

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ ПРЕДРАКОВЫХ СОСТОЯНИЙ ЖЕЛУДКА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
биологического факультета

Успановой Динары Марзагалеевны

Научный руководитель

ассистент кафедры физиологии

человека и животных

_____ С.С. Синдеев

(число, подпись)

Зав.кафедрой физиологии человека

и животных, д.б.н., доцент

_____ О.В. Семячкина-Глушковская

(число, подпись)

Саратов 2016

Введение. Канцерогенез (КГ) – сложный многоэтапный процесс, приводящий к глубоким изменениям нормальных клеток организма, превращающий их в опухолевые [1]. Канцерогенез определяется как возникновение злокачественных новообразований, вызванных воздействием канцерогенных факторов, или как процесс появления опухолей. Он не зависит от механизмов воздействия канцерогенных факторов, выражающихся в более раннем возникновении опухолей в популяциях человека или животных [2].

Канцерогенез является важной социально-экономической проблемой как отечественного, так и мирового здравоохранения. Он занимает 2-е место по смертности и 4-е место в мире по онкологическим заболеваниям. Каждый год регистрируется 988 тысяч новых случаев заболеваемости и 736 тысяч смертей. В России рак желудка по показателям заболеваемости занимает 3-е место [3].

За последние годы произошло расширение представлений о факторах, способствующих развитию опухолей у человека и возникновению рака, что привело к появлению новых задач и направлений в онкологии. Некоторые современные методы, в отдельных случаях, позволяют выявить и предотвратить развитие предраковых состояний на ранних стадиях [4]. Основной задачей онкологии будущего должно стать не лечение больных, а предотвращение онкологических заболеваний [5].

Однако, не смотря на последние достижения науки проблема диагностики рака желудка до сих пор не решена. В силу естественных причин поставить точный диагноз удается чаще всего только на последних стадиях, когда оказание медицинской помощи практически бесполезно. На сегодняшний день, диагностировать предраковые состояния практически невозможно в силу отсутствия точных диагностических методов и критериев [4].

Целью исследования явилось изучение эффективности современных методов диагностики развития предраковых состояний желудка.

Для достижения данной цели были сформулированы задачи:

1. воспроизвести предраковое состояние тканей слизистой желудка у крыс в эксперименте;
2. оценить эффективность методов доплеровской оптической когерентной томографии и лазерной спекл-визуализации для диагностики предрака желудка у крыс;
3. оценить эффективность спектроскопического анализа для диагностики предрака желудка у крыс.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 24 самцах белых беспородных крыс на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского национально исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Животные были разделены на следующие группы:

1. контрольная группа (n=12) – интактные крысы;
2. экспериментальная группа (n=12) – крысы с предраком желудка, подвергавшиеся комбинированному стрессу (хронический и острый стрессы), которые дополнительно в период проведения эксперимента крысы со стандартным рационом получали нитрозаминую диету.

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами руководством по уходу и использованию лабораторных животных [6].

Методы исследования. Для того, чтобы вызвать у животных предраковое состояние слизистой оболочки желудка было использовано комбинированное воздействие предрасполагающих факторов. Для этого у животных провоцировали развитие язв, используя запатентованную стресс-индуцированную модель язвообразования у крыс. Данная модель была разработана ранее коллективом кафедры физиологии человека и животных Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Сущность предлагаемого способа экспериментального моделирования стресс-индуцированного развития острого язвенного кровотечения заключается в том, что на протяжении длительного срока – 5 месяцев животное последовательно подвергали воздействию двух разных по силе и продолжительности стрессов. На первом этапе эксперимента здоровых крыс на 4 месяца помещали в условия высокой популяционной плотности. Для соблюдения правил содержания животных небольшими группами крысы должны проживать в клетке в следующем соотношении ($\text{см}^2/\text{г}$ массы тела=1). В данной модели использовали проживание животных, когда указанное

соотношение было ($\text{см}^2/\text{г}$ массы тела=0,3). На втором этапе тех же животных 1 месяц подвергали острому иммобилизационному стрессу. Для этого крыс каждый день привязывали животом вверх на 2 часа.

Кроме этого для развития предракового состояния желудка, на протяжении всего эксперимента стрессированным животным в диету включали нитрозаминообразующие компоненты. Ежедневно крысы получали N-метиланилин в дозе 2 г/кг, который давали со стандартной едой, и дополнительно нитрит натрия (1 г/л) с водой.

Развитие предрака желудка подтверждалось с использованием стандартного гистологического анализа, для этого образцы ткани помещались в 10% забуференный раствор формалина на срок не менее суток. Далее образцы подвергались стандартной гистологической проводке. Парафиновые блоки нарезались на микротоме. Толщина срезов составляла 5 мкм. Для окраски использовались стандартные гистологические красители - гематоксилин и эозин.

Определение показателей перфузии и автофлуоресценции тканей желудка, скорости кровотока в его сосудах осуществляли на наркотизированных животных (тиопентал натрия, Sigma, 40 мг/кг, ip). Для этого желудок вынимали и фиксировали на специальной пластинке, подогреваемой до температуры тела, промывали физиологическим раствором, дожидались стабилизации кровотока в течение 30 мин и делали запись.

Измерения скорости кровотока в сосудах желудка производили с помощью доплеровской оптической когерентной томографии (ДОКТ) на установке OCS1300SS (США).

Для измерения перфузии тканей желудка применялся метод лазерной спекл-визуализации. Аппаратная часть установки представляла собой высоко-когерентный линейно-поляризованный (300:1) источник лазерного излучения (He-Ne лазер Thorlabs HNL210L - 632.8 нм, 21 мВт), которое посредством одномодового волоконного световода Thorlabs

PMС630-50В-АРС экспонировало ткань желудка исследуемого животного. Субъективная спекл-картина объекта, формируемая объективом Computar M1614-MP2, регистрировалась с помощью КМОП-камеры Basler acA2500-14 gm. Апертурное число объектива устанавливалось равным $f/6$ для комфортного соответствия критерию Найквиста (более 2 пикселей на 1 спекл). Поляризационный фильтр перед объективом был использован для отсеечения прямых, неинформативных отражений и бликов от поверхности объекта.

Для выявления областей тканей желудка находящихся в предраковом состоянии оценивалась автофлуоресценция тканей желудка, связанная с флуоресценцией эндогенных флуорофоров – протопорфиринов с использованием спектрофлуориметра FluoroLog 3 (Франция).

Спектры автофлуоресценции детектировали при использовании возбуждающего излучения различных длин волн из диапазона 360-630 нм. В качестве источников использовали диодные лазеры и мощные узкополосные светоизлучающие диоды. Спектры регистрировали в формате ASCII. Для спектрального диапазона возбуждения 200-800 нм и, соответственно, диапазона испускания 250-850 нм были определены матрицы возбуждения-испускания.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью современного пакета анализа Statistica 10 (StatSoft, Inc., Талса, США). Различия считались достоверными при критерии $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка средней.

Результаты исследований. На первом этапе эксперимента изучались параметры кровотока желудка в контрольной и экспериментальной группах крыс с применением доплеровской оптической когерентной томографии и лазерной спекл-визуализации.

Результаты с применением ДОКТ не выявили достоверно значимых различий в скорости кровотока в сосудах желудка у здоровых крыс и крыс в предраковом состоянии (таблица 1). Действительно, скорость кровотока в сосудах желудка составляла у здоровых крыс $5,9 \pm 0,7$ мм/сек, а у стрессированных $6,2 \pm 0,3$ мм/сек ($p < 0,05$).

Таблица 1 - Средние суммарные значения показателя микроциркуляции и скорости кровотока в слизистой оболочке желудка у интактных крыс и особей с дисплазией органа на фоне язвообразования

	Показатель микроциркуляции, усл.ед.	Скорость кровотока, мм/сек
В норме	$21,5 \pm 1,4$	$5,9 \pm 0,7$
Дисплазия+язвы	$22,4 \pm 1,9$	$6,2 \pm 0,3$

$p < 0,05$

Аналогичные результаты были получены в опытах по изучению перфузии тканей желудка здоровых и экспериментальных крыс. В норме показатели перфузии составляли $21,5 \pm 1,4$ усл. ед., а у крыс в предраковом состоянии $22,4 \pm 1,9$ усл. ед. ($p < 0,05$).

Таким образом, результаты, полученные с применением доплеровской оптической когерентной томографии и лазерной спекл-визуализации, не выявили существенных различий в параметрах кровотока желудка здоровых крыс и крыс в предраковом состоянии, что указывает на неэффективность данных методов для диагностики ранних стадий развития рака желудка.

На втором этапе эксперимента мы исследовали изменения в тканях желудка у крыс в предраковом состоянии с применением метода спектрального анализа.

На рисунке 1 изображены данные по спектральному анализу автофлуоресценции здоровых и дисплазивных тканей желудка. Автофлуоресценция нормальных тканей была в максимальном диапазоне 540-580 нм, в то время как в области дисплазии отмечалось реабсорбция флуоресцентного сигнала за счет спектра гемоглобина (минимум 540-575 нм, максимум 635 нм), что не отмечалось в здоровой слизистой желудка.

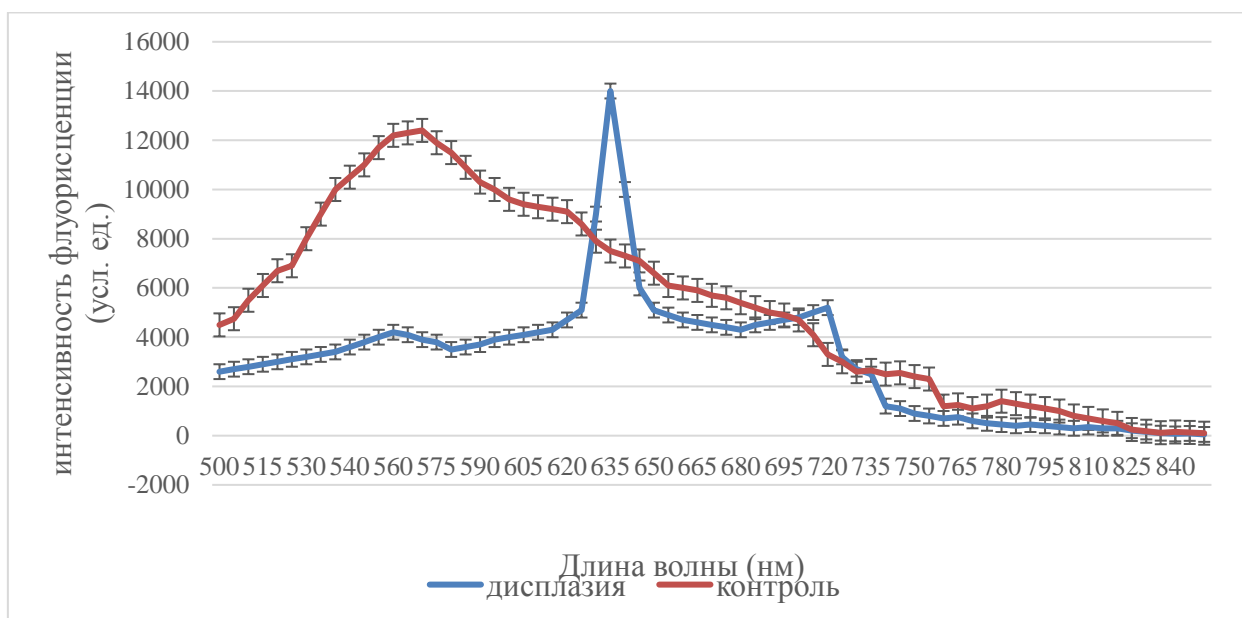


Рисунок 1 – Спектральный анализ слизистой желудка у здоровых крыс и крыс с дисплазией

Для проведения верхней гастроскопии полученные результаты имеют важное значение с целью проведения диагностики развития злокачественных опухолей в пищеводе и желудке, поскольку при этой процедуре используется спектр в области зеленого и синего света. Темные области, связанные с абсорбцией гемоглобина, свидетельствуют о процессах неоваскуляризации, сопровождающие развитие злокачественных опухолей.

Флуоресценция в области красного света (635 – 704 нм) связана с флуоресценцией протопорфирина IX скопившегося в области с предраком желудка.

Полученные нами данные согласуются с данными других авторов, которые указывают на то, что значительное повышение флуоресценции в сравнении с нормой в красном диапазоне ($\lambda = 600-800$ нм) указывает на развитие тканевого дефекта. Источником интенсивной флуоресценции является повышение концентрации эндогенных порфиринов и/или их комплексов с белками, скапливающихся в повреждённых областях.

Во многих научных источниках говорится о том, что порфирины могут являться продуктом жизнедеятельности анаэробной микрофлоры в тканях. Это может быть связано с повышенным содержанием порфиринов с общим нарушением цикла синтеза гема в организме и переносом порфиринов с током крови. Значительное накопление порфирина в эмбриональных и злокачественных опухолевых тканях, свидетельствует о том, что синтез порфирина происходит непосредственно в клетках, обладающих повышенной пролиферативной активностью.

В целом, результаты второго этапа эксперимента указывают на эффективность применения спектроскопического анализа для диагностики риска развития предрака желудка.

Заключение. Канцерогенез - это сложный процесс, приводящий к существенным изменениям здоровых клеток тканей и возникновению злокачественных новообразований, являющихся результатом воздействия канцерогенных факторов.

КГ является важной социально-экономической проблемой как отечественного, так и мирового здравоохранения. Не смотря на разнообразие современных методов исследования, диагностировать рак желудка на ранних стадиях практически невозможно. Отсутствие своевременного лечения обуславливает высокий процент летальных случаев у пациентов с данным диагнозом. В связи с этим, важной задачей современной физиологии и медицины является подбор и разработка эффективных методов диагностики предраковых состояний желудка.

Результаты проведенного исследования показали, что такие методы диагностики, как лазерная спекл-визуализация и доплеровская оптическая когерентная томография не являются эффективными для выявления различий между здоровыми тканями слизистой желудка и тканями с дисплазией. В то время как, применение спектроскопического исследования напротив, позволяет достоверно дифференцировать здоровую слизистую желудка и слизистую с дисплазией. Это делает данный метод перспективным для его дальнейшего использования в профилактике и ранней диагностике канцерогенеза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Анализ инфекционных концепций канцерогенеза / И. В. Рева [и др.] // Фундаментальные_исследования. 2014. Т.2, №2. С. 194-198.
- 2 Потенциальные прогностические факторы в канцерогенезе / Т. Ямамото [и др.] // Успехи_современного_естествознания. 2014. Т. 6, №12-5. С. 517-520.
- 3 Кашин, С. В. Диагностика раннего рака желудка в поликлинической практике / С. В. Кашин, И. О. Иваников, Е. Г. Бурдина // Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2012. Т. 2, №1. С. 147-153.
- 4 Матвеева, Л. В. Роль цитокинов семейства интерлейкина - 1 в желудочном канцерогенезе / Л. В. Матвеева, Л. М. Мосина // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 3, №11. С. 59-65.
- 5 Brand, S. Optical coherence tomography in the gastrointestinal / J. M. Poneros, B. E. Bouma // Endoscopy. 2000. Vol. 32, №10. P. 796-803.
- 6 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.ISBN-13: 978-0-309-15400-0 ISBN-10: 0-309-15400-6.