]. Среди кВ-зависимых пролиферативных и провоспалительных белков следует отметить bcl-2, bcl-xL, мутантный p53, молекулы адгезии, интерлейкины 6 и 8, индуцибельную NO-синтазу, циклооксигеназу-2 и другие.

2.1.3 Оксид азота NO

2.1.3.1 Оксид азота в организме

Оксид азота NO представляет собой парамагнитный газ с одним неспаренным электроном на внешней разрыхляющей π -орбитали, что обуславливает его достаточно высокую реакционную способность. Он легко растворим в воде (4,6мл/100мл), при этом липофилен и легко диффундирует в биологических средах. Является достаточно долгоживущим в биологических тканях (среднее время жизни 5,6 с). С учётом времени жизни в физиологической среде и скорости диффузии, дальность действия NO \cdot составляет в среднем 100-200 мкм. Образует стабильные (время жизни 40 мин при 37°C) комплексы с гемоглобином и вступает в реакции S-нитрозилирования с тиолсодержащими белками, образуя S-нитрозотиолы. Таких белков обнаружено порядка 3000. Таким образом он может транспортироваться в организме, действуя как эндокринный регулятор. [Ищенко, 2002]. Аспекты биологического действия NO:

1. нейромедиатор в центральной и периферической нервной системе;
2. идентифицирован с эндотелиальным фактором релаксации сосудов (EDRF), расслабляющим гладкую мускулатуру, предотвращающим агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов;
3. основа микробицидного и противоопухолевого действия фагоцитов
4. регулирует реакции окислительного фосфорилирования и продукцию АКМ в митохондриях;
5. регулирует активность многих ферментов, концентрацию внутриклеточного Ca $^{2+}$, потребление и транспорт O $_2$ в клетках;
6. является ингибитором свободных радикалов [Ванин, 2001].

2.1.3.2 NO-синтазы

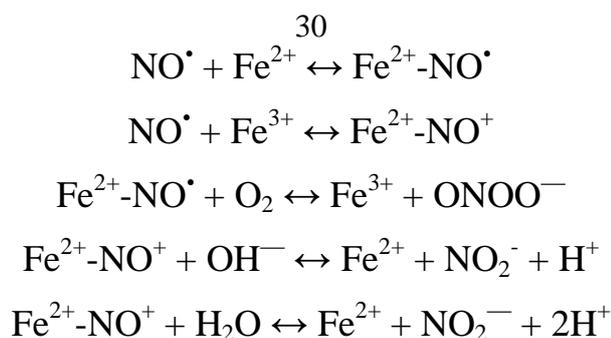
Синтез NO в организме осуществляется цитохром-P450-подобными гемопротеинами – NO-синтазами (КФ1.14.13.39, систематическое название «L-аргинин, НАДФН:кислород-оксидоредуктаза»). Субстратом служит L-аргинин, окисляемый до L-цитруллина и NO при участии NADPH, FAD, FMN и тетрагидриобиптерина. Существуют три группы NO-синтаз:

I тип – нейрональная (nNOS) – содержится в нейронах, активируется глутаматом;
II тип – индуцибельная (iNOS) – содержится в макрофагах, гепатоцитах, фибробластах, миоцитах и других клетках. Экспрессируется под действием фактора транскрипции NF-κB в ответ на действие цитокинов, липополисахаридов, и усиленное производство АКМ, подавляется глюкокортикоидами, цитокинами, простагландинами, а также NO (обратная связь).
III тип – эндотелиальная (eNOS) – содержится в эндотелиоцитах, эритроцитах, тромбоцитах, нейтрофилах, активируется под действием вазоактивных соединений или сдвигового напряжения.

Локализуются в клетке NO-синтазы в микросомах и митохондриях. В разных тканях и у разных видов встречается большое число различных разновидностей NO-синтаз, значительно различающихся по строению, активности, взаимодействию с ингибиторами и специфическими антителами.

2.1.3.3 Антимикробное действие

Синтез индуцибельной NO-синтазы в макрофагах и других клетках является основой неспецифической резистентности. Особое значение имеют свойства NO как антимикробной и противоопухолевой системы, активной в отношении грибов, бактерий, вирусов, паразитов, опухолевых клеток и некоторых чувствительных клеток собственного организма. Цитотоксический эффект связывается с нитрозилированием железосерных групп в активных центрах ферментов с образованием окислов азота и пероксинитрита:



В физиологических условиях в присутствии кислорода NO метаболизируется до стабильных анионов NO_2^- и NO_3^- , а также пероксинитрита, что также обеспечивает микробицидное и цитотоксическое действие [Miranda, 2001]. Пероксинитрит – сильный окислитель, способен окислять SH-группы белков, инициировать ПОЛ, вызывать однонитевые разрывы ДНК, вызывает апоптоз, ингибирует агрегацию тромбоцитов. Кроме того, в кислых условиях в результате нефентоновской реакции он может служить источником гидроксильного радикала и синглетного кислорода. Таким образом, если при низких концентрациях NO действует как регулятор и антиоксидант, то в большой концентрации его воздействие цитотоксическое и прооксидативное [Martinez, 2009].

2.1.3.4 Аутоксическое действие

Цитотоксическое действие NO^\bullet распространяется и на клетки и ткани собственного организма. Особенно уязвимы в этом отношении β -клетки островков Лангерганса. Повреждение их NO^\bullet , синтезируемым макрофагами и самими этими клетками, может приводить к диабету. Повышенный синтез NO при ишемии обуславливает смерть клеток [Осипов, 2007]. Также могут повреждаться макрофаги, костномозговые предшественники, миобласты, гладкомышечные клетки и другие. Также NO^\bullet подавляет пролиферацию нейтрофилов и лимфоцитов. Основными механизмами его действия являются инактивация железосерных центров митохондрий, прямое повреждение ДНК продуктами аутоокисления и ONOO^- , и экспрессия белка апоптоза p53. В работах [Kim, 1998, Li, 1999] показана модификация каспаз-3, 8, 9 с помощью нитрозотиолов и запуска таким образом программируемой гибели клеток.

2.1.3.5 Эндотелиальный фактор релаксации

В 1987 г. эндотелиальный фактор релаксации сосудов (EDRF) был идентифицирован с NO[•], синтез которого осуществлялся конститутивно экспрессируемой эндотелиальной NO-синтазой. Действуя в наномолярных концентрациях, NO[•] подавляет агрегацию тромбоцитов и адгезию тромбоцитов и нейтрофилов к стенкам сосудов, предупреждая тромбообразование, а также стимулирует синтез интерлейкина-8.

Контроль кровяного давления связан с постоянным высвобождением NO[•], причём его действие на широкий спектр гладкомышечных клеток не зависит от происхождения. Расслабляющий эффект осуществляется через присоединение NO[•] к гемовому центру гуанилатциклазы, благодаря чему синтез цГМФ ускоряется в 400 раз, что приводит к снижению внутриклеточного содержания кальция. Опубликованные экспериментальные данные допускают существование пути активации гуанилатциклазы через образование комплексов с FeNO в определённой зоне белковой глобулы гуанилатциклазы. Также регуляция осуществляется путём ингибирования электронпереносящей цепи митохондрий.

2.1.3.6 Оксид азота как нейромедиатор

На способности NO активировать растворимую форму гуанилатциклазы основана его важная роль, как нейромедиатора. Он является медиатором ноцицепции, обоняния, термогенеза, принятия пищи и воды, регулирует циркадные ритмы, процессы координации и баланса, обучения и памяти. Служит одним из важнейших средств регуляции тонуса кровеносной системы, в том числе симулируя высвобождение вазопрессина и участвуя в автономном контроле сердцебиения. NO может осуществлять передачу как классическим путём – от пресинаптического нейрона к постсинаптическому – так и ретроградно, а также опосредованно – через клетки глии и окружающие нейроны. Также NO защищает головной мозг от нейротоксических и ишемических инсультов.

2.1.3.7 Оксид азота как внутриклеточный мессенджер

Значительная реакционная способность монооксида азота позволяет ему модифицировать активные и управляющие центры ферментов, действуя как низкомолекулярный сигнальный мессенджер. Высокая подвижность и относительная стабильность позволяют ему осуществлять не только внутриклеточную сигнализацию, но и паракринную, а с учётом его способности образовывать стабильные комплексы с белками и низкомолекулярными лигандами — он способен распространяться и в пределах организма в целом, действуя подобно гормону.

Согласно наиболее распространённым в настоящее время среди западных исследователей представлениям, основными механизмами модификации целевых молекул оксидом азота являются S-нитрозилирование тиоловых остатков [Beckman, 1996, Martinez-Ruiz, 2004, Gaston, 2003] и нитрозилирование металлов (прежде всего, железа) в активных центрах ферментов. Однако данная теория встречает несколько возражений. Во-первых, нитрозилирование тиолов может происходить лишь при существенно более низких значениях pH, чем существуют в большинстве компартментов живых клеток [Vorodulin, 2013]. Это ставит под сомнение саму возможность протекания таких реакций *in vivo*. Во-вторых, не выявлено значимого механизма специфической деконструкции таких нитрозотиолов. Иная точка зрения развивается в лаборатории проф. Ванина (ИХФ РАН). Согласно полученным данным, определяющая роль принадлежит нитрозильным комплексам железа, а не свободному NO [Ванин, 1993]. Эти комплексы стабильны, одинаково легко присоединяются к тиоловым группам и отсоединяются от них. Также они способны связываться с парами близко расположенных тиоловых групп одной молекулы, а такими элементами структуры обладают многие белки. Это даёт ещё большее богатство возможностей изменения конформации целевых молекул. Также это представление согласуется с гипотезой о ключевой роли свободного железа в NO-зависимой регуляции многих сигнальных путей [Kim, 2000]. Что касается биохимических эффектов

нитрозотолов в экспериментах — их можно объяснить переносом нитрозильной группы путём образования промежуточного комплекса с железом. Показано, что такой процесс более вероятен в физиологических условиях, нежели прямое транснаитрозилирование белков-мишеней [Butler, 2001].

Каким бы ни было реальное соотношение важности этих механизмов — образования комплексов и прямого нитрозилирования — в живых организмах, остаётся фактом: монооксид азота является универсальным мессенджером, влияя на огромное множество сигнальных путей, определяющих жизненные процессы клетки и организма в целом.

2.1.3.8 Структура и механизмы образования ДНКЖ с тиолатными лигандами.

Для понимания функциональной активности ДНКЖ с тиолатными лигандами (комплексов 2,03) существенно знание их природы и механизмов образования. Главное свойство этих комплексов, которое, в основном, позволило получить это знание — характерный для ДНКЖ с тиолатными лигандами сигнал ЭПР (сигнал 2,03). В живых системах в основном представлены ДНКЖ, связанные с тиоловыми группами белков — белок-связанные ДНКЖ. Форма и ширина (4 мТ) сигнала ЭПР этих комплексов, обусловленные анизотропией g -фактора ($g_{\perp}=2,04$ $g_{\parallel}=2,014$) и сверхтонкой структуры (СТС), не изменяются при повышении температуры регистрации от 77 К до комнатной температуры. Это сохранение обусловлено низкой подвижностью белков при комнатной температуре, недостаточной для усреднения анизотропии g -фактора и СТС. Такое усреднение наблюдается для низкомолекулярных ДНКЖ (с цистеином или глутатионом). При комнатной температуре регистрации эти комплексы дают изотропный синглет с полушириной 0,7 мТ с центром при $g_{\text{ср}}=2,03$, характеризующийся 13-компонентной СТС, обусловленной сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона с ядрами азота двух NO^+ -лигандов и четырьмя протонами метиленовых групп в двух лигандах цистеина или глутатиона вблизи атома серы.

Анализ параметров сигнала 2,03 показал, что ответственные за него

комплексы характеризуются формулой $\{(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2\}^+$, где RS^- — тиоловые группы белков. Не исключено замещение одной тиоловой группы лигандом нетиоловой природы. Комплексы имеют структуру плоского квадрата, в вершинах которого в цис-положениях расположены тиоловые и нитрозильные лиганды. Эффективный электронный спин комплексов $S=1/2$, неспаренный электрон преимущественно локализован на dz^2 орбитали железа с электронной конфигурацией d^7 [Vorodulin, 2013].

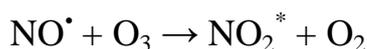
Установленные биологические эффекты действия экзогенных динитрозильных комплексов железа:

1. высокая гипотензивная и вазодилататорная активность;
2. подавление агрегации тромбоцитов;
3. снижение продолжительности экспериментального тромбоза вен конъюнктивы;
4. повышение эластичности эритроцитов;
5. снижение размера некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда;
6. ускорение заживления кожных ран;
7. модуляция апоптоза;
8. экспрессия гена белков антиоксидантной защиты у бактерий;
9. предупреждение трансформации эндотелия пещеристых тел пениса в соединительную ткань при повреждениях чревного нерва;
10. экспрессия синтеза белков теплового шока;
11. модуляция активности глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы, Na-K-АТФазы и гуанилатциклазы [Ванин, 2011].

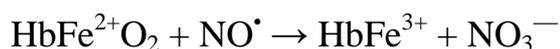
2.1.3.9 Методы регистрации оксида азота

Оксид азота — достаточно долгоживущий радикал, но его регистрация затрудняется низким содержанием в биологических средах и малым временем электронной релаксации. По этой причине наиболее эффективным методом регистрации является метод спиновых ловушек. В качестве ловушек применяют дитиокарбаматы, гемоглобин и другие. С железом гемоглобина NO^\bullet образует долгоживущие комплексы, позволяющие определять его непосредственно в образцах крови.

Другим методом регистрации NO^\bullet является прямая регистрация хемилюминесценции, основанная на излучении кванта света электронно-возбуждённым состоянием после взаимодействия с NO^\bullet озона:



В связи с быстрым окислением NO^\bullet измерение комбинируют с восстановлением NO^{2-} ванадием (III). Электрохимический метод с использованием порфиринового сенсора высокочувствителен, но также детектирует катехоламины, и измерения требуют верификации. Метод оптической спектроскопии основан на взаимодействии NO^\bullet с оксигемоглобином и оксимиоглобином и образовании соответственно метгемоглобина и метмиоглобина:



Однако *in vivo* этот метод неприменим по причине редуктазной активности эритроцитов. В биологических исследованиях могут использоваться биологические методы определения количества NO по изменению диаметра участка сосуда или оптической плотности взвеси тромбоцитов.

Одним из наиболее часто используемых непрямых методов является определение нитрита и нитрата путём спектроскопии с использованием реактива Грисса. Реакция основана на взаимодействии NO_2^- с сульфаниламидом, HCl и N -(1-нафтил)-этилендиамином, и последующей спектроскопии на 543 нм [Miranda, 2001].

Также часто количество NO определяют косвенно путём определения интенсивности экспрессии NO -синтаз. Применимость подобных косвенных методов довольно проблематична. Количественное определение нитритов методом Грисса совершенно некорректно в присутствии восстановителей и тиоловых групп. В сущности, он показывает содержание в образце «доступного азота», переведённого в нитрит из нитратов, аминов, аминокислот, протеидов и т. п. Очевидно, что суммарное количество всех составляющих будет на несколько порядков превышать нормальные концентрации исследуемого оксида азота. Количественная оценка окрашенных NO -синтаз в тканях затрудняется изменениями свойств красителя в кислых и щелочных условиях и в присутствии восстановителей. Также активность NO -синтаз значительно меняется в зависимости от наличия кальция, кофакторов и др. К тому же, существуют стабильные депо оксида азота — в первую очередь, исследуемые нами нитрозильные комплексы — так что такой мессенджер может вырабатываться в одном участке ткани или даже организма в целом, а действие оказывать в других. Таким образом, адекватно оценить содержание NO можно только прямыми методами, из которых наиболее надёжные и корректные — использование парамагнитных и люминесцентных ловушек. Например, следует отметить работу [Huang, 2007], в которой предложен прямой хемилюминесцентный метод определения NO . Метод основан на взаимодействии оксида азота с люминесцирующей ловушкой в образцах сыворотки и последующей хроматографии HPLC, с последующим наблюдением люминесценции в области 498-507 нм.

2.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1 Экспериментальная модель эндометриоза

Экспериментальный эндометриоз индуцировали у крыс-самок линии Вистар разводки питомника «Столбовая», массой 180 ± 20 г. Для моделирования эндометриоза была выбрана модификация операции, описанной в статье [Vernon M.W. and Wilson E.A., 1985]. Заболевание моделировали путём аутотрансплантации двух фрагментов эндометрия с миометрием 2×2 мм, полученных из левого рога матки, к поверхности передней брюшной стенки (эндометрием внутрь перитонеума). Показано, что данная методика является адекватной моделью экспериментального эндометриоза [Посисеева, 2001], и патологический процесс в достаточной мере соответствует естественному течению у данного вида. Подобная методика широко распространена в исследовательской практике [Demirturk, 2006, Cotroneo, 2001, Ota, 2002]. Простое помещение фрагмента эндометрия в брюшную полость приводит к рассасыванию его, и не вызывает патологического процесса. Также не дает результата и операция с сопутствующей овариэктомией.

Оперативные вмешательства проводились на иммобилизационном станке под тиопенталовым наркозом ($0,06$ г на кг живого веса) в течение 40-45 минут. После операции животные выдерживались для приживания имплантатов в течение 4 недель либо 4 суток, в зависимости от цели исследований. Животные содержались в виварии в условиях регулируемого светового дня (12×12 часов) и постоянной комнатной температуры ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) на стандартном пищевом рационе и при свободном доступе к воде.

Ингибин вводили животным опытной группы внутрибрюшинно в дозе 160 мкг/кг в виде стерильного водного раствора объемом $0,5$ мл ежедневно в течение 10 дней. В ряде опытов перед использованием ингибина его подвергали трёхминутному прогреванию на водяной бане при температуре 100°C (патент №2185180). По окончании курса инъекций животные выдерживались ещё в

течение 7 дней, вскрытие производилось на 45 день после операции (к этому моменту масса крыс возрастала до 230 ± 25 г) (рисунок 2).

В эксперименте по исследованию дозовой зависимости животным вводили ингибин в дозировке 20, 80, 160 и 400 мкг/кг. Использовали гормон ингибин, полученный двумя модификациями технологического процесса очистки: методом ступенчатого и непрерывного градиентов. Наркотизация осуществлялась с премедикацией 0,07-0,1 мг атропина сульфата с последующим введением через 10 минут 0,3 мл препарата «Золетил-50» (Zoletil 50, Virbac, Франция) разведением 25 мг/мл. После операции животные выдерживались в течение 3 недель для приживания имплантатов. Начиная с 21 дня после операции, животные были поделены на группы, и им в течение 10 дней вводили по 0,5 мл раствора ингибина внутривентриально. Предварительная термическая обработка препарата проводилась на водяной бане при температуре 100°C в течение 3 минут. Вскрытие производилось через 7 дней после окончания курса инъекций, то есть на 37 день после операции.

Ингибин, ДНКЖ	28	10	7
ДНКЖ раннее введение	4	10	31

Рисунок 2. Продолжительность экспериментов от операции до забоя (в сутках). Отмечены десятидневные периоды введения препарата.

В эксперименте по терапии ДНКЖ животным опытной группы вводился внутривентриально 5 мМ раствор комплекса ДНКЖ с глутатионом по 0,5 мл ежедневно в течение 10 дней. Это соответствует дозе 12 мкмоль/кг, или 8,8 мг/кг. Животным контрольной группы в то же время вводился физиологический раствор в аналогичном объёме. Была сформирована также группа животных, которым вводили комплекс железа с глутатионом, в структуру которого оксид азота не входит. Введение начинали спустя 4 дня после операции или 28 дней (к этому моменту масса крыс достигала 230 ± 25 г). Вскрытие в том и другом случае

производилось на 45 день после операции.

После вскрытия брюшной полости имплантаты и другие органы измеряли, фотографировали, отделяли от окружения и замораживали в жидком азоте для исследования методом ЭПР спектроскопии, а также направляли на гистологическое исследование. Для этого ткани помещали в 20% раствор формалина. После стандартной проводки и заливки образцов ткани в парафин, гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Авторы благодарны д. м. н., профессору О.В. Зайратьянцу и его коллегам НИИ морфологии человека РАМН за помощь при гистологическом исследовании образцов тканей. Авторы благодарны д. м. н. О.В. Паклиной, ФГБУ ГМЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна за помощь в гистохимических исследованиях.

2.2.2 Приготовление динитрозильного комплекса железа

Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) с глутатионом синтезировали путём обработки раствора сульфата железа (Fluka, Buchs, Switzerland) и раствора глутатиона (Sigma, St. Louis, USA) газообразным NO под давлением 100 мм.рт.ст. и молярным соотношением Fe^{2+} и глутатиона, равным 1:2. Синтез проводили в сосуде Тунберга, содержащим 100 мл газовой фазы и 4.5 мл раствора глутатиона. 0.5 мл раствора сульфата железа в дистиллированной воде (pH 5.5) и раствор глутатиона (4.5 мл) в 15 mM HEPES буфере (pH 7.4) помещали соответственно в верхнюю и нижнюю часть сосуда. Затем после откачки воздуха в сосуд напускали NO, после чего при встряхивании сосуда в присутствии NO смешивали растворы железа и глутатиона, и через 5 минут откачивали NO. В результате в растворе возникали диамагнитные димерные ДНКЖ (формула $[(RS-)_2Fe^+(NO^+)_2]_2^{2+}$) (рисунок 3).

Сами по себе эти комплексы не дают сигнала ЭПР. Последний регистрируется в препарате этих димерных ДНКЖ при переходе $Fe(NO)_2$ групп из димерных ДНКЖ на тиоловые группы белков с образованием парамагнитных моноядерных ДНКЖ (формула $[(RS-)_2Fe^+(NO^+)_2]^+$), связанных с белками.

Аналогичное превращение с образованием низкомолекулярных мономерных ДНКЖ имеет место при добавлении 20-кратного избытка глутатиона с повышением pH до 10-11. Характерный ЭПР-сигнал таких комплексов имеет следующие значения g-фактора: $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,014$, $g_{cp.} = 2,03$.

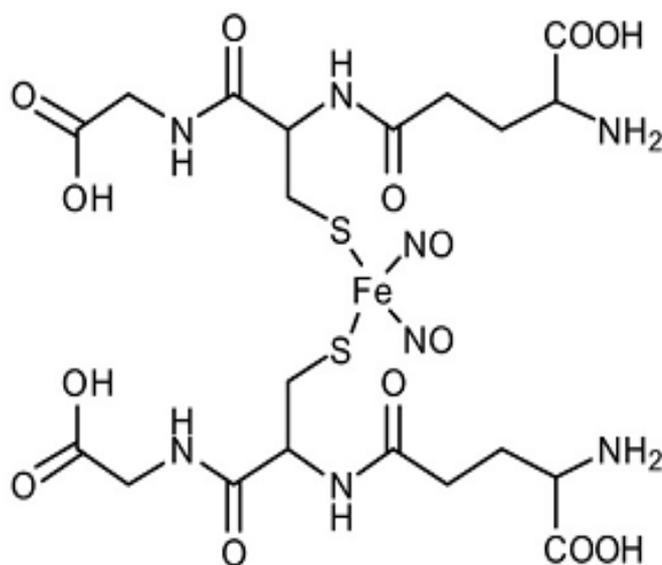


Рисунок 3. Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) с глутатионом

2.2.3 Образование нитрозильных комплексов NO с ингибином

В исследовании использовали ингибин производства ЗАО «СКАЙ Лтд». Шаги по выделению ингибина включают преципитацию гепаринсефарозой, фенилсефарозой, сефакрилом S200, Сефадексом 200, хроматографию, обратнoфазную HPLC, SDS-полиакриламидный электрофорез. (Патенты на методы выделения №2185180, 2201241).

Опыт проводили следующим образом. Согласно ранее разработанной методике ингибин был растворен в дистиллированной воде до концентрации 200 мкг белка в 300 мкл воды. pH раствора составил 6,3-6,5 при 20°C. К такой пробе добавляли динитрозильный фосфатный комплекс в конечной концентрации 800 мкМ в 300 мкл. Несвязавшаяся часть фосфатного ДНКЖ быстро распадается и при записи ЭПР спектра (рисунок 5 спектр 1) такого раствора мы наблюдаем сигнал типичного динитрозильного высокомолекулярного комплекса

аналогичного приведенному на рисунок 4 (спектры 1, 2, 3). Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре фирмы Bruker ECS-106 (ФРГ), $H=336$ мТл, развертка поля 20 мТл, Р-мощность СВЧ-источника - 10-20 мВт, усиление 10^3 - 10^5 , амплитуда модуляции 0,5 мТл, $\tau=0,163$ с, X-диапазон, температура записи спектров 20°C . Количество накоплений спектров определяется конкретной интенсивностью ЭПР сигнала. Для достижения максимальной чувствительности методики использовали до 30 накоплений.

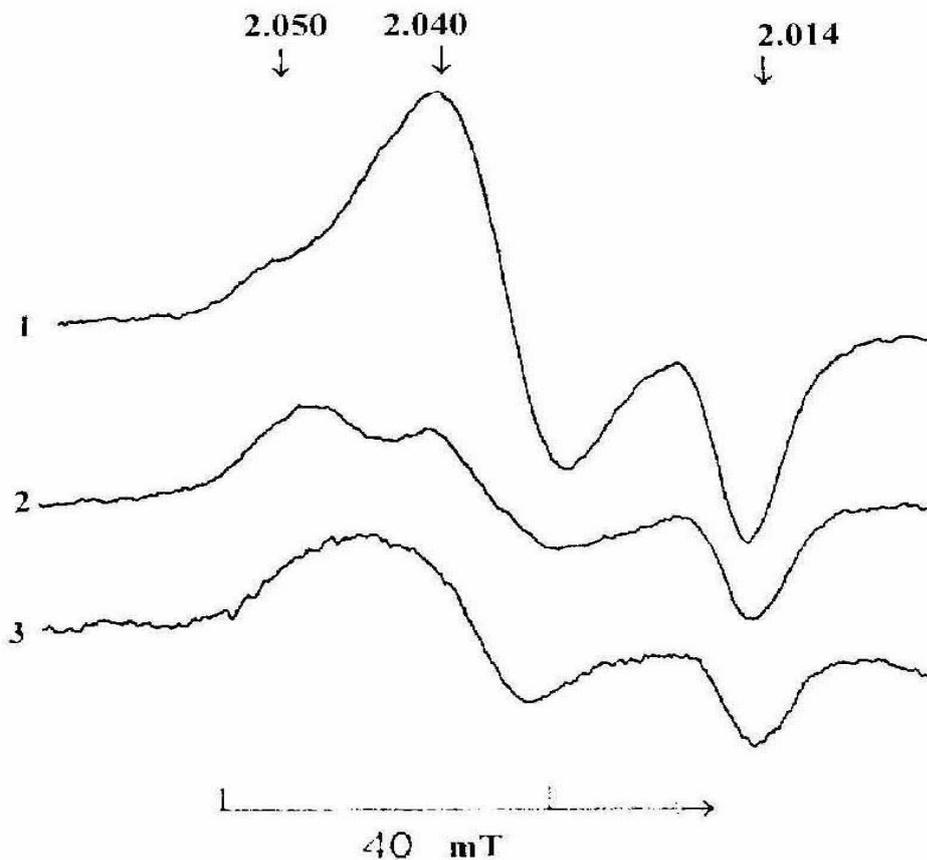


Рисунок 4. Спектры ЭПР динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) на альбумине. 1 – цистеиновый, 2 — фосфатный, 3 — тиосульфатный.

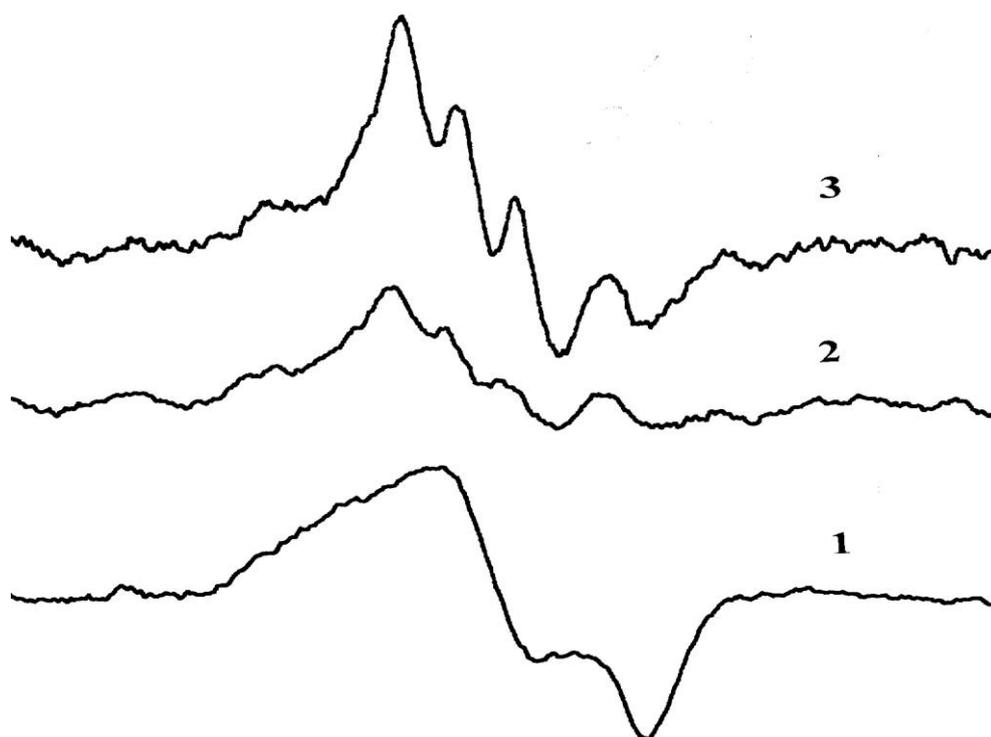


Рисунок 5. Спектры ЭПР ДНКЖ белка ингибина.

1. 3 минуты прогревания в кипящей бане, запись спектра через 3 минуты, рН раствора 6,3-6,5.
2. то же, рН раствора 7,4-7,6.
3. рН раствора 7,4-7,6, спустя 50 минут после 3-минутного прогревания в кипящей бане. Спектры записаны при 20°C.

2.2.4 Наблюдение поведенческих реакций

Наблюдения проводили ежедневно, отбирая по 2 особи случайным образом из опытной и из контрольной группы в течение двух часов (11-13 ч. дня). Фиксировалась общая продолжительность внешнего проявления болевых приступов, определяемых по характерным позам животных [Berkley, 2007] (рисунок 6), а также продолжительность каждого отдельного приступа (в секундах). Животные для наблюдений изолировались в проволочных клетках. Наблюдения производились прежде введения препарата. Подобные бихевиоральные исследования довольно широко распространены в мировой

исследовательской практике, и опыты на животных (преимущественно приматах) достаточно адекватно моделируют патологические процессы у человека [Arnold, 2011].

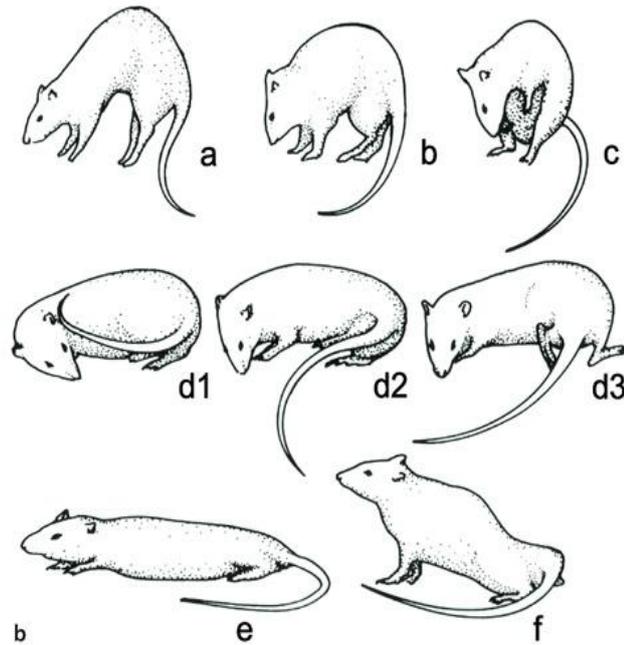


Рисунок 6. Типичные позы животных, свидетельствующие о болевых приступах [Berkley, 2007].

2.2.5 Исследования методом ЭПР спектроскопии

Для исследования брали образцы крови, печени, брюшной стенки с малыми имплантатами, больших имплантатов (творожистое содержимое удаляли и исследовали отдельно) и противоположной брюшной стенки. Образцы тканей помещали в цилиндрическую форму диаметром 4мм и замораживали в жидком азоте.

Сигналы ЭПР регистрировали при температуре жидкого азота ($77\text{ K} = -196^\circ\text{C}$) и 20°C на спектрометре фирмы "Брукер" (ФРГ) ECS-106, имеющего резонатор TE-102, $H=336\text{ мТл}$, развертка поля 20 мТл , Р-мощность СВЧ-источника - $10\text{-}20\text{ мВт}$, усиление $10^3\text{-}10^5$, амплитуда модуляции $0,5\text{ мТл}$, $\tau=0,163\text{ с}$, X-диапазон, и на модифицированном спектрометре Radiopan SE/X 2544 (Польша), имеющем

резонатор TE-102, в X-диапазоне, развертка поля 160 мТл (образцы крови также исследовали при 320 мТл), Р-мощность СВЧ источника – 10-20 мВт, усиление 10^5 , амплитуда модуляции 0.5 мТл, $\tau = 0.163$ с.

В качестве стандарта нами использован парамагнитный моонитрозильный комплекс МНИК ДЭТК-Fe-NO, имеющий следующие значения g-фактора: $g_{\perp}=2,035$ и $g_{\parallel}=2,02$. Растворы различных концентраций дитиокарбомата в диметилсульфоксиде и сульфата железа (II) в малом количестве воды обрабатывали под вакуумом в колбе Тунберга газообразным оксидом азота (NO). Методом двойного интегрирования оценивали концентрацию парамагнитных частиц (молекул) сопоставляя площади спектров ЭПР образца и стандарта. Такой подход является общепринятым для оценки парамагнитных центров методом спектроскопии ЭПР. Ошибка метода обусловлена точностью операции интегрирования спектров и составляет 10-20%. Разброс воспроизведения спектра одного образца не более 2-4%.

2.2.6 Статистическая обработка данных

Объем имплантатов определяли в мм^3 по формуле для эллипсоидов: длина * ширина * высота * $\pi/6$. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 6.0, AnalystSoft BioStat 2009 и Apache Open Office 4. Нормальность распределения выборок оценивали по критерию Колмогорова. Поскольку распределение подавляющего большинства выборок отлично от нормального и им свойственна значительная асимметрия — значимость различий между выборками оценивали при помощи непараметрических методов: U-теста Манна-Уитни-Уилкоксона — он определяет зону перекрещивающихся значений между двумя ранжированными рядами и применим к выборкам весьма малого объема; критерия Краскела-Уоллиса — обобщения теста Манна-Уитни для сравнения нескольких выборок; критерия Колмогорова-Смирнова — определяющего принадлежность двух выборок одному закону распределения; также применялся критерий Фишера. [Гублер, 1973].

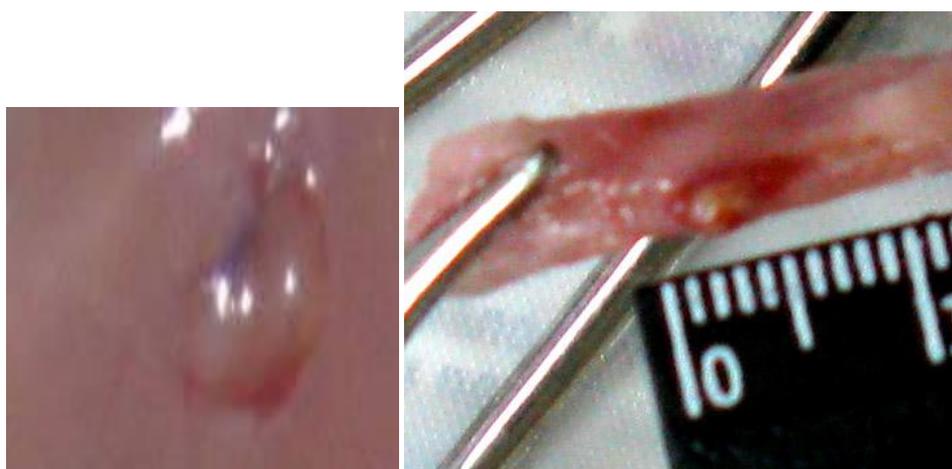
2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

2.3.1. Воздействие на течение экспериментального эндометриоза гормона ингибина

2.3.1.1 Патологоанатомические данные

Количественную оценку лечебного действия ингибина проводили на модели эндометриоза на крысах [Хопёрская, 2009]. Результаты вскрытия подопытных животных показали следующее. В контрольной группе через 2 недели после операции очаги преимущественно имеют вид прозрачных пузырьков, наполненных жидкостью. На этой стадии они называются «белыми» очагами [Groothuis, 2005]. Типичный макроскопический вид сформированных очагов эндометриоза у крыс представлен на рисунке 7.

В наблюдениях контрольной группы к концу 6-й недели эксперимента очаги эндометриоза принимают принципиально иной вид, трансформируясь в эндометриоидную кисту или группу кист. Они представляют собой капсулы, заполненные творожистым содержимым (рисунки 8, 10, 11). Очаги часто соединены с брыжейкой кровеносными сосудами покрытыми слоем жировой ткани. Такие же сосуды (отсутствовавшие на момент пришивания имплантатов) подходят к ним по поверхности брюшной стенки (рис 9).



а

б

Рисунок 7. Вид фрагмента брюшной полости животного с имплантатом из контрольной группы (а) и группы с введением ингибина (б), после вскрытия.



Рисунок 8. Содержимое капсулы.

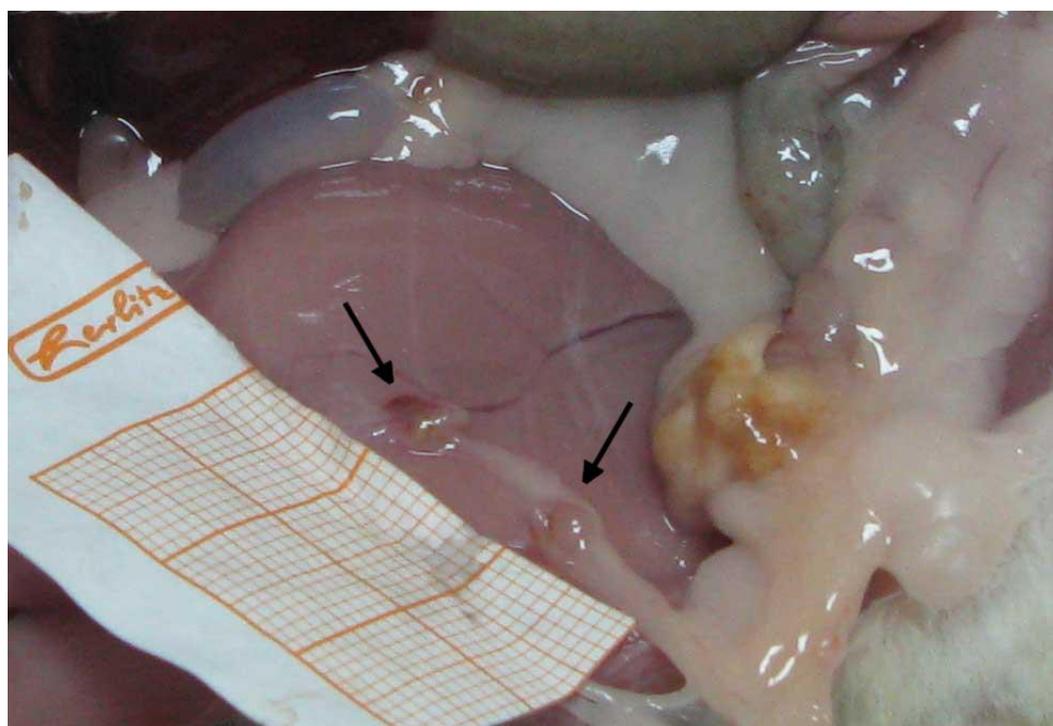


Рисунок 9. Контрольная группа. Два имплантата с тяжами и сосудами.



Рисунок 10. Контрольная группа, имплантат 7 мм.



Рисунок 11. Контрольная группа.
Типичный вид очага.



Рисунок 12. Группа с введением
ингибина. «Шоколадная» киста

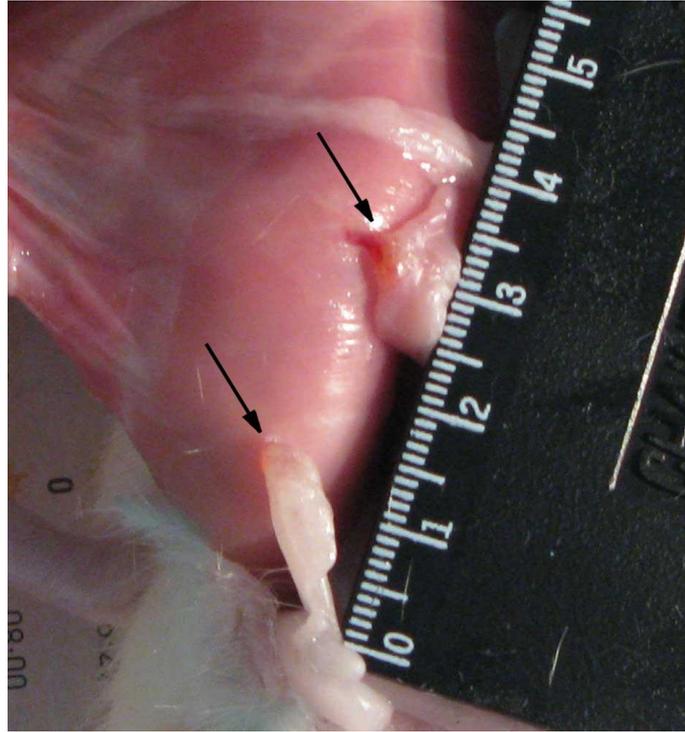


Рисунок 13. Группа с введением ингибина. Остатки одного из имплантатов, второй имплантат с жировым тяжом.

Объёмы очагов определялись по формуле для эллипсоида. Как видно из диаграммы (рисунок 14), отмечается статистически значимое уменьшение размеров очагов (с $113,3 \pm 237,6$ до $11,5 \pm 19,5 \text{ мм}^3$, $p < 0,05$).

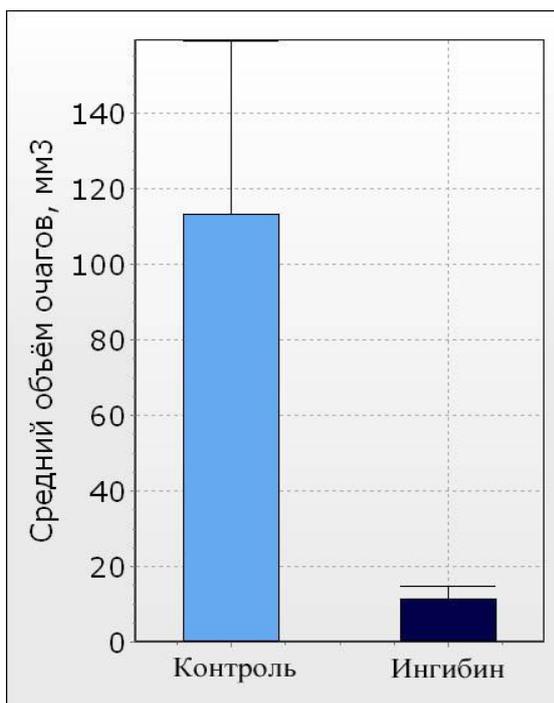


Рисунок 14. Объёмы очагов в эксперименте с ингибином. Данные представлены в форме «среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего».

2.3.1.2 Гистохимическое исследование

Результаты гистологического исследования показали, что в первой контрольной группе в конце 1-й и 2-й недель в области аутотрансплантации фрагмента рога матки формируется активный очаг эндометриоза. Он представлен двумя компонентами – активным стромальным, богатым клетками, и единичными мелкими железами с узким округлой формы просветом, выстланными кубическим или цилиндрическим эпителием (эпителий в фазах покоя или пролиферации).

Во всех случаях характерна слабо выраженная диффузная воспалительная (лейкоцитарная) инфильтрация стромы эндометрия. На границе с аутотрансплантатом в тканях передней брюшной стенки встречаются крупные очаги лейкоцитарной инфильтрации, причем на 2-й неделе – с примесью макрофагов и лимфоцитов, что указывает на развитие хронического воспаления, однако оно не переходит на аутотрансплантат и очаги деструкции в нем не выявляются (рисунки 15, 16).

Воспалительная реакция не выявляется, за исключением участков, где в прилежащей к эндометриоидной кисте мышечной ткани передней брюшной стенки развиваются очаги дистрофии и некроза миоцитов (рисунок 17).

В отличие от наблюдений второй контрольной группы, в основной группе к концу 6-й недели эксперимента на месте аутотрансплантата выявляется чаще только тканевой детрит с выраженной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией тканей передней брюшной стенки. Типичны крупные очаги обызвествления (рисунок 18).

В других случаях еще сохраняется эндометриоидная киста, но в ее стенках наблюдается острое выраженное полнокровие, резко выраженная воспалительная лейкоцитарная инфильтрация. Кроме того, выстилающий кисту эпителий становится уплощенным, содержимое просвета – хлопьевидным (рисунок 19).

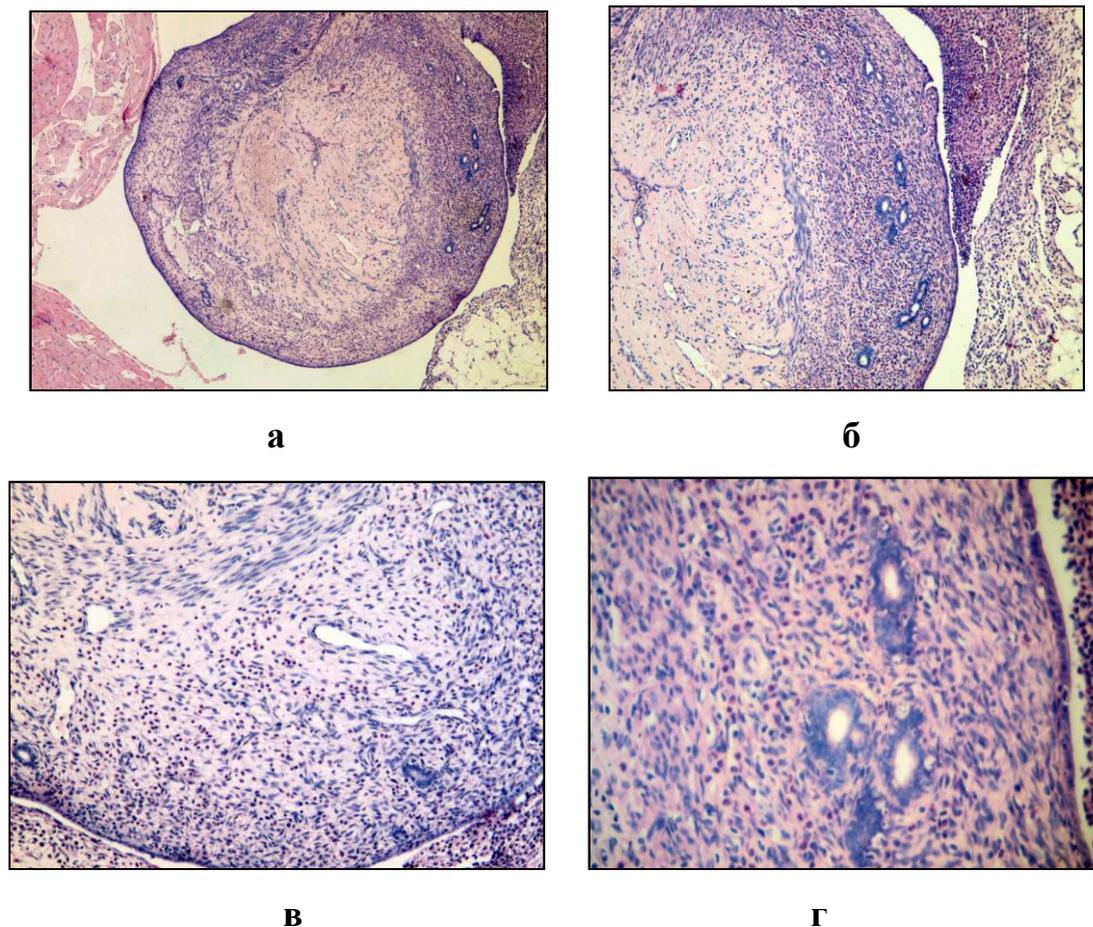


Рисунок 15. Контрольная группа, 1-я неделя эксперимента.

а) ауто трансплантат (в центре) в передней брюшной стенке, представленный тканью эндометрия и миометрия. Вверху справа – очаговая выраженная лейкоцитарная инфильтрация участка брюшины на границе с ауто трансплантатом;

б) участок ауто трансплантата представлен эндометрием с активным стромальным компонентом, богатым клетками, и с небольшим количеством желез с узким округлой формы просветом. В прилежащей брюшине (справа вверху) отмечается очаговая массивная (на границе с ауто трансплантатом), а в эндометрии – диффузная слабо выраженная лейкоцитарная инфильтрация;

в) участок ауто трансплантата представлен эндометрием с активной стромой, богатой клетками, с единичными железами с узким округлой формы просветом. К нему сверху примыкает ткань миометрия с сосудами с расширенным просветом и утолщенными стенками. Преимущественно в эндометрии и прилежащей брюшине (внизу) отмечается слабо выраженная диффузная лейкоцитарная инфильтрация;

г) эндометрий с активной стромой, богатой клетками, немногочисленными железами с округлым узким просветом, выстланными кубическим эпителием, покрытый слоем поверхностного эпителия. В эндометрии – слабо выраженная диффузная лейкоцитарная инфильтрация. К аутотрансплантату прилежит (справа) брюшина, в этом участке – с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, а – х 40, б – х100, в – х200, г – х400.

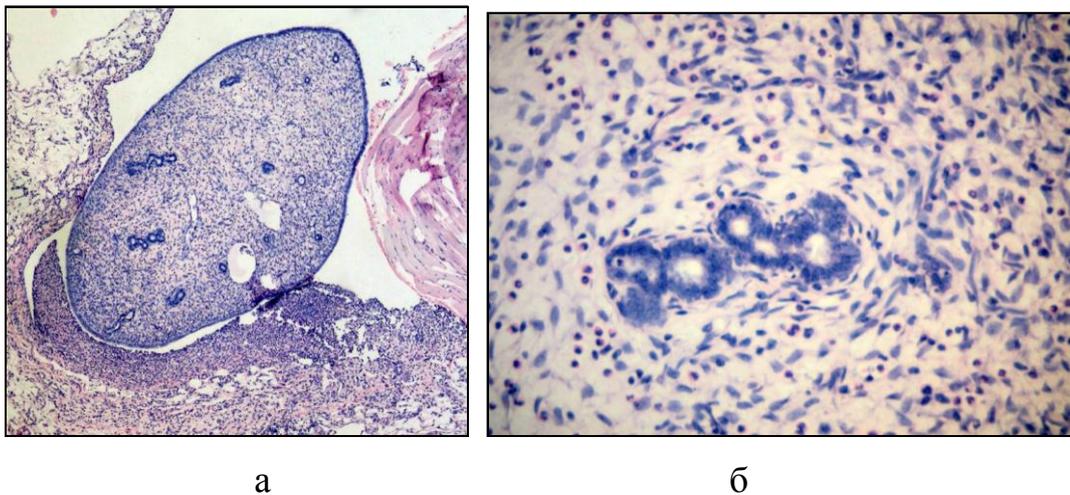


Рисунок 16. Контрольная группа, 2-я неделя эксперимента.

а) аутотрансплантат (в центре), окруженный брюшиной с жировой тканью (слева и внизу) и мышечной тканью (справа). Ткань аутотрансплантата сохранна, представлена, в основном, эндометрием с активным стромальным и неактивным железистым компонентами, покрыта слоем поверхностного эпителия. В центре аутотрансплантата – элементы миометрия с расширенными сосудами. На границе с аутотрансплантатом очаги лейкоцитарной инфильтрации брюшины и прилежащей жировой ткани (внизу);

б) эндометрий представлен двумя компонентами – активной стромой, богатой клетками и единичными железами с узким округлым просветом, выстланными преимущественно кубическим и цилиндрическим эпителием. В эндометрии – слабо выраженная диффузная лейкоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином, а – х40, б – х400.

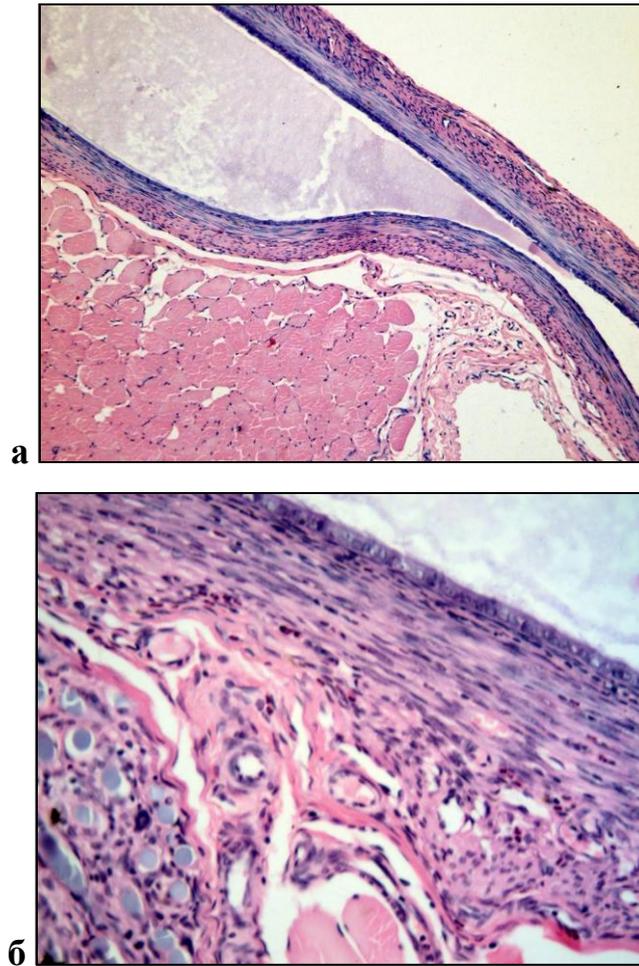


Рисунок 17. Контрольная группа, 6-я неделя эксперимента.

а) Аутотрансплантат представлен крупными кистозно расширенными железами эндометрия, фрагмент одной из таких желез со спавшимся просветом – в центре рисунка (эндометриоидная киста), внизу – мышечная и соединительная ткань передней брюшной стенки. В просвете эндометриоидной кисты – слабобазофильное содержимое. Воспалительная инфильтрация отсутствует. Дистрофические изменения части мышечных клеток передней брюшной стенки;

б) Аутотрансплантат в виде эндометриоидной кисты. Фрагмент стенки эндометриоидной кисты, в ее просвете – слабо базофильное содержимое. Внизу эндометриоидная киста прилежит к мышечной и соединительной ткани передней брюшной стенки с крупным очагом выраженных дистрофических изменений и некроза мышечных клеток и слабой диффузной лейкоцитарной инфильтрацией.

Окраска гематоксилином и эозином, а – х40, б – х400

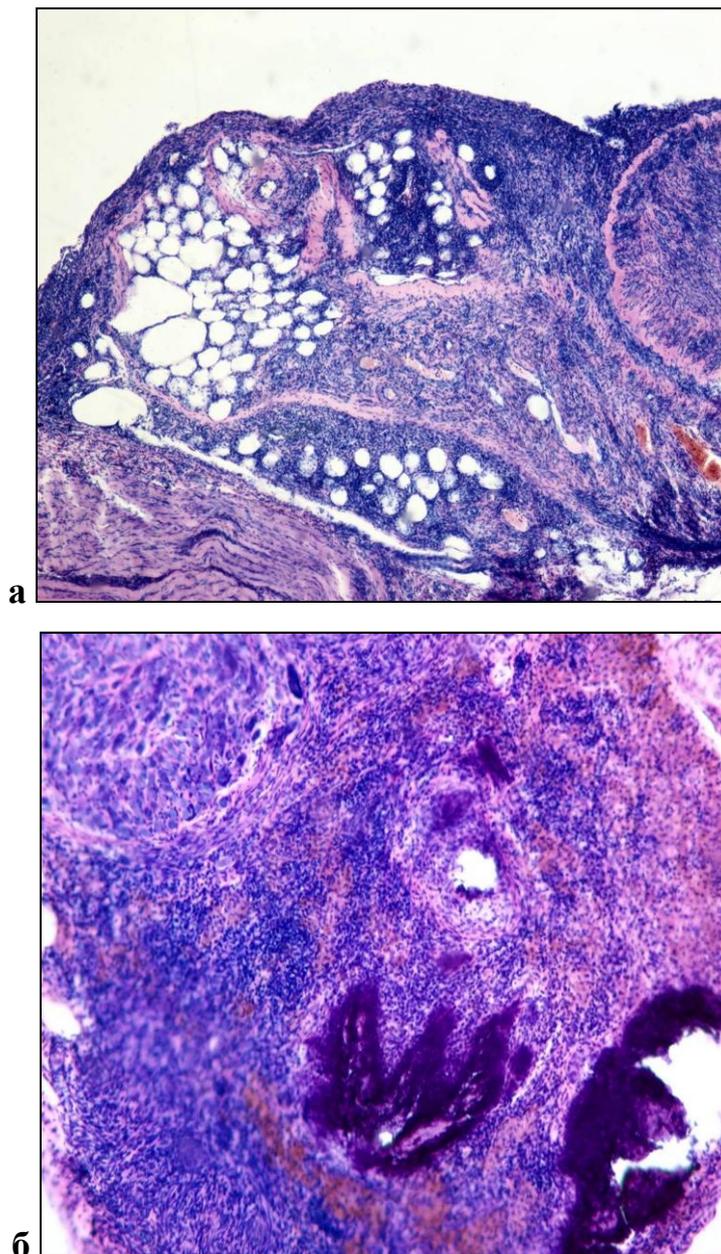


Рисунок 18. Группа с введением ингибина, 6-я неделя эксперимента.

На месте аутотрансплантата тканевой детрит и выраженная очаговая воспалительная (лейкоцитарная) инфильтрация соединительной, жировой и мышечной ткани передней брюшной стенки с крупными очагами обызвествления. Ткань эндометрия или миометрия не выявляется.

Окраска гематоксилином и эозином, а – х40, б – х60.

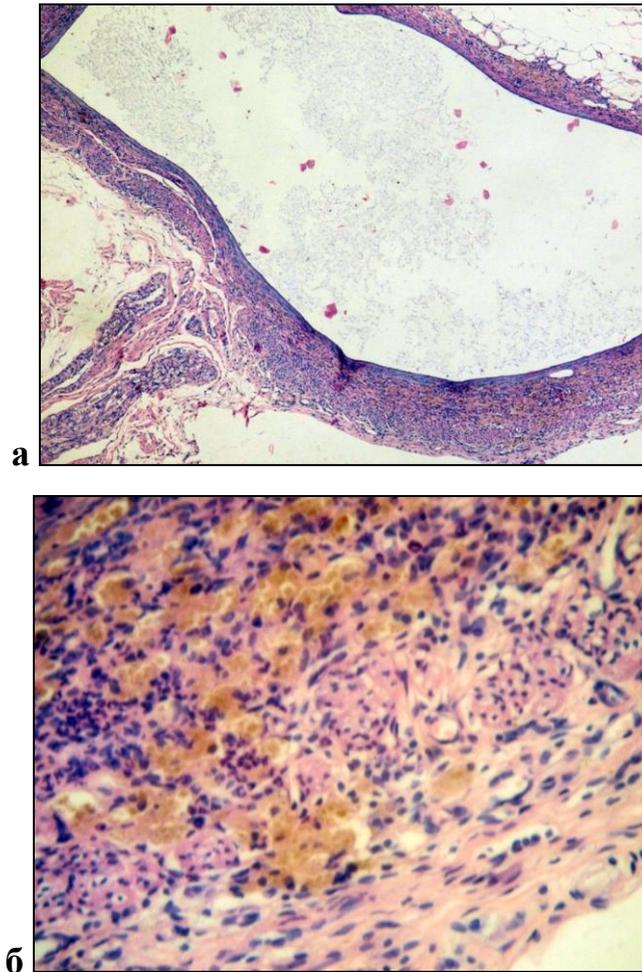


Рисунок 19. Группа с введением ингибина, 6-я неделя эксперимента.

а) аутотрансплантат представлен крупной кистозно расширенной железой эндометрия (эндометриоидная киста). В ее просвете – слабо базофильное хлопьевидное содержимое. Внизу и вверху вокруг эндометриоидной кисты – мышечная, соединительная или жировая ткань передней брюшной стенки с крупными очагами выраженных дистрофических изменений и некроза мышечных клеток (внизу слева) и слабой лейкоцитарной инфильтрацией;

б) фрагмент стенки эндометриоидной кисты, представлен стромальными клетками, и снаружи (справа внизу) клетками, сходными с миометрием. В обоих случаях резко выражены полнокровие и очаговая воспалительная лейкоцитарная инфильтрация стенки кисты.

Окраска гематоксилином и эозином, а – х40, б – х400.

2.3.1.3 Оценка дозировки ингибина при терапии эндометриоза

Из данных, представленных в таблице 3 и рис 20, можно оценить степень ингибирования роста эндометриоидных очагов при использовании ингибина. Для препарата, полученного градиентным выделением, при дозировке 20мкг/кг объем уменьшен в 12,4 раза (по сравнению с контролем 210,7мм³), при 80 мкг/кг — в 7,5 раз, а при 400 мкг/кг — в 4,4 раза. Для препарата, полученного ступенчатым выделением, картина выглядит лучше: 20 мкг/кг — 14,6 раз, 80 мкг/кг — 15,9 раз, 120 мкг/кг — 4,3 раза, 400 мкг/кг с нагревом — 16,3 раза, без нагрева — в 12,9 раз. Если анализировать данные таблицы, проводя сравнение медиан, то картина выглядит намного более доказательно.

Выборки анализировались при помощи критериев Манна-Уитни (определяет, достаточно ли мала зона перекрещивающихся значений между двумя рядами — ранжированным рядом значений параметра в первой выборке и таким же во второй выборке), Колмогорова-Смирнова (используется для проверки гипотезы о принадлежности двух независимых выборок одному и тому же закону распределения) и Фишера (проверяет равенство дисперсий двух совокупностей). Попарное сравнение выборок приводит к следующим выводам:

1. все изученные препараты показали результаты, с достоверностью 80-95% отличающиеся от результатов, полученных на контрольных животных. ингибин эффективно действует во всех исследованных концентрациях.
2. отличия для градиентного препарата по дозам 20 мкг и 80 мкг, 20 мкг и 400 мкг статистически значимы (95%).
3. отличия для ступенчатого препарата по дозам 20 мкг и 80 мкг, 20 мкг и 400 мкг, 20 мкг и 400 мкг без нагрева статистически не значимы (95%).
4. отличия для дозы 20 мкг для градиентного и ступенчатого препаратов статистически не значимы.
5. отличия в действии дозы 80 мкг и 400 мкг для градиентного и ступенчатого препаратов статистически значимы.
6. действие дозы в 400 мкг ступенчатого препарата при нагревании и без

нагревания не приводят к отличиям в эффективности действия. Отличия статистически не значимы.

При анализе концентрационной зависимости действия препарата в рассмотрении не принимали дополнительные опухоли, образовавшиеся на трубах, шве и брюшине. Анализ объединенных данных принципиально не влияет на результаты и не меняет обоснованные статистическими исследованиями выводы.

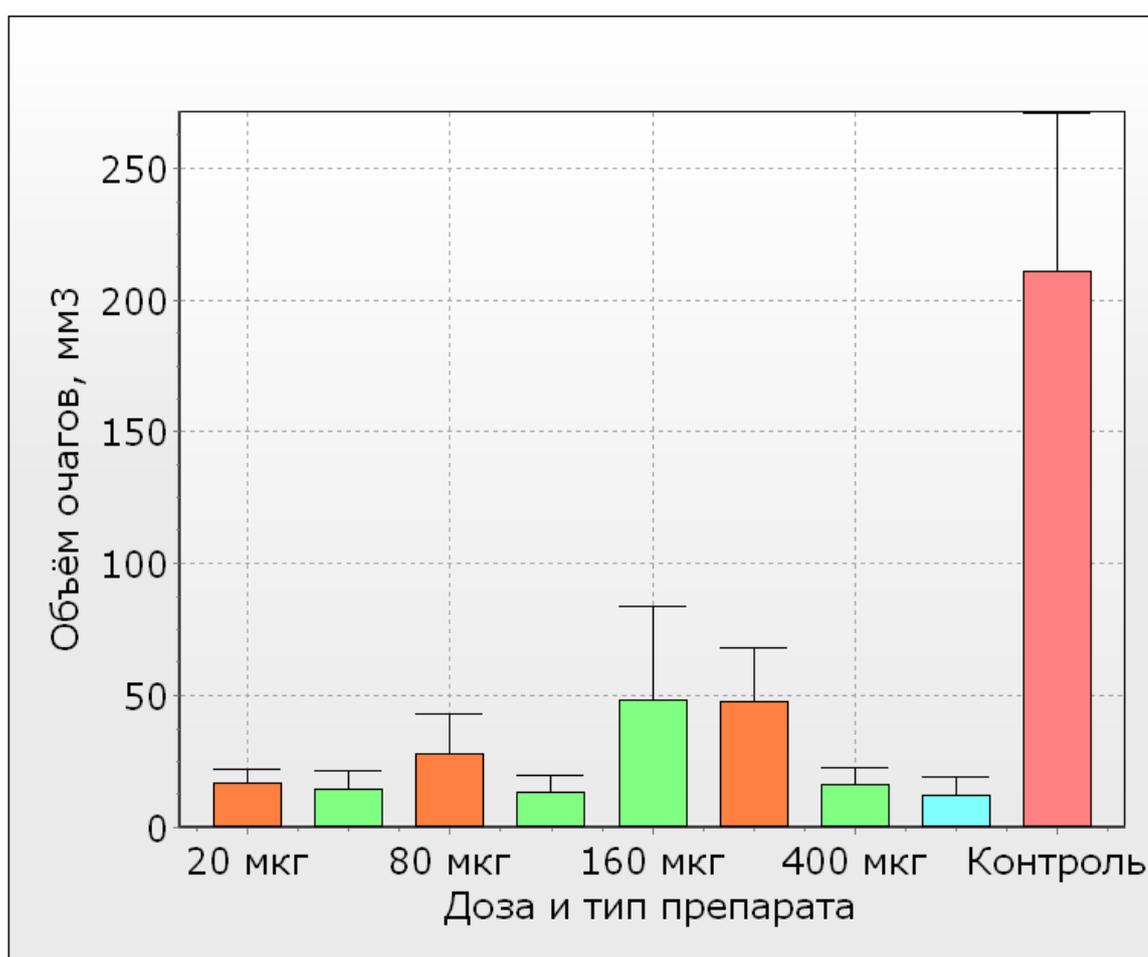


Рисунок 20. Объёмы очагов без учёта дополнительных опухолей. Оранжевым цветом показаны результаты для препарата, полученного методом непрерывного градиента, зелёным — ступенчатого градиента, синим — препарата, не подвергнувшегося термической обработке. Данные представлены в форме "среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего".

Таблица 2 Объёмы очагов при терапии эндометриоза у крыс ингибином, выделенным методами непрерывного и ступенчатого градиента.

	20 мкг непр.	20 мкг ступ.	80 мкг непр.	80 мкг ступ.	120 мкг ступ.	400 мкг непр.	400 мкг ступ.	400 мкг ступ. б/нагр.	Контр.
Среднее	17,0	14,4	27,9	13,2	48,3	47,5	16,3	12,4	210,7
Ст. откл.	17,3	21,6	50,3	20,4	112,0	69,3	20,1	22,5	370,9
Медиана	11,0	3,8	12,6	7,3	6,3	14,1	8,4	2,9	42,4

Таблица 3. Значения тестов Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни для выборок, сформированных без опухолей на трубах при сопоставлении опыта с контролем для препаратов непрерывного и ступенчатого градиентов при терапии эндометриоза у крыс.

	Равномерный градиент		Ступенчатый градиент	
	Тест Колмогорова- Смирнова	Тест Манна - Уитни	Тест Колмогорова- Смирнова	Тест Манна - Уитни
5 мкг	1,084	552	1,077	768
20 мкг	1,044	402	1,220	1032
40 мкг	-	-	1,153	744
100 мкг	0,644	372	1,084	1356
100 мкг без нагрева	-	-	1,433	420

Критические значения λ_k теста Колмогорова-Смирнова для сравнения с экспериментальным значением λ .

	0,05 (95 %)	0,1 (90 %)	0,2 (80%)
λ_k	1,358	1,224	1,07

2.3.2 Воздействие на течение экспериментального эндометриоза ДНКЖ с глутатионом

2.3.2.1 Патологоанатомические данные

При вскрытии животных брюшная полость осматривалась на предмет наличия эндометриоидных очагов. У контрольных животных, забитых через 4 недели после операции, наблюдали полное заживление швов и, после вскрытия, приживление имплантатов. Наряду с разрастанием имплантированной ткани наблюдали спаечные процессы и возникновение опухолей на брюшной стенке и кишечнике. Имплантаты и опухоли представляют собой либо прозрачные пузырьки, наполненные жидким содержимым, с усиленным ростом мелких кровеносных сосудов в окружающей их ткани (малые «белые» и «красные» очаги), либо довольно массивные шарообразные или эллипсоидные образования цвета хаки, наполненные творожистым содержимым (большие очаги). Типичный вид очагов в контрольной и опытной группах представлен на рисунках 21, 22. Количество животных с малыми имплантатами (те, сумма объемов которых в одном животном не превышает 20мм^3) составляет в контроле 20% от общего количества животных, а в опыте 60%. При сопоставлении по группам количество больших имплантатов и дополнительных опухолей, размером более 100мм^3 зафиксировано 25% в контроле и в опыте 9%.

При анализе результатов терапевтического эффекта динитрозильных комплексов в одной из серий была добавлена дополнительная контрольная группа, в которой животным вводился раствор комплекса железа с глутатионом без NO. Предполагалось, что этот комплекс в условиях высокой концентрации оксида азота в эндометриоидном очаге и окружающих тканях сам образует, например, ДНКЖ. Отношение средних объемов имплантатов контрольной группы и группы с введением комплекса Glu-Fe без оксида азота составляет 0,99, $p=0,7$. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что течение патологического процесса в группе с введением комплекса без NO практически не отличается от контрольной группы [Адамян, 2013, Burgova, 2014].



Рисунок 21. Типичный вид эндометриоидных очагов в опыте по введению ДНКЖ через 28 дней после операции. Контрольная группа.



Рисунок 22. Типичный вид эндометриoidных очагов в опыте по введению ДНКЖ через 28 дней после операции. Опытная группа.

В эксперименте с ранним введением комплекса (на 4 сутки после операции) отношение между средними величинами объемов имплантатов, полученными для контрольной и опытной групп, составляет 15,5 — 42. Доля имплантатов малого объема у животных в опыте составляет 66%, в контроле отсутствуют. Крупные имплантаты у животных в опыте не наблюдаются, в контроле они составляют 36% от общего числа очагов.

Типичный вид очагов в контрольной и опытной группах представлен на рисунке 23, 24.



Рисунок 23. Типичный вид эндометриоидных очагов в опыте по введению ДНКЖ через 4 дня после операции. Контрольная группа.



Рисунок 24. Типичный вид эндометриоидных очагов в опыте по введению ДНКЖ через 4 дня после операции. Опытная группа.

Сводные данные об объёме эндометриоидных очагов приведены в таблице 4. Распределение большинства полученных в экспериментах выборок данных отлично от нормального, им свойственна значительная асимметрия. Поэтому представление результатов в виде медианы характеризует свойства выборки лучше, чем «среднее арифметическое \pm среднеквадратическое отклонение». Значимость различий между выборками оценивали при помощи непараметрических методов: U-теста Манна-Уитни-Уилкоксона и критерия Колмогорова-Смирнова.

Различие между законами распределения контрольных и опытных выборок хорошо иллюстрируется сравнением вариационных рядов. На рисунке 25 объёмы

очагов ранжированы по размеру и нанесены на логарифмическую шкалу. Как видно из рисунка, в контроле очаги разной величины представлены относительно равномерно. У животных, обработанных ДНКЖ через месяц после операции, максимум распределения смещён в сторону мелких очагов. Однако особо крупные также составляют значительную долю — это показывает, что на зрелые очаги на поздних стадиях развития ДНКЖ воздействует недостаточно эффективно. Терапия гормоном ингибином и обработка ДНКЖ на ранней стадии развития очагов демонстрируют принципиально иную картину. В обоих опытах половина имплантатов не развились совершенно либо редуцировались без остатка. Очень крупные очаги (более 100 мм³) также отсутствуют. Такое распределение размеров показывает, что введение ДНКЖ в послеоперационный период эффективно блокирует развитие эндометриoidных очагов. Также можно предположить, что терапия ингибином приводит к регрессу уже созревших очагов.

Таблица 4. Средние объёмы эндометриoidных очагов в разных сериях эксперимента. Приведены результаты сравнения выборок по критериям Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова.

	Среднее, мм ³	Медиана, мм ³	Значимость отличий от контроля
Контроль	113,3 — 210,7	14,1 — 42,4	
Ингибин, введение с 28 сут.	11,5 — 48,3	2,9 — 14,1	p(U) < 0,004 p(K) < 0,04
ДНКЖ, введение с 28 сут.	11,4 — 106,5	0,5 — 7,1	p(U) < 0,1 p(K) < 0,003
ДНКЖ, введение с 4 сут.	5,0 — 12,0	0,0 — 0,5	p(U) < 0,001 p(K) < 0,0003

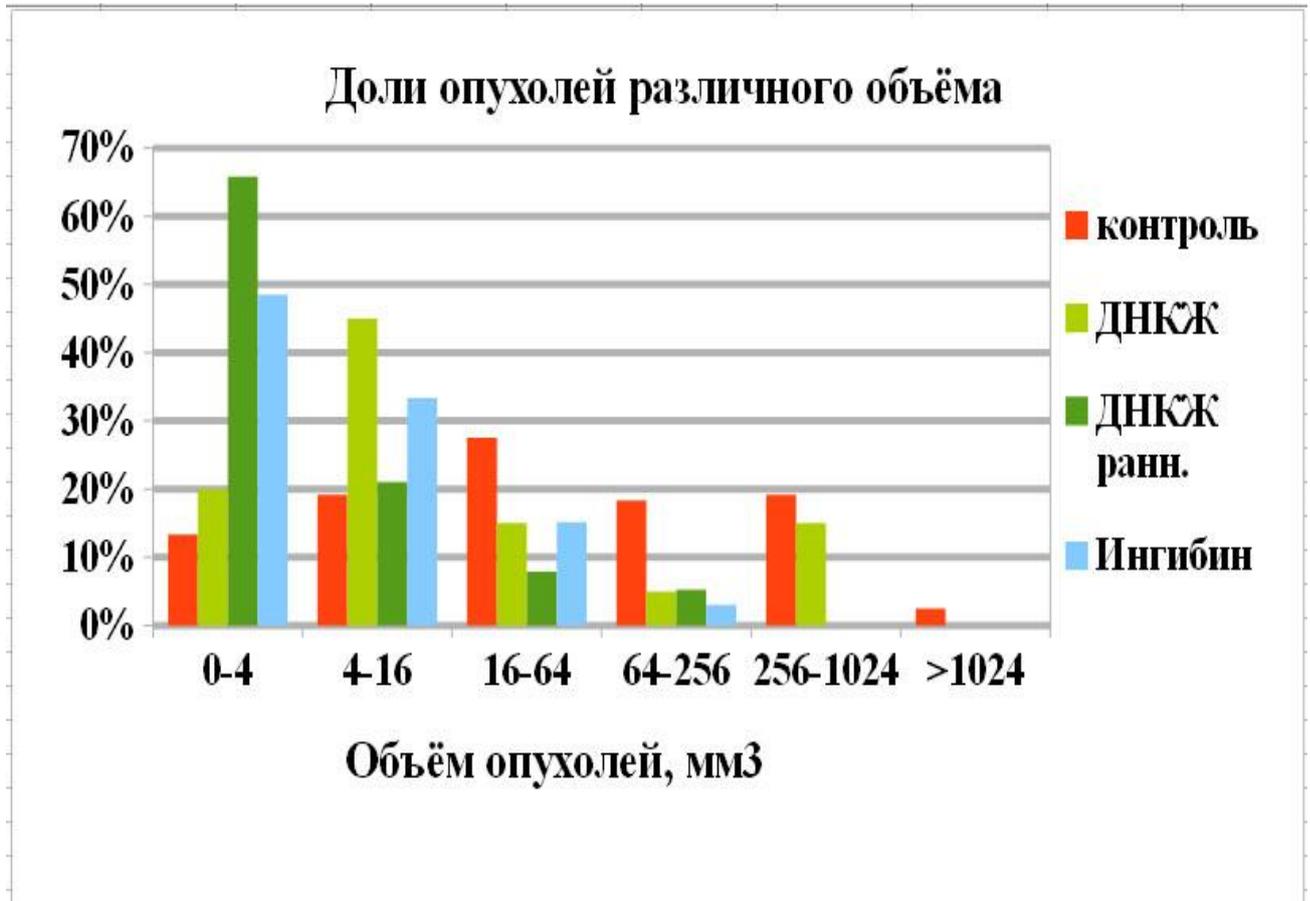


Рисунок 25. Доли очагов различных размеров в экспериментах по терапии модельного эндометриоза.

2.3.2.2 Гистохимическое исследование

В контрольных образцах тканей наблюдается наличие эндометриоидных желез, то есть присутствуют клетки эктопического эндометрия. Имеются признаки перерождения ткани — образование фиброзной псевдокапсулы — и воспаления: очаг заполнен детритом и нейтрофильными массами (рисунок 26). В части опытных образцов эндометриоидных желез не наблюдается, что свидетельствует о регрессии тканей очагов (рисунок 27, б). В других опытных образцах наблюдаются дистрофические изменения эпителия и стромы: набухание, слущивание, отложение коллагена, толщина стромального слоя уменьшена (рисунок 27, а, 28).

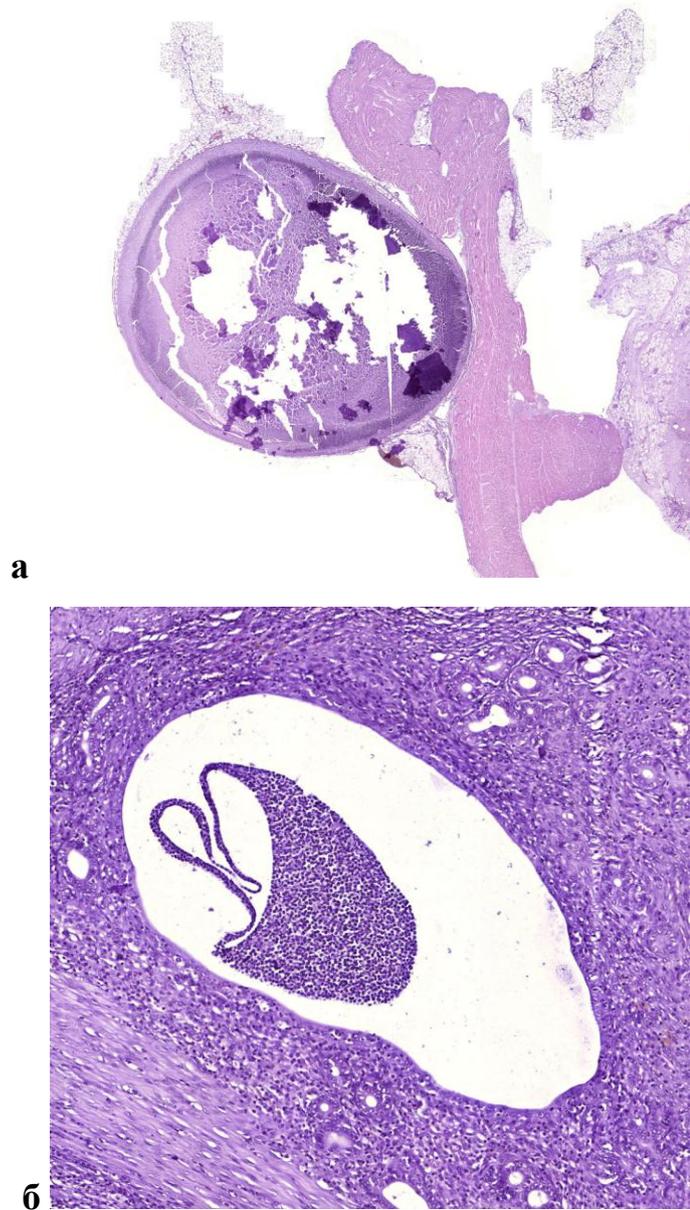


Рисунок 26. Образцы эндометриoidных очагов контрольной группы.

а) Инкапсулированный очаг на брюшине, заполненный детритом, бесструктурными клеточными массами, со сформировавшейся фиброзной псевдокапсулой. Элементов стромы эндометрия не обнаружено.

б) Аутотрансплантат представлен крупной кистозно-расширенной эндометриальной железой и рядом мелкими железами. Просвет заполнен нейтрофильными массами. Эндометриальная строма активная, инфильтрована нейтрофилами.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x50.

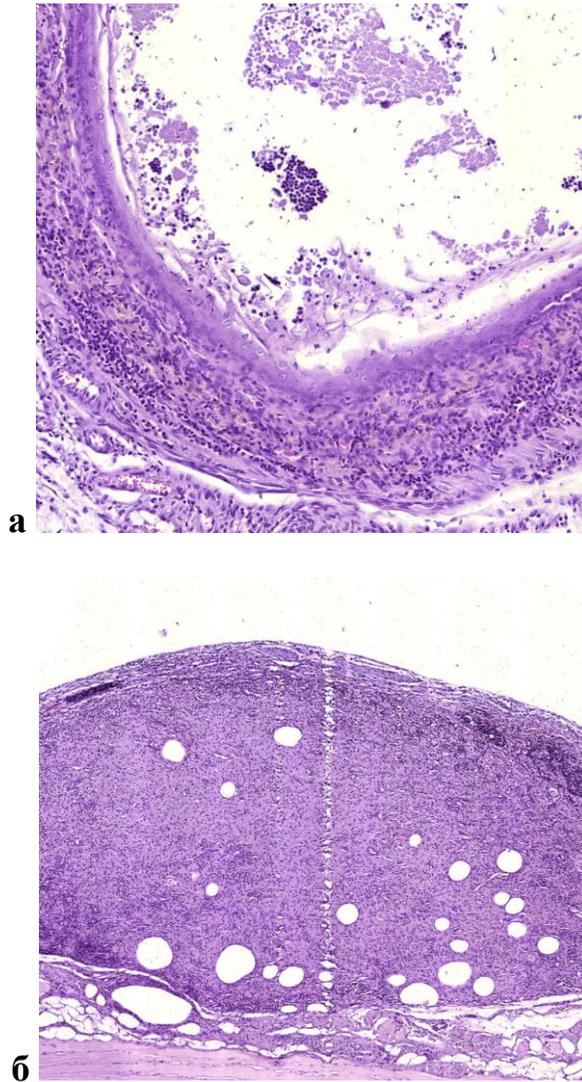


Рисунок 27. Образцы эндометриoidных очагов опытной группы после введения ДНКЖ на раннем этапе.

а) В очаге эндометриоза четко видны дистрофические изменения эпителия в виде набухания, слущивания в просвет железы, отсутствие стратификация, потеря клеточных границ. Строма с выраженной нейтрофильной инфильтрацией, отсутствие фигур митозов стромальных клеток, толщина стромального слоя уменьшена.

б) Очаг экспериментального эндометриоза с полным исчезновением эндометриальных желез и замещением их фиброзной тканью, отложением коллагена и присутствием зрелых липоцитов. Воспалительная инфильтрация скудная, по краю очага представлена лимфоцитами и плазмоцитами.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100.

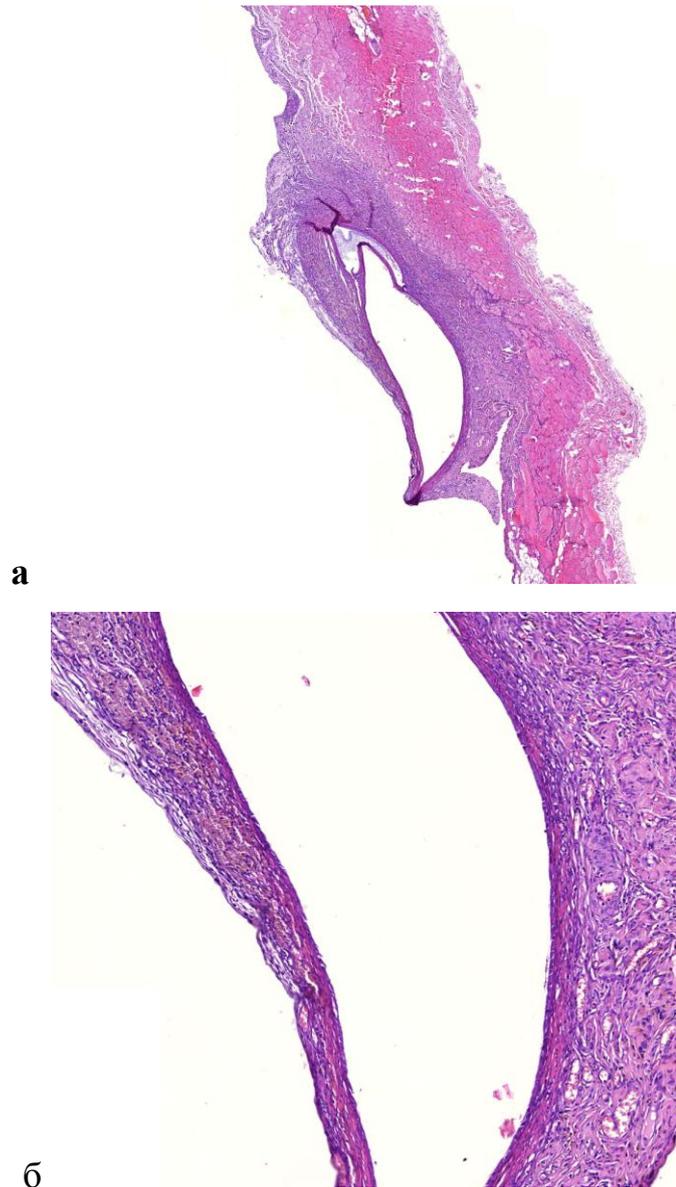


Рисунок 28. Образцы эндометриoidных очагов опытной группы после введения ДНКЖ на раннем этапе.

а) Очаг экспериментального эндометриоза на париетальном листке брюшины. Эндометриoidная железа кистозно расширена, вокруг формируется фиброзная псевдокапсула.

б) Очаг экспериментального эндометриоза на париетальном листке брюшины. При увеличении видны атрофия и уплощение эпителиального слоя и фибрирование эндометриoidной стромы с участками гиалиноза.

2.3.2.3 Наблюдение болевых приступов у животных с экспериментальным эндометриозом.

При измерении продолжительности отдельных болевых приступов спустя 28 дней после операции, в течение 12 дней, обнаружено, что средняя продолжительность отдельных болевых спазмов изменялась в течение всего измеряемого периода времени (таблица 5). Если в начале периода средняя продолжительность спазма для контрольной группы составляла 14-15 секунд, то в конце она составляла 7-10 секунд. Для опытной группы в конце измеряемого периода продолжительность приступа составляла 3-5 секунд. В контрольной группе изменение среднего времени отдельного приступа менее выражено (рисунок 29).

Таблица 5. Время болевых приступов.

День с момента операции	Общее время приступов за 2 часа, сек.		Среднее время одного приступа, сек.	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
29	396	377	14,50	16,50
30	131	78	9,75	8,19
31	179	15	7,16	7,50
32	266	70	14,00	5,00
33	502	266	8,96	9,85
36	126	27	8,40	5,40
37	265	72	6,63	8,00
38	528	43	10,78	3,07
39	351	134	9,24	12,18
40	15	26	7,50	3,71
42	127	35	9,77	5,00
44	25	21	8,33	4,20

Общая продолжительность приступов за период наблюдения изменялась в течение курса введения ДНКЖ (рисунок 30). При сравнении общей продолжительности болевых приступов за период наблюдения в контрольной и опытной группах обнаружено, что медиана в опытной группе в 4 раза меньше, чем в контроле (56 сек. против 222 сек.) [Адамян, 2013].

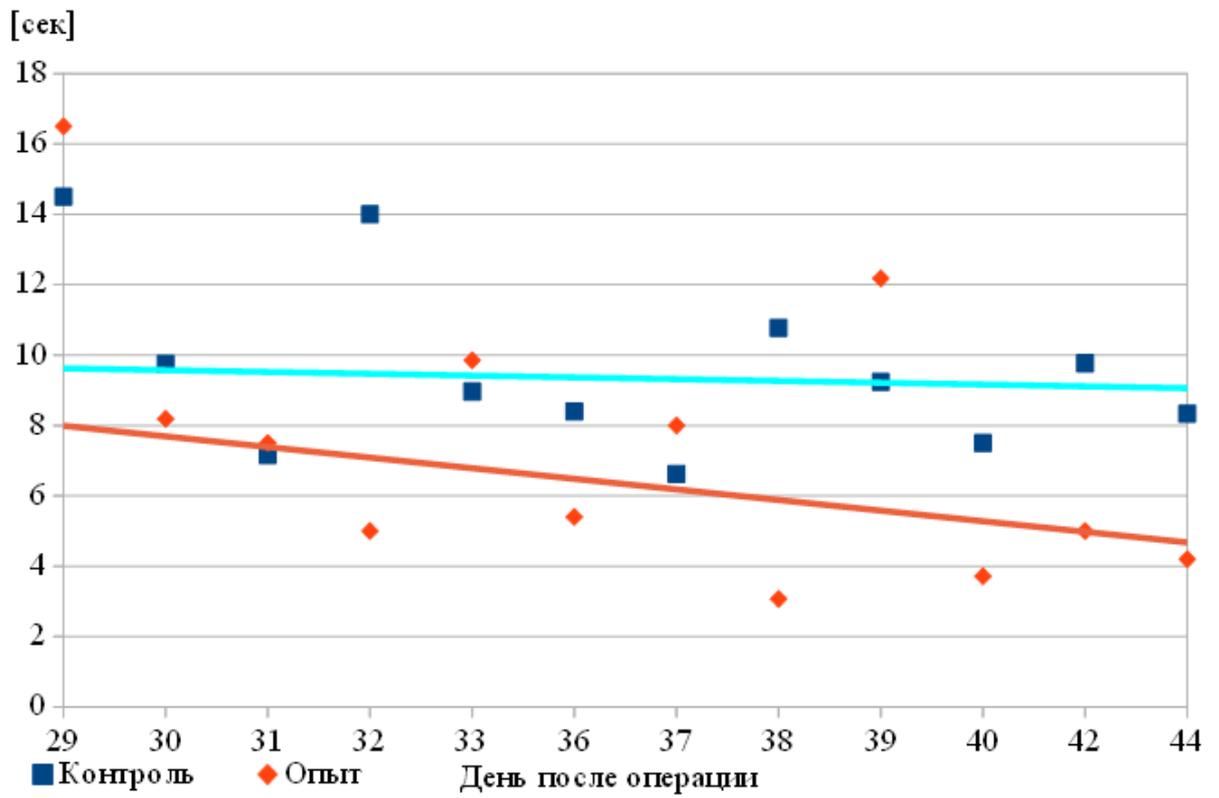


Рисунок 29. Среднее время болевого приступа, сек.

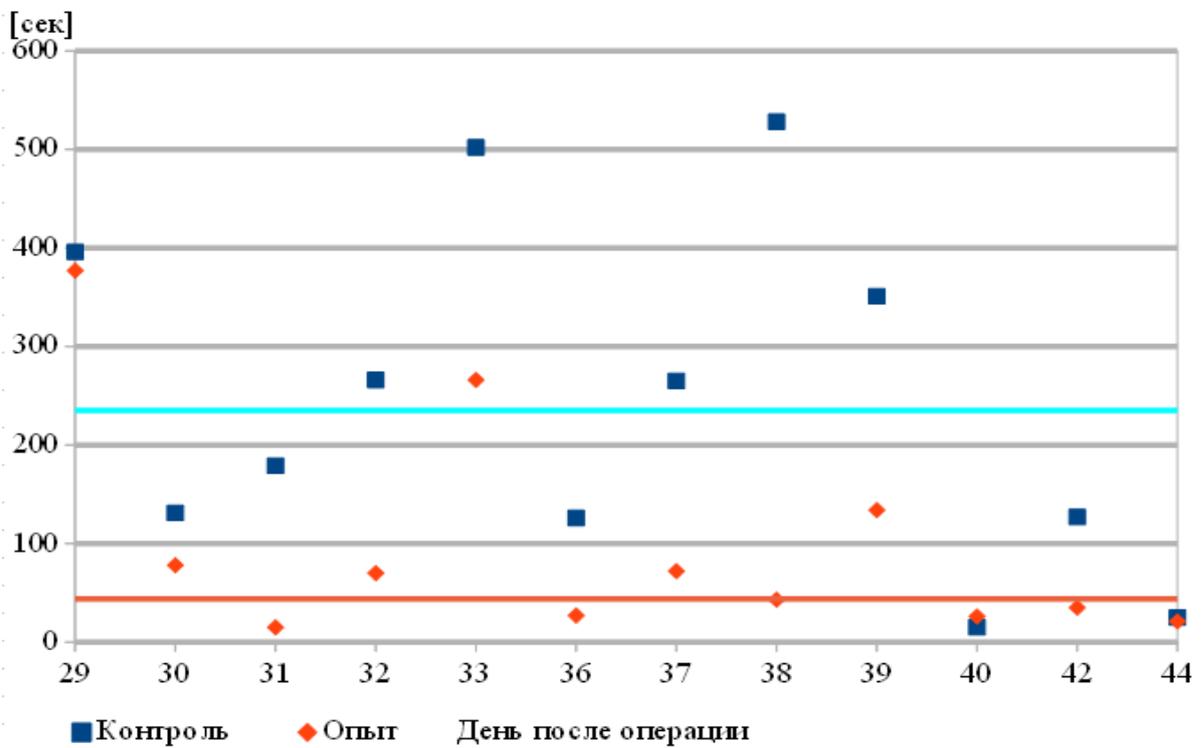


Рисунок 30. Суммарное время болевых приступов (за два часа наблюдения).

2.3.3 Исследования методом ЭПР-спектроскопии

2.3.3.1 Содержание оксида азота в тканях и органах животных с эндометриозом

Образцы тканей были исследованы методом ЭПР-спектроскопии. В спектрах ЭПР образцов печени животных из контрольных групп (рисунок 31, 1) мы наблюдаем сигналы с g -фактором 2,00; 1,97 и 1,94. Первый сигнал является сигналом семи- и убихиноновых радикалов, относящихся к цепи транспорта электрона. Второй – дублетный сигнал с g -фактором 1,97 – относится к сигналам молибдена альдозы. Третий представляет собой главную компоненту сигнала железосерных белков из митохондриальной цепи транспорта электрона. Дифференциальные интенсивности этих сигналов в спектрах ЭПР печени опытной и контрольной групп заметно не различаются.

Практически во всех образцах печени, кишечника и эндометриозидных очагов, в опытных и контрольных группах, регистрируется характерный сигнал моноядерных белковых ДНКЖ ($g_{cp} = 2,03$), концентрацией 0,2-0,7 мкМ и указывающий на синтез оксида азота (рисунок 31, 2, рисунок 32 D).

Наряду с указанными выше сигналами, в спектрах ЭПР печени, кишечника, крови, селезенки и эндометриозидных очагов регистрируются сигналы нитрозильных комплексов гемового железа в концентрации до 2-12 мкМ. Во всех образцах хорошо заметен характерный сигнал HbNO. В соответствии с литературными данными, сигнал ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина характеризуется триплетной СТС, зарегистрированной на рисунке 32 и значениями g -фактора в районе 2,07-1,98. Его компонента при $g=1,98$ характерна для сигнала ЭПР комплексов гема в β -субъединице гемоглобина, триплетная СТС для этого комплекса нехарактерна. Она присуща сигналу ЭПР нитрозильных комплексов α -субъединиц, но в этом случае компонента при $g=1,98$ отсутствует. (рис 31, 32).

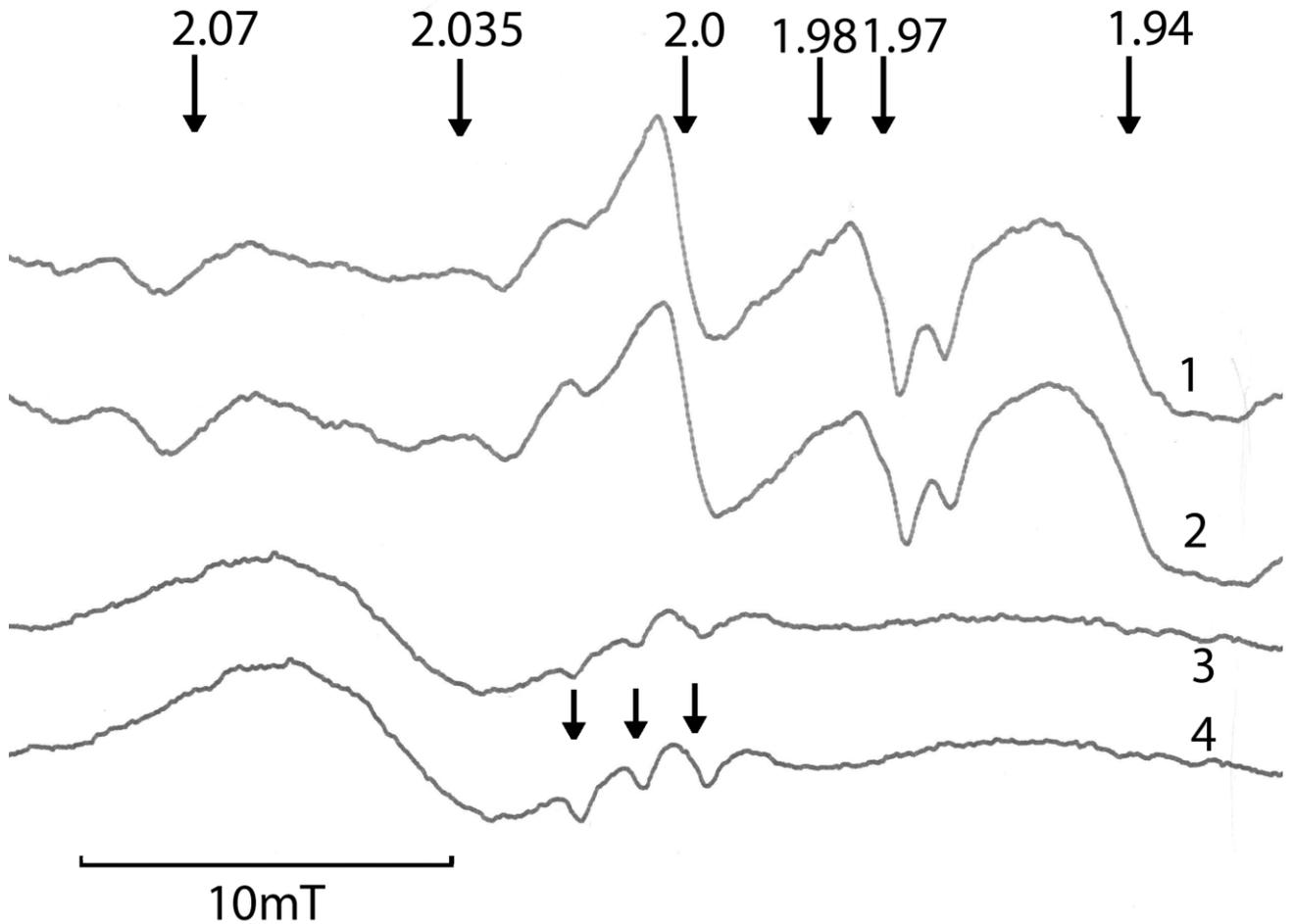


Рисунок 31. Типичные ЭПР-спектры образцов тканей.

1. Спектр образца печени крысы контрольной группы;
2. Спектр образца печени крысы после терапии ДНКЖ;
3. Спектр образца крови крысы контрольной группы;
4. Спектр образца крови крысы после терапии ДНКЖ.

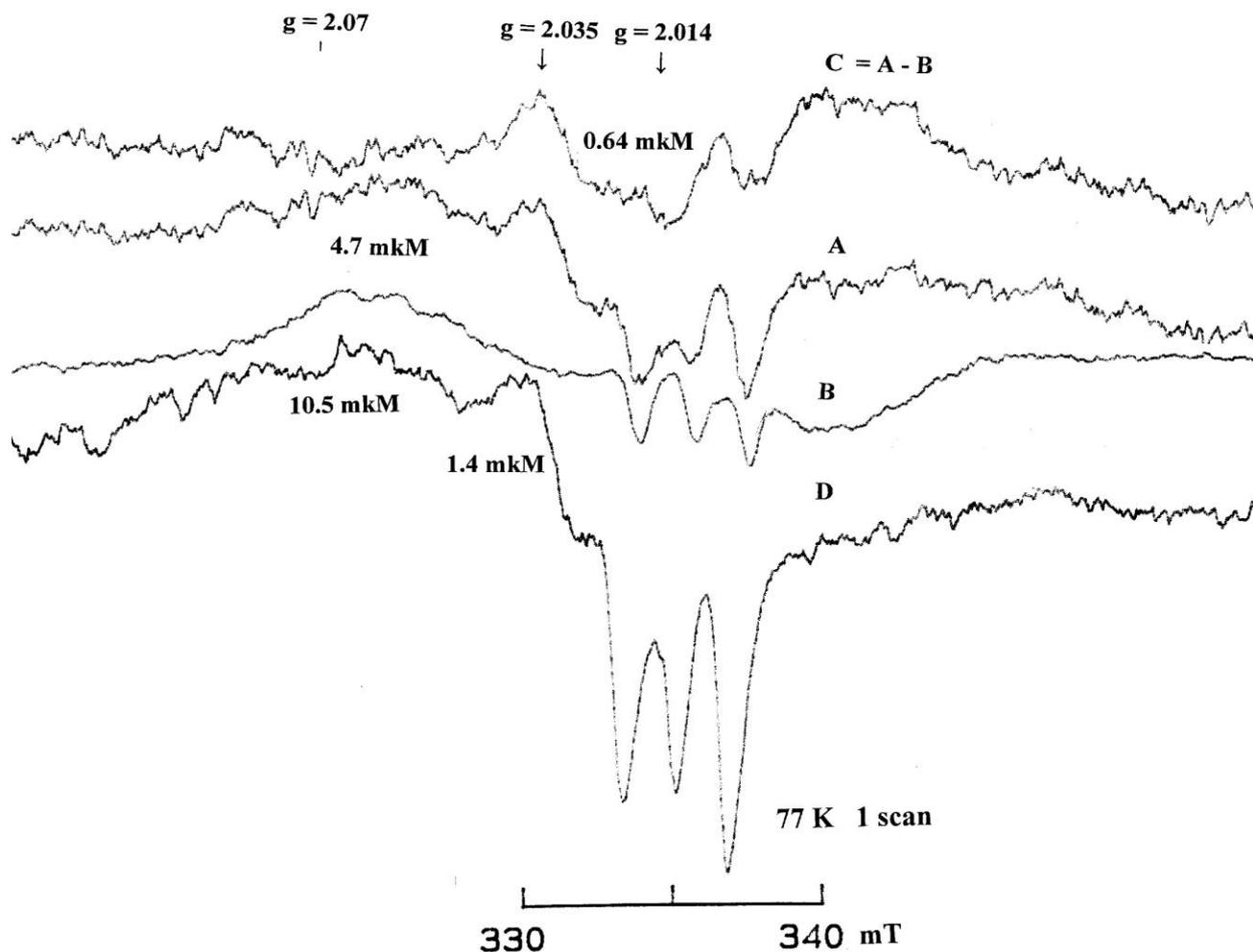


Рисунок 32. Типичные ЭПР спектры тканей крыс.

А – спектр ЭПР фрагмента брюшной стенки на расстоянии 0.5 см от цисты (контроль);

В – спектр ЭПР крови здорового животного, обработанная газообразным NO;

С – сигнал динитрозильного комплекса железа после вычитания: $C = A - B$;

Д – спектр ЭПР содержимого очага – гемовые белки + ДНКЖ.

Условия : ECS-106 Bruker, 77 К, усиление 10^5 , а.м. 5 G, 1 накопление.

Для выявления синтеза NO животным с индуцированным эндометриозом 4-х недель развития за час до забоя вводили экзогенную ловушку — диэтилдитиокарбамат (ДЭТК) натрия и сульфат двухвалентного железа. Возникающий из них комплекс ДЭТК с Fe^{2+} и NO образует парамагнитные моонитрозильные комплексы железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК),

характеризующиеся при 77 К, как известно, сигналом ЭПР с центром при $g = 2,04$ и триплетной СТС с расщеплением 1,2 мТ. Обнаружение этого сигнала при наших измерениях затруднялось из-за появления в биообразцах комплексов ионов Cu^{2+} с ДЭТК, характеризующихся 4-компонентной СТС (рисунок 33). Обнаруживалась только высокополевая компонента триплетной СТС, указанная на этом рисунке стрелкой. Как видно из приведённых на рисунке 33 сигналов ЭПР, эта компонента обнаруживалась в образцах эндометриоидных очагов у контрольных животных (а). Она не обнаруживалась в образцах животных, обработанных ДНКЖ (б) и в образцах ткани стенки брюшины, взятых у интактных животных (без эндометриоза). В обоих последних наблюдался только сигнал ЭПР комплексов Cu^{2+} с ДЭТК.

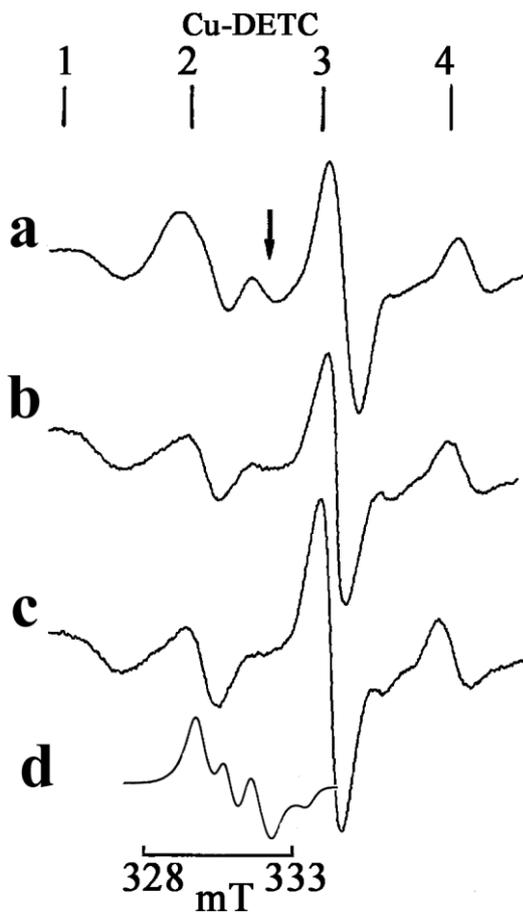


Рисунок 33. Сигналы ЭПР МНКЖ-ДЭТК и комплексов Cu^{2+} с ДЭТК в тканях крыс.

а – спектр ЭПР образца эндометриоидного очага контрольной крысы (45 суток после операции);

б – спектр ЭПР образца, взятого у крысы, обработанной ДНКЖ;

с — спектр ЭПР образца ткани стенки брюшины интактной крысы;

д — стандартный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК.

Всем животным введён в качестве ловушки NO комплекс железа с ДЭТК. Спектры зарегистрированы при 77 К.

Исследования методом ЭПР спектроскопии гемсодержащих белков и экзогенной ловушки ДЭТК показали, что в образцах тканей контрольных

животных регистрируется высокий уровень NO, обеспечивающий образование М-ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемовых белков.

Полученные количественные данные приведены в таблице 6. Как видно из таблицы, оксид азота, связанный с гемоглобином, содержится в организме крыс с эндометриозом в микромолярных концентрациях. Разности значений концентраций в опыте при терапии гормоном ингибином и в контроле недостаточны для того, чтобы считать изменения статистически значимыми, однако наблюдается снижение содержания NO в крови, селезёнке, стенке брюшины, противоположной к имплантату и брюшной стенке рядом с имплантатом (на расстоянии 5-10 мм). В кишечнике, печени и самом имплантате наблюдается повышение концентрации NO.

Таблица 6. Концентрация оксида азота в тканях и органах крысы до и после терапии ингибином.

Образец ткани	Контроль, мкМ (M±SD)	Терапия ингибином, мкМ (M±SD)
Кровь	2,5±0,6	2,5±0,7
Кишечник	2,9±0,9	3,5±0,7
Селезёнка	3,6±0,7	3,0±0,9
Печень	2,9±0,8	2,4±0,7
Противоположная стенка	2,5±0,7	2,3±0,8
Стенка 5 мм от имплантата	2,5±0,9	1,8±0,6

Спектры ЭПР эндогенных парамагнитных центров, возникающих в содержимом эндометриоидных очагов опытных животных, приведены на

рисунке 34. Эти центры представлены мономерной формой ДНКЖ (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими группами белков (они обнаруживаются в приведенных на рисунке 34 спектрах ЭПР 5,6 по компоненте при $g=2,035$). Помимо сигнала свободных радикалов при $g=2,0$ регистрируется и сигнал ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина с характерными значениями g -фактора в районе 2,07-1,98 и триплетной СТС. Как известно из литературы, сигнал ЭПР М-ДНКЖ характеризуется двумя значениями g -фактора: $g_{\perp}=2,035$, $g_{\parallel}=2,014$, $g_{ср.}=2,03$. Амплитуда его компоненты при g_{\parallel} не обнаруживается из-за наложения на неё первой компоненты СТС сигнала ЭПР нитрозогемоглобина (нитрозомиоглобина), поэтому только по амплитуде сигнала ЭПР М-ДНКЖ при $g=2,035$ трудно оценить концентрацию этих комплексов в образцах эндометриоидных очагов. Эта задача решается вычитанием модельного нитрозокомплекса гемоглобина из суммарного спектра ЭПР эндометриоидных очагов с определенным коэффициентом (весом). Такая процедура предусмотрена программным обеспечением ЭПР спектрометра Bruker ECS-106. Модельный нитрозокомплекс гемоглобина получен обработкой крови с известной концентрацией гемоглобина донором оксида азота – нитрозотиолом RSNO. На рисунке 32 приведен такой спектр ЭПР нитрозогемоглобина, концентрация соответствует 12,1 мкМ. После процедуры вычитания (рисунок 32, С) хорошо видны компоненты сигнала ЭПР ДНКЖ с двумя значениями g -фактора: $g_{\perp}=2,035$, $g_{\parallel}=2,014$, $g_{ср.}=2,03$. Концентрация М-ДНКЖ в образцах эндометриоидных очагов контрольных животных варьирует в диапазоне 0,4 — 0,8 мкМ.

В образцах, взятых у обработанных ДНКЖ крыс, и включающих в себя сохранившийся небольшой по размерам эндометриоидный очаг и окружающую его ткань стенки брюшины, сигналы ЭПР наблюдался М-ДНКЖ. ЭПР сигнал нитрозильных комплексов гемоглобина также регистрируется наряду с сигналом эндогенных свободных радикалов, и в печени составляет 3,2 – 4,2 мкМ (рисунок 31). В крови контрольных животных сигнал 2,03 не наблюдается, но при введении опытным животным димерной формы ДНКЖ он регистрируется через

час после введения в виде соответственно мономерной формы и при этом наблюдается возрастание сигнала ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина (спектр не приводится).

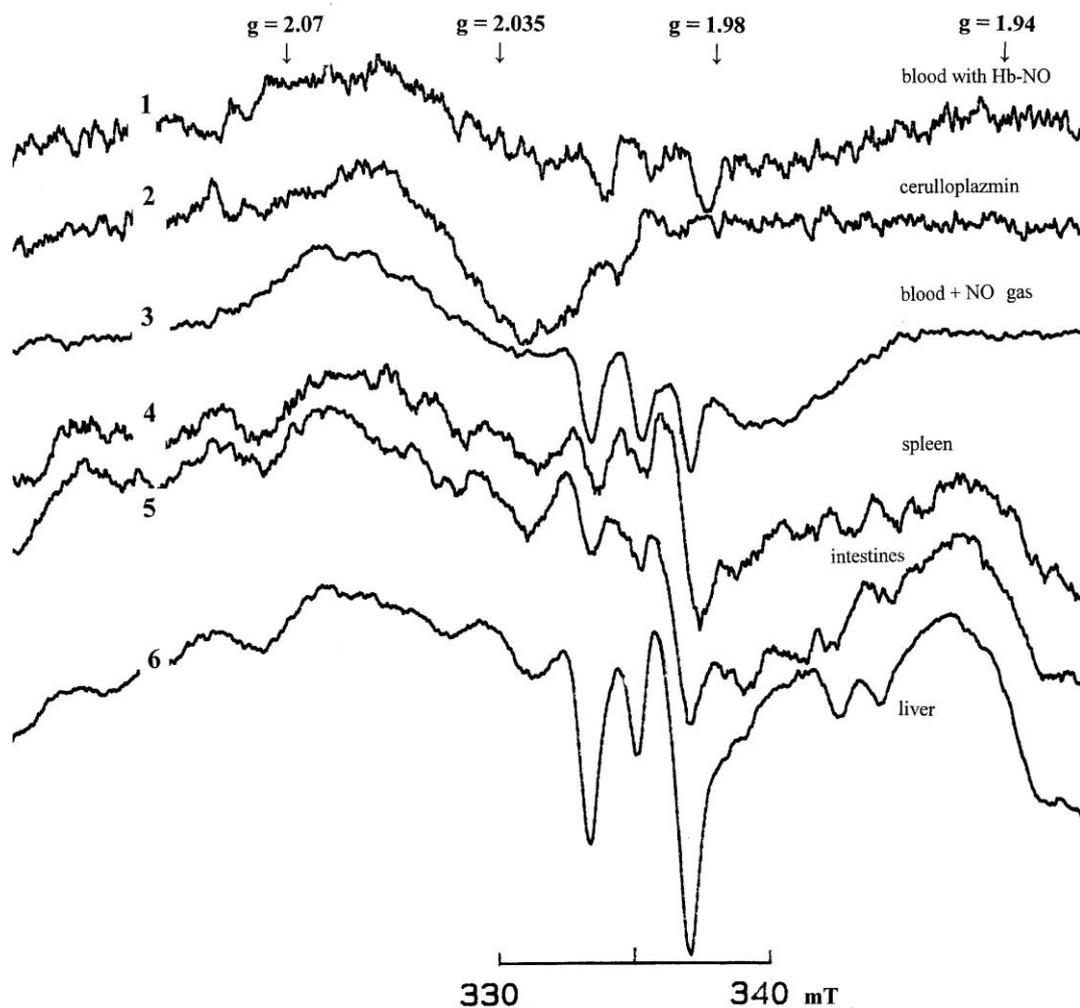


Рисунок 34. Типичные спектры ЭПР тканей после терапии ингибином.

1. Кровь (спектр получен после вычитания ЭПР сигнала (2) церулоплазмينا ЭПР сигнала церулоплазмينا крови здоровой крысы))
2. спектр ЭПР церулоплазмينا крови здоровой крысы
3. спектр ЭПР крови здоровой крысы, обработанной газообразным NO
4. спектр ЭПР селезенки опытной крысы;
5. спектр ЭПР кишечника опытной крысы;
6. спектр ЭПР печени опытной крысы;

Условия: ECS-106 Bruker, 77 К, усиление 10^5 , а.м. 5 G, 1 накопление.

2.3.3.2 Структура комплекса NO с ингибином

Согласно процедуре активации препарата его подвергают трёхминутному прогреванию на водяной бане при 100°C. Форма ЭПР-спектров раствора белка ингибина при pH 7,2-7,4 показывает, что при добавлении фосфатного ДНКЖ (спустя три минуты после прогрева) группировка Fe(NO)₂ переходит на белок, так как имеет более высокое сродство к тиоловому лиганду. При этом белок выступает донором одного атома серы из аминокислотного остатка цистеина для формирования ДНКЖ, в качестве второго лиганда, скорее всего, выступает атом кислорода. При повышении температуры регистрации с 77 К до 293 К (20°C) в спектре ЭПР наблюдается сигнал высокомолекулярного динитрозильного комплекса железа, что свидетельствует о локализации группировки Fe(NO)₂ на белке. Аналогичные результаты были получены ранее на белке с высоким содержанием цистеина (30 остатков) апометаллотионине [Vanin, 1998]. Добавление фосфатного ДНКЖ также приводило к образованию ДКНЖ с одним атомом серы апометаллотионина, о чем свидетельствует форма ЭПР сигнала.

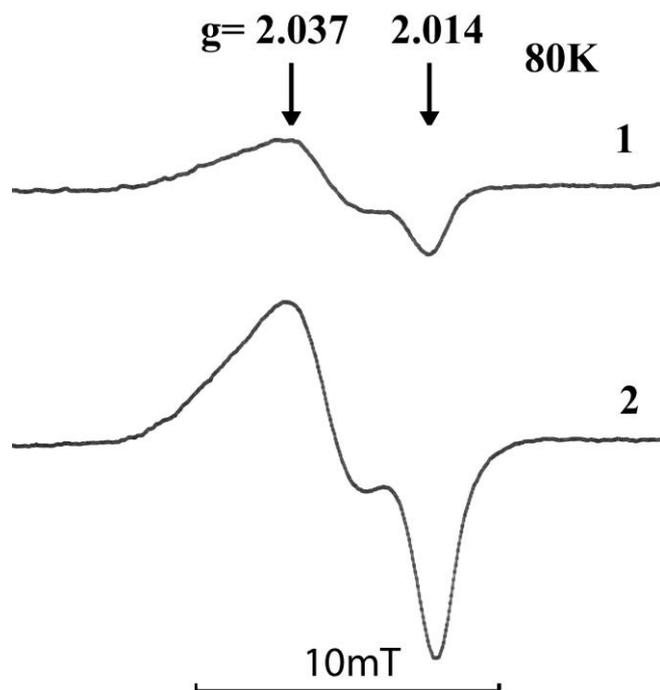


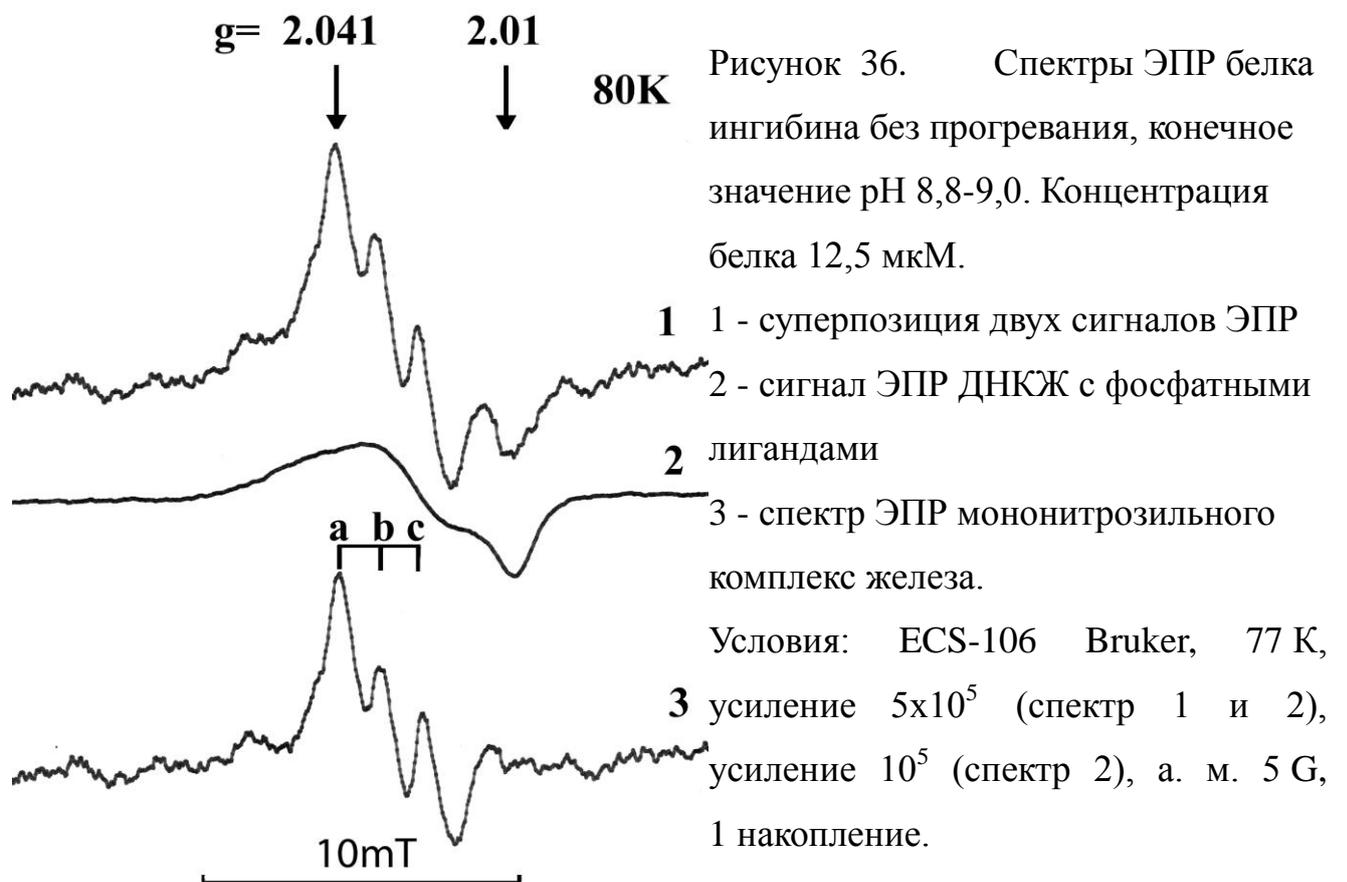
Рисунок 35. Спектры ЭПР водного раствора белка ингибина при pH 7,2-7,4 при трехминутном прогревании (спектр 1) и без нагревания (спектр 2).

При растворении лиофилизованного ингибина в воде значение pH составляет 6,3-6,5, а при добавлении ДНКЖ с фосфатными лигандами смещается до pH 7,2-7,4. Концентрация белка 12,5 мкМ.

Условия: ECS-106 Bruker, 77 К, усиление 10⁵, а. м. 5 G, 1 накопление.

По форме полученных ЭПР сигналов белка ингибина и ранее изученных белков можно предполагать, что при рН 7,2-7,4 одна тиоловая группа белка ингибина участвует в формировании ДНКЖ. Из анализа спектра ЭПР можно видеть, что интенсивность сигнала ЭПР прогретого белка меньше примерно в 3-4 раза, что связано, по-видимому, с окислением части тиоловых групп при нагревании.

При повышении рН до 8,8-9,0 наблюдается принципиально другая картина. Спектр ЭПР (рисунок 36, спектр1) представляет собой суперпозицию двух сигналов от белка с фосфатными лигандами (спектр 2) и белка с тиоловыми лигандами (спектр 3). Форма сигнала ЭПР (спектр 3) свидетельствует об образовании на белке моонитрозильного комплекса железа, четыре лиганда которого являются остатками цистеина (рисунок 36, спектр 3).



Подобный моонитрозильный комплекс железа обнаруживается при выдерживании белка ингибина после прогревания при рН 7,2-7,4 в течение 50 минут и более при 20°C. (рисунок 37, спектр 3). Спектр ЭПР моонитрозильного комплекс железа получен путем вычитания из спектра 2, он представляет собой суперпозицию двух сигналов ЭПР, сигнала ЭПР ДНКЖ с фосфатными лигандами, записанного при значении рН 7,2-7,4. Процедуру вычитания проводили с помощью программного обеспечения ЭПР-спектрометра.

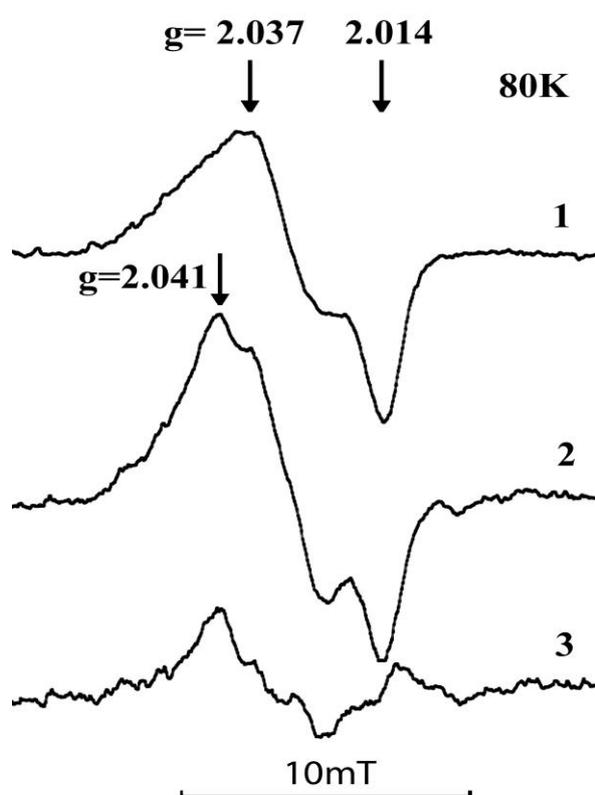


Рисунок 37. Спектры ЭПР белка ингибина после трехминутного прогревания, конечное значение рН 7,2-7,4.

1 - спектр ЭПР ДНКЖ с фосфатными лигандами

2 - суперпозиция двух сигналов ЭПР
3 - спектр ЭПР моонитрозильного комплекса железа

Запись спектров ЭПР 77 К. Концентрация белка 12,5 мкМ.

В последние годы для оценки уровня оксида азота используют дитиокарбаматные соединения железа, которые образуют парамагнитные комплексы, легко регистрируемые в тканях и органах животных и человека. Парамагнитный моонитрозильный комплекс МНКЖ ДЭТК-Fe-NO (рисунок 38), с серосодержащими лигандами и имеющий следующие значения g -фактора: $g_{\perp} = 2,04$ и $g_{\parallel} = 2,02$, готовили обработкой под вакуумом в колбе Тунберга растворы диэтилдитиокарбомата в диметилсульфоксиде и сульфата железа (II) в малом количестве воды газообразным оксидом азота (NO). ЭПР сигнал комплекса

ДЭТК-Fe-NO не приводится, потому как он представляет собой триплет, похожий по форме на ЭПР сигнал восстановленного нитропруссиды (рисунок 39). Сравнивая ЭПР сигналы низкомолекулярных моонитрозильных комплексов и белкового, мы можем сделать предположение о том, что МНКЖ белка ингибина при pH = 7,4-7,6 формируется посредством четырех тиоловых лигандов структура близкая к моонитрозильным комплексам ряда неорганических соединений: восстановленного нитропруссиды, МНКЖ ДЭТК и имеющая подобные значения g-фактора: $g_{\perp} = 2,041$ и $g_{\parallel} = 2,01$.

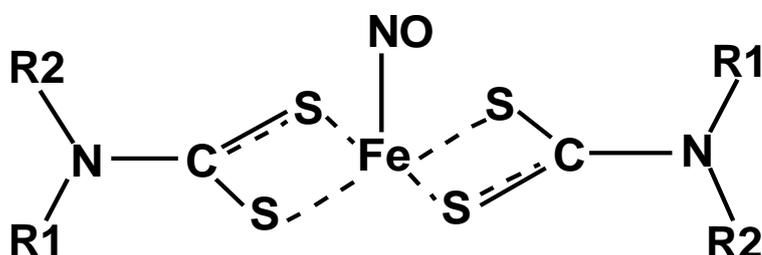


Рисунок 38. Структура парамагнитного комплекса ДЭТК-Fe-NO.
R1=R2-CH₂CH₃.

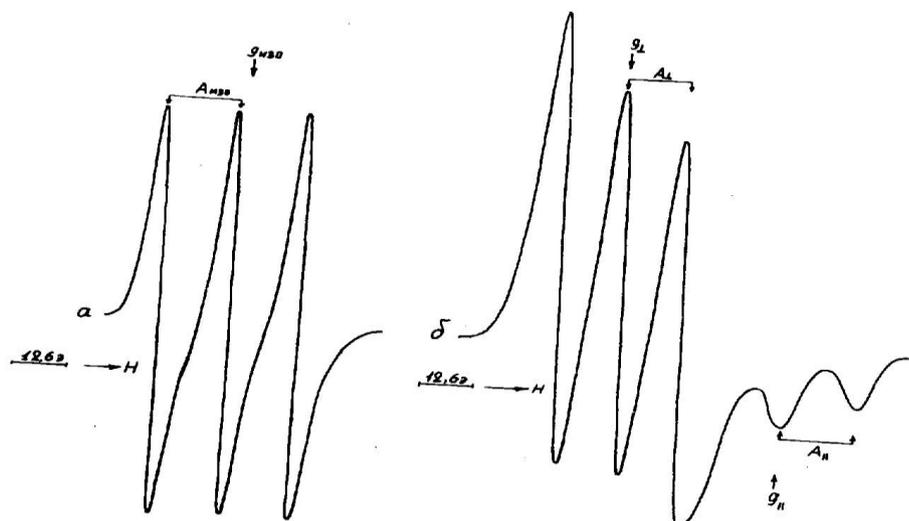


Рисунок 39. Сигналы ЭПР восстановленного дитионитом нитропруссиды в полярном растворителе – диметилформамиде при комнатной температуре (левый спектр) и 77 К (правый спектр). [Дисс. Д.Ш. Бурбаева, 1980].

2.4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.4.1 Исследование влияния гормона ингибина на модельный эндометриоз

Эндометриоз — широко распространённое заболевание, однако методы медикаментозной (в основном, гормональной) терапии малоэффективны и, как правило, действенное лечение — хирургическое сводится преимущественно к удалению эндометриoidных очагов. Для заболевания характерна высокая вероятность рецидива. Это делает необходимой длительную и дорогостоящую послеоперационную терапию, преимущественно гормональными препаратами, которые обладают значительными побочными эффектами и противопоказаниями. Более двадцати лет назад О.А. Хопёрской разработан метод выделения гормона ингибина из фолликулов коров (патент № 2185180). В модельных экспериментах на икре шпорцевых лягушек *Xenopus leavis* была продемонстрирована высокая биологическая активность полученного белка по дифференциации препаратов эктодермы. Это послужило основанием для исследования возможности терапии эндометриоза и некоторых других воспалительных процессов. Процесс выделения ингибина, содержащегося в очень низкой концентрации в фолликулярной жидкости, представляет собой сложный многоступенчатый хроматографический процесс (HPLC на S-3000 и Discovery C18) с последующей лиофилизацией (патент № 2201241). Было показано, что трехминутное нагревание растворенного белка на водяной бане при 100°C позволяет максимизировать биологическое действие гормона, что несомненно составляет удачную экспериментальную находку.

На первом этапе исследований было существенным определить, насколько белок остаётся нативным после выделения и последующего разведения. На наш взгляд наиболее информативным тестом могла стать оценка свободных восстановленных тиоловых групп белка. Для решения такой задачи мы применили метод ЭПР-спектроскопии, который позволяет прямо оценить количество тиоловых групп по их способности взаимодействовать с железом и оксидом азота и формировать моно- или динитрозильные комплексы (МНКЖ или ДНКЖ).

Белковые ДНКЖ имеют характерный сигнал ЭПР с $g_{cp} = 2,03$ и спином $\frac{1}{2}$; по данным исследований группы А.Ф. Ванина и соавт. железо в комплексе находится в состоянии d^7 [Borodulin, 2013].

Анализ формы ЭПР-спектров раствора белка ингибина при рН 7,2-7,4 показывает, что добавление фосфатного ДНКЖ (спустя три минуты после прогрева) приводит к образованию белкового ДНКЖ с тиоловым лигандом. Сигнал ЭПР не прогретого белка интенсивнее сигнала прогретого примерно в 3-4 раза. Возможно, что прогревание приводило как к частичной денатурации ингибина, так и к окислению тиоловых групп. При увеличении времени после нагрева до 50 минут и более форма спектра ЭПР прогретого белка принципиально менялась. Полученные данные говорят о том, что на белке образуется плоская структура – моонитрозильный комплекс железа с четырьмя остатками цистеина, координирующими атом железа с одной молекулой оксида азота. Для не прогретого белка такого мы не наблюдали — он сохранял структуру, обеспечивающую формирование ДНКЖ с аксиально симметричной формой сигнала ЭПР. Однако повышение рН среды до 8,8-9,0 позволяет наблюдать и на не прогретом белке в спектре ЭПР сигналы моонитрозильного комплекса железа ингибина. Представляется маловероятным, чтобы четыре белковых глобулы выступали донорами четырёх тиоловых групп, стерические затруднения не позволят четырем белковым молекулам сформировать плоскую структуру, в центре которой располагается атом железа. По-видимому, прогревание белка в течение 3 минут, как это требуется по методике активации препарата, позволяет сделать доступными дополнительные тиоловые группы из белка, расположенные именно на одной белковой молекуле, для формирования МНКЖ. Причем эти группы расположены таким образом, что промежуточные остатки аминокислот обеспечивают белковой молекуле гибкость, достаточную для образования плоской структуры наподобие той, что представлены на рисунке 38. По нашим оценкам, число связанных атомов железа (в форме ДНКЖ) на одну молекулу белка ингибина составляет 2-3. Исходя из того, что предположительно 2 тиоловые

группы участвуют в формировании ДНКЖ, получается, что 4-6 цистеиновых остатков одной белковой глобулы могут быть химически активны. Эта величина близка к данным других авторов по оценке числа тиоловых групп ингибина. Некоторое время назад внимание исследователей было привлечено к проблеме участия биядерных динитрозильных комплексов железа (Б-ДНКЖ) с тиоловыми лигандами белка в качестве переключателей биохимических процессов в ответ на избыток АКМ, а также как доноров оксида азота NO или (NO⁺). Биядерная форма ДНКЖ (Б-ДНКЖ) представляет собой как бы сдвоенную молекулу, состоящую из двух молекул ДНКЖ.

Представляется заманчивой идея участия ингибина в качестве донора NO⁺ через образование моно-ДНКЖ или биядерного комплекса с железом и оксидом азота (Б-ДНКЖ) с целью модификации рецепторов TGFβ I, II или III типа и таким образом, изменения вектора передачи внутриклеточных сигналов. К сожалению, нам не удалось экспериментально показать образование на ингибине Б-ДНКЖ наподобие соли Руссена, в то время как на альбумине такое наблюдали [Borodulin, 2013]. В этом направлении требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, с большой вероятностью можно утверждать, что температурная активация ингибина приводит к возникновению конформации белка, близкой к нативной, и поэтому обладающей биологической активностью.

Количественную оценку лечебного действия ингибина проводили на модели эндометриоза на крысах. Курс обработки включал в себя 10 ежедневных введений предварительно прогретого на водяной бане препарата животным с развившимся эндометриозом (через 28 дней после операции), в дозировке 160 мкг на 1 кг веса. У контрольных животных обнаружено, что ко 2 неделе после операции на месте аутоимплантата образуется активный очаг эндометриоза, гистологически представленный активной стромой с мелкими железами. К концу 6 недели эксперимента без лечения он трансформируется в эндометриоидную кисту или группу кист, стенка которых выстлана кубическим эпителием. Отмечена диффузная лейкоцитарная инфильтрация внутри очага и крупные очаги

инфильтрации в окружающих тканях. На фотографиях (рисунок 9, 13) можно видеть, что рост очага сопровождается прорастанием к нему кровеносного сосуда, окружённого жировой тканью. Принципиально иная картина наблюдается к концу 6 недели эксперимента в опытной группе. На месте аутотрансплантата выявляется чаще только тканевой детрит с выраженной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией прилегающих тканей брюшины. Типичны крупные очаги обызвествления. Сосуд либо исчезает, либо визуально наблюдается его запустение и деградация. В других случаях еще сохраняется эндометриоидная киста, но в ее стенках наблюдается острое выраженное полнокровие, резко выраженная воспалительная лейкоцитарная инфильтрация. Кроме того, выстилающий кисту эпителий становится уплощенным, содержимое просвета – хлопьевидным.

Таким образом, было показано, что ингибин — белок, в норме участвующий в регуляции репродуктивной функции — способен подавлять развитие патологического процесса, оказывая редуцирующее действие на эндометриоидные очаги. Причём его эффективность оказалась достаточно высокой по сравнению с другими препаратами, предлагаемыми и применяемыми для лечения эндометриоза (таблица 1). Как видно из сравнительной таблицы, по эффективности применения препарат превосходит ряд применяемых лекарственных средств, например, raloxifene, имеющий в России наименование «Эвиста», фирмы Ely Lilly и pentoxifylline («Пентилин», КРКА).

Основной физиологический механизм действия ингибина — связывание с рецептором TGF β II типа и блокирование его дальнейшего взаимодействия с внутриклеточными медиаторами. Таким способом прерывается передача сигнала другими факторами этого семейства (в первую очередь, TGF β 1 и активином) [McCarthy, 1993]. Подавление апоптоза факторами TGF β путём активации транскрипционного фактора NF- κ B показано в различных типах клеток [Arsura, 1996, Gingery, 2008]. TGF β -зависимая инактивация же этого транскрипционного фактора (через сигнал белков Smad) в зрелых опухолях, как

правило, и так заблокирована [Tabibzadeh, 2002]. Таким образом, антипролиферативное действие ингибина на опухолевые клетки подтверждается данными литературы.

По мере проведения клинических испытаний на человеке возникла необходимость совершенствования технологии очистки ингибина и соответственно установления дозы введения. Поэтому была поставлена задача проанализировать лечебные свойства двух типов препаратов, различающихся технологией очистки, и подобрать оптимальной дозировки применения препарата и уточнения необходимости его предварительного прогрева. Препараты отличались процессом снятия с колонки — или методом непрерывного градиента, или ступенчатым градиентом. Дозы введения препарата крысе были выбраны следующие – 20, 80, 160, 400 мкг/кг. Для получения правильного представления о действительном биологическом действии препаратов было решено отдельно провести обработку данных с учетом объема очагов, выросших из пришитых имплантатов, но без опухолей, сформировавшихся на маточных трубах. Результаты измерений эндометриоидных очагов в группах с различной дозировкой и способом снятия ингибина с колонки сравнивались попарно с использованием методов непараметрической статистики.

В диапазоне доз от 20, 80, 160, 400 мкг/кг для ступенчатого препарата не наблюдается различий — средний объем очагов варьирует в диапазоне 13-16 мм³ (контроль — 210±60 мм³), что дает нам основания для использования дозы в 20 мкг/кг как оптимальной. На основании выводов, полученных при обработке данных, может быть сделана следующая рекомендация: при применении градиентного препарата можно использовать его в дозировке 20 мкг/кг, в этом случае средний размер эндометриоидных очагов составляет 17 мм³.

Было обнаружено, что не наблюдается отличий в степени ингибирования размеров эндометриоидных очагов между прогретым и не прогретым “ступенчатым” препаратом при дозе 400 мкг/кг (таблица 4), так что с большой долей уверенности допускается применение дозы 20 мкг/кг без прогрева при

терапии эндометриоза у крыс.

Полученные данные по терапии эндометриоза крыс и сделанные из них выводы способствовали успешному завершению клинических испытаний ингибина. 30 июля 2014 г. препарат белка ингибина был зарегистрирован как лекарственное средство под наименованием «Эндоферин®». Он показал высокую эффективность и безопасность при лечении эндометриоза в медицинской практике.

2.4.2 Исследование влияния на модельный эндометриоз низкомолекулярных ДНКЖ

В литературе представлены результаты исследований биологического действия низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами и показана их высокая эффективность, в том числе в отношении активации апоптоза в клетках HeLa, Jurkat [Gilliano, 2011, Kleschyov, 2006]. Представлялось актуальным изучение воздействия на эндометриоидный процесс ДНКЖ с тиоловыми лигандами, в частности глутатионом.

В ходе экспериментов определена концентрация оксида азота в тканях крыс с эндометриозом методом ЭПР спектроскопии. Впервые было показано, что уровень оксида азота, оцененный по парамагнитным нитрозильным комплексам гемсодержащих белков (g -фактор 2,07 и 1,98), в печени, в селезенке, в крови, в кишечнике, мышечной стенке брюшины составляет от 2,5 до 3,6 мкМ (таблица 6).

К 6 неделе после операции концентрация NO в стенке эндометриоидного очага достигала величины 1,6 мкМ, в окружающих её тканях (0,5 см от очага) 2,5 мкМ. Наряду с нитрозильными комплексами гемсодержащих белков в стенке очага впервые обнаружили образование белковых динитрозильных комплексов железа с тиоловыми лигандами по характерному значению сигнала ЭПР с g -фактором 2,03. При повышении температуры измерения образца до комнатной форма сигнала сохраняла свою аксиальную симметрию, что свидетельствует о нахождении парамагнитной $Fe(NO)_2$ на белковой глобуле. Концентрация ДНКЖ

достигала величины 6 мкМ. По литературным данным уровень свободного железа при эндометриозе резко повышен в зоне воспаления и составляет порядка 100 мкМ [Yamaguchi, 2008], что при повышенном уровне оксида азота может способствовать формированию эндогенных ДНКЖ.

Крысам с модельным эндометриозом вводили ежедневно в течение 10 дней по 0,5 мл 5 мкМ раствора ДНКЖ с глутатионом. Как нетрудно подсчитать, эта доза в 7-9 раз превышала нормальный уровень эндогенного NO. Средний объём эндометриоидных очагов уменьшается в 1,4-2,7 раз после обработки ДНКЖ. Значительный разброс в размерах и типах образующихся очагов можно объяснить присутствием при экспериментальном эндометриозе после шести недель роста имплантатов различных стадий. По классификации ASRM они соответствуют стадиям 2 и 3 эндометриоза [Nogueira, 2007]. Наблюдаемые очаги можно разделить на три категории: небольшие прозрачные пузырьки с жидким содержимым; тёмные пузыри шоколадного цвета с выраженным ангиогенезом внутри очага и в окружающих тканях; крупные капсулы с плотной соединительнотканной оболочкой, наполненные детритом зеленоватого цвета, творожистой консистенции. Помимо трёх вышеперечисленных трёх типов очагов также наблюдаются переходные формы, показывающие, что регистрируемые типы очагов являются разными стадиями единого патологического процесса, что отмечается и другими исследователями [Groothuis, 2005, Matsuzaki, 2004].

Механизм возникновения и протекания хронических болевых приступов при эндометриозе был исследован в ряде блестящих работ группы К. Беркли [Berkley, 2005, Stratton, 2011, McAllister, 2009, Dmitrieva, 2010]. Большинство экспериментальных работ проводилось на крысах с хирургически индуцированным эндометриозом. Позы, характерные для болевых приступов у крыс, использовались для количественной оценки длительности болевых приступов у животных из контрольной и опытной групп. В опытной группе наблюдалось постепенное сокращение в течение лечения как продолжительности отдельных болевых приступов, так и суммарное время спазмов в наблюдаемом

отрезке (2 часа). Известно, что NO является важным нейромедиатором. При этом он играет в носисепции и антиносисепции двойственную роль, действуя в определенных концентрациях как возбудитель болевых импульсов, а в большей концентрации как их гаситель [Cury, 2011]. Это согласуется с известным фактом, что нестероидные противовоспалительные препараты, содержащие нитрогруппу, обладают лучшим анальгетическим действием, чем их аналоги без нитрогруппы [Romero-Sandoval, 2002].

Трудность излечения эндометриоза у человека связана с клиническими особенностями данного заболевания: при оперативном вмешательстве возможно удаление лишь крупных, разросшихся очагов, при этом неизбежна контаминация брюшной полости фрагментами эктопической ткани; высока вероятность последующего развития новых очагов из не замеченных и вновь занесённых фрагментов эндометрия. По этой причине заболевание отличается высокой частотой рецидивов. Учитывая такую специфику терапии эндометриоза, а именно необходимость предупреждения рецидивов после оперативного удаления уже сформировавшихся очагов, мы сочли особенно актуальным проведение опыта с введением ДНКЖ с глутатионом на ранней стадии формирования эндометриоидных очагов из пришитых имплантатов — с 4 дня после операции. В экспериментах с ранним введением ДНКЖ в дозе 12 мкмоль/кг результаты наиболее наглядны: у половины особей экспериментальных групп имплантаты рассасываются бесследно, вовсе не развиваясь в очаги, а средний объём эндометриоидного очага меньше контрольного более чем на порядок.

На гистологических препаратах всех серий видно, что у особей, обработанных ДНКЖ с глутатионом, даже при сохранении соединительнотканной капсулы наблюдаются явные дистрофические изменения эндометриоидной стромы с массовой лейкоцитарной инфильтрацией. В иных случаях наблюдается полное замещение железистых клеток фиброзной тканью. Таким образом, даже при сохранении размеров эндометриоидного очага, его быстрый рост и активная эндокринная и паракринная секреция прекращаются. В перспективе применения

ДНКЖ для лечения эндометриоза человека необходимо отметить специфику экспериментальной модели на крысах: секвестризация воспалительных очагов и образование плотной капсулы характерно для грызунов, у приматов и копытных фибротические изменения гораздо менее выражены.

2.4.3 Механизмы биологического действия ДНКЖ

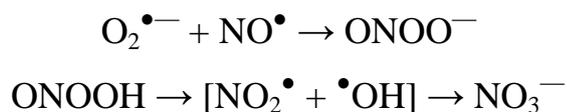
2.4.3.1 Оксидативный стресс

Известно, что развитие эндометриоза сопровождается окислительным стрессом, а возможно, именно окислительный стресс и является причиной развития эндометриозных очагов. Эта проблема была предметом исследования во многих работах [S. Gupta, 2006, Jackson, 2005, Као, 2005, Szczepanska, 2003, Defrere, 2011]. Меньшее количество исследований посвящено развитию и проявлениям нитрозативного стресса при эндометриозе [Но, 2013]. По-видимому, это связано в первую очередь непосредственно с корректным определением метаболитов оксида азота в организме человека и животных. Нитрозильные комплексы железа в таких условиях могут выступать в роли восстановителя-антиоксиданта — а именно, ловушки супероксидного анион-радикала. При взаимодействии супероксида с NO в составе комплекса он изомеризуется в нитрат, будучи связанным с железом. И в этом случае исключается высвобождение таких агрессивных промежуточных форм, как пероксинитрит и гидроксильный радикал, что может происходить при их прямом взаимодействии, без катализатора ДНКЖ.

2.4.3.2 Цитотоксичность оксида азота, высвобождаемого из ДНКЖ

Как известно, одним из аспектов клеточного иммунного ответа является так называемый «кислородный взрыв». Он выражается в перестройке нейтрофилов и макрофагов и массовой активации в них ферментов, в первую очередь НАДФ-Н оксидазы и индуцибельной NO-синтазы. При взаимодействии производимых ими супероксидного анион-радикала и монооксида азота, соответственно, образуется пероксинитрит. В присутствии перекиси H_2O_2 пероксинитрит распадается с

образованием гидроксильного радикала.



Оба этих вещества — сильные окислители (особенно гидроксил-радикал), способные повреждать мембраны и ферменты клеток [Зентов,2001]. Кроме того, пероксинитрит способен инициировать и запрограммированную гибель целевых клеток. Развитие «кислородного взрыва» — важный элемент противомикробного и противоопухолевого иммунитета организма [Geng,1996]. Однако многие микроорганизмы и опухоли обладают развитыми механизмами нейтрализации как самих АКМ, так и инициированных этими АКМ сигналов, приводящих к апоптозу клетки. При ослабленном иммунитете возникает парадоксальная ситуация: иммунокомпетентные клетки интенсивно вырабатывают супероксидный радикал (перекись водорода) и оксид азота, но для ликвидации опухоли или инфекции их не хватает. Более всего страдает при этом сам организм: усугубляется окислительный стресс, повреждаются здоровые клетки. Казалось бы, введение дополнительного NO должно только ухудшать состояние организма. Однако применяемые низкомолекулярные комплексы ДНКЖ с глутатионом превращаются в достаточно стабильные белковые ДНКЖ. Даже в используемых нами концентрациях (в 5-6 раз выше уровня оксида азота при эндометриозе) они не только не усугубляют окислительный стресс, но и противодействуют ему, безопасно преобразуя супероксид-радикал в нитрат без высвобождения гидроксил-радикала [Espey, 2006].

2.4.3.3 Модификация эффекторов

Другим аспектом регуляторной роли NO и его производных является способность модифицировать функциональные группы ферментов, изменяя их активность. Последние литературные данные говорят о том, что более 3000 белков клетки подвергаются модификации [Beckman, 1996, Hess, 2005, Radi, 2004, Villalobo, 2007, Martinez-Ruiz, 2011] при обработке их низкомолекулярными

нитрозотиолами или донорами NO, что изменяет их физиологическое действие. Согласно наиболее обоснованным гипотезам, образование нитрозотиолов RSNO возможно через взаимодействие оксида азота и тиольного радикала RS•. Образование RSNO возможно только в кислых средах и в присутствии кислорода за счет образования в этих условиях NO⁺. Согласно гипотезе А.Ф. Ванина [Vanin, 1997], ДНКЖ могут выступать в качестве доноров не только оксида азота, но и NO⁺, и приводить к нитрозилированию белков в клетке. В присутствии эндогенного железа и оксида азота, в большом количестве производимого при воспалительных процессах, белки могут образовывать динитрозильные комплексы железа, что также может приводить, во-первых, к модулированию их биохимической активности, и во-вторых, они сами могут служить катализаторами синтеза нитрозотиолов. Такая гипотеза обоснована экспериментально и не подвергается резкой критике в литературе [Borodulin, 2013, Vanin, 2014].

Влияние оксида азота на различные клетки весьма многообразно, и данные различных экспериментов по исследованию его во многих обзорах характеризуются как «противоречивые» [Martinez, 2009, Mocellin, 2007]. Разнообразие и зачастую противоположность эффектов воздействия NO в зависимости от концентрации его, типа и состояния клетки объясняется огромным количеством ключевых элементов. Вот лишь некоторые из них, объясняющие гибель эндометриоидных клеток в вышеописанных экспериментах:

1. Оксид азота модифицирует CD40 — один из основных элементов TNF-рецептора [Godoy, 2010, Weiss, 2010]; инактивирует IκB-киназу (в низких концентрациях, напротив, активирует) [Kneten, 1999]; предотвращает инактивацию IκB интерлейкином-1 [Mendes, 2002]. Нарушает связывание собственно NF-κB с промоторами генов [Hogerlinden, 2004, Parohova, 2009];
2. Связывается с активином, ингибином и другими представителями семейства TGFβ — в этих белках присутствуют пары близко расположенных тиоловых групп, что облегчает образование ДНКЖ. Также, возможно, модифицирует ALK (элементы TGFβ-рецепторов). В конечном счёте, Smad-белки и каскад MAP-

- киназ вызывают экспрессию проапоптотических генов [Craven, 2007, Saura, 2005];
3. Блокирует эстрогеновые рецепторы [Garban, 2005]. Таким образом он предотвращает эстрогензависимую пролиферацию эндометриоидных очагов;
 4. При нокауте p53 — вызывает апоптоз через активацию p38 и JNK (в присутствии p53 же, напротив, противодействует апоптозу через инактивацию p38) [Kibbe, 2002];
 5. Блокирует рибонуклеотидредуктазу — фермент, имеющий ключевое значение для биосинтеза ДНК и пролиферации клеток [Leroivre, 1994];
 6. Инактивирует глутатионтрансферазы — один из важнейших элементов резистентности клеток к токсинам и лекарствам [Gong, 2006];
 7. Кроме того, глутатионтрансферазы π и μ способны связывать факторы АКТ-1 и JNK. NO, таким образом, высвобождает эти проапоптотические киназы [Townsend, 2003];
 8. Способен как ингибировать, так и активировать каспазу-3 и каспазу-9, непосредственным путём и через цГМФ-зависимые киназы [Torok, 2002, Kim, 1997]. Kim предполагает, что влияние на апоптоз связано с уровнем внутриклеточного негемового железа [Kim, 2000]. В работах группы А. Узденского отмечено, что влияние NO на процесс апоптоза зависит и от того, вырабатывается он индуцибельной или нейрональной NOS. В одних клетках может одновременно защищать от некроза и некроптоза, но инициировать апоптоз. Возможно, определяющим фактором здесь является локальная концентрация или связывание с железом. [Узденский, 2013].

В ряду вышеперечисленных возможных механизмов ингибирования эндометриоидного процесса представляется наиболее привлекательным объяснение, связанное с подавлением активности фермента ароматазы. Ароматаза p450 — ключевой фермент синтеза эстрогенов, катализирующий преобразование андростерендиона и тестостерона в эстрон и эстрадиол [Oner, 2010]. В эндометриоидных тканях наблюдался повышенный уровень этого фермента [Attar,

2006]. Модификация ароматазы посредством ДНКЖ может приводить к снижению продукции эстрогенов и блокированию дальнейшего роста эстрогензависимой эндометриоидной ткани.

2.4.3.4 Механизм биологического действия ингибина

Будучи представителем сверхсемейства белков TGF β , ингибин способен связываться с корецептором — бетагликаном и второй субъединицей TGF β -рецептора. При этом она в результате конформационных перестроек теряет способность связываться с первой субъединицей и вызывать фосфорилирование её GSSG-домена. Таким образом ингибин служит эндогенным активным блокатором TGF β -рецепторов. Следует отметить, что основной путь передачи сигнала TGF β — путём активации белков Smad — ингибируется под действием эстрогеновых рецепторов [Ito, 2010]. В эндометриоидных клетках, обладающих значительным количеством эстрогеновых рецепторов, этот путь уже заблокирован, и воздействие ингибина не играет роли. Другой важный TGF β -зависимый эффектор — TGF β -активируемая киназа (ТАК). Через каскад митоген-активируемых протеинкиназ она способна стимулировать пролиферативные и проонкогенные факторы — такие, как JNK и AP-1. Кроме того, ТАК стимулирует высвобождение транскрипционного фактора κ B (а именно, его основной формы из субъединиц p65 и RelA). p65/RelA инициируют экспрессию таких белков, как bcl-2, bcl-xL, молекулы адгезии, интерлейкины 6 и 8, индуцибельная NO-синтаза, циклооксигеназа-2, фактор роста сосудов (VEGF), рецептор эндотелиального фактора роста (EGFR) и другие. В целом, действие p65/RelA оказывает пролиферативное и провоспалительное действие. Блокирование же TGF β -рецепторов ингибирует высвобождение этого транскрипционного фактора, угнетая пролиферацию, ангиогенез и воспалительные реакции, и смещая баланс сигнальных эффектов в клетке в сторону апоптоза. Использование блокаторов ТАК в качестве противоопухолевых лекарственных средств предлагалось и ранее [Halder, 2005, Bholá, 2013]. Ингибин положительно отличается тем, что является

естественным эндогенным фактором, консервативным для всех высших позвоночных.

Представляется привлекательным использовать для объяснения терапевтического эффекта ингибина результаты опытов по формированию ДНКЖ его тиоловыми группами при взаимодействии с низкомолекулярными (фосфатными) комплексами. На основании вышеизложенных представлений и полученных в этой работе данных можно предположить, что в эксперименте с ингибином содержащийся в эндометриоидном очаге в высокой концентрации оксид азота NO модифицирует ингибин таким образом, что взаимодействие его с TGF β -рецепторами переключает пути активации эффекторов, вызывая стимуляцию апоптоза и антиангиогенеза. Закономерен вопрос, насколько реализуем в действительности такой процесс. Согласно имеющимся данным о структуре ингибина, в первичной последовательности белка имеются 5 цистеиновых остатков. Показано, что в опытах *in vitro* ингибин способен образовывать динитрозильные комплексы железа и, выступая донором NO⁺, модифицировать рецепторы. Таким образом в зоне эндометриоидном очаге в условиях высоких локальных концентраций NO (10 мкМ) и железа (100 мкМ), может реализоваться ситуация, когда ингибин изменяет своё действие вследствие его модификации, в результате чего запускается апоптоз.

2.4.3.5 Ингибирование ангиогенеза

Известно, что эффективным методом лечения опухолей, в том числе злокачественных, является блокирование ангиогенеза. Ещё в 1971 году [Folkman, 1971] было постулировано, что предотвращение ангиогенеза может подавлять рост опухоли, вызывая её голодание по жизненно необходимым питательным веществам. Лечение, основанное на блокировании ангиогенеза, имеет ряд важных особенностей: 1) Идеальным вариантом может быть введение эндогенных блокаторов ангиогенеза, которые будут гораздо менее токсичны, чем обычные химиотерапевтические препараты; 2) Такие вещества действуют на

нормальные клетки (кровеносных сосудов), вместо того, чтобы атаковать опухоль напрямую, поэтому они в меньшей степени могут привести к развитию резистентных к лекарствам опухолей.

Оксид азота в приложении к регуляции ангиогенеза, как и во многих своих функциях, играет двойственную роль. С одной стороны, он способен способствовать ангиогенезу, через активацию цГМФ-зависимой протеинкиназы (сGPK1) стимулируя экспрессию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) [Ziche, 2001]. Это показано как в здоровых клетках, так и в опухолевых, и ингибиторы NO-синтаз предлагаются в качестве противоопухолевого лечебного средства, а доноры NO — для стимуляции ангиогенеза, например, после ишемии [Hoeber, 2004, Murohara, 2002, Baum, 2004].

В условиях же высоких локальных концентраций NO наблюдаемое в экспериментах угнетение ангиогенеза можно объяснить сокращением синтеза циклооксигеназы-2 путём блокирования NF-κB [Groothuis, 2005]. Ингибин, вводимый в количестве, превышающем физиологические уровни, оказывает влияние за счёт конкуренции за рецепторы TGFβ, необходимые для завершения процессов формирования сосудистой стенки.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

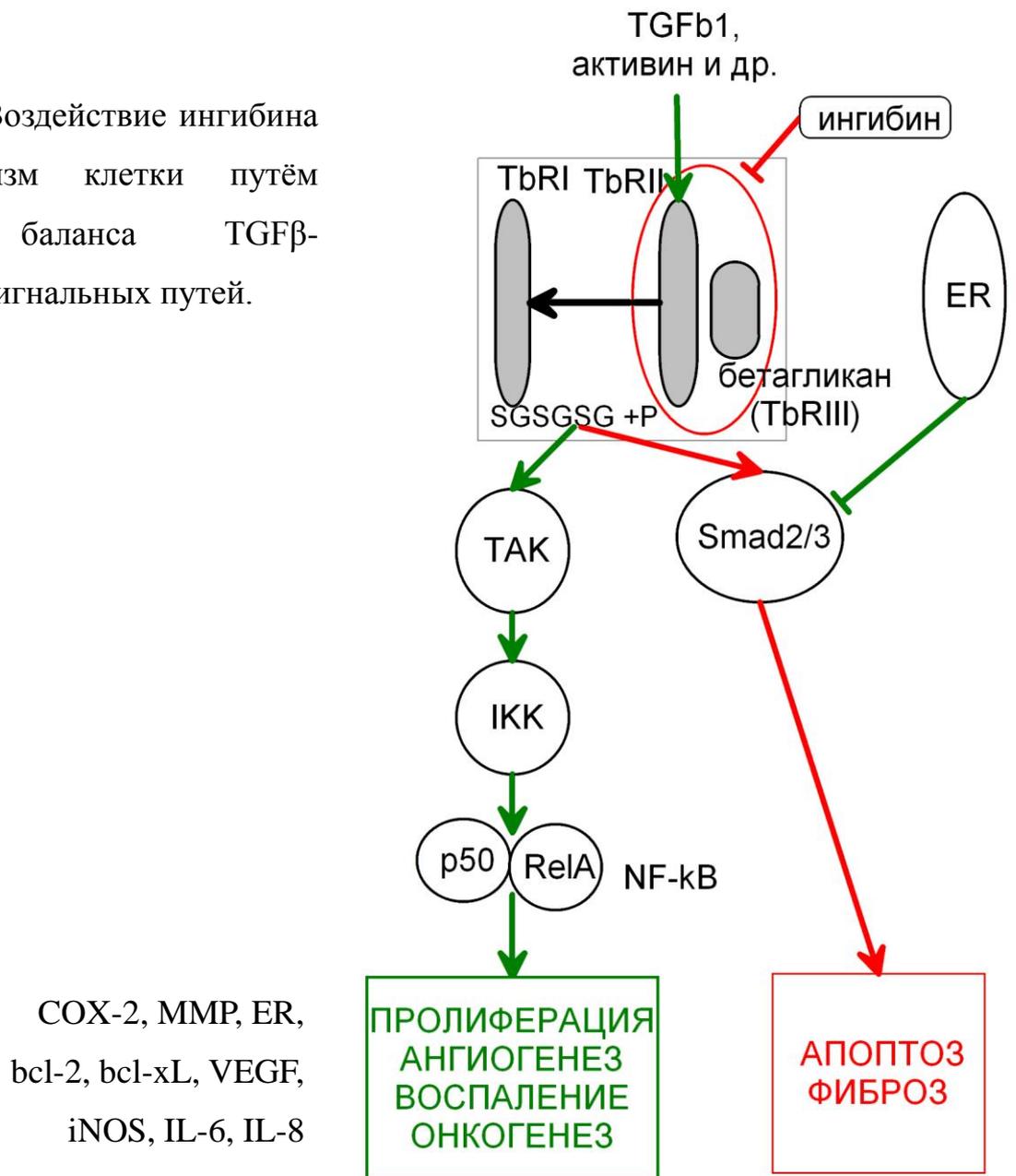
В основе данной работы лежит исследование влияния нитрозильных комплексов железа на быстрорастущие ткани на примере модели индуцированного эндометриоза — заболевания, заключающегося в разрастании эктопических очагов эндометриоидной ткани в условиях хронического воспаления. В данной работе впервые показано, что введение в организм животных с индуцированным эндометриозом низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа приводит к угнетению роста патологической ткани — эндометриоидных образований — и регрессу их активно секретирующей железистой составляющей. Особенно это выражено на стадии быстрого роста эндометриоидных очагов. Мы склонны полагать, что ДНКЖ не только служат донорами оксида азота, но и в силу высокого сродства к тиоловым группам могут сами модулировать активность белков, в том числе сигнальных молекул и рецепторов [Адамян, 2013, Ванин, 2013, Burgova, 201].

Методом ЭПР-спектроскопии впервые оценено характерное для такого заболевания содержание монооксида азота в тканях организма. Также впервые установлено присутствие в тканях опытных животных при эндометриоидном патологическом процессе белковых динитрозильных комплексов железа.

Исследовано воздействие на индуцированный эндометриоз гормона фолликулов ингибина. Установлено, что введение ингибина в дозировке, на 2-3 порядка превышающей его нормальный уровень в организме, позволяет блокировать воспалительные процессы и пролиферацию эктопических эндометриоидных очагов [Хоперская, 2009]. Это означает, что после начала введения ингибина блокируется рост сформировавшихся очагов и образование новых. При этом по механизму апоптоза гибнут железистые клетки очага, блокируется формирование новых сосудов и инициируется запускание сформированных ранее (путём апоптоза в клетках тканей сосудов). Механизм действия ингибина — блокирование II и III субъединиц TGF β -рецептора.

Основанная на данных литературы схема на рисунке 40 показывает эффекты блокируемых ингибином TGFβ-зависимых сигнальных каскадов. Определяющим моментом влияния этого гормона можно считать блокирование пути активации транскрипционного фактора κВ. Резюмируя вышесказанное, можно констатировать, что введение избыточного количества гормона ингибина смещает вектор системы внутриклеточных сигналов, переключая метаболизм секретирующих клеток эндометриоидного очага с пролиферации на апоптоз.

Рисунок 40. Воздействие ингибина на метаболизм клетки путём смещения баланса TGFβ-зависимых сигнальных путей.



На рисунке 41 приведена сформированная автором на основе современных литературных данных схема воздействия на систему сигнальных путей, отвечающую на воздействие ингибина, универсальной сигнальной молекулы — оксида азота.

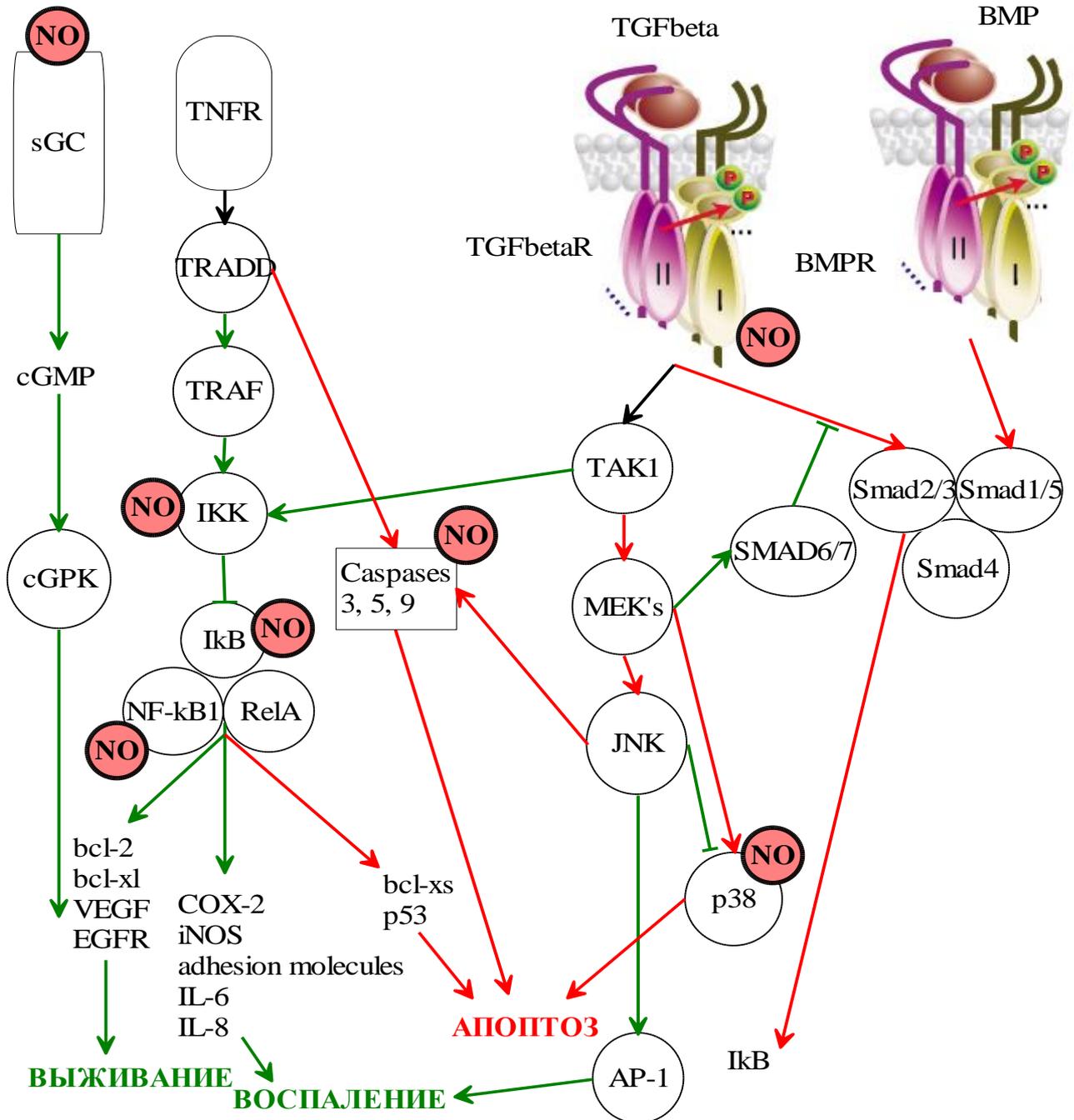


Рисунок 41. Сигнальные пути управления апоптозом и пролиферацией и их ключевые точки, подверженные модифицированию оксидом азота и его комплексами.

В качестве источника оксида азота использовали динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с глутатионом. В физиологических условиях такие комплексы способны переходить на высокомолекулярные лиганды — остатки цистеина белков. Такие стабилизированные на белках комплексы могут служить депо и донорами оксида азота и иона нитрозония (NO^+) [Ванин, 2014].

В данной работе впервые показано, что введение в организм животных с индуцированным эндометриозом низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа в количестве, в несколько раз превышающем нормальный уровень, приводит к угнетению роста патологической быстрорастущей ткани — эндометриоидных образований — и регрессу их активно секретирующей железистой составляющей. Наиболее выражено эффект проявляется на стадии быстрого роста эндометриоидных очагов [Сереженков, 2015].

Мы склонны полагать, что ДНКЖ не только служат донорами оксида азота, но и в силу высокого сродства к тиоловым группам могут сами модулировать активность белков, в том числе сигнальных молекул и рецепторов. Подтверждением этому служат данные ЭПР-спектроскопии ДНКЖ ингибином, что согласуется с многочисленными литературными данными [Бородулин, 2013, Skodje, 2014].

Результаты данной работы важны для понимания закономерностей функционирования и регуляции белков. В настоящее время основными механизмами этой регуляции является модификация белков посредством присоединения различных группировок (таких как фосфат, нитрогруппа, аргинин, ацетат и т. п.). Можно предполагать, что присоединение высвобождаемой из низкомолекулярных и белковых ДНКЖ группировки $\text{Fe}(\text{NO})_2$ приводит к посттрансляционному изменению функции белков и является принципиально новым эффектором белковой активности.

Полученные в данной работе экспериментальные данные послужили основой для создания и последующего клинического испытания препарата «Эндоферин®» (действующее вещество — гормон ингибин) по лечению эндометриоза. Препарат

«Эндоферин®» утвержден как лекарственное средство (свидетельство №451371) для применения в медицинской практике. Дальнейшее исследование регуляторных функций ДНКЖ создаёт предпосылки для разработки принципиально новой стратегии терапии эндометриоза и других заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Терапия низкомолекулярными ДНКЖ с глутатионом в дозе 12 мкмоль/кг вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму (в 1,4-2,7 раз по отношению к контролю на поздних стадиях роста, до 42 раз при терапии на ранних стадиях). В эндометриоидном очаге под действием экзогенных ДНКЖ наблюдается изменение соотношения железистых и стромальных клеток, снижается концентрация оксида азота.
2. Впервые методом ЭПР-спектроскопии по интенсивности сигналов нитрозильных комплексов гемовых белков оценили уровни NO в эндометриоидном очаге и тканях крысы с эндометриозом. Показано, что концентрация оксида азота варьирует в зависимости от ткани в диапазоне от 2,5 до 3,6 мкМ.
3. Впервые в печени, стенке эндометриоидного очага и прилежащих тканях крыс с модельным эндометриозом обнаружены белковые ДНКЖ, их концентрация составляет 0.2-0.7 мкМ.
4. Методом ЭПР-спектроскопии определено количество восстановленных тиоловых групп в белке ингибине, равное 4, что свидетельствует о высокой нативности белка, применяемого для воздействия на эндометриозный процесс.
5. Терапия гормоном ингибином в дозе 160 мкг/кг вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму (в 4,3-17,5 раз по отношению к контролю). Гистологическими исследованиями показано изменение соотношения железистых и стромальных клеток в эндометриоидном очаге под действием гормона ингибина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л.В. Применение динитрозильных комплексов железа с глутатионом снижает болевые проявления у крыс с экспериментальным эндометриозом / Л.В. Адамян, Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев, В.Д. Микоян, А.А. Степанян, А.А. Цыганов, А.Ф. Ванин // Проблемы репродукции. — 2013. — N 5. — С. 73-80.
2. Адамян Л.В. Динитрозильные комплексы железа с глутатионом купируют экспериментальный эндометриоз у крыс / Л.В. Адамян, Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев, В.Д. Микоян, А.А. Степанян, М.М. Сонова, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 2013. — Т. 58, Вып. 2. — С. 302–312
3. Адамян Л.В. Эндометриозы: Руководство для врачей / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков // М.: Медицина. — 1998. — 411 с.
4. Адамян Л.В. Окислительный стресс и генитальный эндометриоз / Л.В. Адамян, К.Н. Арсланян, А.А. Осипова, Е.Н. Бургова, М.М. Сонова, О.Н. Поддубная // Проблемы репродукции. — 2008. — № 4. — С. 6-9.
5. Адамян Л.В. Нарушение связывания железа при эндометриозе / Л.В. Адамян, С.А. Гаспарян, В.А. Сереженков, А.Ф. Ванин, Е.Н. Бургова // Акушерство и гинекология. — 2003. — № 6. — С. 24—27.
6. Бургова Е.Н. Динитрозильные комплексы железа с цистеином тормозят развитие экспериментального эндометриоза у крыс / Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 2012. — Т. 57. — N 1. — С. 105-109
7. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами и их обратимое превращение в нитрозотиолы / А.Ф. Ванин, И.В. Маленкова, П.И. Мордвинцев, А. Мюльш // Биохимия. — 1993. — т. 58. — №7. — С. 1094-1103.
8. Ванин А.Ф. Оксид азота – регулятор клеточного метаболизма // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — №11. — С. 7-12
9. Ванин А.Ф. Перспективы создания на основе динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами лекарственных средств

- различного действия / А.Ф. Ванин, Е.И. Чазов // Биофизика. — 2011. — Т: 56. — N 2. — С. 304-315
10. Ванин А.Ф. Физико-химическое обоснование лечебного действия на эндометриоз динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами / А.Ф. Ванин, Л.В. Адамян, Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев // Биофизика. — 2014. — Т. 59, Вып. 4. — С. 766–776
11. Велиев Е.И. Влияние динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами на состояние кавернозных тел пениса у крыс / Е.И. Велиев, С.В. Котов, В.К. Шишло, В.А. Сереженков, В.И. Лозинский, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 2008. — Т. 53. — № 2. — С. 326-335
12. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин // Л.: Медицина, 1973. — 142 с.
13. Зентов Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. / Н.К. Зентов, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова // М.: Наука Интерпериодика, 2001. — 340 с.
14. Ищенко А.И. Эндометриоз: диагностика и лечение / А.И. Ищенко, Е.А. Кудрина // М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 104 с.
15. Мурашко А.В. Активная форма рибонуклеотидредуктазы и уровень свободного железа в миоме матки человека / А.В. Мурашко, Е.Н. Бургова, Л.В. Адамян, И.А. Мороз, Д.Ш. Бурбаев, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 1998. — № 43. — вып 1. — С. 143-147.
16. Осипов А. Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А.Н. Осипов, Г.Г. Борисенко, Ю.А. Владимиров // Успехи биологической химии. — 2007. — т. 47. — С. 259-292
17. Посисеева Л.В. Эндометриоз: клиничко- экспериментальные сопоставления / Л.В. Посисеева, А.О. Назарова, И.Ю. Шарабанова, А.Л. Палкин, С.Б. Назаров // Проблемы репродукции. — 2001. — №4. — С. 27-31

18. Серезенков В.А. Ингибирующее влияние доноров оксида азота: моно- и биядерных динитрозильных комплексов железа, нитрозотиола на основе глутатиона и метформина на модельный эндометриоз крыс / В.А. Серезенков, Н.А. Ткачев, М.И. Кузнецова, С.Ю. Зайцев // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2015. — № 2. — С. 39-46.
19. Стрижаков А.Н. Эндометриоз: спорное и нерешенное / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов // Врач. — 2006. — N 9. — С. 5-9.
20. Стрижаков А.Н. Эндометриоз. Клинические и теоретические аспекты / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов — М.: Медицина, 1996. — 330с.
21. Хоперская О.А. Влияние препарата «Индаптин» на экспериментально индуцированный эндометриоз у крыс / О.А. Хоперская, А.В. Ильичев, А.П. Бельков, Е.Н. Бургова, В.А. Серезенков, Н.А. Ткачев, М.М. Сонова, К.С. Маилова, О.В. Зайратьянц, Л.В. Адамян, А.Ф. Ванин // Проблемы репродукции. — 2009. — N. 5. — С. 52-58.
22. Altintas D. Comparison of the effects of cetrorelix, a GnRH antagonist, and leuprolide, a GnRH agonist, on experimental endometriosis / D. Altintas, A. Kokcu, M. Tosun, M.B. Cetinkaya, B. Kandemir // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2008. — Vol. 34 (6). – pp. 1014-1019.
23. Arnold C. Behavioral tests as indicator for pain and distress in a primate endometriosis model / C. Arnold, J. Lamp, O. Lamp, A. Einspanier // J. Med. Primatol. – 2011. – Vol. 40. – pp. 317-326
24. Arsura M. Transient activation of NF-kB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-b1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation / M. Arsura, G.R Panta, J.D. Bilyeu, L.G. Cavin, M.A. Sovak, A.A. Oliver, V. Factor, R. Heuchel, F. Mercurio, S.S. Thorgeirsson, G.E. Sonenshein // Oncogene. – 2003. – Vol. 22. – pp. 412-425
25. Arsura M. TGFb1 Inhibits NF-kB/Rel Activity Inducing Apoptosis of B Cells: Transcriptional Activation of Ikb α / M. Arsura, M. Wu, G.E. Sonenshein // Immunity.

– 1996. – Vol. 5. – pp. 31-40.

26. Attar E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects / E. Attar, S.E. Bulun // *Hum. Reprod. Update* – 2006. — Vol. 12. — pp. 49-56.
27. Baum O. Endothelial NOS is main mediator for shear stress-dependent angiogenesis in skeletal muscle after prazosin administration / O. Baum, L. Da Silva-Azevedo, G. Willerding, A. Wöckel, G. Planitzer, R. Gossrau, A.R. Pries, A. Zakrzewicz // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. — pp. 2300-2308.
28. Beckman J.S. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. / J.S. Beckman, W.H. Koppenol // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 271. – pp. 1424-1437.
29. Berkley K.J. The Pains of Endometriosis / K.J. Berkley, A.J. Rapkin, R.E. Papka // *Science*. – 2005. — Vol. 308 No. 5728. — pp. 1587-1589
30. Berkley K.J. Visceral Pain Models, Female Reproductive Organ Pain / K.J. Berkley // *Encyclopedia of Pain*. – 2007. – pp. 2640-2644
31. Bhola N.E. TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer / N.E. Bhola, J.M. Balko, T.C. Dugger, M.G. Kuba, V. Sánchez, M. Sanders, J. Stanford, R.S. Cook, C.L. Arteaga // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123(3). – pp. 1348-1358.
32. Boese M. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex / M. Boese, P.I. Mordvintcev, A.F. Vanin, R. Busse, A. Mülsch // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270 (49). – pp. 29244-29249
33. Borodulin R.R. Redox conversions of dinitrosyl iron complexes with natural thiol-containing ligands / R.R. Borodulin, L.N. Kubrina, V.A. Serezhenkov, D.S. Burbaev, V.D. Mikoyan, A.F. Vanin // *Nitric Oxide*. – 2013. – Vol. 35. — pp. 35-41

34. Burgova E.N. Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress experimental endometriosis in rats / E.N. Burgova, N.A. Tkachev, L.V. Adamyan, V.D. Mikoyan, O.V. Paklina, A.A. Stepanyan, A.F. Vanin // *European Journal of Pharmacology*. — 2014. — Volume 727. — pp. 140–147
35. Burgova E.N. Effects of dinitrosyl iron complexes with glutathione and S-nitrosoglutathione on the development of experimental endometriosis in rats: A comparative studies / E.N. Burgova, N.A. Tkachev, L.V. Adamyan, O.V. Paklina, V.D. Mikoyan, A.F. Vanin // *European Journal of Pharmacology*. — 2014. — Vol. 741. — pp. 37-44
36. Butler R. Direct NO group transfer from S-nitrosothiols to iron centres / A.R. Butler, S. Elkins-Daukes, D. Parkin, D. Lyn, H. Williams // *Chem. Commun.* — 2001. — pp. 1732-1733
37. Chazov E.I. Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers / E.I. Chazov, O.V. Rodnenkov, A.V. Zorin, V.L. Lakomkin, V.V. Gramovich, O.N. Vyborov, A.G. Dragnev, C.A. Timoshin, L.I. Buryachkovskaya, A.A. Abramov, V.P. Massenko, E.V. Arzamastsev, V.I. Kapelko, A.F. Vanin // *Nitric Oxide*. — 2012. — Vol. 26(3). — pp. 148-156
38. Chen Q. The inhibitory effect of 15-R-LXA4 on experimental endometriosis / Chen Q., W. Zhou, D. Pu, Z. Li, Q. Huang, Q. Chen // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2009. — Vol. 145 (2). — pp. 200-204.
39. Cotroneo M.S. Pharmacologic, but Not Dietary, Genistein Support Endometriosis in a Rat Model / M.S. Cotroneo, C.A. Lamartinier // *Toxicological Sciences*. — 2001. — Vol. 61. — pp. 68-75
40. Craven P.A. Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells / P.A. Craven, R.K. Studer, J. Felder, S. Phillips, F.R. DeRubertis // *Diabetes*. — 1997. — Vol. 46(4). — pp. 671-681
41. Cury Y. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive

- system / Y. Cury, G. Picolo, V.P. Gutierrez, S.H. Ferreira // Nitric Oxide. – 2011. – Vol. 25(3). – pp. 243-254
42. D'Hooghe T.M. Increased prevalence and recurrence of retrograde menstruation in baboons with spontaneous endometriosis / T.M. D'Hooghe, C.S. Bambra, B.-M. Raeymaekers, P.R. Koninckx // Human Reproduction. – 2009. — Vol.11 No. 9. — pp. 2022-2025.
43. Defrère S. Insights into iron and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) involvement in chronic inflammatory processes in peritoneal endometriosis / S. Defrère, R. González-Ramos, J.-C. Lousse, S. Colette, O. Donnez, J. Donnez, A. Van Langendonck // Histol. Histopathol. – 2011. – Vol. 26(8). – pp. 1083-1092.
44. Demirturk F. Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Agonist Rosiglitazone on the Induction of Endometriosis in an Experimental Rat Model / F. Demirturk, H. Aytan, A. Caliskan, P. Aytan, and R. Koseoglu // J. Soc. Gynecol. Investig. – 2006. — Vol. — 13 No. 1. — pp. 58-62
45. Derynck R. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling / R. Derynck, Y. E. Zhang // Nature. – 2003. — Vol. 425. – pp. 577-584
46. Dmitrieva N. Endocannabinoid involvement in endometriosis / N. Dmitrieva, H. Nagabukuro, D. Resuehr, G. Zhang, S.L. McAllister, K.A. McGinty, K. Mackie, K.J. Berkley // Pain. – 2010. – Vol. 151(3). – pp. 703-710.
47. Dogan E. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib / E. Dogan, U. Saygili, C. Posaci, B. Tuna, S. Caliskan, S. Altunyurt, B. Saatli // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 82 Suppl 3. – pp. 1115-1120.
48. Esparza-Lopez J. Ligand Binding and Functional Properties of Betaglycan, a Co-receptor of the Transforming Growth Factor- β Superfamily / J. Esparza-Lopez, J.L. Montiel, M.M. Vilchis-Landeros, T. Okadome, K. Miyazono, F. Lopez-Casillas // The J. Biol. Chem. – 2001. — Vol. 276. No. 18. — pp. 14588-14596

49. Espey, M. A Chemical Perspective on the Interplay Between NO, Reactive Oxygen Species, and Reactive Nitrogen Oxide Species / M. Espey, K. Miranda, D. Thomas, S. Xavier, D. Citrin, M. Vitek, D. Wink. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 962. — pp. 195-206
50. Florio P. Healthy women and patients with endometriosis show high concentrations of inhibin A, inhibin B, and activin A in peritoneal fluid throughout the menstrual cycle. / P. Florio, S. Luisi, P. Viganò, M. Busacca, M. Fadalti, A.R. Genazzani, F. Petraglia // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13(9). — pp. 2606-2611
51. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications / J. Folkman // *N. Engl. J. Med.* — 1971. — Vol. 285(21). — pp. 1182-1186.
52. Foster M.W. A genetic analysis of nitrosative stress / M.W. Foster, L. Liu, M. Zeng, D.T. Hess, J.S. Stamler // *Biochemistry.* — 2009. — Vol. 48(4). — pp. 792-799
53. Garban H. Rapid nitric oxide-mediated S-nitrosylation of estrogen receptor: Regulation of estrogen-dependent gene transcription / H.J. Garban, D.C. Marquez-Garban, R.J. Pietras, and L.J. Ignarro // *PNAS.* — 2005. — Vol. 102 No. 7. — pp. 2632–2636
54. Gaston B.M. S-Nitrosylation Signaling in Cell Biology / B.M. Gaston, J. Carver, A. Doctor, L.A. Palmer // *Molecular interventions.* — 2003. — Vol. 3, issue 5. — pp. 253-263
55. Geng Y.J. Apoptotic death of human leukemic cells induced by vascular cells expressing nitric oxide synthase in response to gamma-interferon and tumor necrosis factor-alpha. / Y.J. Geng, K. Hellstrand, A. Wennmalm, G.K. Hansson // *Cancer Res.* — 1996. — Vol. 56(4). — pp. 866-874.
56. Gilliano N.Ya. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: Studies with HeLa cell cultures / N.Ya. Giliano, L.V. Konevega, L.A. Noskin, V.A. Serezhenkov, A.P. Poltorakov, A.F. Vanin // *Nitric Oxide.* — 2011. —

Vol. 24, Issue 3. – pp. 151-159

57. Gingery M. TGF- β coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NF κ B and SMAD pathways to promote osteoclast survival / A. Gingery, E.W. Bradley, L. Pederson, M. Ruan, N.J. Horwood, M.J. Oursler // *Exp. Cell Res.* – 2008. – Vol. 314. – pp. 2725-2738
58. Godoy L.C. Loss of CD40 endogenous S-nitrosylation during inflammatory response in endotoxemic mice and patients with sepsis. / L.C. Godoy, A.I. Moretti, M.C. Jurado, D. Ozer, M. Janiszewski, K. Ckless, I.T. Velasco, F.R.M. Laurindo, H.P. Souza // *Shock.* – 2010. – Vol. 33(6). – pp. 626-633
59. Gong Y.W. Nitric oxide mediates inactivation of glutathione S-transferase in suspension culture of *Taxus cuspidata* during shear stress / Y.W. Gong, Y.J. Yuan // *Journal of Biotechnology.* – 2006. – Vol. 123(2). – pp. 185-192.
60. Groothuis P.G. Vascular development in endometriosis / P.G. Groothuis, A.W. Nap, E. Winterhager, R. Grummer // *Angiogenesis.* – 2005. – Vol. 8. – pp. 147-156
61. Güney M. Effect of caffeic acid phenethyl ester on the regression of endometrial explants in an experimental rat model / M. Güney, S. Nasir, B. Oral, N. Karahan, T. Mungan // *Reprod. Sci.* – 2007. – Vol. 14(3). – pp. 270-279
62. Gupta S. Role of oxidative stress in endometriosis. / S. Gupta, A. Agarwal, N. Krajcir, J.G. Alvarez // *Reprod. Biomed. Online.* – 2006. – Vol. 13(1). – pp. 126-134.
63. Haimbach R.E. Unique insight into the growth of autotransplanted uterine tissue in a rat model of endometriosis using magnetic resonance imaging (MRI) / R.E. Haimbach, S.C. Lenhard, T. Schaeffer // *Journal of investigate surgery.* – Vol. 17, Is. 6. – pp. 351-352.
64. Halder S.K. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers / S.K. Halder, R.D. Beauchamp, P.K. Datta

// Neoplasia. — 2005. — Vol. 7(5). —pp. 509-521

65. Hess D. Protein S-nitrosylation: purview and parameters / D.T. Hess, A. Matsumoto, S.-O. Kim, H.E. Marshall, J.S. Stamler // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2005. — Vol. 6. — pp. 150-166
66. Hoeben A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben, B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom, E.A. De Bruijn // Pharmacol. Rev. — 2004. — Vol. 56(4). — pp. 549-580
67. Hogerlinden M. Characterization of the Progressive Skin Disease and Inflammatory Cell Infiltrate in Mice with Inhibited NF- κ B Signaling / M. van Hogerlinden, B.L. Rozell, R. Toftgård, and J.P. Sundberg // J. Invest. Dermatol. — 2004. — Vol. 123. —pp. 101-108
68. Hong M. Effect of TCTS on experimental endometriosis of rats / M. Hong, Y.Q. Hua, L. Yu, X.Y. Sun, X.D. Li, Q. Zhu // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. — 2003. — Vol. 28(1). — pp. 69-72
69. Huang K.-J. Real-time imaging of nitric oxide production in living cells with 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dicarbethoxy-8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-s-indacence by invert fluorescence microscope / Ke-Jing Huang, Hong Wang, Ming Ma, Xian Zhang, Hua-Shan Zhang // Nitric Oxide. — 2007. — Vol. 16, Issue 1. — pp. 36-43
70. Itil I.M. Effect of BCG vaccine on peritoneal endometriotic implants in a rat model of endometriosis / I.M. Itil, T. Cirpan, F. Akercan, A. Gamaa, M. Kazandi, A.C. Kazandi, P.S. Yildiz, N. Askar // Aust. N. Z. J. Obstet Gynaecol. — 2006. — Vol. 46(1). —pp. 38-41.
71. Ito I. Estrogen inhibits transforming growth factor beta signaling by promoting Smad2/3 degradation / I. Ito, A. Hanyu, M. Wayama, N. Goto, Y. Katsuno, S. Kawasaki, Y. Nakajima, M. Kajiro, Y. Komatsu, A. Fujimura, R. Hirota, A. Murayama, K. Kimura, T. Imamura, J. Yanagisawa // J. Biol. Chem. — 2010. —

Vol. 285(19). –pp. 14747-14755.

72. Jackson L.W. Oxidative stress and endometriosis / L.W. Jackson, E.F. Schisterman, R. Dey-Rao, R. Browne, D. Armstrong // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20. — pp. 2014-2020.
73. Kao S.H. Oxidative damage and mitochondrial DNA mutations with endometriosis / S.H. Kao, H.C. Huang, R.H. Hsieh, S.C. Chen, M.C. Tsai, C.R. Tzeng // Ann. N. Y. Acad. Sci. . –2005. –Vol. 1042. – pp. 186-194.
74. Katkiewicz M. Endometritis accompanying endometriosis in cows / M. Katkiewicz, M. Wierzchoń, Z. Boryczko // Życie Weterynaryjne. – 2011. – No. 8. – pp. 614-617
75. Kibbe M.R. Potentiation of nitric oxide—induced apoptosis in p53^{-/-} vascular smooth muscle cells / M.R. Kibbe, J. Li, S. Nie, B. M. Choi, I. Kovesdi, A. Lizonova, T. R. Billiar, E. Tzeng // American Journal of Physiology. — Cell Physiology.— 2002. –Vol. 282(3 51-3). – pp. 625-634.
76. Kim Y.M. Nitric Oxide Inhibits Apoptosis by Preventing Increases in Caspase-3-like Activity via Two Distinct Mechanisms / Y.M. Kim, R.V. Talanian, T.R. Billiar // J. Biol. Chem.— 1997. – Vol. 272, No. 49. – pp. 31138-31148
77. Kim Y.M. Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha / Y.M. Kim, K. Son, S.J. Hong, A. Green, J.J. Chen, E. Tzeng, C. Hierholzer, T.R. Billiar // Mol. Med. – 1998. – Vol. 4(3). – pp. 179-190
78. Kim Y.M. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. / Y.M. Kim, H.T. Chung, R.L. Simmons, T.R. Billiar // J. Biol. Chem. – 2000. –Vol. 275. – pp. 10954-10961
79. Kim-Shapiro D.B. Mechanisms of nitrite bioactivation / D.B. Kim-Shapiro, M.T. Gladwin // Nitric Oxide. — 2014. — Vol. 38. — pp. 58-68.
80. Kipp J.L. Activin Regulates Estrogen Receptor Gene Expression in the Mouse

- Ovary / J.L. Kipp, S.M. Kilen, T.K. Woodruff, and K.E. Mayo // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, No. 50. – pp. 36755-36765
81. Kleschyov A.L. Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2 / A.L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, D. Gottfried, M. Skatchkov, N. Sjakste, A. Daiber, V. Umansky, T. Munzel // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 40(8). – pp. 1340-1348.
82. Kneten A. NF- κ B and AP-1 Activation by Nitric Oxide / A. von Knethen, D. Callsen, B. Brüne // *Molecular Biology of the Cell.* – 1999. – Vol. 10. –pp. 361-372
83. Kobayashi H. The role of iron in the pathogenesis of endometriosis / H. Kobayashi; Y. Yamada; S. Kanayama; N. Furukawa; T. Noguchi; S. Haruta; S. Yoshida; M. Sakata; T. Sado; H. Oi // *Gynecological Endocrinology.* – 2009. – Vol. 25(1). – pp. 39-52
84. Lee T.-H. Nitric oxide modulates mitochondrial activity and apoptosis through protein S-nitrosylation for preimplantation embryo development / T.-H. Lee, M.-S. Lee, C.-C. Huang, H.-M. Tsao, P.-M. Lin, H.-N. Ho, J.-Y. Shew, Y.-S. Yang // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2013. – Vol. 30(8). – pp. 1063-1072.
85. Lepoivre M. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages / M. Lepoivre, J.M. Flaman, P. Bobe, G. Lemaire, Y. Henry // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – pp. 21891-21897.
86. Li J. Nitric Oxide Suppresses Apoptosis via Interrupting Caspase Activation and Mitochondrial Dysfunction in Cultured Hepatocytes / J. Li, C.A. Bombeck, S. Yang, Y.-M. Kim and T.R. Billiar // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, No. 24. – pp. 17325-17333
87. Manukhina E.B. Nitric oxide in the cardiovascular system. / E.B. Manukhina, B.V. Smirin, I.Yu. Malyshev et al. // *Izv. RAS, Ser. Biol.* – 2002. – №5. – pp. 585-

596.

88. Martinez M.C. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease / M.C. Martínez, R. Andriantsitohaina // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2009. – Vol. 11, No 3. – pp. 669-702
89. Martínez-Ruiz A. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms / A. Martínez-Ruiz, S. Cadenas, S. Lamas // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51(1). – pp. 17-29.
90. Martinez-Ruiz A. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction / A. Martinez-Ruiz, S. Lamas // *Cardiovascular Research*. – 2004. – Vol. 62. – pp. 43-52
91. Matsuzaki S. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats / S. Matsuzaki, M. Canis, C. Darcha, R. Dallel, K. Okamura, G. Mage // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82(6). – pp. 1609-1615.
92. Mayer B. Inactivation of soluble guanylate cyclase by stoichiometric S-nitrosation // B. Mayer, A.L. Kleschyov, H. Stessel, M. Russwurm, T. Münzel, D. Koesling, K. Schmidt // *Mol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 75(4). – pp.886-891
93. McAllister S.L. Endometriosis-induced vaginal hyperalgesia in the rat: role of the ectopic growths and their innervation / S.L. McAllister, K.A. McGinty, D. Resuehr, K.J. Berkley // *Pain*. — 2009. — Vol. 147(1-3). — pp. 255-264.
94. McCarthy S.A. Inhibition of Vascular Endothelial Cell Growth by Activin-A / S.A. McCarthy, R. Bicknell // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268, No. 31. — pp. 23066-23071
95. McPherron A.C. GDF-3 and GDF-9: Two New Members of the Transforming Growth Factor- β Superfamily Containig a Novel Pattern of Cisteines / A.C. McPherron, S.-J. Lee // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268 No. 5. — pp. 3444-3449

96. Mendes A.F. Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes. / A.F. Mendes, A.P. Carvalho, M.M. Caramona, M.C. Lopes // *Inflammation Research*. — 2002. — Vol. 51(7). — pp. 369-375.
97. Miranda K.M. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite / K.M. Miranda, M.G. Espey, D.A. Wink // *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. — 2001. — Vol. 5, No. 1. — pp. 62-71
98. Mocellin S. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities / S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti // *Med. Res. Rev.* — 2007. — Vol. 27(3). — pp. 317-352.
99. Mohammadzadeh A. Evaluation of the effect of pentoxifylline on white blood cell count in serum and peritoneal fluid in female rats with endometriosis / A. Mohammadzadeh, M. Heidari, H. Soltanghorae, M. Jeddi-Tehrani, M. Ghaffari Novin, M.M. Akhondi, H. Zeraati, F. Mohammadzadeh // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* — 2008. — Vol. 34(3). — pp. 307-313.
100. Moor J.P. Weaning and the Developmental Changes in Follicle-Stimulating Hormone, Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide, and Inhibin B in the Male Rat / J.P. Moore, Jr., S.J. Winters // *Biology of Reproduction*. — 2008. — Vol. 78. — pp. 752-760
101. Murohara T. Nitric Oxide and Angiogenesis in Cardiovascular Disease / T. Murohara and T. Asahara // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2002. — Vol. 4(5). — pp. 825-831.
102. Muse K.N. How does mild endometriosis cause infertility? / K.N. Muse, E.A. Wilson // *Fertil Steril*. — 1982. — Vol. 38(2). — pp. 145-152.
103. Nagler H.M. Inhibin B Is A Better Marker Of Spermatogenesis Than Other Hormones In The Evaluation Of Male Factor Infertility / H.M. Nagler // *Fertility and Sterility*. — 2006. — Vol 86, No 2. — pp. 110-114

104. Nogueira Neto J. Evaluation of the macroscopic growth degree of experimental endometriosis in rats / J. Nogueira Neto, O.J. Torres, T.M. Coelho, J.N. Nunes Jr., G.C. Aguiar, L.K. Costa // *Acta Cir. Bras.* — 2007. — Vol.22 supl. 1. — pp. 8-11
105. Oner, G. The effects of metformin and letrozole on endometriosis and comparison of the two treatment agents in a rat model / G. Oner, B. Ozcelik, M.T. Ozgun, I.S. Serin, F. Ozturk, M. Basbug // *Hum. Reprod.* — 2010. — Vol. 25(4). — pp. 932-937
106. Ota H. Suppression of natural killer cell activity by splenocyte transplantation in a rat model of endometriosis / H. Ota, H. Rong, S. Igarashi, T. Tanaka // *Human Reproduction.* — 2002. — Vol. 17, No. 6., — pp. 1453-1458
107. Parohova J. The cross-talk of nuclear factor kappaB and nitric oxide in the brain *Activitas Nervosa* / J. Parohova, S. Vrankova, A. Barta, M. Kovacsova, D. Bartko, O. Pechanova // *Superior Rediviva.* — 2009. — Vol. 51 No. 3-4. — pp. 123-126
108. Piva M. Interleukin-6 Differentially Stimulates Haptoglobin Production by Peritoneal and Endometriotic Cells in Vitro: A Model for Endometrial-Peritoneal Interaction in Endometriosis / M. Piva, G.M. Horowitz, K.L. Sharpe-Timms // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* — 2001. — Vol. 86. — No. 6. — pp. 2553-2561
109. Portz D.M. Oxygen free radicals and pelvic adhesion formation: I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model / D.M. Portz, T.E. Elkins, R. White, J. Warren, S. Adadevoh, J. Randolph // *Int. J. Fertil.* — 1991. — Vol. 36(1). — pp. 39-42.
110. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration / R. Radi // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101(12). — pp. 4003-4008.
111. Romero-Sandoval E.A. NCX-701 (nitroparacetamol) is an effective antinociceptive agent in rat withdrawal reflexes and wind-up / E.A. Romero-Sandoval, J. Mazario, D. Howat, J.F. Herrero // *Br. J. Pharmacol.* — 2002 Vol.

- 135(6). — pp. 1556-1562.
112. Saura M. Nitric Oxide Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling in Endothelial Cells / M. Saura, C. Zaragoza, B. Herranz, M. Griera, L. Diez-Marqués, D. Rodriguez-Puyol, M. Rodriguez-Puyol // *Circulation Research*. — 2005. — Vol. 97. — pp. 1115-1123
113. Schmierer B. Activin A Signaling Induces Smad2, but Not Smad3, Requiring Protein Kinase A Activity in Granulosa Cells from the Avian Ovary / B. Schmierer, M.K. Schuster, A. Shkumatava, and K. Kuchler // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278, No. 23. — pp. 21197-21203
114. Serezhenkov V.A. Antidiabetes drug metformin is a donor of nitric oxide: EPR measurement of efficiency / V.A. Serezhenkov, I.S. Kuznetsov, T.I. Romantsova, M.I. Kuznetsova, A.F. Vanin // *Biophysics*. — 2011. — Vol. 56, Issue 6. — pp. 1088-1095
115. Skodje, K. Coordination-triggered NO release from a dinitrosyl iron complex leads to anti-inflammatory activity / K. M. Skodje, M.-Y. Kwon, Su Wol Chung, E. Kim // *Chem. Sci.* — 2014. — Vol.5. — pp. 2374-2378
116. Stamler J.S. S-nitrosylation: integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery / S.M. Haldar, J.S. Stamler // *J. Clin. Invest.* — 2013. — Vol. 123(1). — pp. 101–110.
117. Stoeckemann K. Effects of the progesterone antagonists onapristone (ZK 98 299) and ZK 136 799 on surgically induced endometriosis in intact rats / K. Stoeckemann, C. Hegele-Hartung, K. Chwalisz // *Hum. Reprod.* — 1995 . — Vol. 10(12). — pp.3264-3271.
118. Stratton P. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications / P. Stratton, K.J. Berkley // *Human Reproduction Update*. — 2011. — Vol.17, No.3. — pp. 327-346
119. Szczepanska M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle / M. Szczepanska, J. Kozlik, J. Skrzypczak, and M. Mikolajczyk // *Fertil. Steril.* —

2003. — Vol. 79(6). — pp.1288-1293.
120. Tabibzadeh S. Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty / S. Tabibzadeh // *Frontiers in Bioscience*. — 2002. — Vol. 7. — pp. 1231-1246
121. Tabruyn S.P. A new role for NF- κ B in angiogenesis inhibition / S.P. Tabruyn, A.W. Griffioen // *Cell Death and Differentiation*. — 2007. — pp. 1-5
122. Tong S. Inhibins and activins: clinical advances in reproductive medicine / S. Tong, E.M. Wallace and H.G. Burger // *Clinical Endocrinology*. — 2003. — Vol. 58. — pp. 115-127
123. Török N.J. Nitric Oxide Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release by Nitrosylating Caspase 9 / N.J. Török, H. Higuchi, S. Bronk, G.J. Gores // *Cancer Research*. — 2002. — Vol. 62. — pp. 1648-1653
124. Townsend D.M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D.M. Townsend, K.D. Tew // *Oncogene*. — 2003. — Vol. 22. — pp. 7369-7375
125. Uygur D. Leflunomide — an immunomodulator-induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis / D. Uygur, H. Aytan, S. Zergeroglu, S. Batioglu // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2006. — Vol. 13(5). — pp. 378-383.
126. Uzdensky A. Protection Effect of GDNF and Neurturin on Photosensitized Crayfish Neurons and Glial Cells / A. Uzdensky, M. Komandirov, G. Fedorenko, A. Lobanov // *J. Mol. Neurosci.* — 2013. — Vol. 49. — pp. 480-490
127. Van Langendonck A. Oxidative stress and peritoneal endometriosis / A. Van Langendonck, F. Casanas-Roux, J. Donnez // *Fertil. Steril.* — 2002. — Vol. 77(5). — pp. 861-870.
128. Vanin A.F. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands / A.F. Vanin, V.A. Serezhenkov, V.D. Mikoyan, M.V. Genkin // *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. — 1998. — Vol. 2, No. 4. — pp. 224-234

129. Vanin A.F. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies. / A.F. Vanin, I.V. Malenkova, V.A. Serezhenkov // Nitric Oxide. — 1997. — Vol. 1(3). — pp. 191-203.
130. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology / A.F. Vanin // Nitric Oxide. — 2009. — Vol. 21(1). — pp. 1-13
131. Vernon M.W. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. / M.W. Vernon, E.A. Wilson // Fertil Steril. — 1985. — Vol. 44. — No. 5. — pp. 684-694.
132. Villalobo A. Enhanced Cell Proliferation Induced by Nitric Oxide / A. Villalobo // Dynamic Cell Biology. — 2007. — Vol. 1(1). — pp. 60-64
133. Walton K.L. A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands / K.L. Walton, Y. Mankanji, M.C. Wilce, K.L. Chan, D.M. Robertson, C.A. Harrison // J. Biol. Chem. — 2009. — Vol. 284(14). — pp. 9311-9320.
134. Wang Y. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. / Y. Wang, R.K. Sharma, T. Falcone, J. Goldberg, A. Agarwal // Fertil Steril. — 1997. — Vol. 68(5). — pp. 826-830.
135. Weiss J.M. Macrophage-dependent nitric oxide expression regulates tumor cell detachment and metastasis after IL-2/anti-CD40 immunotherapy / J.M. Weiss, L.A. Ridnour, T. Back, S.P. Hussain, P. He, A.E. Maciag, L.K. Keefer, W.J. Murphy, C.C. Harris, D.A. Wink, and R.H. Wiltout // Journal of Experimental Medicine. — 2010. — Vol. 207(11). — pp. 2455-2467.
136. Whitman M. TGFβ signaling at the summit / M. Whitman, L. Raftery // Meeting review Development. — 2005. — Vol. 132 (19). — pp. 4205-4210
137. Wiater E. Identification of Distinct Inhibin and Transforming Growth Factor-

- binding Sites on Betaglycan. Functional separation of betaglycan co-receptor actions / E. Wiater , C.A. Harrison, K.A. Lewis, P.C. Gray, W.W. Vale // *J. Biol. Chem.* — 2006. — vol. 281, No. 25. — pp. 17011-17022
138. Xu Z. Lipoxin A4 inhibits the development of endometriosis in mice: the role of anti-inflammation and antiangiogenesis / Z. Xu, F. Zhao, F. Lin, J. Chen, Y. Huang // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2012. — Vol. 67. — pp. 491-497
139. Yamaguchi K. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress / K. Yamaguchi, M. Mandai, S. Toyokuni, J. Hamanishi, T. Higuchi, K. Takakura, S. Fujii // *Clin. Cancer Res.* — 2008. — Vol. 14(1). — pp. 32-40
140. Yao Z. Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds / Z. Yao, X. Shen, I. Capodanno, M. Donnelly, J. Fenyk-Melody, J. Hausamann, C. Nunes, J. Strauss, K. Vakerich // *J. Invest. Surg.* — 2005. — Vol. 18(4). — pp. 177-183.
141. Yeo S.G. Increased expression of pattern recognition receptors and nitric oxide synthase in patients with endometriosis. / S.G. Yeo, Y.S. Won, H.Y. Lee, Y.I. Kim, J.W. Lee, D.C. Park // *Int. J. Med. Sci.* — 2013. — 10(9). — pp. 1199-1208
142. Ziche M. Nitric oxide and angiogenesis / M. Ziche, L. Morbidelli // *Journal of Neuro-Oncology.* — 2000. — Vol. 50. — pp.139-148

Список используемых сокращений

- AP-1 — активирующий протеин - 1
- BMP — морфогенетический протеин кости
- cGMP, цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат
- cGPK — цГМФ-зависимая протеинкиназа
- COX-2 — циклооксигеназа II типа
- DETC, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат
- DNIC, ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа
- EDRF — эндотелиальный фактор релаксации
- eNOS — эндотелиальная NO-синтаза (I типа)
- GSH — глутатион
- HPLC — жидкостная хроматография высокого разрешения
- IKK — ингибитор каппа-B киназа
- iNOS — индуцибельная NO-синтаза (II типа)
- IκB — ингибитор каппа-B
- JNK — c-Jun N-концевая киназа
- LPS — липополисахариды
- MAPK — митоген-активируемые протеинкиназы
- NF-κB — ядерный фактор каппа B
- nNOS — нейрональная NO-синтаза (III типа)
- SDS — натрия додецилсульфат
- TGFβ — трансформирующий ростовой фактор бета
- TNFα — фактор некроза опухоли альфа
- VEGF — эндотелиальный фактор роста сосудов
- AKM — активированные кислородные метаболиты
- RHP — рибонуклеотидредуктаза
- СТС — сверхтонкая структура (спектра ЭПР)
- ЭПР — электронный парамагнитный резонанс