

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

Кафедра биохимии и биофизики

ИНДУЦИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЙ И ВЫЯВЛЕНИЕ
ХЕЛИКОБАКТЕРИЙ В ЖЕЛУДКАХ МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ХИМИЧЕСКИМИ КАНЦЕРОГЕНАМИ В СОЧЕТАНИИ СО
СВЕТОВЫМ СТРЕССОМ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4-го курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Гусевой Кристины Андреевны

Научный руководитель:

д.б.н., профессор _____ Коннова С.А.

Зав. кафедрой биохимии и биофизики

д.б.н., профессор _____ Коннова С.А.

Саратов 2016

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. За последние пятьдесят лет рост уровня заболеваемости раком желудка в развитых странах стал постоянной тенденцией. Он является третьей ведущей причиной онкологической смертности во всем мире. Частично это происходит из-за бессимптомного характера течения заболевания, что зачастую приводит к выявлению поздней стадии опухоли, на которой варианты лечения весьма ограничены.

Установлено, что хронические гастриты и язвы желудка играют важную роль в возникновении рака. Жизненно важно понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза рака желудка, для содействия в разработке новых препаратов, которые могут повысить выживаемость пациентов. Моделирование раковых опухолей ЖКТ индуцированием различными стрессовыми воздействиями широко применяется в экспериментальной онкологии и может быть использовано для изучения механизмов желудочного канцерогенеза, а также разработки новых методов лечения рака желудка, в частности, метастазирующих опухолей. Следовательно, изучение различных факторов, их сочетания и роли в развитии предопухолевых состояний является весьма актуальной задачей, как для теории онкогенеза, так и для практики - профилактики и лечения данного заболевания.

Цель работы – индуцировать на модели белых беспородных мышей развитие патологических состояний желудка при воздействии химическими канцерогенами в сочетании со световым стрессом и выявить присутствие хеликобактерий у животных.

Для реализации цели решались следующие **задачи**:

- 1) индуцировать патологические изменения желудка мышей длительным воздействием химических канцерогенов (нитриты в сочетании с амином) и светового стресса;

- 2) провести сравнительное исследование влияния названных выше факторов на показатели белкового обмена животных;
- 3) выполнить сравнительные гистологические исследования внутренних органов животных, подвергавшихся химическому и световому стрессам;
- 4) исследовать наличие хеликобактерий в желудке контрольных и опытных мышей методом ПЦР.

Материалы и методы исследования:

Для эксперимента были взяты 60 белых беспородных мышей (самцы и самки) возрастом 2 месяца и весом около 20 г., которые разделены на 7 экспериментальных групп. Животным экспериментальных группы к стандартному рациону ежедневно добавляли 0,2% раствор нитрита натрия в питьевой воде, вводили толуидин (5 мкг/мышь) натошак в паштете. Через 35 дней после начала эксперимента был введён стрессовый фактор - круглосуточное освещение (800 люкс). Продолжительность эксперимента составила 107 суток. Из опыта животных выводили путём декапитации при лёгком эфирном наркозе. В сыворотке крови животных определяли содержание креатинина по методу Яффе без протеинизации; определение содержания мочевины выполнено уреазным глутаматдегидрогеназным методом, основанным на оптическом тесте Варбурга; выделение тотальной ДНК из тканей желудка происходило с помощью набора реагентов фирмы «Синтол»; выявление бактерий рода *Helicobacter* выполняли методом ПЦР с использованием видоспецифичных и родоспецифичных праймеров; гистологическое исследование тканей желудка проводилось на базе гистологической лаборатории СГМУ им. В. И. Разумовского.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 61 источника, в нём рассмотрены следующие вопросы: стрессовые воздействия, вызывающие патологии желудочно-кишечного тракта

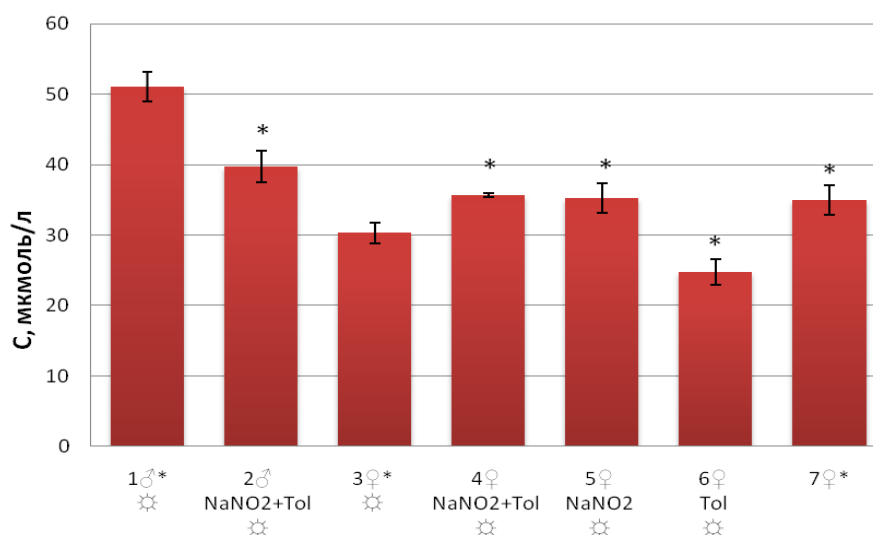
(ЖКТ) у лабораторных животных; методы создания животных моделей предраковых состояний ЖКТ; биохимические показатели, указывающие на патологические изменения обмена веществ, связанные со стрессовыми воздействиями; *Helicobacter pylori* как индуктор трансформации слизистой оболочки ЖКТ; молекулярно-биологический метод (ПЦР-исследование).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В эксперименте для получения предраковых состояний ЖКТ у мышей были использованы толуидин в пище и нитриты в воде, которые в процессе совместного действия в ЖКТ образуют сильные канцерогены – нитрозамины. Клетки с животными круглосуточно освещались, что снижало уровень в крови гормона эпифиза – мелатонина, который является мощным антиоксидантом, способным убивать раковые клетки.

Для доказательства стрессового воздействия названных выше факторов на организм животных были исследованы изменения некоторых показателей состояния системы поддержания ионного и осмотического гомеостаза внутренней среды животных. Поэтому по окончании эксперимента было произведено определение содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови мышей контрольных и опытных групп. Исследования показали, что концентрация креатинина в сыворотке крови варьировала от 25 до 40 мкмоль/л (Рисунок 1).

Наиболее высокое значение (51 мкмоль/л) наблюдалось у мышей (самцов) первой контрольной группы, содержащихся в условиях светового стресса. По сравнению с самками, подвергавшимися световому стрессу, этот показатель выше в 1,7 раза, а по сравнению с нестрессированными самками седьмой группы этот показатель увеличен в 1,5 раза.



Примечание: * - показатели с уровнем достоверности более 99% по сравнению с контролем (контролем для 2 группы является группа 1; контролем для 4, 5, 6 групп является группа 3).

Рисунок 1 – Содержание креатинина у животных, подвергнутых различным стрессовым воздействиям.

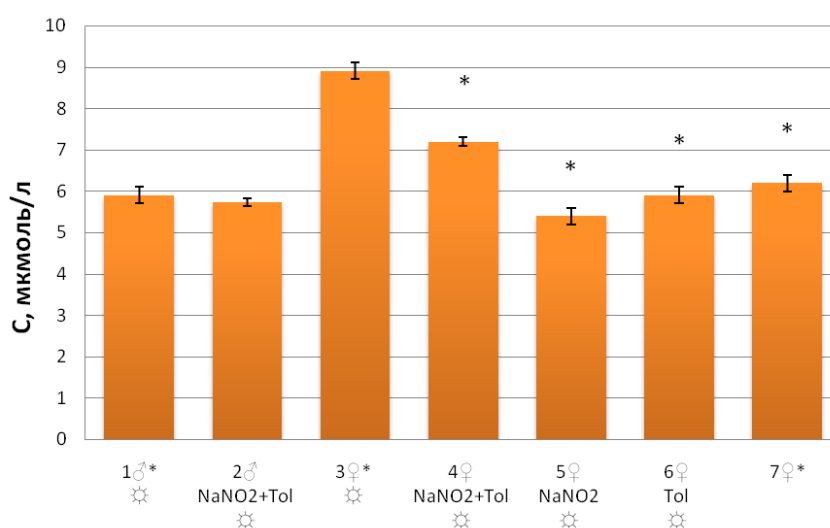
У самцов второй группы, подвергавшихся дополнительному химическому воздействию, содержание креатинина в сыворотке крови было в 1,3 раза ниже, по сравнению с первой группой животных.

У самок достоверное снижение количества креатинина в сыворотке крови от группы 7 (контрольных самок) выявлены для групп 3 (световой стресс) на 15 %, и группы 6 (световой стресс + толуидин) на 29% . Особо значимые различия по этому показателю у самок опытных групп не выявлены. Как правило, любое изменение уровня концентрации креатинина в крови может свидетельствовать о развитии какого – либо патологического состояния в организме. Наиболее часто встречаемыми заболеваниями в этом случае являются острая и хроническая почечная недостаточность, мышечная дистрофия, голодание, снижение обмена веществ, а также развитие злокачественных опухолей.

Концентрация мочевины (Рисунок 2) в среднем варьировала в пределах 5,5-7,3 мкмоль/л. Максимальное значение наблюдалось у

мышей группы 3. По сравнению с группой нестрессированных мышей этот показатель был увеличен в 1,4 раза. Мочевина в высоких концентрациях повышает проницаемость цитоплазматических мембран и чувствительность миокарда.

Следует отметить, что токсическое действие мочевины усиливается креатинином. При сопутствующих заболеваниях печени синтез мочевины, а значит, и инактивация аммиака нарушаются, что в дальнейшем ведёт к накоплению аммиака в клетках и угнетению тканевого дыхания. У самок мышей из групп с дополнительной химической нагрузкой содержание мочевины в сыворотке крови было достоверно снижено.



Примечание: * - показатели с уровнем достоверности более 99% по сравнению с контролем (контролем для 2 группы является группа 1; контролем для 4, 5, 6 групп является группа 3).

Рисунок 2 – Содержание мочевины у животных, подвергнутых различным стрессовым воздействиям.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что изменение показателей белкового обмена в большей степени связано с действием светового фактора. Следует полагать, что введенные нами дозы нитрита,

амин и их комбинации не нарушают деятельность почек при выбранной экспозиции (107 суток) эксперимента. Увеличение концентрации мочевины в сыворотке крови может быть вызвано и внепочечными причинами, такими как обезвоживанием организма, усиленным распадом белков (острая дистрофия печени, злокачественные опухоли). Понижение концентрации мочевины в сыворотке крови отмечают при патологическом изменении значительной части печени, недостатке белка в питании, а также продолжительном голодании.

В доступных статьях нормальное содержание креатинина в сыворотке крови мышей варьирует в пределах 43 – 165 мкмоль/л, а содержание мочевины в пределах 3,5 – 14 мкмоль/л. Поэтому можно констатировать, что полученные нами результаты исследований в целом коррелируют с литературными данными. Интересно, что нормальное содержание биохимических показателей у мышей совпадает с показателями у взрослого человека. Так у женщин нормальным считается содержание креатинина в пределах 53 – 97 мкмоль/л, а для мужчин – 80 – 115 мкмоль/л. Нормальное содержание мочевины в крови здорового взрослого человека варьирует от 2,5 до 6,4 мкмоль/л.

Таким образом, в данной работе вполне уместно говорить о роли различных стрессовых воздействий на организм, что в дальнейшем подтверждает возможность использования выбранных показателей биохимического анализа для мониторинга развития стресса у животных при моделировании различных предраковых состояний.

Важным фактором в формировании предраковых состояний является персистенция в желудке модельных животных хеликобактерий. В желудке грызунов видовой состав хеликобактерий отличается от таковых у человека. Для выявления наличия хеликобактерий в тканях желудка весьма успешно используется ПЦР.

Учитывая, что инфицирование животных хеликобактериями является одним из определяющих факторов развития воспалительного

процесса и последующих предраковых образований, был выполнен анализ на присутствие в желудке мышей ДНК *H. pylori*. Были использованы видоспецифичные праймеры на 23S рРНК данной бактерии следующего состава (НРУ-S) 5'-AGGTТАAGAGGATGCGTCAGTC-3', (НРУ-A) 5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3', которые не дали положительного результата в опытных образцах. Был выполнен ПЦР – анализ с родоспецифичными праймерами на 16S рРНК бактерий рода *Helicobacter* следующего состава: 16-1F, 5-СТАТGACGGGTATCCGGC-3 и 16-1R, 5 - АТТССАССТАСТСТСССА-3.

Проведённые исследования выявили ДНК хеликобактерий в образцах желудков 4, 5, 6 и 7 экспериментальных групп, что, по-видимому, подтверждает инфицирование как действующий фактор в данном эксперименте. Можно предположить, что отрицательный результат на видоспецифичные праймеры обусловлен присутствием других возможных видов хеликобактерий в ЖКТ мышей (Рисунок 3), которые при снижении сопротивляемости организма могут вызывать воспалительные процессы.

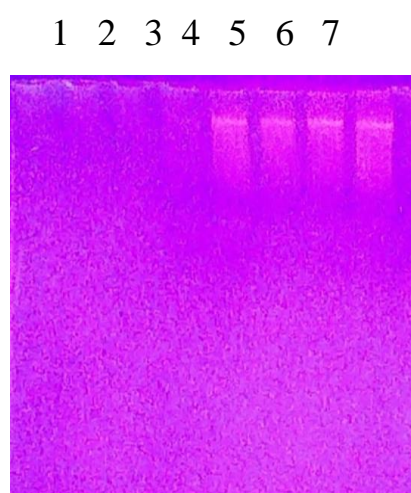
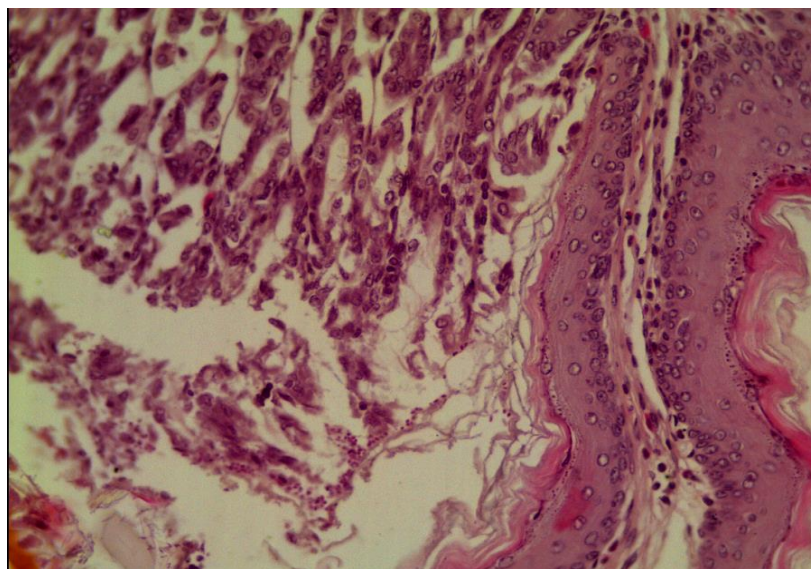


Рисунок 3 – Электрофорез продуктов амплификации на родоспецифичные праймеры.

Также, помимо выше перечисленных биохимических анализов, было произведено гистологическое исследование тканей желудка и пищевода экспериментальных животных. По его итогам образования опухолей ЖКТ в опытных группах мышей не выявлено. Однако, у самцов второй группы, подвергавшихся химическому воздействию толуидина и нитрита, выявлено наличие в пищеводе многослойного плоского ороговевающего эпителия, формирующего складки с признаками утолщения и усиленного ороговевания. В подслизистой пищевода отмечена инфильтрация эозинофилами до 20 штук в поле зрения при увеличении 776.

Обнаружено, что у самок групп 4 и 5, в сравнении с контролем группы 7 (Рисунок 4), пищевод покрыт многослойным плоским эпителием с ороговеванием и формированием складок, обнаружена инфильтрация эозинофилами подслизистой, а в клетках желез желудка появляются эозинофильные зерна – по типу «зернистой дистрофии». Всё вышеперечисленное, как правило, говорит о начальных стадиях развития предраковых заболеваний. Инфильтрация эозинофилами подслизистой оболочки, отёк, полнокровие сосудов и ороговевание эпителия наблюдаются при развитии гастрита. Дистрофия развивается вследствие нарушения обменных процессов, приводящих к структурным изменениям тканей и клеток, а также нарушению их регенерации. Так, при зернистой дистрофии в клетках и тканях обнаруживают зёрна, которые в обычных условиях не встречаются или их количество увеличивается по сравнению с нормой. Впоследствии, клетки и ткани утрачивают характерную для них тонкую структуру.



Увеличение 20X1, окрашивание гематоксилин – эозином

Рисунок 4 – Микрофотография среза желудка мыши из группы 7♀ (контроль).

Вследствие нарушения кровообращения происходит ограничение клубочковой фильтрации и тканевого обмена. Отсюда можно сделать вывод, что при продолжительном нарушении фильтрации почек будет происходить накопление вредных веществ, обладающих гепатотоксическим, а также кардитоксическим действием на организм, что в конечном итоге может стать причиной развития патологических состояний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного эксперимента было показано негативное действие на организм лабораторных животных используемых стрессовых воздействий, которые индуцировали изменение ряда биохимических показателей азотистого обмена: креатинина и мочевины. Выявленное воздействие стрессовых факторов коррелирует с патологическими изменениями желудка. Инфекция *H. pylori* рассматривается как один из факторов хронического воспаления желудка – хеликобактериоза, способствующего развитию гастритов, язвенной болезни и различных

новообразований желудка. Поэтому моделирование предраковых состояний может дать фундаментальное представление о течении воспалительных процессов, индуцированных стрессорами различной природы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что комплексное воздействие химических (нитриты и амины в пище и воде) и светового стрессов в течение 107 суток вызывает формирование у мышей предраковых патологий, что выявлено гистологическими методами исследований.
2. В ходе эксперимента выявлена метаплазия тканей желудка у мышей 4 и 5 экспериментальных групп.
3. Обнаружено, что нитриты, толуидин и световое воздействие вызывает нарушение системы утилизации и обезвреживания аммиака, о чём свидетельствуют результаты исследований содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови у белых беспородных мышей. Отмечено некоторое увеличение содержания креатинина и мочевины у мышей под воздействием светового стресса.
4. В желудке белых беспородных мышей, подвергавшихся комплексному воздействию химического и светового стрессов (группы 4,5, 6), методом ПЦР обнаружены бактерии рода *Helicobacter*, персистенция которых очевидно усиливает действие прочих факторов.