

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

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ β -АРРЕСТИНА-1 В ДИАГНОСТИКЕ
ПРЕДРАКОВЫХ СОСТОЯНИЙ ЖЕЛУДКА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Чубуклей Ирины Андреевны

Научный руководитель:

Ассистент кафедры физиологии

человека и животных _____ Синдеев С. С.

Зав. кафедрой физиологии

человека и животных

д.б.н., доцент _____ Семячкина – Глушковская О.В.

Саратов 2016 год

Введение. Проблема своевременной ранней диагностики злокачественных новообразований очень актуальна [1,2,3]. Это наиболее агрессивная по течению и прогнозу злокачественная эпителиальная опухоль человека. Рак желудка (РЖ) находится на втором месте среди причин смерти от онкологических заболеваний и четвертое из наиболее распространенных злокачественных образований [4,5]. Одним из характерных признаков РЖ считается быстрое прорастание аномальных клеток за пределы своих границ и способных проникать в соседние части тела и распространяться в другие органы.

Вместе с проблемой рака стоит так же вопрос возникновения предраковых заболеваний, которые предшествуют образованию рака. Предраковые состояния — это заболевания, увеличивающие риск возникновения рака, а предраковые изменения — это морфологические изменения ткани, в которой рак может возникнуть с большей вероятностью, чем в нормальной [6,7]. Считается, что рак — это длительный многоступенчатый процесс, протекающий годами в виде предраковых заболеваний [8, 9, 10]. Несмотря на то, что во многих странах мира разработаны программы по борьбе с раком, большое число пациентов, особенно в развивающихся странах, начинают лечение уже на более серьезных стадиях болезни, когда комбинированное лечение уже не так эффективно и резко увеличивает затраты. На сегодняшний день основными предраковыми состояниями считаются хронический атрофический гастрит (ХАГ) и бактерию *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), которая вызывает гастрит; эрозии, язвы желудка (ЯЖ), полипы желудка. Кишечная метаплазия и дисплазия считаются основными предраковыми изменениями. Их часто обозначают как нестабильный желудочный эпителий [11]. Доказано, что более 80% случаев дистального рака желудка связаны с инфекцией *H. pylori* и последующим гастритом [12, 13]. Формирование хронического гастрита, дуоденита и язвенной болезни у 60—70% взрослых начинается в детском и подростковом возрасте, но чаще встречается в молодом возрасте и преимущественно у

мужчин [14]. Заболевания, возникшие в молодом возрасте, нередко становятся хроническими у взрослых [15, 16]. Риск развития рака желудка у больных, имеющих предраковые заболевания, повышен примерно в 2—5 раз по сравнению с тем, кто имеет нормальный, здоровый желудок [17]. Учитывая все выше представленные данные, следует полагать, что раннее выявление в слизистой оболочке желудка изменений, своевременная диагностика, правильное наблюдение и лечение больных с предраковыми состояниями и изменениями слизистой оболочки желудка непереносимое условие профилактики рака желудка.

Целью данной работы было исследование возможности использования показателя уровня β -аррестина-1 в крови и тканей желудка для диагностики и предсказания риска развития предраковых состояний желудка.

Для решения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

1. Воспроизвести в эксперименте предраковое состояние тканей желудка у крыс. Оценить состояние тканей слизистой желудка.

2. Определить содержание β -аррестина-1 в крови и тканях желудка оценить его значимость для ранней диагностики канцерогенеза желудочной стенки.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на самцах белых беспородных крыс (n= 35) на базе кафедры физиологии человека и животных и вивария Саратовского Государственного университета.

Животные были разделены на следующие группы:

1. контрольная группа – интактные крысы (n=10);
2. крысы с язвой желудка, подвергавшиеся комбинированному стрессу (хронический и иммобилизационный стрессы (n=10));
3. крысы с предраком желудка, подвергавшиеся комбинированному стрессу (хронический и иммобилизационный стрессы), которые дополнительно в период проведения эксперимента крысы со стандартным рационом получали нитрозаминовую диету (n=15).

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами руководством по уходу и использованию лабораторных животных [71].

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами руководством по уходу и использованию лабораторных животных [18].

Воспроизведение предракового состояния слизистой оболочки желудка у крыс. Развитие язв желудка у животных вызывали, 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 этих животных в течении 1 месяца подвергали иммобилизационному стрессу. Для этого животных привязывали животом вверх каждый день на 2 часа.

Кроме этого для создания модели 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.

Данная модель была разработана ранее коллективом кафедры физиологии человека и животных и запатентована [19].

Подготовка тканей для гистологического исследования. Ткани желудка помещали в 10% забуференный раствор формалина не менее чем на сутки для фиксации. После чего образец подвергался стандартной спиртовой гистологической проводке и заливался жидким парафином. Толщина срезов составляла 4—5 мкм. Срезы тканей желудка окрашивали гистологическими красителями гематоксилином и эозином. С помощью медицинского микровизора проводящего свет $\mu\text{Vizo-101}$ (ЛОМО) были сделаны фотографии.

Определение концентрации бета-аррестина-1. Содержание бета-аррестина-1 изучали стандартным авидин-биотиновым методом иммуноферментного анализа с использованием специфических антител (Beta-arrestin-1 (ARRB1) ELISA kit, 96, CSB EL002134 RA) на фотометре микропланшетного формата Multiskan Ascent (ThermoLabsystems, Финляндия).

Результаты

Гистологическое исследование тканей желудка

В результате исследования в контрольной группе не были выявлены какие-либо изменения в слизистой оболочке желудка (рис. 3). В группе стрессированных крыс, не потребляющих – N-метиланилин и нитрит натрия, выявлялись только язвы желудка в количестве 21 мелких и 18 крупных. В группе стрессированных крыс, потребляющих азотсодержащие соединения, у 8 из 10 крыс отмечалось множество точечных и крупных язв желудка, при этом в области преджелудка, слизистая органа была с признаками ороговевания и гидропической дистрофией эпителия (рис. 1).

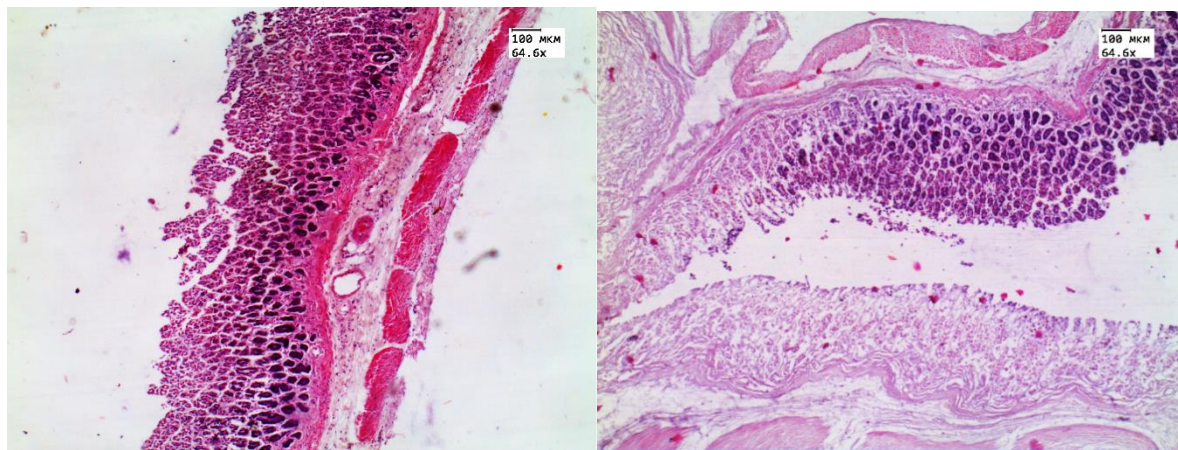


Рис. 1 Изображение тканей желудка крыс: слева – нормальное состояние, а справа — с признаками ороговевания эпителия

Желудок крыс, как и у человека, покрыт многослойным неороговевающим эпителием. Появление лейкоплазии желудка является признаками предраковых необратимых изменений в органе. Притом, 2 из 10 крыс умерли от острого язвенного кровотечения.

Помимо этого, у животных получавших N-метиланилин и нитриты с пищей были и подвергавшихся воздействию стресса были обнаружены кистозные расширения у основания желёз и геморрагические эрозии (рис. 4, 5, 6,7).

Определение содержания β -аррестина-1 в крови и тканях желудка

В таблице 1 показано, что уровень β -аррестина-1 в крови был завышен у крыс с признаками предрака желудка, в то время как группа животных с язвами незначительно отличалась от контрольной. Аналогичная ситуация наблюдалась при исследовании тканей желудка.

	Группа сравнения (здоровые особи), n=10	Группа с язвами, n=10	Группа с предраковыми изменениями желудка, n=15
Ткани слизистой	0,32±0.02	0,35±0.02	0,41±0.03*
Кровь	0,24±0.02	0,27±0.02	0,36±0.02*

Таблица 1 — Концентрация β -аррестина-1 (нг/мл) в крови и тканях желудка у грызунов в исследуемых группах. $p < 0,05$ * — относительно базальных значений.

Из графика, представленного на рис. 2 можно видеть, что достоверные различия в содержании β -аррестина-1 между здоровыми крысами и стрессированными животными с язвами желудка в исследуемых образцах отсутствуют. В то же время, животные с предраковыми изменениями слизистой желудка имели достоверные различия в концентрации β -аррестина-1 как в тканях самого желудка, так и в крови: по сравнению с группой контроля концентрация β -аррестина-1 в крови была выше на 50 %, а в тканях желудка — на 28 %.

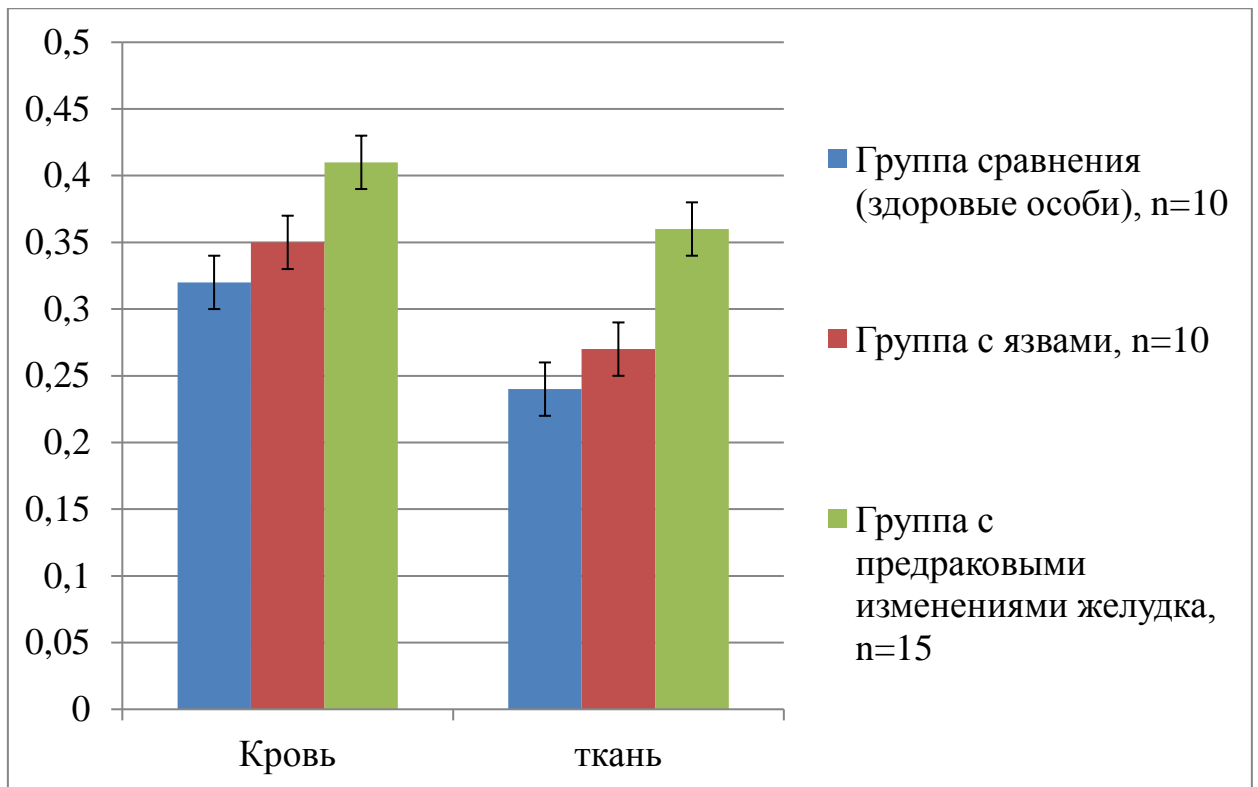


Рис. 2 — Концентрация β -аррестина-1 (нг/мл) в крови и тканях желудка у грызунов в исследуемых группах.

Заклучение. Исходя из результатов эксперимента, можно сделать предположение, что, под влиянием стресса на фоне применения N-метиланилина и нитрита натрия, язвенные поражения желудка могут трансформироваться в злокачественную опухоль. Т.к. группа интактных животных была устойчива к воздействию, мы можем полагать о возможности моделирования предраковых изменений желудка путем воздействия таких факторов как хронический социальный стресс и азотсодержащие соединения, поступающие с пищей и водой.

Хронический стресс провоцирует развитие язв в желудке, дополнительное воздействие усугубляет ульцерогенез, приводя к появлению острых язвенных кровотечений, длительное потребление малых доз азотсодержащих соединений (N-метиланилина и нитрита натрия) с продуктами питания и водой на фоне хронических стресс-индуцированных язв желудка сопровождается появлением предраковых изменений органа.

По результатам гистологического исследования тканей желудка у исследуемых групп было подтверждено наличие язв в обеих экспериментальных группах, в группе контроля состояние слизистой оболочки соответствовало здоровому. Основным отличительным признаком, обнаруженным у стрессированных крыс, получавших нитрозаминовую диету, было ороговевание эпителия, чего не наблюдалось у животных подверженных стрессированию, но не получавших нитрозамины. Помимо этого, у животных получавших нитрозамины были обнаружены и другие патологии тканей слизистой оболочки желудка – дистрофию желёз, эрозии и кисты, также расцениваемые как предрасполагающие к канцерогенезу.

В условиях срыва механизмов адаптации проявляются резервные возможности организма. Важным показателем этого процесса является β -аррестин-1, который также является ко-фактором в активации сосудистых β_2 -адренорецепторов. Существует мнение, что повышенный синтез β -аррестина-1 может быть важным фактором, который сопровождает перерождение язвенных поражений желудка в злокачественные опухоли. Для того, чтобы

узнать верна ли эта гипотеза были проведены работы по иммуноферментному определению β -аррестина-1 в крови и тканях желудка.

Также можно сделать вывод, что определение концентрации бета-аррестина-1 в крови и тканях желудка может быть новым методом прогнозирования риска развития злокачественных изменений в органе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Денисов, Л.Е. Формирование групп риска по раку желудка / Л.Е. Денисов, О.Н. Минушкин, Е.Г. Бурдина и др. // Кремлевская мед. 1999. Т. 1. С. 13-17.
2. Опыт эндоскопической диагностики и лечения раннего рака желудка / А.С. Маады [и др.]. М: Клиническая эндоскопия, 2007. Т. 4, С. 12-15.
3. Черноусов, А.Ф. Ранний рак и предопухолевые заболевания желудка / А.Ф. Черноусов, С.А. Поликарпов, Э.А. Годжелло. М: «ИздАТ». 2002. 320 с.
4. Розуменко, В.Д. Нейроонкология: современное состояние / В.Д. Розуменко // Онкология. 2006, Т.8. С. 188-131.
5. Задачи компьютерной томографии при обследовании больных раком желудка в онкорádiологической клинике / Н.К. Силантьева[и др.]. // Сибирский онкологический журнал. 2015. №5. С. 5-13.
6. Аруин, Л.И. Helicobacter pylori и рак желудка / Л.И. Аруин // Арх. патология. 1994. № 3. С. 3-5.
7. Sipponen, P. Gastric Cancer: Pathogenesis, Risks and Prevention, / P. Sipponen // Gastroenterol. 2002. Vol. 37. P. 39—44.
- 8 Correa, P. Chronic gastritis: a clinic pathological classification / P. Correa // Am. J. Gastroenterol. 1988. Vol. 83. P. 504—509.
9. Correa, P. Gastric cancer. In: Cancer Surveys. Trends in Cancer Incidence and Mortality / P. Correa, V. Chen // Imperial Cancer Research Fund. 1994. Vol. 19. P. 55—76.
10. Correa, P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis / P. Correa // Am. J. Surg. Pathol. 1995. Vol. 19. P. 37—43.
11. Yoshida, S. Gastric premalignancy and cancer screening in high risk patients / S. Yoshida, D. Saito // Am. J. Gastroenterol. 1996. Vol. 91. P. 839—843.
12. Helicobacter pylori: a true carcinogen? / A. Cats [et al]// Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1998. Vol. 10. P. 447—450.
13. Goldstone, A. Helicobacter pylori infection and gastric cancer / A. Goldstone, P. Quirket, M. Dixon // J. Pathol. 1996. Vol. 179. P. 129—137.

14. Дорофеев, Г.И. Гастродуоденальные заболевания в молодом возрасте / Г.И. Дорофеев, В.М. Успенский. М.: «Медицина», 1984. 160 с.

15. Денисова, Н.А. Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки у подростков / Н.А. Денисова // Врач. 1993. №2. С. 21–25.

16. Филимонов, Р.М. Подростковая гастроэнтерология / Р.М. Филимонов. М. «Медицина», 1990. 288с.

17. Бабак, О.А. Хронический атрофический гастрит – точка отсчета начала канцерогенеза / О.А. Бабак, Ю.В. Протас // Современная гастроэнтерология. 2005. №5. С. 9–14.

18. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.ISBN-13: 978-0-309-15400-0ISBN-10: 0-309-15400-6

19. Патент 2472231; Семячкина–Глушковская О.В. Способ моделирования развития мелкоочаговых мозговых геморрагий в коре головного мозга у новорожденных крыс / О.В. Семячкина–Глушковская, В.А. Бедникова, И.А. Фролов, И.А. Семячкин–Глушковский, С.В. Капралов, Т.Г. Анищенко, О.А. Бибикова, В.В. Тучин, Ю.Г. Шапкин // Патент на изобретение № 2472231 зарегистрировано 16.06.2011 г. Заявка на патент № 2011124711/14 от 16.06.2011 г. Срок действия до 16.06.2031 г