

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ЭНДОСКОПИИ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ РАКА ЖЕЛУДКА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Минеевой Татьяны Павловны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

_____ Е.И. Саранцева

(подпись, дата)

Зав. кафедрой человека и животных,

д.б.н., доцент

_____ О. В. Семякина - Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2020

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка, являясь одной из самых распространенных злокачественных опухолей человека, занимает 5-е место в структуре заболеваемости в Российской Федерации (РФ) и 3-е в структуре смертности от злокачественных новообразований. Кроме того, отмечается географическая гетерогенность заболеваемости с максимальным уровнем в Японии, России, Чили, Корее, Китае. Мужчины заболевают в 1,3 раза чаще женщин, пик заболеваемости приходится на возраст 65 лет.

Хронические воспалительные заболевания ЖКТ непосредственно влияют на развитие злокачественных опухолей. Этому предшествует, так называемое, предраковое состояние: патологическое изменение свойств клеток, выстилающих ЖКТ, наличие хронического гастрита, язв и полипов, которые увеличивают риск развития заболевания. Именно поэтому сегодня остро стоит вопрос изучения онкологии ЖКТ как хронического «раневого процесса», в который вовлекаются онкогенные факторы внутренней и окружающей среды.

Существует большое количество различных теорий возникновения рака желудочно-кишечного тракта, основанных на воздействии вирусов, хромосомных повреждений, клеточных мутаций, иммунных нарушениях.

Обычно опухоли выявляются на запущенных III и IV стадиях, где перспективы выздоровления у пациентов не очень оптимистичны. Для обнаружения неопластических изменений используют перспективные оптические методы, так как они чрезвычайно чувствительны для раннего выявления заболевания. Эндоскопия - хорошо зарекомендовавший себя и широко используемый метод. Однако, несмотря на высокий технический прогресс, обычная эндоскопия в белом свете имеет свои недостатки и обычно выявляет поражения, которые уже имеют симптомы непроходимости, кровотечения и боли, связанные с ростом опухоли.

Ошибочные диагнозы, связанные с трудностями дифференциации воспалительной аденокарциномы от начальной стадии, имеют отрицательное

влияние на точность диагностики. Только опытные гастроэнтерологи с многолетней практикой наблюдения в эндоскопии могут обнаружить незначительные начальные изменения в слизистой оболочке пищевода, желудка или толстой кишки.

Эти ограничения стандартной эндоскопии представляют собой серьезную проблему и инициируют разработку новых методов фотодиагностики.

Одним из многообещающих и перспективных направлений в решении указанной проблемы является развитие «оптический биопсии», основанной на применении флуоресцентных методов для неинвазивного обнаружения ранних форм рака.

В настоящее время актуальным является развитие новых технологий повышения диагностических возможностей и качества проведения флуоресцентной гастроскопии ЖКТ с целью выявления ранних форм онкологических изменений в нем и установления размера и границ раковых поражений органа.

Вышеизложенное определили цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы явилось – оценка методов флуоресцентной диагностики рака желудка на ранних стадиях.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Смоделировать злокачественное образование желудка на основе изучения сочетанного и отдельного влияния социального стресса и нитрозаминовой диеты у лабораторных животных.

2. Проанализировать возможность развития опухоли с помощью гистологических методов.

3. Оценить эффективность синхронной флуоресцентной спектроскопии (СФС) в отношении нормальных тканей желудка и его злокачественными поражениями.

Выпускная квалификационная работа состоит из списка сокращений, введения, 3 глав: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключения, выводов, списка использованной литературы (43 источников на русском и английском языках). Дипломная работа изложена на 44 странице машинопечатного текста.

Основное содержание работы включает в себя обзор литературы патогенеза и канцерогенеза онкологических новообразований и описание метода флуоресцентной диагностики, как одному из современных способов выявления рака желудочно-кишечного тракта на ранней стадии его развития.

В соответствии с «Этическими требованиями о гуманном обращении с лабораторными животными» («Этический кодекс»), действующими от 1985 года, в качестве материала исследования использовались белые беспородные крысы (n=20), которые были поделены на 4 группы: 1 группа (n=5) – контроль (интактные животные); 2 группа (n=5) — крысы, проживающие в условиях хронического социального стресса (перенаселение). Согласно правилам содержания животных в виварии небольшими группами (Лабораторные животные. 1993. № 2) крысы должны проживать в клетке в следующем соотношении ($\text{см}^2 / \text{г}$ массы тела=1). В наших экспериментах животные содержались при соотношении ($\text{см}^2 / \text{г}$ массы тела=0,3). Данное соотношение в три раза превышает норму; 3 группа (n=5) — особи, получающие с едой нитрозамины. Нитрозамины (2 г/кг) и нитрит натрия (1 г/л) добавляли в обычную диету; 4 группа (n=5) — животные, подвергшиеся комбинации воздействия хронического стресса (перенаселение) и нитрозаминовой диеты.

Результаты исследования

Результаты исследования показали, что у всех животных уменьшились масса тимуса, селезенки, надпочечников и продолжалось повышение артериального давления на фоне тахикардии в течение всего периода наблюдения. Животные также потеряли вес, который не соответствовал возрастным требованиям в конце наблюдения (таблица 1).

Таблица 1 - Оценка степени появления язв желудка у животных с нитрозаминовой диетой+стресс

Органы	Контроль, n=5	Диета+ стресс (4 месяца), n=5	Диета+ стресс (5 месяца), n=5	Диета+ стресс (6 месяца), n=5	Диета+ стресс (7 месяца), n=5	Диета+ стресс (8 месяца), n=5	Диета+ стресс (9 месяца), n=5
Язвы желудка, шт	0	17 из них 10 точечная и 7 крупных (3/5)	18 из них 11 точечная и 7 крупных (2/5)	21 из них 13 точечная и 8 крупных (3/5)	21 из них 12 точечная и 9 крупных (3/5)	23 из них 14 точечная и 9 крупных (4/5)	25 из них 15 точечная и 10 крупных (5/5)
Масса тела, г	265 ± 3	215±5*	221±7*	230±10*	248±9*	240±7*	256±12

*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ - относительно контроля

Эти результаты отражают влияние комбинированного сочетания стресса и нитрозаминовой диеты. В ходе влияния такого образа жизни наблюдается снижение резервных возможностей организма и у подавляющего большинства крыс он проявляется в виде точечных и крупных язв желудка (рисунок 1 А-Г). Динамика возникновения язвенной болезни желудка была примерно одинаковой на протяжении всего периода наблюдения.

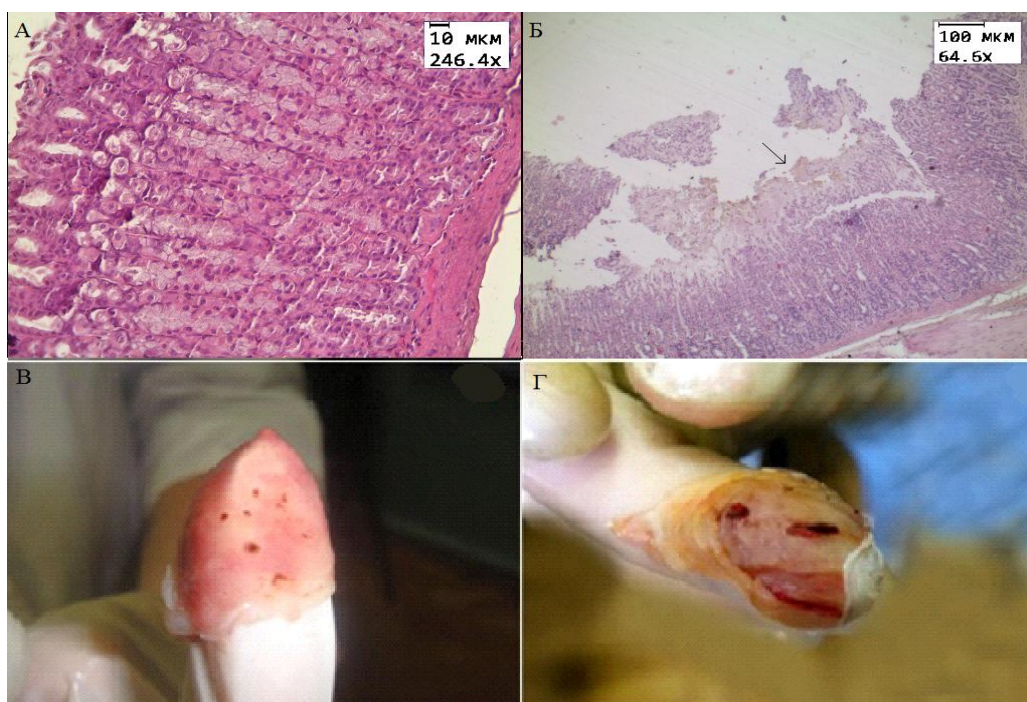


Рисунок 1 - Гистологический анализ тканей желудка у животных 2 группы социальный стресс (перенаселение): А - нормальная слизистая желудка; Б - язва желудка (указано стрелкой); макрофотографии точечных язв (В) и крупных язв (Г) в желудке. Окраска гематоксилин и эозин

Результаты проведенной серии экспериментов отражают тот факт, что хронический стресс является прямым фактором повреждения слизистых оболочек желудка, однако он не связан с развитием злокачественных новообразований в органе. В группе животных, получающих нитрозаминовую диету в течении 9 месяцев у 75% животных проявились признаки атрофического гастрита, который проявляется истончением слизистой желудка и полной атрофией пилорических желез (рисунок 2 А, Б).

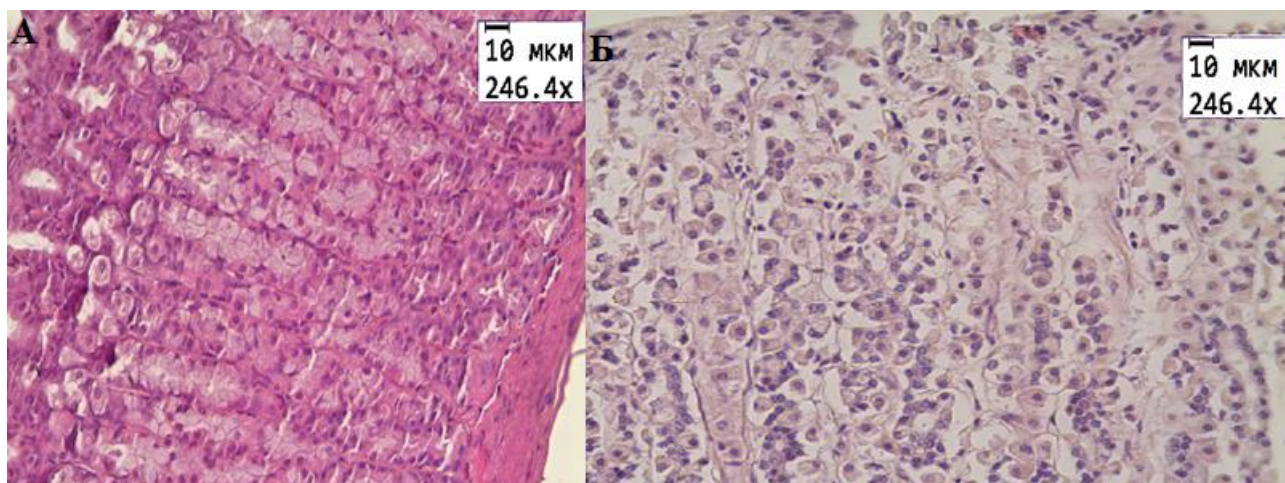


Рисунок 2 - Гистологический анализ тканей желудка у животных 3 группы (нитрозаминовая диета): А- нормальная слизистая желудка; Б- атрофический гастрит. Окраска гематоксилин и эозин

Злокачественные изменения в желудке наблюдались только при сочетанном воздействии стресса и нитрозаминов. В ходе эксперимента высокодифференцированная аденокарцинома формировалась у 85% крыс (17 из 20) (рисунок 3 А, Б).

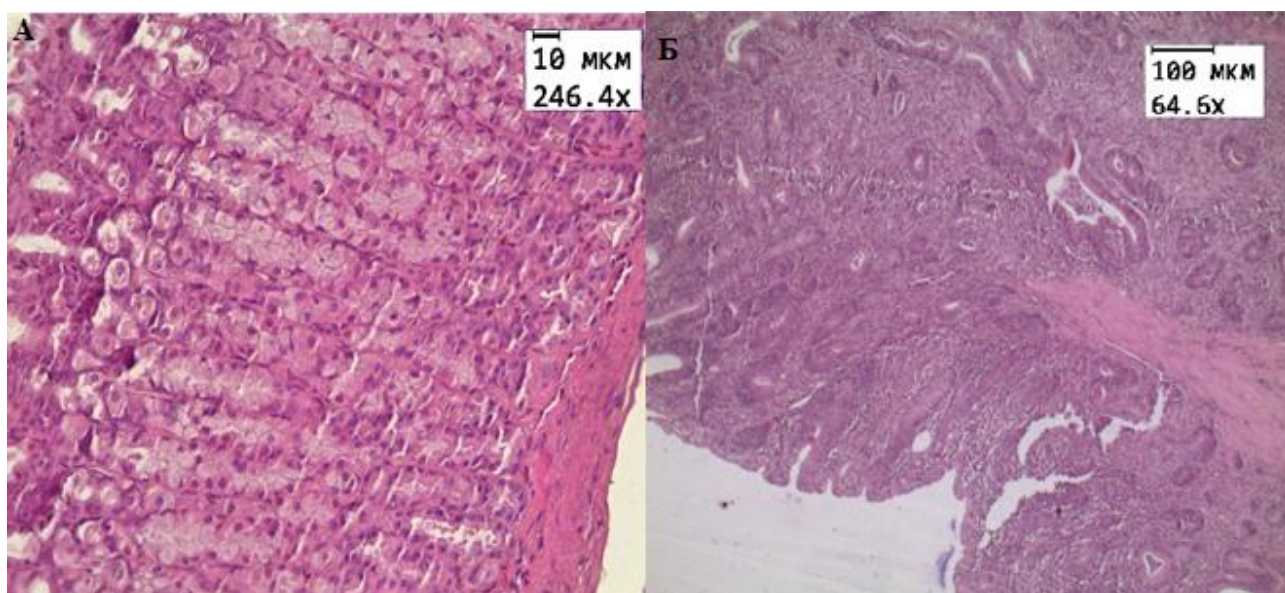


Рисунок 3- Гистологический анализ тканей желудка животных 4 группы (стресс + нитрозаминовая диета): А - нормальная слизистая желудка; Б - аденокарцинома желудка. Окраска гематоксилин и эозин

В ходе эксперимента хронический стресс вызывал повреждение тканей желудка крыс и снижал устойчивость к канцерогенному воздействию нитрозаминов, что приводило к развитию злокачественных метастатических поражений желудка при длительном воздействии.

Результаты исследований, усредненные для этого типа тканей, представлены на рисунке 4, на них о показано четкие различия в нормальных, предраковых и злокачественных изменениях в тканях желудка крыс. Флуоресценция со злокачественных новообразований в органе была максимальной при 635 нм, где находится максимум эмиссии протопорфирина, за счет высокого накопления фотосенсибилизатора в тканях. Наиболее важным результатом было то, что при фотодиагностике предраковые изменения (атрофический гастрит) впоследствии были гистологически подтверждены. Интенсивность флуоресценции в этом случае была промежуточным значением между нормальной и злокачественной опухолью желудка. Мы обнаружили, что пик наиболее очевидных изменений, т. е. диагностических значений флуоресценции, приходился на диапазон лазерного возбуждения, на диапазон фотосенсибилизатора в 625-650 нм. У нормальной слизистой пик автофлуоресценции в районе 480-530 нм, где идет сигнал в основном от протеиновых кросс-линков и флавинов. Однако во многих случаях фотоанализ выявил ложную флуоресценцию, которая не связана со злокачественными изменениями в желудке, проявляющимися на фоне воспалительных процессов (язв). Это свидетельствует о проявлении неспецифичных эффектов 5-АЛК/ПпIX, снижающих диагностическую значимость данного фотосенсибилизатора.

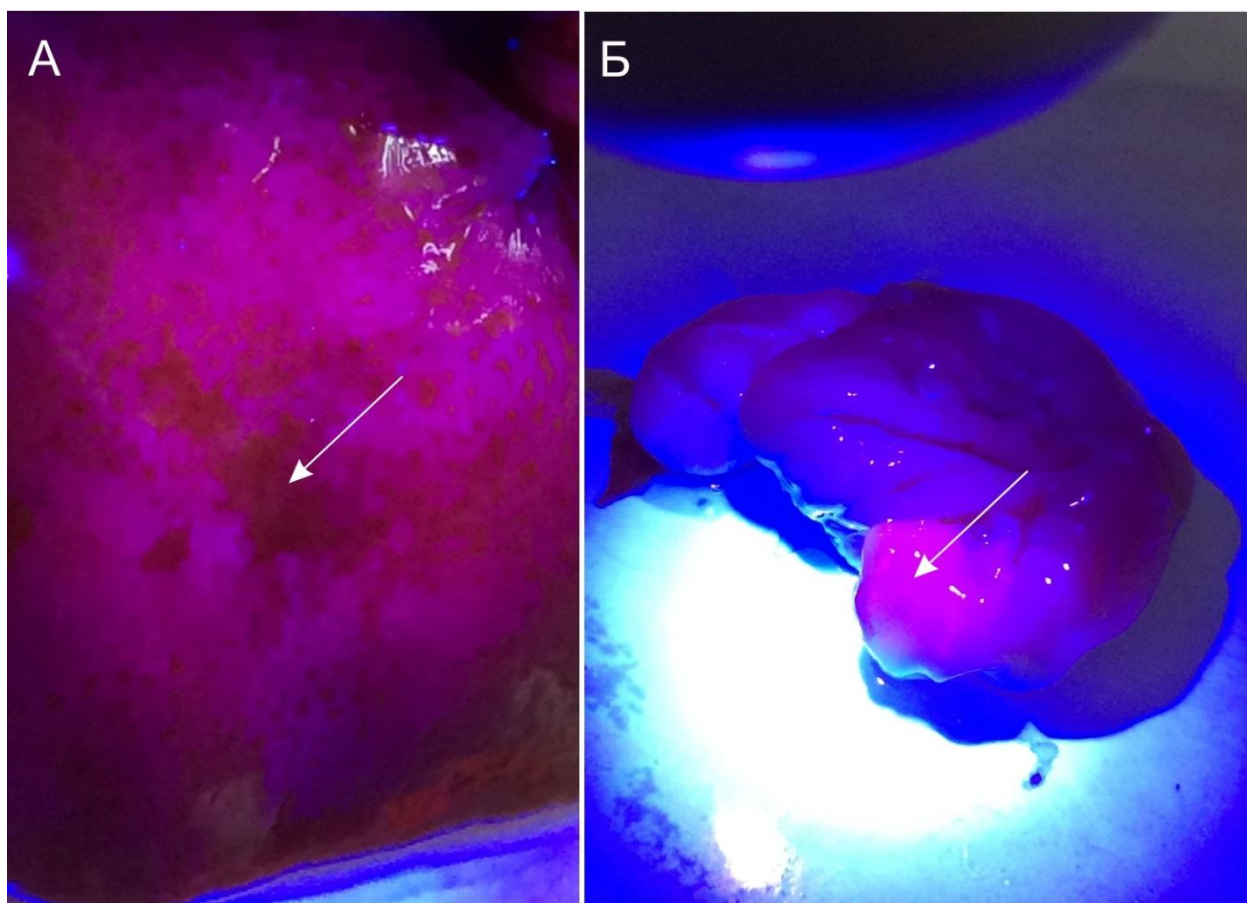


Рисунок 4 – Фотодинамическая диагностика аденокарциномы у крыс с применением фотосенсибилизатора 5-АЛА/ПпIX: А,Б - фотоанализ желудка в ультрафиолетовом свете (красная флуоресценция отражает локализацию опухоли в органе, голубой свет – нормальную слизистую)

Для фильтрации "ложного" сигнала флуоресценции от 5-ALA/ppix был разработан метод синхронной спектроскопии флуоресценции (СФС) из очага воспаления.

На рисунке 5 показаны ткани желудка в состоянии нормы (а и в) и при злокачественных изменениях (б и г) с использованием двух режимов спектрального анализа МВИ (а и б) и СФС (в и г). Оба метода оказались чувствительными к выявлению спектра эндогенной флуоресценции аминокислот, таких как тирозин и триптофан, а также ферментного комплекса, катализирующего окислительно-восстановительные реакции, такие как никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Высокая флуоресцентная активность

этого комплекса при дисплазии желудка указывает на усиление метаболических процессов и аэробного гликолиза раковых клеток. показатели окислительно-восстановительных процессов, связанных с раком желудка.

Усиленный рост раковых клеток отражается в интенсивном свете флуорофоров, которые являются структурными элементами мембраны, такими как эластин и коллаген.

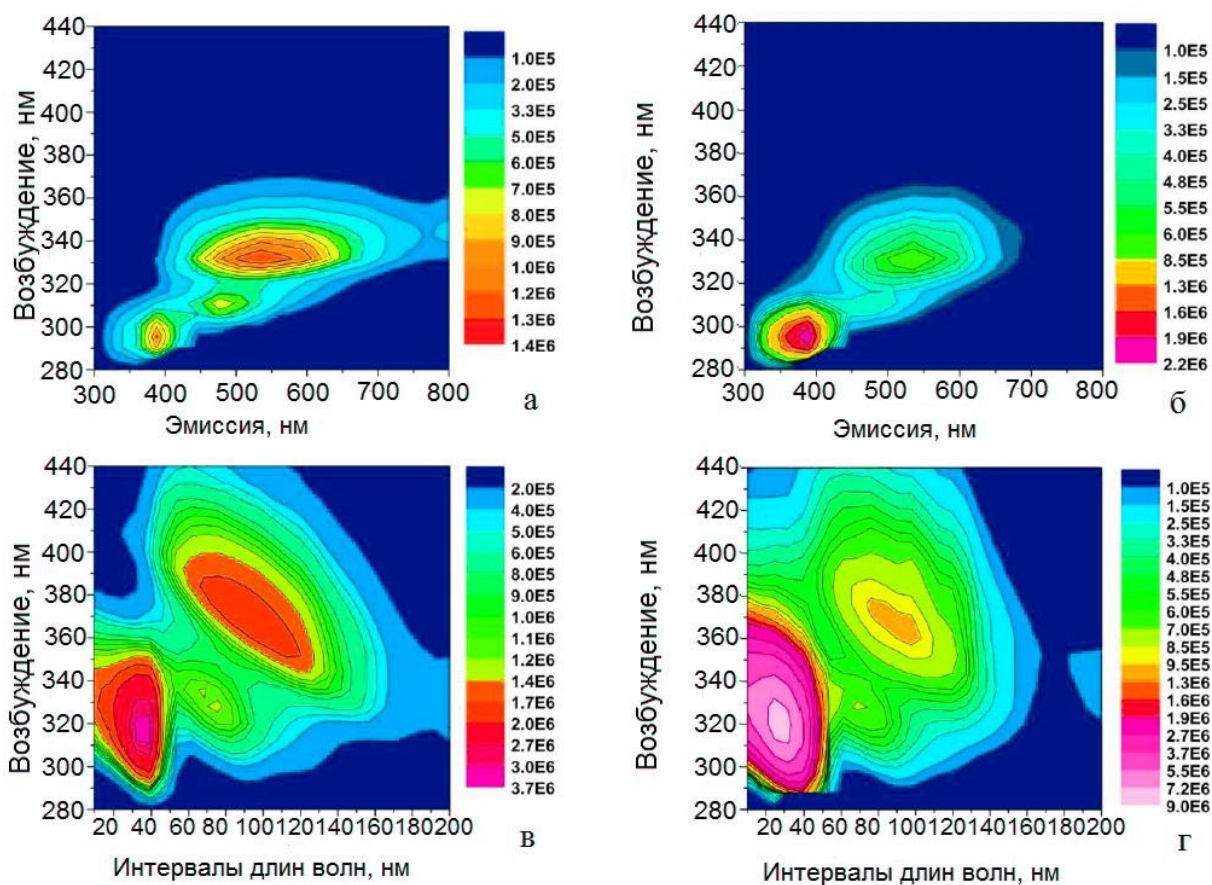


Рисунок 5 – Сравнение спектрального анализа тканей желудка в норме (а и в) и при развитии злокачественных новообразований в органе (б и г) с использованием матрица возбуждения-излучения (а и б) и синхронной флуоресцентной спектроскопии (в и г)

Спектральный анализ флуоресцентного сигнала от полученных фотосенсибилизаторов представлен на рисунке 11.

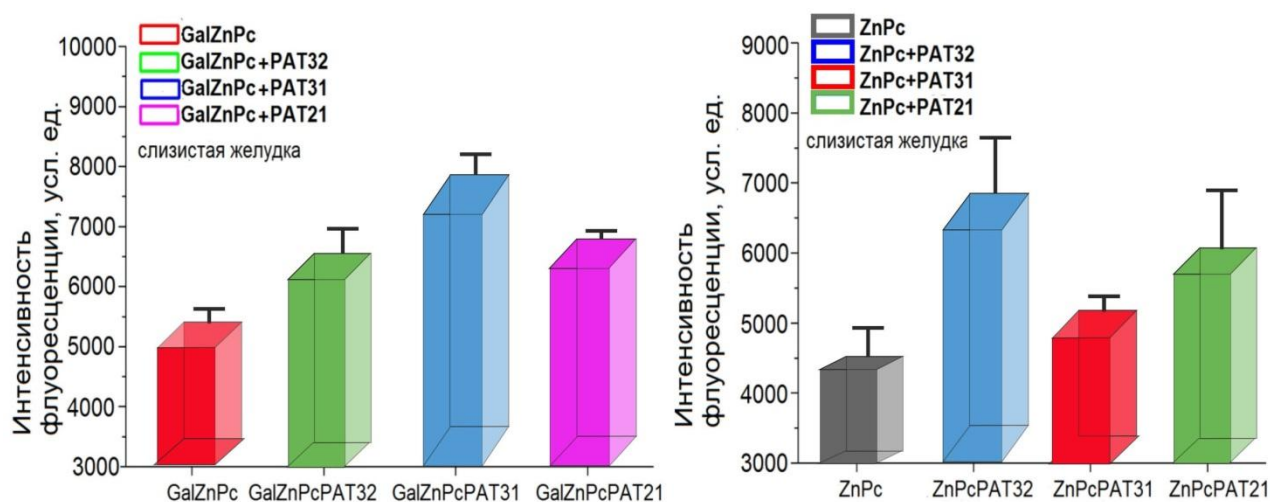


Рисунок 11 – Спектральный анализ флуоресцентного сигнала с опухолевых поражений желудка крыс на основе применения функционализированного цинкового фталоцианина ZnPc-31/32 и 21 и ZnPc-Gal--31/32 и 21

Таким образом, используемый нами метод позволил установить спектральные параметры, позволяющие различать нормальные, предраковые и злокачественные изменения в тканях желудка крыс. Интенсивность флуоресценции при предраковых изменениях была промежуточным значением между нормой желудка и злокачественными изменениями.

ВЫВОДЫ

1. Хронический стресс приводит к повреждению тканей ЖКТ и снижает устойчивость к канцерогенным эффектам нитрозаминов, что при сочетанном длительном воздействии приводит к формированию злокачественных метастазирующих повреждений желудка крыс в лабораторных условиях.

2. Повреждения тканей желудка и возникновение точечных и крупных язв подтверждено с помощью гистологического анализа, который показал наличие глубоких изменений в структуре слизистой оболочки желудка у экспериментальных животных.

3. технологии спектрального анализа с применением обычной матрицы возбуждения-излучения и синхронной флуоресцентной спектроскопии позволяют эффективно дифференцировать размеры и границы злокачественных новообразований желудка, что подтверждает сравнительный анализ этих методов.