

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

Механизмы развития предраковых изменений в желудке у крыс

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

по направлению 06.04.01 Биология
студентки 2 курса биологического факультета
Аль Джахер Набаа Хамид

Научный руководитель
зав. кафедрой физиологии

человека и животных,

доктор биологических наук, доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)

Зав. кафедрой
физиологии человека и животных
д. б. н., доцент



О. В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. Рак желудка - одна из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей человека, которые последнее время все чаще выявляются у лиц молодого возраста. Одной из важных причин высокой заболеваемости раком желудка является употребление в пищу продуктов, содержащих нитриты. Из нитритов путем преобразования в желудке образуются нитрозамины. Прямое локальное действие нитрозаминов, как полагается, является одной из ключевых причин возникновения рака желудка. Однако, изучение про-канцерогенных эффектов стресса и нитритов в продуктах питания носит, в основном, феноменологический характер, и механизмы остаются малоизученными, что делает актуальным проведение детальных работ в этом направлении.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является изучение формирования предрака желудка у белых беспородных крыс.

Были поставлены следующие задачи.

1. Провести гистологический анализ тканей желудка у здоровых крыс и на фоне формирования предрака.
2. Оценить гемодинамические параметры желудка животных в норме и в состоянии предрака.
3. Определить уровень β -аррестина-1 и оксида азота в крови и тканях желудка у здоровых и больных животных.

Научная новизна. В ходе проведенных исследований по изучению механизмов развития предраковых изменений в желудке у крыс были получены результаты о патологическом состоянии тканей, нарушении гемодинамики, а также увеличение содержания бета-аррестина-1 и оксида азота в крови и тканях желудка на фоне развития предрака.

Практическая значимость. Полученные данные работы могут оказаться полезными для выявления предраковых состояний на ранних стадиях развития у пациентов с помощью доплеровской оптической когерентной томографии, лазерной спекл-контрастной визуализации и

определения в крови оксида азота и бета-аррестина-1, как дополнительных клинических маркеров.

Структура и объем. Работа состоит из введения, основной части, включающей, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, выводов, заключения, списка использованных источников. Магистерская работа изложена на 69 страницах, содержит 2 таблицы и 12 рисунков. Список литературы включает 86 источников.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В **обзоре литературы** представлены материалы по язве и раку желудка. Рассмотрены классификация язв, причины, симптомы и основные принципы лечения. Подробно представлены материалы по образованию рака желудка, этиологии рака, а также его лечению.

Материалы и методы исследования

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

Животные были поделены на 4 группы:

- 1 группа – контроль (интактные животные, $n=10$);
- 2 – комбинированный стресс – (в течение 9 месяцев воздействия социального стресса - проживание крыс в условиях перенаселения + острый стресс (иммобилизация 2 часа), $n=90$);
- 3 – нитрозамины (животные в течение 9 месяцев получали толуидин в дозе 2г/кг, который давали со стандартной едой и дополнительно нитрит натрия (2г/л) с водой), $n=90$);
- 4 группа – комбинированный стресс+нитрозамины (в течение 9 месяцев крысы подвергались стрессу (социальный стресс+иммобилизация)) и содержались на нитроаминовой диете, $n=90$).

Все процедуры были выполнены в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными при проведении экспериментальных работ. Животных содержали в стандартных условиях вивария: 12-часовой период освещения, температура 20°C, корм и вода *ad libitum*.

Методы исследования.

Экспериментальная модель развития предрака желудка

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.

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.

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

Гистологический анализ тканей желудка

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 μ Vizo-101 (ЛОМО) были сделаны фотографии.

Оценка кровотока тканей желудка оптическими методами

Определение показателей перфузии тканей желудка и скорости кровотока в его сосудах осуществляли на наркотизированных животных (тиопентал натрия, Sigma, 40 мг/кг, ip). С этой целью желудок вынимали и фиксировали на особой пластинке, которая подогревалась до температуры тела, затем желудок промывали физиологическим раствором, дожидались стабилизации кровотока в течение 30 мин и производили запись.

Измерения скорости кровотока в сосудах желудка осуществляли с помощью доплеровской оптической когерентной томографии (ДОКТ) на установке OCS1300SS (США). Для измерения перфузии тканей желудка применялся метод лазерной спекл-визуализации.

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).

Определение концентрации NO в крови

Содержание оксида азота в крови и тканях желудка определяли с помощью спектрофотометрического метода.

Статистический анализ

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 исследования

Гистологическое исследование тканей желудка. В результате исследования в контрольной группе не были выявлены какие-либо изменения в слизистой оболочке желудка .

Далее изучали влияние комбинированного стресса (каждый месяц исследовали ткани желудка у 10 крыс) на формирование пептических язв желудка. В первые два месяца опытов, изменений в слизистой оболочке желудка не наблюдалось ни у одного испытуемого животного. На третьем месяце наблюдений у 7 из 10 животных появлялись множественные мелкие пептические язвы желудка в количестве 17. Аналогичная картина наблюдалась в течении последующих 4 месяцев. На девятом месяце исследования отмечались наиболее яркие результаты: образование язв в количестве 21 мелкие и 18 крупные у всех 10 крыс.

Таким образом, результаты первой серии экспериментов показали, что стресс выполняет потенцирующую роль в развитии пептических язв в желудке у крыс.

На втором этапе научных работ изучали влияния нитрозаминов на развитие пептических язв в желудке у крыс. Для этого крысы употребляли нитрозамины без стресса в течении 9 месяцев. Результаты выявили у 75% крыс (15 из 20) развитие признаков атрофического гастрита, который проявлялся резким истончением слизистой желудка, полной атрофией пилорических желез, сохранялась только слизистая, которая была представлена однослойным призматическим железистым эпителием (показана стрелкой на рисунке). Кроме того, выявлено появление кишечной метаплазии в виде бокаловидных клеток. Данные изменения является предраковым состоянием для желудка.

Поскольку в наших исследованиях не были выявлены злокачественные изменения тканей желудка в условиях стресса и длительного применения нитрозаминов, на следующем этапе исследований изучали комбинированное воздействия стресса и нитрозаминов.

Результаты выявили появление острых язв в желудке уже через 1 месяц экспериментов. В последующие месяцы опытов наблюдалось прогрессивное увеличение числа пептических язв на фоне атрофического гастрита: число мелких и крупных язв желудка увеличивалось с 1-го месяца наблюдения с 14 и 9 до 37 и 24, соответственно. Число животных с язвенным поражением желудка увеличивалось с 30% на 1-м месяце наблюдения до 100% на 9-м месяце опытов. Через 9 месяцев после начала экспериментов гистологический анализ стенок желудка животных показал, что у крыс на фоне множественного язвообразования и атрофического гастрита отмечается также появление кишечной метаплазии, что все в совокупности является предраковыми состояниями.

Результаты данного эксперимента показали, что такие факторы как стресс и нитрозамины оказывают про-онкологические эффекты только в сочетании друг с другом, приводя к множественным предраковым изменениям в стенке желудка.

В дальнейшем исследования проводились с контрольной группой и группой предрака желудка.

Динамика гемодинамических изменений развития предракового состояния желудка. Было установлено, что начальное развитие злокачественного поражения желудка сопровождалось повышением перфузии тканей желудка на 30% ($p < 0.05$) с увеличением кровотока на 17% ($p < 0.05$). Таким образом, предраковое состояние желудка сопровождалось повышением скорости кровотока в сосудах, а также увеличением перфузии тканей желудка.

Определение содержания β -аррестина-1 в крови и тканях желудка. Было показано, что уровень β -аррестина-1 в крови был завышен у крыс с признаками предрака желудка по сравнению с животными контрольной группы. Аналогичная ситуация наблюдалась при исследовании тканей желудка.

Так, 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 тканях желудка была выше на 62%, а в крови – на 48 %.

Таким образом, уровень β -аррестина-1 в крови был завышен у крыс с признаками предрака желудка по сравнению с животными контрольной группой.. Аналогичная ситуация наблюдалась при исследовании тканей желудка.

Определение содержания оксид азота в крови и тканях желудка. В ходе эксперимента было установлено, что в предраковом состоянии отмечалось повышение содержания оксида азота в крови и тканях желудка до $0,44 \pm 0.07$ мкг/мл и $0,48 \pm 0.02$ мкг/мл соответственно.

Показано, что при хронических язвах увеличивается в 1,3 и 1,5 раза содержание оксида азота как в крови, так и в тканях желудка.

На основе проведенных данных было заключено, что определение в крови оксида азота и бета-аррестина-1 является дополнительным клиническим маркером риска развития аденокарциномы желудка в группе пациентов с хроническими язвами органа и имеющими случаи кровотечения из пептических язв.

ВЫВОДЫ

1. Такие факторы как стресс и нитрозамины оказывают про-онкологические эффекты только в сочетании друг с другом, приводя к множественным предраковым изменениям в стенке желудка.
2. Предрак желудка сопровождался повышением скорости кровотока в сосудах, а также увеличением перфузии тканей желудка.
3. Уровень β -аррестина-1 в крови был завышен у крыс с признаками предрака желудка по сравнению с животными контрольной группой.
4. У крыс с предраком желудка увеличивается содержание оксида азота как в крови, так и в тканях желудка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак желудка, в отличие от других форм рака, отличается склонностью к раннему появлению большого числа метастазов, которые чаще всего поражают лимфатические узлы и печень.

В большинстве случаев рак желудка диагностируется уже на поздних стадиях. Более чем у двух третей пациентов заболевание выявляется только на IV стадии, когда опухоль уже невозможно лечить хирургическим путем. В России в 2006 г. лишь у 23,3% больных заболевание было выявлено на I–II стадиях, 5-летняя популяционная выживаемость не превышает 13%. В исследовании EUROCORE-4 было показано, что 5-летняя выживаемость больных раком желудка в Европе составляла всего 24,1%. Частота рецидивов рака желудка даже при успешной терапии велика (до 70%), а 5-летняя выживаемость не превышает 30%.

Причин возникновения рака желудка достаточно много. Наиболее существенной принято считать нерациональное питание, а именно, регулярное потребление нитрит-содержащих продуктов. Нитриты содержатся в консервах, копченостях, колбасных изделиях, куда они попадают в качестве консервантов. Так же, одним из факторов образования опухолей могут быть стрессы, а именно, стрессовые повреждения слизистой оболочки в виде образования стрессогенных язв желудка и двенадцатиперстной кишки.

Идет поиск адекватных моделей для исследования закономерностей и факторов, способствующих развитию опухолей. Наиболее доступной животной моделью являются грызуны.

Анализ литературных источников, посвященных изучению проканцерогенных эффектов стресса и нитритов в продуктах питания носят, в основном, феноменологический характер, и механизмы остаются малоизученными, что делает актуальным проведение детальных работ в этом направлении.

В связи с этим нами было проведено исследование по изучению механизмов развития предраковых изменений в желудке у крыс, на основе которого были получены результаты о патологическом состоянии тканей, нарушении гемодинамики, а также увеличение содержания бета-аррестина-1 и оксида азота в крови и тканях желудка на фоне развития предрака.

Определение в крови оксида азота и бета-аррестина-1 является дополнительным клиническим маркером риска развития предрака желудка в группе пациентов с хроническими язвами органа и имеющими случаи кровотечения из пептических язв.

