

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ПРОБЛЕМЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студента 4-го курса 422 группы  
специальности 06.03.01 Биология  
биологического факультета  
Хороводова Александра Петровича

Научный руководитель:

Зав. кафедрой физиологии человека

и животных, д.б.н., доцент,

  
15.06.17

О.В. Семячкина-Глушковская

Зав. кафедрой

физиологии человека и животных,

д.б.н., доцент

  
15.06.17

О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2017

**Введение.** Проблема рака желудка остро стоит в современном мире, так по данным ВОЗ рак желудка является причиной смерти в 12,5 % у мужчин и 10,9 % у женщин среди онкологических больных нашей страны. Россия, Китай, Япония, страны Латинской Америки, в особенности некоторые регионы этих стран, отличаются высокими показателями заболеваемости раком желудка (60-170 случаев на 100 тыс. населения в год [1, 2, 3]). В Москве в настоящее время раком желудка заболевает в год около 3,5 тыс. человек. Особенности распространения рака желудка в разных странах обусловлены преимущественно различиями в характере питания, особенностями микроэлементного состава почв и растительной продукции, нитратной нагрузкой. В  $\frac{3}{4}$  случаях заболевание выявляется на III-IV стадиях. Выживаемость на данных стадиях при радикальном вмешательстве составляет 15% и 0% соответственно. Причина таких результатов заключается в отсутствии современных методов диагностики. В клинике для диагностики применяется гастроэндоскопия и различные ее вариации. Этот метод имеет ряд недостатков: недостаточная квалификация специалиста, использование устаревшей аппаратуры. Современной нужны более совершенные методики диагностики. Для развития методов диагностики нужны «научные инструменты», то есть модели для изучения рака желудка. Экспериментальное моделирование рака желудка имеет большое значение в изучении механизмов канцерогенеза и разработке новых методов лечения этой патологии. Большинство существующих моделей не только трудновоспроизводимы и дорогостоящи, но и не в состоянии воспроизвести метастазирование рака желудка [4].

В связи с этим была поставлена следующая цель – разработать модель образования рака желудка с последующим метастазированием у крыс, используя хронический стресс и нитрозамины.

Для решения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить влияние хронического стресса на состояние слизистой оболочки желудка крыс.
2. Изучить влияние нитрозаминов на состояние слизистой оболочки желудка крыс.
3. Изучить влияние комбинированное воздействие хронического стресса и нитрозаминов на состояние слизистой оболочки желудка крыс.
4. Применить полученные результаты для разработки модели рака желудка у крыс с последующим метастазированием.

Структура и объем работы. Дипломная работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка цитированной литературы. Список литературы включает 56 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 46 страницах машинописного текста.

**Основное содержание работы.** В обзоре литературы дипломной работы описаны современные представления о моделировании канцерогенеза, о самом процессе развития рака желудка, о причинах развития рака желудка. В разделе, посвященном материалам и методам исследования, представлена информация об объектах исследования и методах, использованных в ходе выполнения экспериментов.

На большой выборке крыс ( $n=100$ ) впервые были разработаны алгоритмы индуцирования развития метастазирующей опухоли желудка за счет подавления устойчивости тканей органа к канцерогенным эффектам нитрозаминов, поступающих с продуктами питания, в условиях длительного (9 месяцев) воздействия хронического стресса (перенаселение) [5]. На протяжении всего срока наблюдения проводили у части животных тестовые гистологические и спектральные исследования тканей желудка. Животных умерщвляли декапитацией, далее проводили вскрытие брюшной полости и извлекали желудок для дальнейшего проведения гистологического анализа. Работа выполнена на базе кафедры физиологии человека и животных

Саратовского национально исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Для проведения эксперимента животные были разделены на группы: три экспериментальных и одна контрольная. В первой группе животным в стандартный виварный рацион на протяжении всего эксперимента добавляли нитрозамины (2г/кг) и нитрит натрия (1г/л) в питьевую воду.

Вторую группу из 30 здоровых самцов крыс помещали в условия их длительного проживания (в течение 9 месяцев) в высокой популяционной плотности. В соответствии с правилами содержания животных в виварии небольшими группами (Лабораторные животные. 1993. № 2) крысы должны проживать в клетке в следующем соотношении ( $\text{см}^2$  /г массы тела=1). В наших экспериментах животные проживали при соотношении ( $\text{см}^2$  /г массы тела=0,3), которое в три раза превышало нормативы.

Следующим шагом в исследованиях явилось изучение комбинированного действия канцерогенных эффектов азотсодержащих соединений и перенаселения. С этой целью была набрана третья группа.

Хронически стрессированные крысы мужского пола ежедневно на протяжении 9 месяцев получали N-метиланилин в дозировке 2г/кг, который давали со стандартной едой, и дополнительно нитрит натрия (1г/л) с водой.

Содержание и манипуляции над животными проводили в соответствии с международными правилами гуманного отношения к экспериментальным животным.

Гистологический метод диагностики, который основан на изучении тонкой морфологической структуры клеточного строения тканей организма. Материалом для гистологического исследования являются фрагменты тканей, взятые оперативным путём специально для создания гистологического препарата желудка. После забора материала выполняется его подготовка к исследованию, включающая в себя ряд этапов. Фиксация, проводка и заливка гистологического материала проводились следующим методом. Из материала, взятого после спектрофотометрического анализа и

последующего выведения животных из эксперимента, нарезались фрагменты, показавшие наиболее ярко выраженный спектр протопорфирина IX. Их фиксация проводилась в 10% нейтральном забуференном фосфатом формалине в течение 2 суток. Такая обработка предотвращает распад клеток и разрушение структуры ткани под действием собственных ферментов клеток и процессов гниения, таким образом, сохраняя прижизненную структуру и делая возможным изучение ткани. Принцип действия фиксирующих жидкостей основан на быстрой гибели клеток и коагуляции белка. Затем ткань желудка выдерживали в проточной водопроводной воде в течение 2 часов. После этого выполняли ручную проводку забранного материала изопропиловым спиртом с минеральным маслом до парафина. Этот этап обеспечивает уплотнение ткани, которое, в свою очередь, необходимо для получения срезов. Спектральное исследование проводилось *in vivo* на наркотизированных животных (золетил / рометар 20 мг/мл). Образцы, подготовленные для флуоресцентного анализа, были 1,5 см в диаметре и содержали область опухоли, нормальную и воспаленную область слизистой оболочки желудка и пограничных переходных зон, что позволило получить более точную и полную картину возможных различий спектроскопической картины в этих трех областях. Спектры обнаруживаются с использованием микроспектрометра USB4000 (OceanOptics Inc., Dunedin, USA). Используемым источником белого света является галогенная лампа HL-2000 (OceanOptics Inc., Dunedin USA). Оптический зонд 6 + 1 используется для подачи облучения и получения отраженного сигнала от ткани.

В качестве флуоресцентного маркера использовали препарат Аласенс (дельта-аминолевулиновая кислота/протопорфирин IX, НИОПИК, Москва) в дозировке 20 мг/кг, введение осуществлялось *per os* за 2 часа до проведения исследований.

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 плюс-минус стандартная ошибка средней.

Первым этапом нашей работы изучалось состояние тканей слизистой желудка крыс, содержащихся на нитрозаминовой диете, в течение 9 месяцев, с помощью гистологического метода анализа. На протяжении первых трех месяцев исследования изменение состояния тканей выявлено не было. Спустя 4 месяца с момента начала кормления у 76% животных (23 из 30) были выявлены признаки атрофического гастрита, который проявлялся резким истончением слизистой желудка, полной атрофией пилорических желез, сохранялась только слизистая, которая была представлена однослойным призматическим железистым эпителием. У остальных 7 животных подобных изменений выявлено не было. Данный эксперимент показал эффект длительного употребления нитрозаминов в пищу. А именно, развитие атрофического гастрита у подавляющего большинства крыс.

Следующим этапом нашего исследования стал гистологический анализ тканей желудка крыс, подвергавшимся воздействию хронического стресса в течение 9 месяцев. Изменения тканей выявлено не было на протяжении двух месяцев с момента начала эксперимента. Спустя три месяца у 33 % крыс (10 из 30) наблюдались мелкие ( $d < 1\text{мм}$ ) множественные язвы. Через 9 месяцев у всех крыс были выявлены пептические язвы обоих типов со значительным увеличением числа язв (мелкие ( $d < 1\text{мм}$ ),  $n = 21$  и большие ( $d > 1\text{мм}$ ),  $n = 9$ ).

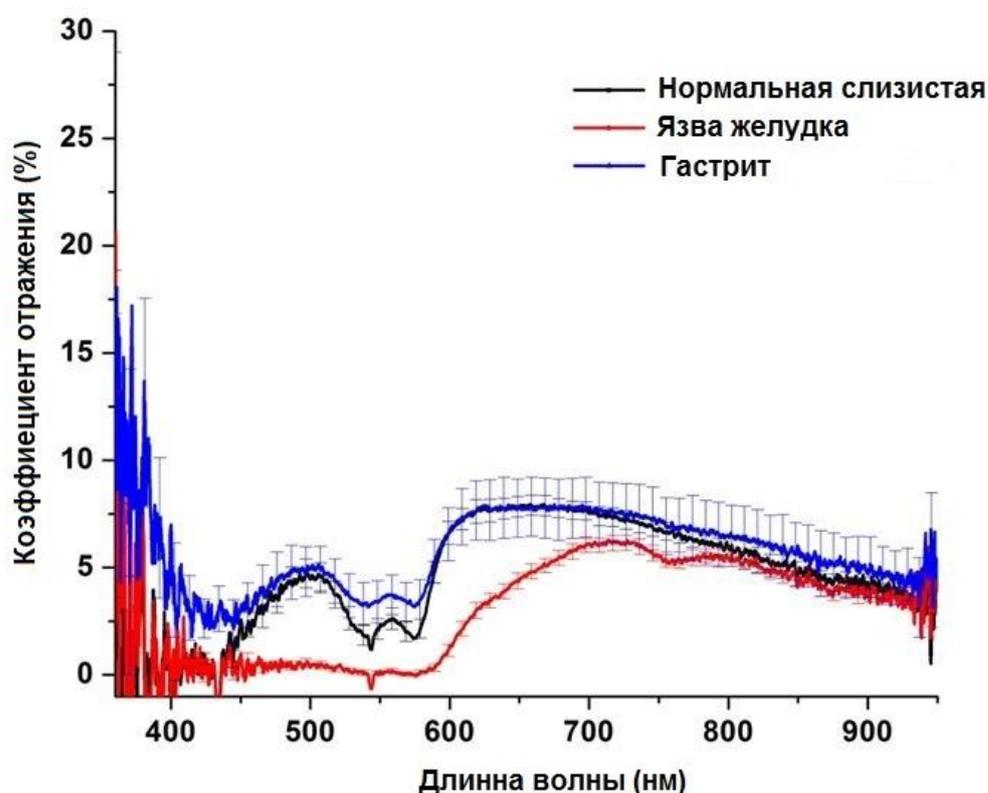


Рисунок 1- Спектры диффузного отражения нормальной, воспаленной и язвенной слизистой оболочки желудка крысы.

Параллельно с гистологическим проводилось спектрофотометрическое исследование. С его помощью были также выявлены воспалительные участки, связанные с появлением гастрита у животных из первой группы. Воспалительные участки, прежде всего, характеризуются понижением уровня оксигемоглобина в их спектре отражения, которое показано на рисунке 1 (синяя кривая), двумя минимумами, характерными для нормальной слизистой оболочки. Далее кривые уменьшаются и становятся в один широкий минимум, связанный с поглощением дезоксигемоглобина в диапазоне 545-570 нм. Нормальные отражения слизистой оболочки представлены хорошо выраженным минимумом оксигемоглобина на 543 и 575 нм соответственно рис.1(черная кривая).

На втором этапе исследовали ткани желудка животных, которые подвергали длительному (9 месяцев) воздействию хронического стресса. В случае язвы наблюдается более сильное воспаление, спектры диффузного

отражения показали появление дезоксигемоглобина в поврежденной области, а также сильное уменьшение коэффициента отражения интенсивности, за счет продуктов гемоглобина в широком спектральном диапазоне - от 400 до 600 нм (рисунок 1 (красная кривая)).

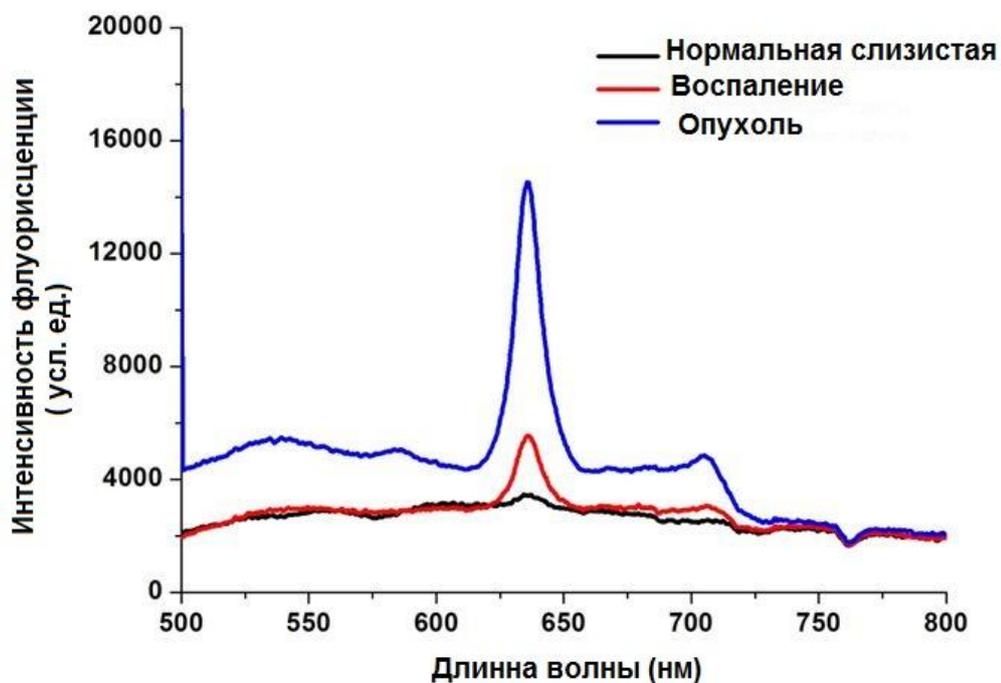


Рисунок 2 - Флуорисцентный сигнал нормальной, воспаленной и опухолевой ткани слизистой желудка крысы

На третьем этапе нашей работы исследовались ткани желудка крыс, содержащихся на нитрозаминовой диете и содержащихся в условиях хронического стресса. Значение 14000 условных единиц интенсивности флуорисценции протопорфирина IX в диапазоне 625-650 нм рисунке 2 (красная кривая) говорит о наличии опухолевых образований в ткани слизистой, впоследствии подтвердилось при гистологическом исследовании. Интенсивность спектра флуоресценции нормальной ткани в диапазоне 635-650 нм рис.2 (черная кривая) не превышает 4000 условных единиц, что значительно ниже, чем спектр опухолевой ткани.

Таким образом, данный эксперимент показывает влияние хронического стресса на слизистую оболочку желудка. Длительное содержание животных в

условиях перенаселение проводило к образованию множественных пептических язв желудка.

**Заключение.** Рак желудка представляет собой одну из сложных задач экспериментальной медицины, поскольку в этой области отсутствуют модели, воспроизводящие естественные условия развития болезни. На сегодняшний день существует около 50 разных моделей рака желудка. Однако, подавляющее большинство из них основано либо на прививании злокачественных клеток иммунодефицитным мышам, что далеко от реальных условий, либо осуществляется путем длительного введения сильных канцерогенов, таких как хлороформ, формалин и др., что также не является естественными факторами, провоцирующими развитие рака желудка.

Среди ведущих причин онкологии желудка рассматривается стресс и высокое содержание в пище нитрозаминов. В данной работе была впервые разработана новая экспериментальная модель развития рака желудка у крыс на основе сочетания двух естественных факторов, таких как хронический стресс (перенаселение) и присутствие в пище и воде нитритов. Данная модель позволяет также изучать развитие метастазов, которые отмечаются в печени. Таким образом, в длительном эксперименте получена оригинальная высоко воспроизводимая модель развития метастазирующего рака желудка у крыс.

**Список использованных источников:**

1. Двойрин, В.В. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований населения России некоторых других стран СНГ в 1993 г. / В.В. Двойрин, Е.М. Аксель, Н.Н Трапезников // М.: ОНЦ РАМН, 1995. 231 С.
2. Заридзе, Д.Г. Региональные проблемы здоровья населения России// Д.Г. Заридзе, А.Д. Марочко, Т.Х. Басиева, В.А. Кустов // Ред. В.Д.Белякова. М.: РАЕН, 1993. С. 227—236.
3. Cancer incidence in the native peoples of far eastern Siberia / D. G. Zaridze [et al.] //International journal of cancer. 1993. Т. 54. №. 6. С. 889-894.
4. Mouse models of gastric cancer / Y. Hayakawa [et al.] // Cancers. 2013. Т. 5. №. 1. С. 92-130.
5. Adrenergic mechanism responsible for pathological alteration in gastric mucosal blood flow in rats with ulcer bleeding. /O. V. Semyachkina - Glushkovskaya [et al.] // Twelfth International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (PIBM 201). International Society for Optics and Photonics, 2014. №3. С. 15-19.

