МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

ПРИМЕНЕНИЕ НИТРОГЛИЦЕРИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ФОТОДИАГНОСТИКИ РАКА ЖЕЛУДКА

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 5 курса 531 группы
Направления 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика
Биологического факультета
Шимановой Вероники Эдуардовны

Научный руководитель
к. б. н., доцент _____ Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой
д.б.н., доцент _____ О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка одна из основных причин смертей среди онкологических больных в мире. Так, по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) рак желудка является причиной смерти в 15,8% у мужчин и 12,4% у женщин среди онкологических больных нашей страны. В России каждый год заболевают более 51.000 человек, метастазы возникают у 80-90 % больных раком желудка. а 55% из них умирают в течение года с момента диагностики. Механизм развития рака желудка, несмотря на многочисленные исследования, изучен недостаточно. Это связано также с отсутствием подходящих моделей животных, позволяющих изучать злокачественные новообразования и факторы, индуцирующие их развитие в органе.

Причиной такой высокой смертности является поздняя постановка диагноза - рак желудка выявляется только на поздних стадиях развития заболевания, так как протекает либо бессимптомно, либо маскируется под другие заболевания.

В связи с этим была поставлена следующая цель – исследовать нитроглицерин как средство для повышения качества фотодиагностики рака желудка у крыс.

Для решения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

1. Смоделировать рак желудка у крыс с последующим метастазированием;

2. Изучить свойства нитроглицерина в качестве средства повышения фотодиагностики рака желудка;

3. Разработать подходы во флуоресцентной диагностике рака желудка для повышения биодоступности злокачественных клеток и снижения токсичности фотосенсибилизаторов.

1 Основная часть

Существует огромное количество разных теорий возникновения рак желудка (РЖ), основанных на воздействии вирусов, хромосомных повреждений, клеточных мутаций, иммунных нарушений, клеточной дезорганизации. РЖ предшествует, так называемые, предраковое состояние и предраковые изменения: изменение свойства клеток, выстилающих желудок.

Предраковые состояния (клиническое понятие) — это заболевания, при которых риск развития рака увеличен.

Предраковые изменения (морфологическое понятие) — это гистологическое нарушение, при котором рак развивается с большей долей вероятности, чем в аналогичном ему неизмененном участке.

РЖ является главной причиной смертности среди онкологических заболеваний ЖКТ, что связывают с трудностью ранней диагностики этого заболевания.

Факторы, вызывающие канцерогенез – канцерогены. Они могут быть химической, биологической, физической природы. Более 75 % случаев злокачественных опухолей человека вызвано воздействием химических факторов внешней среды. Примерами химических канцерогенов, вызывающих рак желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) могут служить полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и нитрозамины (НА). Они попадают в организм при употреблении в пищу колбас, копченостей, консервированных продуктов. Известно, что стресс играет важную роль в развитии рака, включая индуцирование развития злокачественных новообразований ЖКТ.

Данное исследование было сфокусировано на разработке методики ранней фотодинамической диагностики развития РЖ у крыс с применением оригинальной модели, основанной на сочетании двух стрессовых факторов: проживания животных в условиях перенаселения, а также химического стресса, связанного с потреблением нитритов с водой и ароматического амина с пищей.

2 Материалы и методы

Исследования проводились на белых беспородных крысах – самцах весом в среднем 250 г. в количестве 30 особей. Животные были поделены на 2 группы: 1-я группа – контроль (интактные животные, n = 10); 2 группа – животные, подвергшиеся сочетанному воздействию хронического стресса (перенаселение) и нитрозаминовой диеты (n = 20), в течение 9 месяцев (N-метиланилин в низкой дозе 2г/кг, который давали со стандартной едой и дополнительно нитрит натрия (1г/л) с водой ежедневно).

До проведения гистологических исследований тканей желудка все крысы проходили флуоресцентную диагностику с помощью фотосенсибилизатора дельта-аминолевулиновая кислота/протопорфирин IX (5-АЛК/ПпIX).

Для изменения уровня сигнала фталоцианина в тканях желудка были использованы вазоактивные препараты: 1) модулятор синтеза NO – нитроглицерин (0.2 мг/кг *per os*) и L-NAME (10 мг/кг, *iv*) и 2) вещества с прямым воздействием на сосудистую стенку, таких как ICI-118551 - блокатор бета2-адренорецепторов (0.05 мкг/кг, *iv*) и нифедипин – блокатор Ca^{2+}-каналов (0.5 мг/кг, *per os*).

Для определения перфузии использовали метод лазерной допплеровской флуориметрии (ЛДФ) микроциркуляции крови, а именно лазерный анализатор скорости поверхностного капиллярного кровотока «ЛАКК-01» (НПП «ЛАЗМА», Россия), оснащенный гелий-неоновым лазером («ЛГН-207 Б») с мощностью лазерного излучения на выходе световодного кабеля не менее 0,3 мВт.

На первом этапе экспериментов проводили флуоресцентную диагностику с помощью фотосенсибилизатора 5-дельтааминолевулиновая кислота/протопорфирин IX (5-АЛК/ПпIX). По истечении 9 месяцев животных выводили из эксперимента и вводили физиологический раствор 5-АЛК в дозе 20 мг/кг вводили *per os* за 2 часа до начала экспериментов. После накопления и преобразования 5-АЛК в протопорфирин IX, который является

флуоресцентным маркером, делались спектральные измерения с применением фиброоптического зонда, детектор-микроспектрометрической системы USB4000 (Ocean Optics Inc, Dunedin, USA) с источником возбуждения на 405 нм (25 mw, LED-405, Polironik, Russia).

С помощью фотосенсибилизатора 5-АЛК/ПпIX оценивали состояние слизистой оболочки желудка, выявляли наличие патологических участков и подозрительных на рак очагов, далее проводили флуоресцентную визуализацию эпителия, осуществляя поиск очагов красной флуоресценции 5-АЛК-индуцированного ПпIX.

Затем, забирали органы, проводили гистологический анализ тканей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ, с каждого образца изучали по 10 срезов), по стандартной методике с изготовлением парафиновых блоков и окраской тонких срезов (3–5 мкм) гематоксилином и эозином.

3 Результаты исследований

В результате проведенных экспериментов были выявлены, морфологические изменения в тканях желудка крыс из группы сочетанного действия стресса и нитрозаминов (ежедневного применения нитритов и нитратов в пище и воде), в сравнении с контрольной группой животных.

До гистологических исследований в эксперименте с применением флуоресцентной диагностики с помощью фотосенсибилизатора 5-АЛК/ПпIX оценивали состояние слизистой оболочки желудка, выявляли наличие патологических участков и подозрительных на рак очагов, далее проводили флуоресцентную визуализацию эпителия, осуществляя поиск очагов красной флуоресценции 5-АЛК-индуцированного ПпIX. Спектры измеряли по центру и на периферии флуоресцирующих интактных участков и пораженных тканей. Всего было измерено 280 спектров флуоресценции, из них в точках нормальной слизистой оболочки – 120, в очагах воспаления слизистой оболочки – 160.

Наиболее важным результатом явился тот факт, что предраковые изменения (атрофический гастрит), которые впоследствии подтверждались гистологически, также выявлялись в процессе фотодиагностики. Интенсивность флуоресценции в этом случае занимала промежуточное значение между нормой и злокачественными поражениями желудка.

Нами обнаружено, что пик наиболее ярких изменений, т.е. диагностически значимых значений флуоресценции приходился на диапазон лазерного возбуждения фотосенсибилизатора в 625-650 нм. У нормальной слизистой пик автофлюоресценции в районе 480-530 нм, где идет сигнал в основном от протеиновых кросс-линков и флавинов. Флуоресценция со злокачественных новообразований в органе была максимальной при 635 нм, где находится максимум эмиссии протопорфирина, за счет высокого накопления фотосенсибилизатора в тканях.

Результаты исследований, усредненные для данного типа ткани, представлены на рисунке 1, где ясно отражены существенные различия между

нормальными, предраковыми и злокачественными изменениями в тканях желудка крыс.

Рисунок 1 – Спектр интенсивности флуоресценции с нормальной слизистой оболочки, предраковых и злокачественных новообразований слизистой оболочки желудка крыс после введения фотосенсибилизатора 5-АЛК

В результате проведенных экспериментов были выявлены, морфологические изменения в тканях желудка крыс из группы сочетанного действия стресса и нитрозаминов (Б, В, Г), в сравнении с контрольной группой животных (А). Как показано на рисунке 2.

Метастатические узлы были представлены скоплением атипичных клеток с большими гиперхроматическими ядрами.

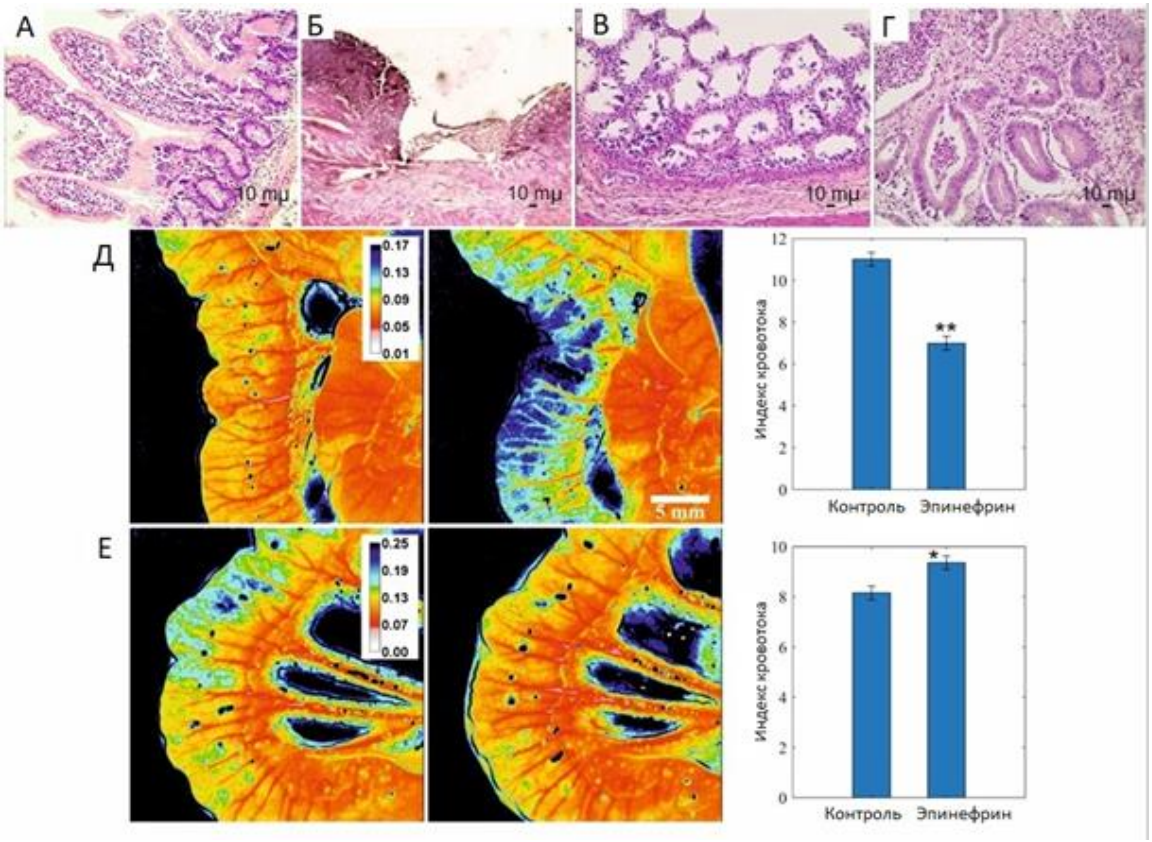

Рисунок 2 – Морфологические изменения в тканях желудка, индуцированные хроническим стрессом + нитрозаминовой диетой и мониторинг LSCI реакции микро кровообращения на слизистых, связанных с развитием РЖ: А – нормальные ткани; Б – язва и В – эпителиальная дескумация; Г –дифференцированная аденокарцинома; Д – представитель LSCI (слева) и после инъекции эпинефрина (справа) у крыс; Е – аденокарцинома желудка у крыс (стресс + нитрозамины);
Синий цвет указывает на области с низким потоком и красным – высокий поток. *- $p < 0$; * *- $p < 0.001$

В качестве альтернативы для повышения диагностической значимости флуоресцентного анализа тканей желудка были разработаны новые формы фосенсинбилизаторов на основе функционализированного цинкового фталоцианина со встроенными полимерными щетками (PI-трансплантат-PMAA, используемый в качестве системы-носителя для фотосенсибилизаторов ZnPc-31/32 и 21 и ZnPc-Gal-31/32 и 21). Результаты

выявили, что полимерные щетки существенно повышают уровень флуоресцентного сигнала от функционализированного фотосенсибилизатора по сравнению с его обычной формой.

Молекулярная формула и схема химической структуры функционализированного фталоцианина приставлены на рисунке 3.

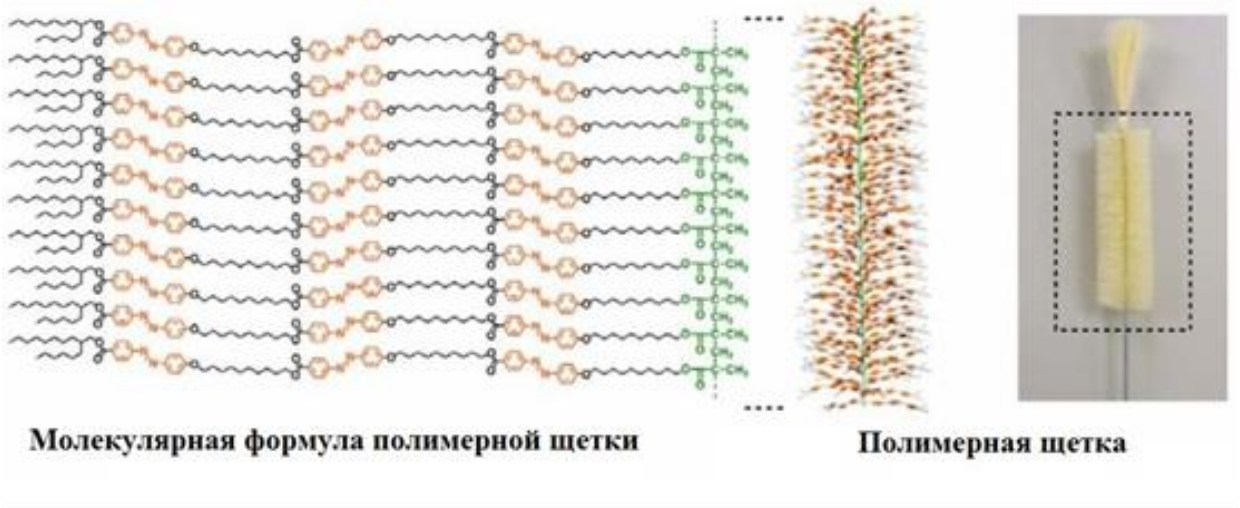

Рисунок 3 – Молекулярная формула полимеров, входящих в структуру функционализированного фталоцианина

Результаты исследования показали, что содержание NO в тканях желудка, в сравнении с нормой, превышало таковую в 1,9 ($p<0.05$) раз у крыс, как показано на рисунке 4.

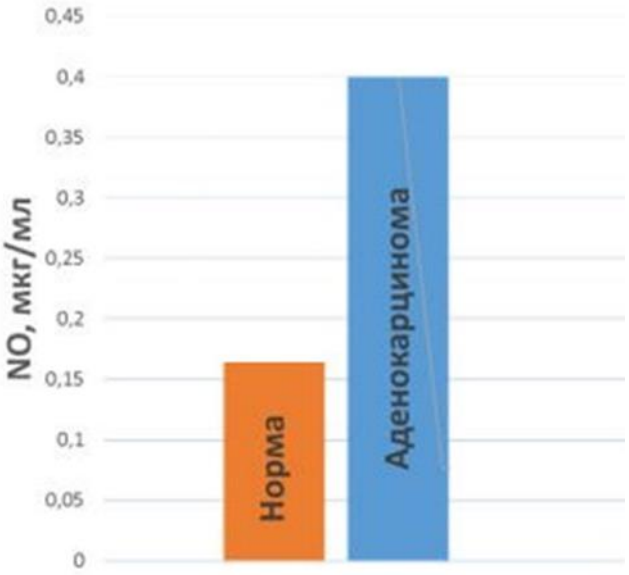

Рисунок 4 – Содержание оксида азота (NO, мкг/мл) в эпителии желудка в норме и при развитии аденокарциномы у крыс: $p < 0.05$ относительно контрольной группы

Результаты in vivo и ex vivo исследований фотодинамической диагностики развития аденокарциномы желудка у крыс выявили, что лазерное излучение на длине волны 635 нм является оптимальным для максимального возбуждения фотосенсибилизатора 5-АЛК/ПпIX и фотодиагностики предраковых и злокачественных образований в органе, подтвержденных гистологическими методами.

Выводы

1. На основании данных исследований, был воспроизведен рак желудка, на фоне сочетания хронического стресса и ежедневного применения нитритов и нитратов в пище и воде, провоцируя развитие рака желудка у крыс с высокой воспроизводимостью, с последующим метастазированием.

2. Использование вазодилататоров, такие как нифедипин (блокатор Ca^{2+}-каналов и нитроглицерин (донор NO) существенно повышали интенсивность флуоресцентного сигнала, в то время как вазоконстрикторы, такие как ICI118551 (блокатор бета-2-адренергических рецепторов) и L-NAME (блокаторы NO-синтазы) подавляют уровень флуоресцентного сигнала. Так же лазерное излучение на длине волны 635 нм является оптимальным для максимального возбуждения фотосенсибилизатора 5-дельта-аминолевулиновая кислота/протопорфирин IX (5-АЛК/ПпIX) и фотодиагностики предраковых и злокачественных образований в органе, подтвержденных гистологическими методами.

3. Нами были синтезированы новые формы функционализированного цинкового фталоцианина на основе встраивания полимерной щетки PI-трансплантат-PMAA, используемый в качестве системы-носителя для фотосенсибилизаторов ZnPc-31/32 и 21 (1) и ZnPc-Gal-31/32 и 21 (2), которые влияют на состояние сосудистой стенки желудка крыс с аденокарциномой и повышают качество флуоресцентного сигнала от фотосенсибилизатора.