

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет (институт)

ЛФ МИ

(наименование)

Кафедра Медицинская

кибернетика и информатика

(наименование)

Направление подготовки (специальность) 30.05.03 Медицинская кибернетика
(код и наименование)

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему

Разработка методики ранней диагностики рака яичников

Студент

Баланюк 30.05.18

(подпись, дата)

(фио полностью)

Руководитель/научный руководитель

Г. Герасименко С. Ч.

(подпись, дата)

Герасименко С. Ч.

(фамилия, инициалы)

Консультанты (если имеются):

по

(наименование раздела)

(подпись, дата)

(фамилия, инициалы)

по

(наименование раздела)

(подпись, дата)

(фамилия, инициалы)

по

(наименование раздела)

(подпись, дата)

(фамилия, инициалы)

Нормоконтролёр

Алексеев 01.06.18

(подпись, дата)

Алексеев Н. Н.

(фамилия, инициалы)

Рецензент инженер-физик ГБОУ "ООО"
(должность, место работы)

В. В. 14.06.18

(подпись, дата)

Белыхарова Е. А.

(фамилия, инициалы)

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 25.05.18 № 1)

Заведующий кафедрой

М. К. И.

Г. Герасименко С. Ч.

(подпись)

(фамилия, инициалы)

Работа защищена с отметкой отл (протокол заседания ГЭК от 22.06 № 1)

Секретарь ГЭК

Крибавская М. В.

(подпись)

(фамилия, инициалы)

Пенза 2018

РЕЦЕНЗИЯ
на дипломную работу студентки
Пензенского государственного университета
Баланюк Ксении Васильевны

Тема дипломной работы: «Разработка методики ранней диагностики рака яичников».

Рецензируемая работа посвящена актуальной теме разработки методики ранней диагностики рака яичников на основе анализа экзосом.

Баланюк К.В. обработано большое количество научного материала, в том числе иностранной литературы, объективно рассмотрена проблематика ранней диагностики рака яичников, изучены основные функции экзосом в развитии онкологического процесса, проведен анализ особенностей и методов исследования экзосом. Материал в дипломной работе логически структурирован, написан научным стилем изложения.

В дипломной работе разработана оригинальная методика ранней диагностики рака яичников, описаны экспериментальные исследования по анализу экзосом опухолевых клеток, а также анализ корреляционных зависимостей между исследуемыми признаками экзосом. В результате данной работы были установлены наиболее значимые признаки экзосом, характеризующие наличие онкологического процесса.

К недостаткам проекта следует отнести ограниченность сферы применения методики ранней диагностики рака яичников (может быть использована только для научных исследований, связанных с ранней диагностикой рака яичников). Однако отмеченный недостаток не оказывает существенное влияние на оценку дипломного проекта.

Работу отличает самостоятельность и понимание рассматриваемой проблематики. Все утверждения в работе сформулированы корректно и аккуратно доказаны.

Считаю, что рецензируемая дипломная работа полностью отвечает требованиям государственного стандарта, предъявляемым к работам подобного рода, заслуживает оценки «отлично», а Баланюк Ксения Васильевна – присвоения квалификации «врач-кибернетик».

Инженер-физик ГБУЗ
«Областной онкологический
диспансер»

 Екатерина Александровна
Бляхарская
«14» июня 2018 г.



«Утверждаю»

Заведующий кафедрой

«16» февраля 2018 г.

ЗАДАНИЕ на дипломное проектирование

1. Студент гр. 12МК1 факультета Медбного специальности 30.05.03

Баланюх Ксения Васильевна

(фамилия, имя, отчество)

2. Руководитель проекта Геращенко Сергей Иванович

3. Время дипломного проектирования с 26 февраля 2018 г. по 15 июня 2018 г.

4. Место преддипломной практики кафедра МКЧ МНТРУ

5. Тема проекта Разработка методики ранней

диагностики рака молочной

Тема утверждена приказом ПГУ № 156 а/о от «01» марта 2018 г.

6. Техническое задание на проект (назначение устройства, условия применения, внешние воздействия, специальные требования и т. п.)

Объектом исследования является метод
анализа изображений и признаков, характеризующие
развитие онкологического процесса

Целью работы является разработка и исследование методики ранней диагностики рака молочной железы.

Основные требования:

- анализ современных методов визуализации и
анализа изображений

- разработка методики ранней диагностики
рака молочной железы

- проведение эксперимента по анализу изображений

Методика ранней диагностики рака молочной железы предназначена для научных исследований, связанного с ранней диагностикой рака молочной железы

7. Объем и содержание основной части проекта

7.1. Пояснительная записка (перечень вопросов, подлежащих разработке, расчетов, обоснований, описаний)

Введение; 1) Каким образом растет рак молочной;
2) Обзор методов визуализации и анализа

Экспозиция; 8) Разработка методик ранней диагностики ранней сенной болезни на основе анализа экспозиции; 4) Экспериментальная оценка методик ранней диагностики ранней сенной болезни на основе анализа экспозиции;
Заключение

7.2. Графическая часть (перечень и содержание чертежей, плакатов)

1. Цель и задачи работы
2. Актуальность работы
3. Методы получения экспозиции
4. Методы визуализации и анализа экспозиции
5. Разработка методик ранней диагностики ранней сенной болезни
6. Экспериментальная оценка методик ранней диагностики ранней сенной болезни
7. Анализ коррекционных мероприятий
8. Результаты и выводы

8. Консультанты и содержание дополнительных разделов (указывается конкретное содержание задания)

8.1. По конструкции устройства не планируется

Консультант

8.2. По технологии не планируется

Консультант

8.3. По экономике и организации производства не планируется

Консультант

8.4. По безопасности жизнедеятельности _____

Консультант _____

9. Календарный график по выполнению проекта

Наименование этапов работы	Объем работы	Срок выполнения	Подпись руководителя, консультанта
1. Проверение	5%	26.02.18 - 2.03.18	
2. Метод визуализации и анализ экосистем	20%	5.03.18 - 23.03.18	
3. Разработка методики расчета диаграмм	25%	26.03.18 - 19.04.18	
4. Экспериментальная оценка методики расчета систем	30%	20.04.18 - 11.05.18	
5. Фактологичность	5%	14.05.18 - 18.05.18	
6. Оформление РЗ	10%	21.05.18 - 13.06.18	
7. Подготовка презентации и реферата	5%	14.06.18 - 21.06.18	

Примечание. Задание по п. 8 должно быть согласовано с руководителем проекта. В случае, если по отдельным дополнительным разделам (см. п. 8) консультанты не назначаются, необходимые задания на проектирование выдает руководитель проекта и вносит в пп. 8.1–8.4.

Дата выдачи задания «26» февраль 20 18 г.

Руководитель дипломного проекта № ПТУ.05.03-12ДР122.01ТЗ

Задание к исполнению принял «26» февраль 20 18 г.

Дипломный проект к защите допустить

Декан факультета

Директор института

20 ____ г.

РЕФЕРАТ

Пояснительная записка к дипломной работе на тему «Разработка методики ранней диагностики рака яичников» содержит 72 листа, 30 рисунков, 7 таблиц, 85 использованных источников, 2 приложения.

ОНКОЛОГИЯ, ЭКЗОСОМЫ, ПОТЕНЦИАЛ, БРОУНОВСКОЕ ДВИЖЕНИЕ, ДИАГНОСТИКА, РАК ЯИЧНИКОВ, КОЭФФИЦИЕНТ КОРРЕЛЯЦИИ

Объектом исследования являются методы анализа экзосом и признаки, характеризующие развитие онкологического процесса..

Целью работы является разработка и исследование методики ранней диагностики рака яичников на основе анализа экзосом опухолевых клеток.

Назначение работы заключается в применении данной методики в качестве альтернативного неинвазивного метода ранней диагностики рака яичников.

Областью применения данного метода научные исследования, связанные с ранней диагностикой рака яичников. Результаты могут быть использованы в ранней диагностике онкологии и при проектировании медицинской аппаратуры.

					ПГУ 30.05.03 – 12ДР122.01. ПЗ		
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	Разработка методики ранней диагностики рака яичников		
Разраб.		Баланюк К.В.		30.05.18			
Провер.		Геращенко С.И.		1.06.18			
Реценз.		Бляхарская Е.А.		14.06.18			
Н. Контр.		Янкина Н.Н.		11.06.18			
Утверд.		Янкина Н.Н.		01.06.18			
					Лит.	Лист	Листов
						4	72
					Кафедра МКиИ, гр.12ЛК1		

ОТЗЫВ

на дипломную работу студентки
Баланюк Ксении Васильевны

Широкая распространенность онкологических заболеваний, в том числе рака яичников, сохраняющийся высокий уровень смертности от них, обуславливают необходимость внедрения в клиническую практику современных эффективных методов ранней диагностики.

Целью дипломной работы является разработка и исследование методики ранней диагностики рака яичников на основе анализа экзосом опухолевых клеток.

В дипломной работе разработана оригинальная методика ранней диагностики рака яичников, описаны экспериментальные исследования по анализу экзосом опухолевых клеток и анализ корреляционных зависимостей между исследуемыми признаками экзосом. В результате исследований были установлены наиболее значимые признаки экзосом, характеризующие наличие онкологического процесса.

Студентка Баланюк К.В., при выполнении дипломной работы, проявила способность самостоятельно решать сложные научно-технические задачи, показала отличные знания, умения пользования научной литературой, в том числе иностранной.

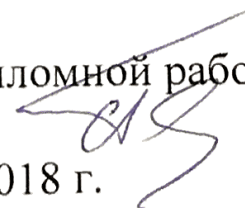
Разделы дипломной работы соответствуют заданию и в достаточной мере раскрывают тему. Оформление текстового документа соответствует заданию и в достаточной мере раскрывают тему. Оформление текстового документа соответствует требованиям стандартов.

Считаю, что дипломная работа студентки Баланюк К.В. может быть допущена до защиты в ГАК и заслуживает оценки “отлично”, а сама Баланюк К.В., - присвоения квалификации “врач-кибернетик”.

Руководитель дипломной работы

д.т.н., профессор

“12” июня 2018 г.

 С.И.Герашенко

СОДЕРЖАНИЕ

	с.
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА ЯИЧНИКОВ	9
1.1 Эпидемиология рака яичников	9
1.2 Этиология рака яичников.....	13
1.3 Патогенез рака яичников	16
1.4 Диагностика рака яичников	18
1.5 Роль экзосом в диагностике рака.....	19
1.6 Основные результаты и выводы по разделу 1	22
2 ОБЗОР МЕТОДОВ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И АНАЛИЗА ЭКЗОСОМ	25
2.1 Анализ траектории наночастиц	26
2.2 Динамическое рассеяние света	29
2.3 Стохастическая оптическая микроскопия.....	32
2.4 Основные результаты и выводы по разделу 2	46
3 РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЭКЗОСОМ	50
3.1 Теоретические основы джоульметрического метода	50
3.2 Теоретическое описание разработанной методики	54
3.3 Описание этапов ранней диагностики рака яичников.....	56
3.4 Основные результаты и выводы по разделу 3	67
4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЖОУЛЬМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ЭКЗОСОМ	68
4.1 Результаты экспериментального исследования экзосом пациентов с раком яичников	68
4.2 Результаты экспериментального исследования работоспособности анализатора экзосом на основе джоульметрического метода	71
4.3 Основные результаты и выводы по разделу 4	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	83

ВВЕДЕНИЕ

Опухоли яичников встречаются в любом возрасте, но преимущественно после 40 лет. Превалируют доброкачественные формы (75–80%). Злокачественные опухоли встречаются в 20–25% случаев. В климактерическом периоде эти цифры возрастают до 50%. Ежегодно в мире регистрируется 165 тыс. новых случаев злокачественных новообразований яичников и 101 тыс. смертей от него. Этот рак является одной из основных причин смерти от злокачественных новообразований женских репродуктивных органов. Рак яичников составляет 4 % от всех диагностированных раков, и 5 % от всей смертности от рака у женщин [1].

В большинстве индустриальных стран мира РЯ также является самой частой причиной смерти среди всех гинекологических опухолей, что связано с поздней диагностикой. Ранняя диагностика РЯ остается важной задачей в онкогинекологии, и усилия ученых всего мира в течение ряда десятилетий направлены на ее решение. Однако, несмотря на это, выживаемость больных с данной патологией остается на низком уровне. Основные причины недостаточной эффективности лечения больных РЯ кроются в запущенности опухолевого процесса к началу лечения в связи с отсутствием полноценных диагностических методик распознавания РЯ на начальных этапах его возникновения [2].

Механизмы образования и развития онкологических заболеваний на протяжении многих лет изучались и продолжают изучаться учёными всего мира. Сегодня исследователи Онкологического центра Андерсена при Техасском университете установили, что немаловажную роль в развитии рака играют экзосомы.

В настоящее время рядом исследований показано, что биохимический состав экзосом, выделенных из плазмы или мочи больных РЯ, отличается от состава экзосом здоровых доноров. Однако внедрение новой методики в

клиническую практику задерживается из-за отсутствия стандартного способа анализа экзосом.

Эта технологическая проблема активно обсуждается в современной литературе [3]. В основе существующих методов лежат предположения о специфических характеристиках физической плотности, нано-размерности или наличии специфических белковых маркеров на поверхности экзосом. Существование принципиально различных подходов свидетельствует об отсутствии оптимального метода. Так, основной проблемой является гетерогенность популяции экзосом в составе любой биологической жидкости в плане как физических так и биохимических характеристик [2, 4].

Кроме того, любая биологическая жидкость, в том числе и моча, содержит комплексы молекул или субклеточных образований, которые могут иметь физические или биохимические характеристики, аналогичные экзосомальным.

1 ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА ЯИЧНИКОВ

1.1 Эпидемиология рака яичников

Проблема диагностики и излечения новообразований яичников представляется одной из наиболее сложных и важных в онкогинекологии. В различных странах мира заболеваемость и показатель смертности с гроб яичников обладает тенденцию к увеличению. Если обратиться к GLOBOCAN - всемирной базе данных, за 2015 в мире раком яичников были больны около 238 700 женщин, 151 900 из них с летальным исходом [5].

По сопоставлению с данными за 2008 г. отмечался подъем как количества заболевших (на 0,6% в год), так и количества погибших (на 0,8% в год). По оценкам эпидемиологов, в 2015 г. количество заболевших превысило 250 тыс.

Таблица 1.1 – Показатели заболеваемости среди субъектов ПФО

Республика, край, область	Показатель, чел.
Приволжский ФО	2911
Нижегородская область	374
Кировская область	122
Самарская область	338
Оренбургская область	228
Пензенская область	170
Пермский край	220
Саратовская область	253
Ульяновская область	115
Республика Башкортостан	339
Республика Марий Эл	43
Республика Мордовия	85
Республика Татарстан	384

А количество погибших — 160 тыс. Заболеваемость во всем мире в 2012 г. составила 9,1 на 100 000 женщин в год, риск заболеваемости до 75-летнего возраста — 1%. Более высокий процент заболеваемости был замечен в Англии и Российской Федерации (16,8 на 100 000 женщин в год), а исключительно невысокий — в Китае (3,6) [6].

По данным отечественной статистики в Российской Федерации вместе с республикой Крым зарегистрировано 14 049 случая рака яичников, примерно 7,8 тыс. из них с летальным исходом. Наибольшая часть умерших в возрастной группе 40–54 года (9,2%) [7].

Ежегодно в мире регистрируется 225,5 тыс. новых случаев злокачественных новообразований яичников и 140,2 тыс. смертей от него, в США — 22,3 тыс. и 15,5 тыс., в России — 13,1 тыс. и 7,8 тыс. За период с 2005 по 2010 г. прирост абсолютного числа заболевших составил 6%. Во многих странах эта патология занимает среди злокачественных новообразований 5-е ранговое место.

Различия в уровнях заболеваемости между отдельным и группами населения и регионам и являются основой не только для выявления предполагаемых факторов риска, но и определения теоретических возможностей профилактики и заболевания. Сопоставление максимального и минимального показателей заболеваемости раком среди различных популяций позволяет косвенно оценить долю онкологических заболеваний, которые можно предупредить [8].

1.2 Этиология рака яичников

Результаты эмпирических, эпидемиологических, медицинских, эндокринологических анализов в совокупности позволяют причислить РЯ к гормонозависимым опухолям, то есть образование зависит в основном от гормонального равновесия гипоталамус-гипофиз-яичники [9].

В настоящий период имеется 3 ключевых патогенетических гипотезы происхождения и формирования РЯ: концепция непрерывной овуляции,

гонадотропная концепция и концепция влияния условий окружающей среды (в частности, талька) [10].

Концепция непрерывной овуляции подразумевает, что каждая овуляция в жизни девушки травмирует ткань яичников, а процедура заживления повышает клеточное деление и возможность попадания эпителиальных клеток в строму яичника, богатую факторами роста.

В соответствии со 2-ой концепцией, высокий уровень гонадотропинов повышает риск формирования опухоли посредством прямой стимуляции роста эпителия. 3-я предположение представляется более ранней и признает, что же главным катализатором возникновения РЯ являются влияния негативных условий окружающей среды.

Имеется и касательно новейшая концепция, в соответствии с каковой половые гормоны оказывают непосредственное влияние на яичниковый эпителий и на удаление предопухолевых клеток: эстрогены повышают, а прогестерон сокращает пролиферацию эпителия в ткани яичников, а канцерогены поступают в яичники посредством заноса в результате повторяющихся менструаций [9].

В нынешний период точно определено, что фактором злокачественного изменения клеток является накопление всевозможных мутаций, локализованных, в частности, в онкогенах и генах-супрессорах. Онкогены кодируют белки, исполняющие важную роль в действиях положительной регуляции клеточного деления и дифференцировки. Если экспрессия их избыточна или протекает в модифицированном варианте, это индуцирует неуправляемую пролиферацию клеток. Гены-супрессоры несут ответственность за синтез белков, осуществляющих негативный контроль клеточного деления либо индукцию апоптоза [10].

1.3 Патогенез рака яичников

Как правило, невозможно точно узнать, почему у одного человека развивается рак, а у другого - нет. Но исследования показали, что определенные

факторы риска могут увеличить шансы человека на развитие рака. (Есть также факторы, которые связаны с более низким риском развития заболевания. Иногда это называют защитными факторами риска или просто защитными факторами).

Факторы риска рака включают воздействие химических веществ или других веществ, а также определенное поведение. Они также включают вещи, которые люди не могут контролировать, например, возраст и семейная история. Семейная история некоторых видов рака может быть признаком возможного наследственного синдрома рака [11].

Большинство факторов риска рака (и защитных) первоначально выявляются в эпидемиологических исследованиях. В этих исследованиях ученые рассматривают большие группы людей и сравнивают тех, кто развивает рак у тех, кто этого не делает. Эти исследования могут показать, что люди, которые развивают рак, более или менее склонны вести себя определенным образом или подвергаться воздействию определенных веществ, чем те, у кого не развивается рак.

В приведенном ниже списке представлены наиболее изученные известные или предполагаемые факторы риска развития рака. Хотя некоторых из этих факторов риска можно избежать, другие, например, стареющие, не могут. Ограничение вашего воздействия на предотвращаемые факторы риска может снизить риск развития определенных видов рака.

Возраст. Согласно последним статистическим данным программы NCI «Наблюдение, эпидемиология и конечные результаты», средний возраст диагноза рака составляет 66 лет. Это означает, что половина случаев рака встречается у людей ниже этого возраста и у половины людей старше этого возраста. Четверть новых случаев рака диагностируется у людей в возрасте от 65 до 74 лет.

Аналогичная картина наблюдается для многих распространенных типов рака. Например, средний возраст при диагнозе составляет 61 год для рака

молочной железы, 68 лет для колоректального рака, 70 лет для рака легких и 66 лет для рака предстательной железы.

Но болезнь может возникать в любом возрасте. Например, рак кости чаще всего диагностируется среди людей моложе 20 лет, причем более четверти случаев встречаются в этой возрастной группе. И 10% лейкозов диагностируются у детей и подростков в возрасте до 20 лет, тогда как только 1% рака в целом диагностируется в этой возрастной группе. Некоторые виды рака, такие как нейробластома, чаще встречаются у детей или подростков, чем у взрослых [11].

Алкоголь. Употребление алкоголя может увеличить риск развития рака рта, горла, пищевода, гортани (голосового аппарата), печени и груди. Риск рака намного выше для тех, кто употребляет алкоголь, а также курит табак.

Диетические рекомендации определяют умеренное употребление алкоголя в качестве одного напитка в день для женщин и до двух напитков в день для мужчин.

Было высказано предположение, что некоторые вещества в красном вине, такие как ресвератрол, обладают противораковыми свойствами. Однако нет никаких доказательств того, что употребление красного вина снижает риск развития рака.

Питание. Во многих исследованиях была рассмотрена возможность того, что определенные диетические компоненты или питательные вещества связаны с увеличением или уменьшением риска развития рака. Исследования раковых клеток в лаборатории и на животных моделях иногда свидетельствовали о том, что изолированные соединения могут быть канцерогенными (или иметь противоопухолевую активность) [12].

Но, за немногими исключениями, исследования человеческих популяций пока не показали окончательно, что любой диетический компонент вызывает или защищает от рака. Иногда результаты эпидемиологических исследований, которые сравнивают диеты людей с раком и без него, показали, что люди с

раком и без него различаются по своему усвоению определенного диетического компонента.

Однако эти результаты показывают только, что диетический компонент связан с изменением риска развития рака, а не с тем, что диетический компонент несет ответственность за изменение риска или вызывает его. Например, участники исследования с раком и без него могут отличаться по-другому, кроме своего рациона, и вполне возможно, что какая-то другая разница объясняет разницу в раке.

Когда из эпидемиологического исследования появляется доказательство того, что диетический компонент связан с уменьшенным риском развития рака, можно провести рандомизированное исследование, чтобы проверить эту возможность. Случайное назначение диетическим группам гарантирует, что любые различия между людьми, у которых есть высокий и низкий уровень потребления питательных веществ, обусловлены самим питательным веществом, а не другими необнаруженными различиями [12].

Гормоны. Эстрогены, группа женских половых гормонов, являются известными канцерогенами человека. Хотя эти гормоны имеют существенные физиологические роли как у женщин, так и у мужчин, они также связаны с повышенным риском некоторых видов рака. Например, принимая комбинированную терапию гормонов в менопаузе (эстроген плюс прогестин, который является синтетическим вариантом женского гормона прогестерона), может увеличить риск рака молочной железы у женщины. Менопаузальная гормональная терапия только с эстрогеном увеличивает риск развития рака эндометрия и используется только у женщин, у которых была гистерэктомия.

Исследования также показали, что риск рака молочной железы у женщины связан с эстрогеном и прогестероном, произведенным ее яичниками (известными как эндогенный эстроген и прогестерон). Высокий показатель в течение длительного времени этих гормонов связано с повышенным риском рака молочной железы. Увеличение экспозиции может быть вызвано ранним началом менструации, поздней менопаузой, старением при первой

беременности и никогда не рожавшими. И наоборот, рождение является защитным фактором для рака молочной железы.

Иммунодепрессия. Многие люди при трансплантации органов принимают лекарства для подавления иммунной системы. Иммунодепрессанты делают иммунную систему менее способной обнаруживать и уничтожать раковые клетки или бороться с инфекциями, которые вызывают рак. Инфекция ВИЧ также ослабляет иммунную систему и повышает риск развития определенных видов рака [13].

Исследования показали, что пациенты при пересадке органов подвергаются повышенному риску развития большого числа различных видов рака. Некоторые из этих видов рака могут быть вызваны инфекционными агентами, тогда как другие - нет. Четыре наиболее распространенных рака среди реципиентов трансплантатов, которые чаще встречаются у этих людей, чем у общей популяции, - это неходжкинская лимфома (НХЛ) и рак легких, почек и печени. НХЛ может быть вызвана инфекцией вируса Эпштейна-Барра (EBV) и раком печени при хронической инфекции вирусами гепатита В (HBV) и гепатита С (HCV). Как правило, рак легких и почек ассоциируется с инфекцией.

Люди с ВИЧ / СПИДом также увеличивают риск возникновения рака, вызванного инфекционными агентами, включая EBV; человеческий герпесвирус 8 или связанный с саркомой Капоши вирус; HBV и HCV, которые вызывают рак печени; и человеческий папилломавирус, который вызывает шейный, анальный, орофарингеальный и другие виды рака. ВИЧ-инфекция также связана с повышенным риском возникновения рака, который, как полагают, не вызван инфекционными агентами, такими как рак легких.

Ожирение. Люди, страдающие ожирением, могут иметь повышенный риск развития нескольких видов рака, включая рак молочной железы (у женщин, перенесших менопаузу), толстой кишки, прямой кишки, эндометрия, пищевода, почек, поджелудочной железы и желчного пузыря [11].

И наоборот, употребление здоровой диеты, физическая активность и поддержание здорового веса может помочь снизить риск возникновения некоторых видов рака. Эти здоровые поведения также важны для уменьшения риска других заболеваний, таких как сердечные заболевания, диабет типа II и высокое кровяное давление.

Излучение. Высокоэнергетическое излучение, такое как рентгеновское излучение, гамма-излучение, альфа-частицы, бета-частицы и нейтроны, могут повредить ДНК и вызвать рак. Эти формы излучения могут выделяться при авариях на атомных электростанциях и при изготовлении, испытании или использовании атомного оружия [14].

Некоторые медицинские процедуры, такие как рентгенографии грудной клетки, компьютерная томография (КТ), позитронно-эмиссионная томография сканирование (ПЭТ), и лучевая терапия также могут вызвать повреждение клеток, что приводит к раку. Тем не менее, риск рака от этих медицинских процедур очень мал, и преимущество от их наличия почти всегда превышает риски.

Существует еще один вид излучения, способный повысить риск развития онкологии. Радон - это радиоактивный газ, выделяемый камнями и почвой. Образуется при распаде радиоактивного элемента радия. Радий, в свою очередь, образуется при разрушении радиоактивных элементов урана и тория. Люди, которые подвергаются воздействию высокого уровня радона, имеют повышенный риск развития рака легких.

Люди, проживающие в районе с высоким уровнем радона в его скалах и почве, могут проверить свой дом на этот газ. Домашние тесты на радон просты в использовании и стоят не дорого. Большинство магазинов оборудования продают тестовые комплекты.

Ультрафиолетовое излучение. Воздействие ультрафиолетового излучения вызывает раннее старение кожи и повреждение кожи, которое может привести к раку кожи.

Люди всех возрастов и тонов кожи должны ограничить количество времени, которое они проводят на солнце, особенно между полуденным и поздним днем, и избегать других источников ультрафиолетового излучения, например, соляриев. Важно помнить, что УФ-излучение отражается песком, водой, снегом и льдом и может проходить через ветровые стекла и окна. Несмотря на то, что рак кожи чаще встречается среди людей со светлым тоном кожи, риску развития рака кожи подвержены все.

Табак и курение. Использование табака является основной причиной рака и смерти от рака. Люди, которые употребляют табачные изделия или регулярно находятся в обществе курящих (пассивное курение), имеют повышенный риск развития рака.

Курение табака увеличивает риски развития многих видов рака, включая рак легких, гортани (голосового аппарата), ротовой полости, пищевода, горла, мочевого пузыря, почек, печени, желудка, поджелудочной железы, ободочной кишки и прямой кишки, шейки матки, а также острый миелоидный лейкоз. Люди, которые употребляют бездымный табак (жевательный табак), увеличивают риск возникновения рака во рту, пищеводе и поджелудочной железе.

Не существует безопасного уровня употребления табака. Людям, употребляющим табак любого типа, настоятельно рекомендуется бросить курить. Люди, бросившие курить, независимо от их возраста, имеют значительную прирост в ожидаемой продолжительности жизни по сравнению с теми, кто продолжает курить. Кроме того, отказ от курения во время диагностики рака снижает риск смерти [15].

1.4 Диагностика рака яичников

У большинства больных раком яичника к моменту установления диагноза имеется распространенный опухолевый процесс. С одной стороны, это объясняется быстрой имплантацией серозно-папиллярной опухоли по брюшине. С другой стороны, абдоминальные боли, симптомы со стороны ЖКТ

имеют «стертый» характер, что приводит к поздней диагностике рака яичника. Жалобы на общую слабость, потерю аппетита, увеличение живота за счет асцита, одышку в связи с гидротораксом появляются при распространенном злокачественном процессе.

В большинстве случаев опухоль выявляется при клиническом обследовании (общем и гинекологическом осмотре) с применением трансабдоминального и трансвагинального УЗИ. При подозрении на злокачественную опухоль яичника проводится КТ органов брюшной полости и малого таза. По показаниям выполняется эндоскопическое исследование желудка и кишечника для исключения метастатического характера опухоли яичника [16].

Для выявления отдаленных метастазов рака яичника обязательно выполнение рентгенографии легких.



Рисунок 1.1 – Изображение двустороннего поражения яичников - с обеих сторон кистозные опухоли. Компьютерная томограмма

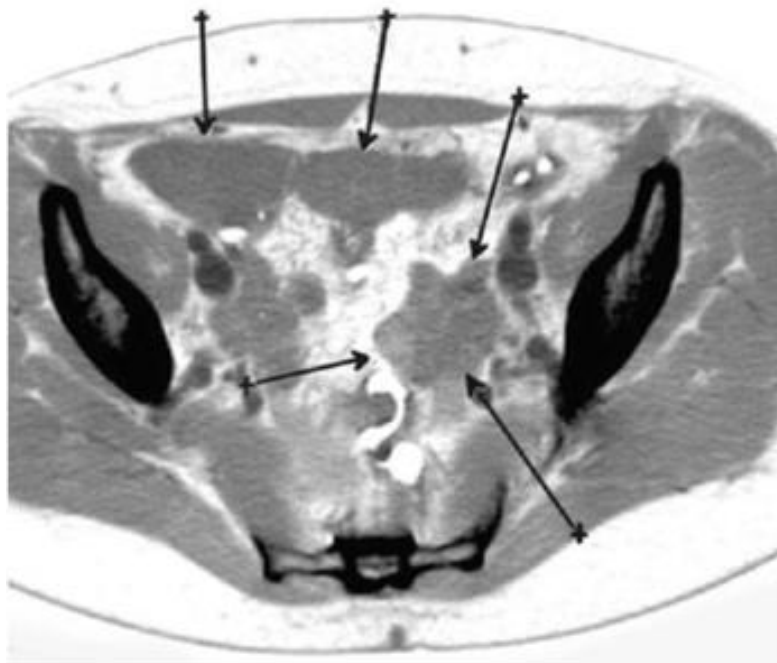


Рисунок 1.2 – Изображение опухоли левого яичника с бугристыми контурами, неоднородной структуры с участками распада. По париетальной брюшине передней брюшной стенки массивные метастазы. Компьютерная томограмма

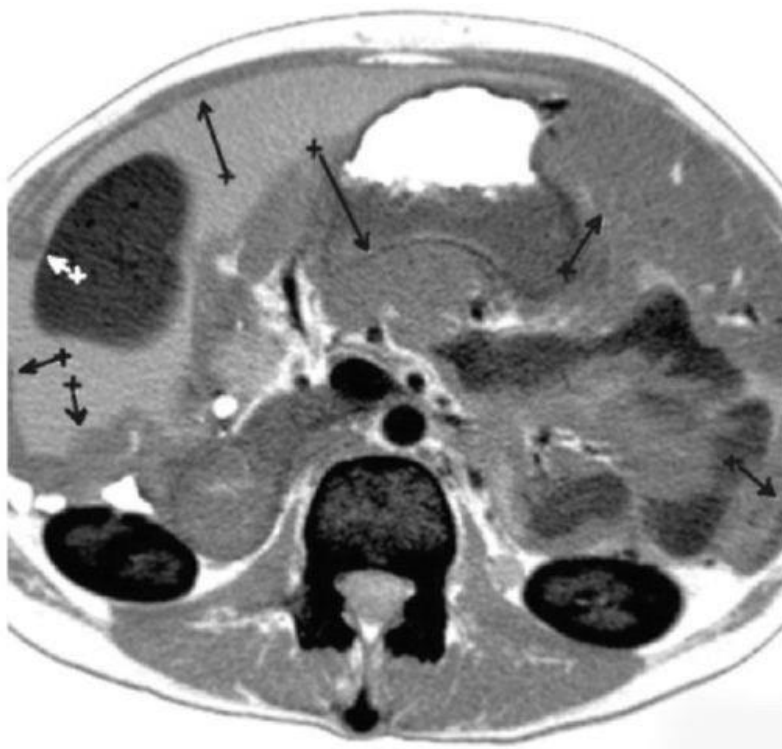


Рисунок 1.3 – Диссеминация опухоли яичников по брюшине - и по париетальному, и по висцеральному листкам на всем протяжении мягкотканной плотности масса с бугристым контуром. Асцит. Компьютерная томограмма

Показано определение уровня опухолюассоциированного антигена СА-125. Хотя СА-125 не является столь значимым показателем на момент установления диагноза рака яичника, его динамика в процессе лечения крайне важна [16].

В случаях, когда не может быть выполнена операция на 1-м этапе лечения, необходимо морфологическое подтверждение диагноза (цитологическое исследование эвакуированной асцитической/плевральной жидкости или гистологическое исследование биоптатов метастатических очагов). Общий и биохимический анализы крови позволяют оценить состояния кроветворения, а также функции печени и почек.

1.5 Экзосомы в диагностике рака

Межклеточное взаимодействие является важным условием функционирования многоклеточного организма. Осуществляться оно может с помощью межклеточных контактов, и так же путем передачи секретируемых молекул при помощи экзоцитоза. За последние десятилетия обнаружен так же третий механизм межклеточной коммуникации – передача молекул с помощью, так называемых экстраклеточных везикул, который на данный момент активно изучается [17].

Сами везикулы заключены в оболочку, имеющую сходство с оболочкой самой клетки. Они могут включать в себя как малые порции обычного цитоплазматического содержимого, так и специфические наборы биологически активных молекул. Образование таких структур свойственно самым различным видам клеток любого эволюционного уровня. Как выяснилось, внеклеточные везикулы имеют огромное значение в жизнедеятельности клетки и принимают активное участие во многих процессах регуляции в организме. Из-за разновидности структуры и содержимого, они относятся к специфичным признакам отдельных клеток, процессов и состояний, являются не только хранилищем клеточного содержимого, но и активными транспортерами

сигналов межклеточной коммуникации. Помимо этого, они вовлечены в процессы формирования различных патологий, включая вирусные, онкологические и нейродегенеративные заболевания. Данный аспект обуславливает огромную заинтересованность в изучении внеклеточных везикул [18].

Экзосомы считаются одним из самых интенсивно изучаемых видов микровезикул. Они представляют собой микроскопические внеклеточные везикулы диаметром 30–100 нм, выделяемые различными видами клеток. В них включены белки, микроРНК (miR), ДНК и мРНК. Известно около 1000 представителей miR. Они контролируют в клетке функционирование более 80 % генов, кодирующих белки. (ex0 13). Все без исключения мРНК в экзосомах человека имеют клеточное происхождение, даже образованные из кардиомиоцитов, гепатоцитов, тучных клеток, адипоцитов клеток эндотелия, поджелудочной железы, рака молочной железы, колоректального рака, глиобластомы, и др [19].

Большинство последних исследований направлены на изучение данных РНК, которые способны реализовывать перепрограммирование клеток-реципиентов, инициируя в них изменение экспрессии различных белков. На данный момент произведено более 40 масштабных исследований, нацеленных на изучение мРНК и микроРНК в составе экзосом.

В последние десятилетия белковый состав экзосом активно исследовался с помощью методов масс-спектрометрии, вестерн-блоттинга, флуоресцентных меток и иммуноэлектронной микроскопии. Данные исследования показали, что белки поступают в экзосомы при помощи ESCRT-системы после моноубиквитинирования, но молекулярные механизмы данного процесса окончательно не выяснены. Протеиновый состав экзосом отображает их происхождение. К белкам-маркерам экзосом причисляют белки высококонсервативного семейства тетраспанинов, которые необходимы для связывания и транспортировки микроРНК (CD63, CD81 и CD9), Alix и Tsg101 – элемента эндосомного белкового комплекса сортировки, необходимого для

транспортировки и биогенеза экзосом. Экзосомы насыщены актинсвязывающими белками и белками цитоскелета, несут ГТФ-азы семейства Rab и аннексины, которые содействуют соединению мембран. Кроме того, в них найдены белки теплового шока HSP60, HSP70, HSP90, комплекс протеаз и их активаторов (активная форма металлопротеиназы ADAM10), ассоциированный с беременностью белок PAPPA, прогепариназа, extracellular matrix metalloprotease inducer (EMMPRIN), urokinase-type plasminogen activator (uPA), матриксные металлопротеиназы (MMP-2,-9). Экзосомы, образованные от клеток иммунной системы, несут белки комплекса гистосовместимости II класса [20].

Что же до различных видов РНК, в экзосомах преобладают матричные и микроРНК, причем сывороточные экзосомы и экзосомы мочи также содержат тРНК, рРНК, миРНК и маРНК [21]. Наиболее изучены свойства микроРНК экзосом, которые участвуют в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном этапе, и матричных РНК, которые при переносе от родительской клетки к клетке-мишени способны участвовать в регуляции фенотипических свойств этих клеток. Функции других видов РНК экзосом в настоящее время находятся на стадии изучения.

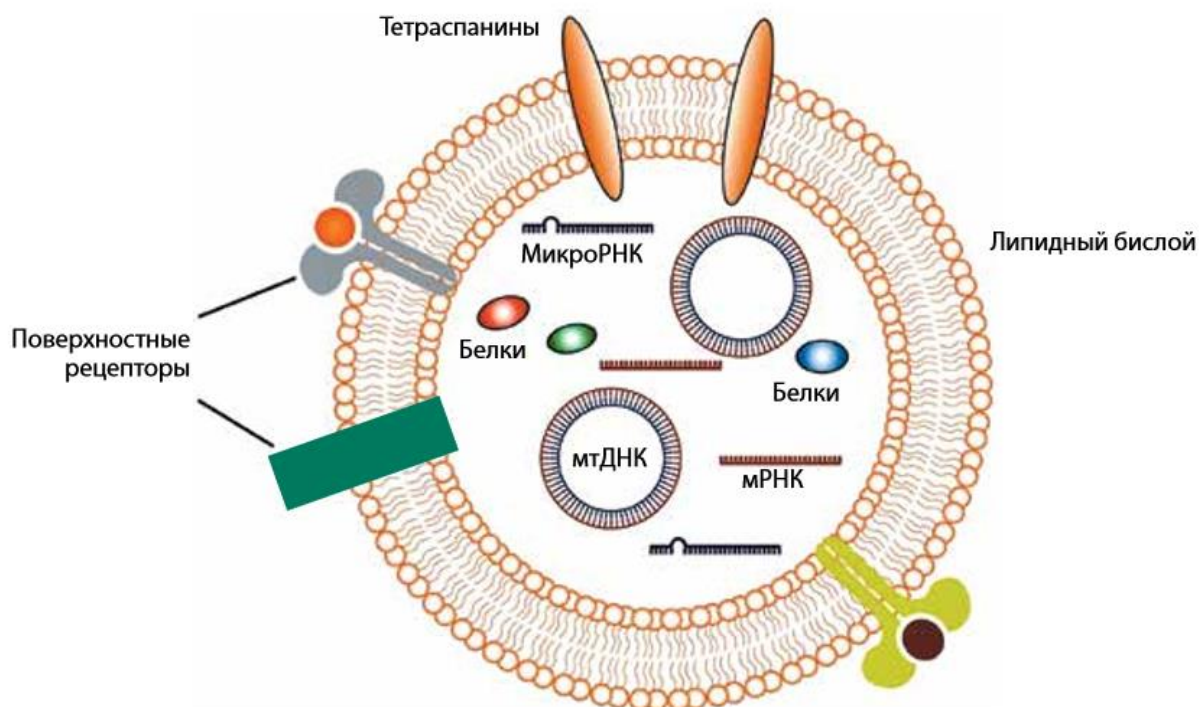


Рисунок 1.5 – Изображение молекулярной структуры экзосом

Если говорить о механизмах взаимодействия экзосом с клетками-реципиентами, то они в сравнении с обсуждаемым составом экзосом (что является темой для бесконечного изучения, так как в человеческом организме циркулируют и экзосомы микробиоты), довольно неплохо изучены. На сегодняшний день можно выделить 4 главных пути клеточно-экзосомальных отношений:

а) присоединение и слияние мембраны экзосомы с мембраной клетки-мишени, после чего белки мембраны экзосомы перемещаются в плазматическую мембрану клетки [22];

б) поглощение экзосомы при помощи транс- и эндоцитоза клеткой-мишенью, в результате чего содержимое микрочастицы выходит в цитоплазму клетки [23];

с) лигандрецепторные взаимодействия между клетками и экзосомами без слияния мембран [24];

д) воздействие компонентов содержимого экзосом в результате лизиса экзосомальной мембраны в межклеточной среде [25].

При помощи вышеперечисленных механизмов экзосомы способны оказывать влияние на рост, развитие межклеточные взаимодействия, и фенотипическую изменчивость клеток, а значит и принимать участие в процессах канцерогенеза [26].

Многие исследования показали, что экзосомы способны свободно абсорбироваться на поверхности клеток и проникать в клетки-реципиенты. В связи с этими возможностями, все исследования в отношении изучения экзосом можно разделить на 2 категории:

1. Обнаружение биомаркеров заболеваний (в том числе выявление опухолей на ранних стадиях) [27].

2. Поставка лекарств в организме [28].

Экзосомы, которые секретируются опухолевыми клетками, оказывают значительное воздействие на рост и развитие злокачественных новообразований, а так же на химиорезистентность, отдаленное метастазирование, патологический ангиогенез, и уход малигнизированной клетки от иммунного контроля. Экзосомы способны не только лишь создавать иммунопривилегированную среду внутри опухолевой структуры [21], но и транспортировать проапоптотические молекулы (Fas-лиганд, TRAIL), инициирующие гибель активированных противоопухолевых Т-лимфоцитов [24].

С помощью , расположенных на мембранах, адгезионных рецепторов и лигандов, специфичных для разных видов клеток и тканей, экзосомы целенаправленно взаимодействуют с определенными видами клеток, принося в последние биологические молекулы наиболее обширного диапазона действия, включая различные виды РНК, факторы роста, рецепторы, биоактивные липиды и цитокины. Секреция экзосом характерна для подавляющего большинства злокачественных опухолей и, очевидно, является отличительной особенностью неопластической модификации клеток [21].

Путем транспортировки большого числа информационных молекул экзосомы реализуют основные функции при образовании первичных опухолей и опухолевой прогрессии, в том числе формирование многочисленной терапевтической устойчивости, активацию онкогенных и антиапоптотических сигнальных путей, защита от проапоптотических условий или доставку проапоптотических факторов к клеткам, участвующих в процессах противоопухолевого иммунитета [29], реорганизацию микроокружения и стромальных клеток [27, 30], повышение ангиогенеза и экспрессии клетками проангиогенных факторов [31], а так же увеличение инвазивной способности клеток [32].

Огромное количество подлинного материала накоплено в тематике роли экзосом в угнетении противоопухолевого иммунитета, включительно подавление функций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (NK-клеток), а так же угнетение дифференцировки антигенпрезентирующих клеток. Помимо этого, экзосомы опухолевых клеток повышают число и увеличивают активность иммуносупрессорных клеток, способствуют активному переносу различных вирусов, в том числе вирусы, ассоциированные с канцерогенезом. Некоторые данные говорят о том, что опухолевые клетки, используя секрецию экзосом, избавляются от химиопрепаратов (в частности, доксорубицина). Данный процесс лежит в основе приобретения устойчивости малигнизированными клетками к противоопухолевой терапии [32, 33].



Рисунок 1.6 – Графическое изображение функции экзосом

Отдельного внимания заслуживает способность экзосом менять основные функции опухолевых клеток, например таких как пролиферация, дифференцировка, посредством эпигенетических механизмов регуляции транскрипции генов методом переноса информационных и малых РНК [34]. Данные сведения во многом поясняют и феномен генетической нестабильности, который лежит в основе селекции наиболее малигнизированных клеток [35, 36]. Также установлено, что экзосомы, секретируемые эмбриональными стволовыми клетками, могут эпигенетически перепрограммировать разнообразные клетки-мишени [37]. Более того, существуют сведения, удостоверяющие умение экзосом «передавать» клеткам-мишеням способность к метастазированию [38, 39]. Изучение белкового состава экзосом говорит о том, что набор этих белков неслучаен и непосредственно зависит от вида секретирующей их опухоли, что может быть использовано для нахождения маркеров определенных заболеваний. Однако это требует еще дальнейших масштабных экспериментов.

Статистика исследований российских и зарубежных ученых показывает, что продукция экзосом опухолевыми клетками значительно превышает количество выработки экзосом нормальными клетками. Практически во всех биологических жидкостях организма, таких как кровь, моча, сперма, плевральные жидкости можно обнаружить продуцируемые экзосомы. Наличие экзосом в биологических жидкостях возможно использовать как биомаркеры для диагностики заболеваний. В настоящее время уже ведутся работы в этом направлении под кодовым наименованием – «жидкая биопсия» [40,41].

Наиболее высокая концентрация экзосом опухолевого происхождения у пациенток с РЯ отвечает поздней стадии, прогрессии заболевания или большей возможности к метастазированию. При злокачественных образованиях концентрация экзосом в сыворотке крови выше, чем при доброкачественной опухоли в яичниках или у здоровых пациенток. Например, на IV стадии злокачественной опухоли яичника число экзосом в крови увеличилось почти в 50 раз по сравнению с нормой.

В случае, если объем опухоли минимален, то считают, что экзосомы действуют в основном локально, уже при более поздних стадиях экзосомы поступают в кровь и становятся системными.

Протуморогенный потенциал экзосом, исходящий от опухолевых клеток, представлен на рисунок 1.7. После анализирования уровня 8 специфических микроРНК в ткани РЯ и экзосомальных микроРНК из асцитической жидкости больных, было высказано предположение, что при эпителиальном РЯ экзосомы, продуцируются клетками первичной опухоли и опухолевыми клетками интраперитонеальных метастазов и скапливаются в асците. [42]. Представлено, что профили микроРНК при РЯ и доброкачественных образованиях яичников значительно отличаются [43].



Рисунок 1.7 – Протуморогенный потенциал экзосом, происходящих из опухолевых клеток

В исследовании S. Runz et al. [44] представлено наличие экзосом в асците у многих пациенток с РЯ. В экзосом-положительных образцах число экзосом значительно менялось. Анализ асцитической жидкости и сыворотки крови больных с распространенным РЯ в парных образцах продемонстрировал одновременное наличие экзосом примерно в 50 % случаев. В прочих результатах экзосомы определялись лишь в асците. Представлено, что фенотипически сывороточные экзосомы существенно схожи с образцами экзосом, выделенных из асцитической жидкости, и несут CD24, ADAM10 и CD9 (белок семейства тетраспанинов – маркер экзосом). Экзосомы, извлеченные из асцитической жидкости, активизируют опухолевый рост, включают обширный диапазон протеаз и их активаторов. Считают, что выраженный протеолитический компонент экзосом, способен в существенной

степени контролировать опухолевый рост и диссеминацию, меняя локальное микроокружение и делая доступными ростовые факторы, которые заключены в матрикс, а так же растворять элементы экстраклеточной матрицы и увеличивать миграционную и инвазивную активность опухолевых клеток [42]. В этой же работе сказано, что экзосомы, извлеченные из асцитической жидкости пациенток с РЯ, радикально поглощаются естественными киллерами (клеточная линия NK-92-С1) и почти никак не поглощаются опухолевыми клетками. Но к сожалению, детали механизма поглощения экзосом клетками исследованы весьма недостаточно.

Таким образом, экзосомы создают связь между опухолевыми клетками, протуморогенными клетками иммунной системы и эндотелиальными клетками, а значит, скорее всего имеет немаловажное значение в инвазии опухоли, неоангиогенезе и метастазировании.

1.6 Основные результаты и выводы по разделу 1

На основании проведенного мета анализа иностранной литературы, сформируем основные наиболее важные особенности рака яичников.

1 Ежегодно в мире регистрируется 225,5 тыс. новых случаев злокачественных новообразований яичников и 140,2 тыс. смертей от него, в США — 22,3 тыс. и 15,5 тыс., в России — 13,1 тыс. и 7,8 тыс. За период с 2005 по 2010 г. прирост абсолютного числа заболевших составил 6%. Во многих странах эта патология занимает среди злокачественных новообразований 5-е ранговое место.

2 В нынешний период точно определено, что фактором злокачественного изменения клеток является накопление всевозможных мутаций, локализованных, в частности, в онкогенах и генах-супрессорах. Онкогены кодируют белки, исполняющие важную роль в действиях положительной регуляции клеточного деления и дифференцировки.

3 К факторам, предрасполагающим к развитию рака яичников, относят пожилой возраст, женский пол, наследственную предрасположенность,

неправильное питание, употребление спиртных напитков, наркотических веществ, курение, гормональные нарушения, ультрафиолетовое излучение.

4 Пациенты с раком яичников, проявляющимися в виде симптомов, чаще всего страдают от боли в правом верхнем квадранте или боли в эпигастральной области, что, вероятно, связано со сдавлением камня в пузырном протоке [77]. Они могут испытывать сильную боль в правой верхней части живота, которая часто сопровождается неуклонно возрастающей тошнотой и рвотой в течение 30 минут, длящейся до нескольких часов.

5 Ранняя диагностика РЯ остается главной нерешенной проблемой в онкогинекологии. Поздняя диагностика злокачественных опухолей яичников обусловлена как отсутствием специфических признаков заболевания, так и поздним обращением женщин за медицинской помощью.

Таким образом, актуальность исследования рака яичников как медико - социально значимого негативного явления очевидна.

2 МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И АНАЛИЗА ЭКЗОСОМ

Несмотря на наноразмерность, экзосомы могут быть визуализированы методами флуоресцентно-световой, сканирующей или трансмиссионной электронной микроскопии. Эти методы позволяют анализировать биологические или структурные особенности единичных экзосом и применяются в исследовательских целях. Использование методов микроскопии для диагностики маловероятно, по крайней мере, в обозримом будущем.

Более отчетливые перспективы диагностического применения могут иметь методы количественного анализа экзосом, которые позволяют в той или иной степени оценить размер, поверхностный заряд, количество, а иногда и качество везикул в составе исследуемого образца. Так, наиболее широкое применение имеют методы:

1. Методы проточной цитометрии (flowcytometry).
2. Методы динамического светорассеяния.
3. Анализ траекторий наночастиц [44].

Все три метода основаны на обработке частиц монохромным поляризованным (лазерным) излучением и анализе отраженного излучения. В первом случае анализируется отраженное излучение последовательно от каждой частицы, пересекающей луч лазера в направленном потоке жидкости исследуемого образца. Во втором и третьем – излучение, отраженное от частиц в состоянии случайного движения, вызванного некомпенсированными толчками молекул растворителя (т.н. броуновское движение). Основным недостатком метода проточной цитометрии является тот факт, что нижняя граница детектируемых частиц для большинства современных цитометров определяется как 200 нм.

Такие приборы предполагают возможность калибровки с тем, чтобы игнорировать сигналы от частиц больших размеров и несколько увеличить чувствительности анализа частиц малых размеров. Более надежным решением проблемы является использования частиц, «декорированных» антителами к

белкам поверхности экзосом, которые связывают экзосомы, и флуоресцентно-меченых вторичных антител, которые опосредуют количественную оценку связанных экзосом.

Такой подход позволяет произвести измерения в надежном диапазоне чувствительности прибора, но непосредственные результаты анализа требуют аккуратной интерпретации. При анализе броуновского движения наночастиц в жидкости (DLS, NTA) из характеристик отраженного света рассчитывается коэффициент диффузии частиц, который, в свою очередь, определяется размерами частицы, точнее – гидродинамическим радиусом.

Методом динамического светорассеяния можно оценить характеристики излучения, отраженного множеством частиц в растворе, и оценить соотношение частиц разных размеров [45]. При этом отсутствие возможности непосредственной оценки характеристик отдельных частиц существенно снижает информативность методики. Относительно недавно разработанный метод анализа траекторий наночастиц предполагает детекцию отраженного излучения с помощью ультрамикроскопа и анализ характеристик движения каждой отдельной частицы. Этот метод позволяет оценить размеры частиц, концентрацию частиц разных размеров и интенсивность рассеяния света индивидуальной частицей, что может отражать ее химическую структуру или свойства поверхности [46]. Результаты анализа траекторий наночастиц могут быть показаны разными способами, что позволяет удобное использование и интерпретацию.

Более детальный анализ биохимического состава экзосом предполагает их дезинтеграцию и получение результатов, «усредненных» для популяции. Так, профайлинг белков или нуклеиновых кислот в составе экзосом может быть проведен с помощью масс-спектрометрии или методами сиквенирования нового поколения, соответственно. Принципы этих методов не предполагают никаких особенностей при анализе. Анализ отдельных молекул в составе экзосом может быть проведен традиционными методами молекулярной биологии.

2.1 . Анализ траектории наночастиц

Метод АТН в виде устройства был реализован Nanosight (Великобритания). Он основан на наблюдении броуновского движения отдельных частиц [47]. Это позволяет использовать принцип измерения их размеров в коллоидных растворах, интенсивности рассеяния и концентрации каждой фракции. Программа позволяет выбирать центры наночастиц, рисовать траектории их движения, вычислять размер каждой частицы, для которой также определяется интенсивность рассеяния света. Анализ распределения частиц по графу «Размер-Интенсивность» позволяет широко интерпретировать результаты. Если точки на ней не лежат на степенной функции, а сгруппированы в определенных областях, это означает более сложный состав исследуемого образца [48].

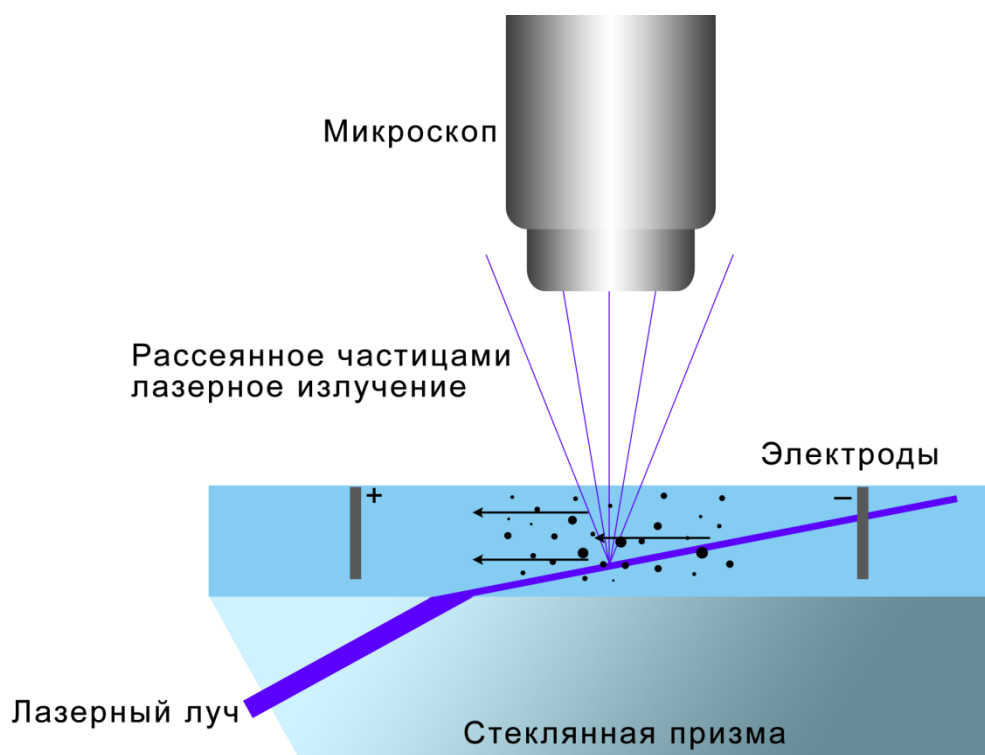


Рисунок 2.1 – Графическое изображение принципа работы АТН

Значительной областью применения АТН является анализ вирусных и вирусоподобных частиц [48], в том числе при изготовлении вакцин. Активный АТН разрабатывается для анализа экзосомы и микропузырьков при

клиническом диагнозе [49]. Использование флуоресцентно меченых антител против белков [50] на поверхности бионанатиков и режим флуоресценции прибора позволяет измерять общее количество и размеры экзосом, а также селективно меченную фракцию. Преимущества метода: видимость, простота, короткое время измерения, отсутствие сложных процедур подготовки проб, разумная стоимость, низкая стоимость расходных материалов.

2.2 Динамическое рассеяние света

ДРС позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости. Из этого коэффициента рассчитывается радиус нанообъектов. Вследствие броуновского движения дисперсных частиц или макромолекул в жидкости происходят флуктуации их концентрации. Результатом являются локальные неоднородности показателя преломления и флуктуации интенсивности рассеянного света при прохождении через такую среду луча лазера. Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света. Гидродинамический радиус частиц рассчитывается по формуле Стокса–Эйнштейна, связывающей их размер с вязкостью жидкости и коэффициентом диффузии.

Достоинства ДРС [51]: возможность работы в жидкой среде в условиях близких к естественным, простота пробоподготовки, оперативное получение распределения наночастиц по размерам, отсутствие воздействия на объект, простота эксплуатации, зависимость интенсивности рассеянного света от размера взвешенных частиц, обеспечивающая достаточно точное измерение распределение тяжелых частиц на фоне мелких.

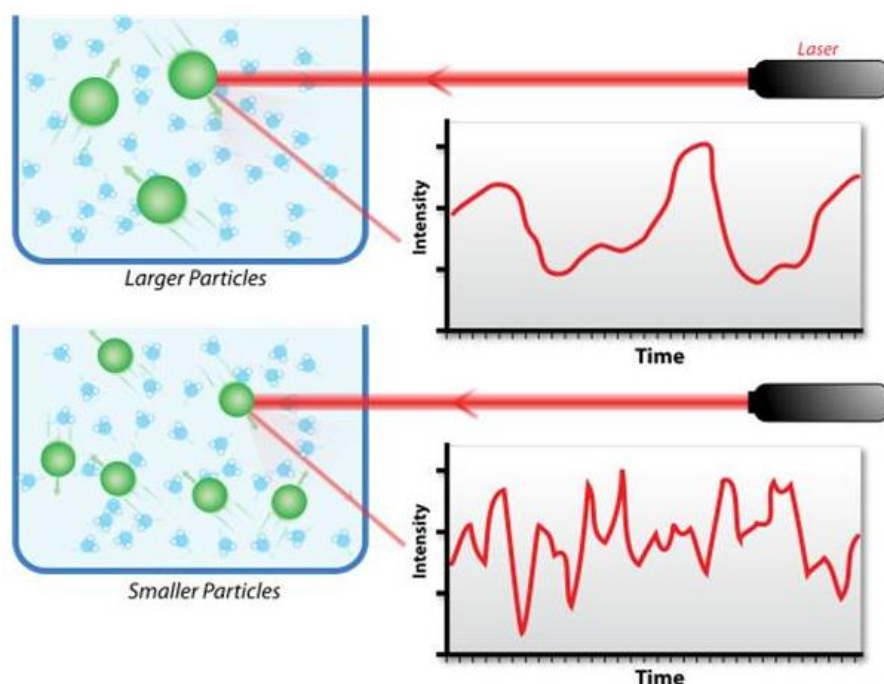


Рисунок 2.2 – Графическое изображение принципа работы ДРС

Недостатки: невозможность определения формы объектов, артефакты при наличии объектов сложной формы, необходимость подбора растворителя для гидрофобных нанопорошков, зависимость интенсивности рассеянного света от размера взвешенных частиц, затрудняющая измерение легких частиц на фоне тяжелых.

2.3 Стохастическая оптическая микроскопия

В методе используется последовательное возбуждение молекул, окрашивающих объект флуорофоров. Каждая молекула представлена как дифракционное пятно. Это возможно при использовании маломощного возбуждающего излучения, которое статистически надежно возбуждает небольшую долю присутствующих флуорофоров. Такой подход позволяет определить локализацию каждой флуоресцентной молекулы с нанометровой точностью. Повторяющиеся импульсы позволяют определить положение всех молекул, которые при наложении создают изображение с чрезвычайно высоким разрешением и точными координатами. Из-за короткого времени экспозиции и

высокой частоты кадров СОМ можно использовать для наблюдения за динамическими процессами в живых клетках. Трудность в получении их изображений - это сферические aberrации и рассеяние света в тканях.

Это приводит к потере фотонов каждого флуорофора и уменьшению точности локализации. Решением проблемы может быть использование первичных меток и яркого переключаемого флуорофора, излучающего в дальнем красном спектре. СОМ является удобным инструментом для определения локализации рецепторов на нейронах, молекулах внеклеточной матрицы мозга в синаптической и перисинаптической областях нейронов, что вносит существенный вклад в понимание их функций [52].

2.4 Основные результаты и выводы по разделу 2

1 Анализ траекторий наночастиц - метод визуализации и изучения наночастиц в растворах. В его основе лежит наблюдение за Броуновским движением отдельных наночастиц, скорость которого зависит от вязкости и температуры жидкости, а также размера и формы наночастицы. Это позволяет использовать данный принцип для измерения размера наночастиц в коллоидных растворах и суспензиях. В дополнение к размеру, одновременно возможно измерение интенсивности рассеянного света индивидуальной наночастицей, что позволяет разделять частицы по их материалу. Третьим измеряемым параметром является концентрация каждой из фракций наночастиц.

2 Методом динамического рассеяния света определяются гидродинамические радиусы белков, агрегатов и везикулярных частиц, в то время как методы статического светорассеяния позволяют получить молекулярные массы белков, ко-эффициенты их межмолекулярного взаимодействия и др. Такие исследования важны с точки зрения как фундаментальных проблем биофизики крови, так и диагностики заболеваний.

3 В методе используется последовательное возбуждение молекул, окрашивающих объект флуорофоров. Каждая молекула представлена как

дифракционное пятно. Это возможно при использовании маломощного возбуждающего излучения, которое статистически надежно возбуждает небольшую долю присутствующих флуорофоров. Такой подход позволяет определить локализацию каждой флуоресцентной молекулы с нанометровой точностью.

3 РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА АНАЛИЗА ЭКЗОСОМ ПРИ ПОМОЩИ ДЖОУЛЬМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

Сочетание возможностей ранее предложенных методических приемов с имеющимся у нас опытом использования относительно оригинальных приемов выделения и характеристики экзосом позволило предложить следующую методику анализа экзосом из разных источников.

Нами предположено, что джоульметрический способ позволяет выявлять экзосомы в самых разных биологических жидкостях. Этот подход дает возможность оценивать размеры присутствующих в растворе частиц и, тем самым, устанавливать возможную гетерогенность их препаратов. Практическое отсутствие в литературе ссылок на использование данной методики для изучения экзосом позволяет считать применение нами этого приема определенным вкладом, позволяющим оптимизировать стратегию их изучения. Применение джоульметрической камеры позволяет обнаруживать экзосомы в исходных препаратах, отслеживать кинетику их продукции различными клетками и контролировать качество получаемых препаратов экзосом на всех этапах их выделения.

3.1 Теоретическая основа джоульметрического метода

В основу джоульметрического метода [53, 54] положено соответствие между работой, совершаемой внешним источником электрической энергии, и изменением состояния исследуемого объекта. Если в качестве внешнего воздействия использовать ток $I(t)$, а в качестве параметра, характеризующего состояние объекта, изменение межэлектродного напряжения $U(t)$ во времени, то значения затраченной работы $A(t)$ на временном интервале $t_0 - t$ можно определить на основании следующей зависимости:

$$A(t) = \int_{t_0}^t I(t)U(t)dt. \quad (3.1)$$

Значение произведенной работы $A(t)$ находится на основании обработки зависимостей тока $I(t)$ и напряжения $U(t)$ во времени. Поэтому одновременно с оценкой джоульметрических характеристик в любой момент времени можно получать значение потребляемой объектом мощности $W(t) = I(t) \cdot U(t)$ и протекающих через ячейку зарядов $Q(t) = \int I(t)dt$. При этом наличие значений входного воздействия и отклика в виде набора выходных переменных позволяет определять передаточную функцию исследуемой системы и идентифицировать параметры элементов принятых эквивалентных схем замещения.

В джоульметрии используются два режима наложения входного воздействия: гальваностатический и потенциостатический[10].

В гальваническом режиме на электроды подается стабилизированный ток $I(t) = I_{const}$ и регистрируется зависимость падения напряжения на электродах от времени $U_{мэ}(t)$. Формирователь сигнала реализуется на основе стабилизированного источника тока.

В потенциостатическом режиме падение напряжения на электродах датчика поддерживается постоянным на заданном уровне либо меняется по определенному закону. При этом регистрируется зависимость изменения тока от времени $I(t)$.

После подачи стабилизированного тока на датчик, введенный исследуемый объект, на электродах начинает возрастать напряжение. Кривая зависимости межэлектродного потенциала от времени приведена на рис. 7. В начальный момент времени наблюдается резкий скачок напряжения, происходит заряд «двойного электрического слоя» (участок 1). Затем на датчике начинаются электрохимические реакции (участок 2). В результате в межэлектродном пространстве датчика снижается объемная концентрация ионогенных групп, вступающих в реакцию. Это приводит к увеличению объемного сопротивления датчика и, как следствие, постепенному увеличению межэлектродного напряжения. После вступления в реакцию всех ионогенных

групп, на данном энергетическом уровне, рост напряжения прекращается (участок 3) [10].

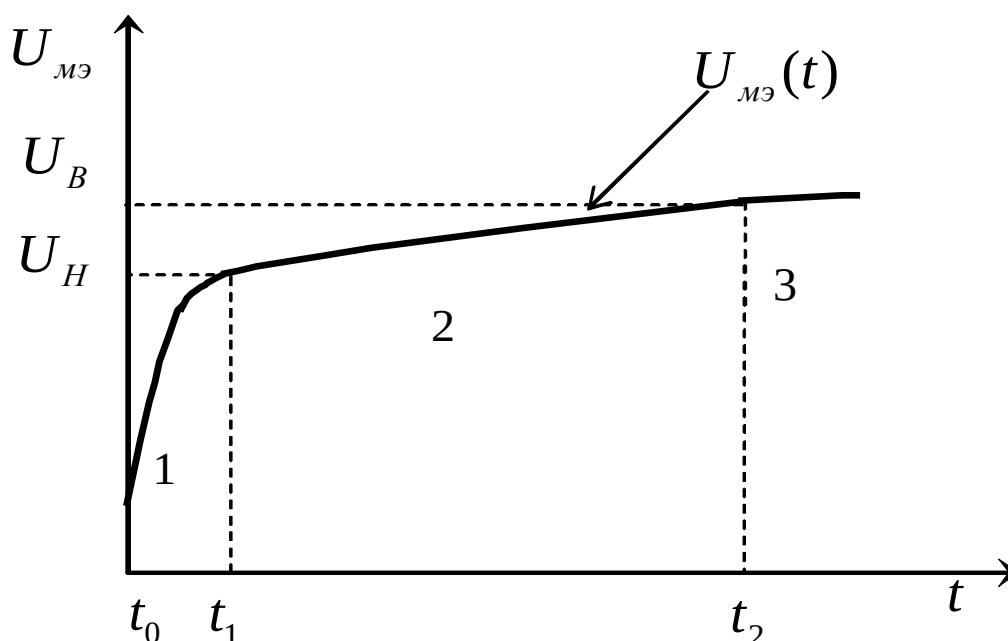


Рисунок 1.20 - Кривая зависимости межэлектродного напряжения от времени

Джоульметрический метод предполагает различные методы его реализации. В основном они зависят от способа входных воздействий и обработки сигналов при получении выходных параметров. Каждый конкретный метод исследований представляет собой определенную комбинацию применяемых способов и имеет свои достоинства и недостатки.

3.2 Теоретическое описание разработанной методики

Структурные элементы живой материи в любой момент протекания жизненного цикла подвергаются электрическим воздействиям и сами оказывают такое воздействие на окружающие элементы. Изучение информации о таких воздействиях, измерение их параметров и, в особенности, реакций на них, традиционно используются для постижения сути различных биологических процессов и медицинской диагностики.

Джоульметрический метод анализа экзосом основан на изучении свойств везикул путём наблюдения за их откликом на постоянное внешнее

электрическое воздействие. Для этого в исследуемый объект вводятся электроды, в результате образуется система «электрод – биообъект – электрод», которая становится неким датчиком, способным характеризовать свойства среды, заключаемой в образуемом межэлектродном пространстве. В качестве регистрируемых параметров наиболее часто при этом выступают значения пропускаемого через электроды тока и вызванного им падения напряжения на электродах во время электрического воздействия, т.е. снятии вольтамперных характеристик. [56].

Суть данного метода заключается в регистрации происходящих в организме человека патологических процессов, отражающихся на изменении электрохимических свойств экзосом исследуемых биологических жидкостей.

Устройство включает в себя: генератор сигналов, куда вводятся определенные параметры электрохимическую ячейку с активными электродами (посредством которых осуществляется воздействие на исследуемые биологические жидкости), микроскоп, видеокамера для микроскопа, персональный компьютер.



Рисунок 3.13 – Структурная схема созданного устройства для анализа
ЭКЗОСОМ

С генератора сигналов постоянный ток $I(t)$ поступает на электрохимический объект. Электроды, размещенные в нем, используются в качестве датчика. Воздействие постоянного тока приводит к перемещению жизнеспособных частиц, которые наблюдаются в микроскопе. Видеокамера, подключенная к микроскопу, позволяет наблюдать все эти перемещения на мониторе персонального компьютера. Данные перемещения анализируются и рассчитываются с помощью ПК, что позволяет определить необходимые параметры.

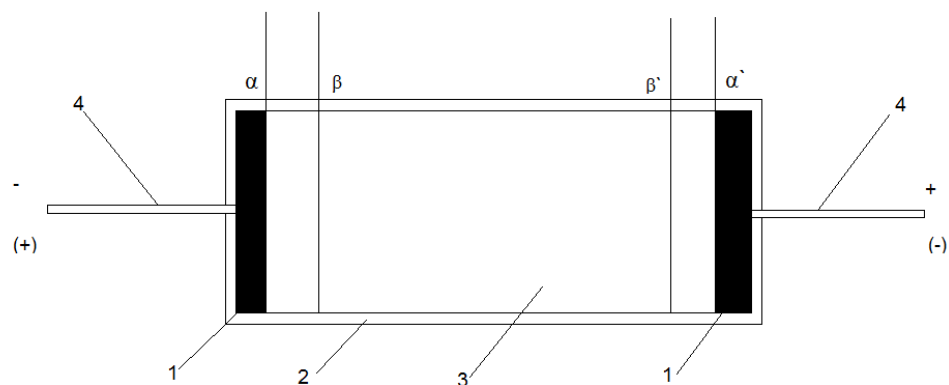
Контактные датчики характеризуются явлением массопереноса веществ, участвующих в электрохимических преобразованиях. Этот процесс осуществляется за счет диффузии и миграции. В каждой точке объема межэлектродного пространства датчика соблюдается первый закон Фика

$$-J_0(x, t) = D_0 \frac{dC_0(x, t)}{dx} \quad (5)$$

Согласно закону, поток веществ на поверхности электрода $-J_0(x, t)$ пропорционален коэффициенту диффузии деполяризатора D_0 и градиенту концентрации окисленной формы вещества $C_0(x, t)$ в момент времени t на расстоянии x от поверхности электрода.

В основу электрохимических метод положен принцип действия электрохимической ячейки. Ее схематическое изображение показано на рисунке 1.21. Ячейка содержит два электрода, корпус, электролит и выводы закрепленные в корпусе.

В ячейке электроды a и a_1 находятся в контакте с электролитом b и b_1 . У поверхностей электродов образуются реакционные промежутки ab и ab_1 , которые называют двойным электрическим слоем. В них происходят основные электрохимические процессы превращения и обмена зарядом.



Рисунок

Принцип действия электрохимической ячейки основан на прохождении постоянного тока через электролиты. Электрическое поле создается электролитом. При отсутствии внешнего электрического поля движение ионов носит хаотический порядок. В процессе воздействия поля, помимо хаотического движения, возникает упорядоченное перемещение ионов в направлении поля

Все процессы происходящие в ЭЯ протекают за счет прохождения тока от внешнего источника. Он представляет собой скорость потока положительных зарядов от α к α' во внешней цепи. Прохождение тока через ячейку сопровождается фарадеевским процессом и процессом формирования двойного электрического слоя.

В соответствии с законами Фарадея, величина тока в цепи определяется зависимостью

$$I = F \frac{dn_{e^-}}{dt}, \quad (6)$$

Где I – ток, F – постоянная Фарадея (96493), t – время

В электрохимической ячейке протекают следующие реакции

На аноде $X_j = X_j^+ + e^-(\alpha)$

На катоде $X_j^+ + e^-(\alpha') = X_j$

Где $X_{j,i}$ – восстановленная формула носителей, $X_{j,i}^+$ – окисленная формула носителей.

При изменении направления тока через ячейку α становится катодом, α' анодом, поэтому реакции на электродах протекают в противоположных направлениях. Внутри ячейки заряд между α и α' переносится либо окисленной, либо восстановительной формой носителей. По внешней цепи заряд переносится электронами [11].

На границе раздела фаз между электродом и электролитом возникают двойные заряженные электрические слои. Один слой несет положительный заряд, а другой отрицательный, подобно обкладкам заряженного конденсатора. На рисунке... показано распределение зарядов и изменение потенциала в двойном электрическом слое. Согласно Гуи, слой заряда, находящийся в электролите, несколько размыт. Поэтому разность потенциалов между электродом и электролитом падает с увеличением расстояния от поверхности электрода.

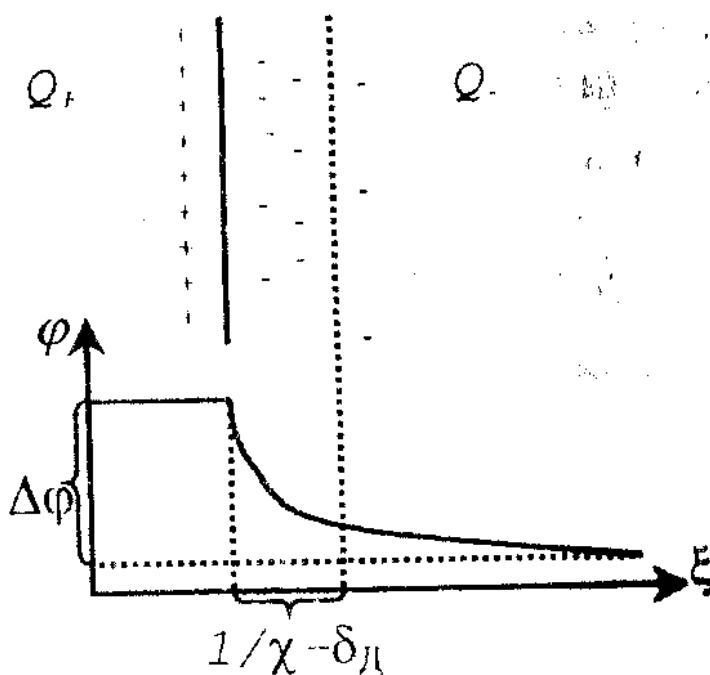


Рисунок 1.22 – Распределение зарядов и изменение потенциала в двойном электрическом слое

За счет электростатического взаимодействия в двойном электрическом слое создается повышенная плотность зарядов, зависящая от разности

потенциалов между точками в нем и в середине раствора. Объемная плотность зарядов и электрический потенциал связаны следующим соотношением:

$$\rho = F \sum z_j c_j e^{\frac{z_j F}{RT} \Delta \Phi} \quad (7)$$

Где c_j - концентрация ионов; z_j – их заряд; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Влияние двойного электрического слоя связано не только с расходом части энергии на его заряд, но и в существенной степени на кинетику электродных процессов.

Фарадеевский процесс и процесс формирования двойного электрического слоя сопровождается изменением напряжения межэлектродного датчика [11].

На рисунке показана схема формирования уровней потенциалов электрохимической ячейки, в зависимости от расстояния относительно поверхностей электродов, при пропускании токов.

Согласно схеме, напряжение, фиксируемое на электродах, складывается из трех частей, соответствующих трем межфазным границам:

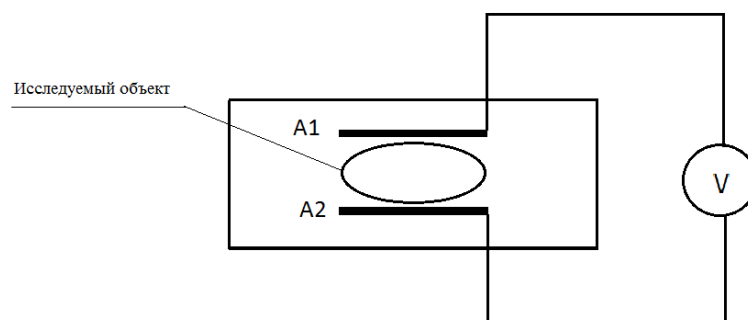
$$E = (\Phi_1 - \Phi_2) + (\Phi_2 - \Phi_3) + (\Phi_3 - \Phi_1) \quad (8)$$

Потенциалы фаз $(\Phi_1 - \Phi_2)$ и $(\Phi_3 - \Phi_1)$ характеризуют процессы, происходящие вблизи поверхностей электродов, а $(\Phi_2 - \Phi_3)$ в электролите. Электрохимические реакции приводят к изменению во времени значений напряжений каждой фазы соотношения.

Потенциалы фаз характеризуются значением перенапряжения η . Связь между его величиной и потенциалами электродов определяется выражением:

$$\eta = E - E_0 \quad (9)$$

где E потенциал электрода под током; E_0 - равновесный потенциал.



Рисунок

Если экзосому поместить в электрическое поле, то ее мембрана представляет собой барьер для проникновения поля внутрь. Вклад в общий дипольный момент, в большей степени, вносит смещение двойного электрического слоя вокруг экзосомы. В результате дипольный момент везикулы совпадает с направлением поля. Так как одноименные полюса отталкиваются, электроды, формирующие электрическое поле будут создавать силы отталкивания для диполя (рисунок 3.2.2).

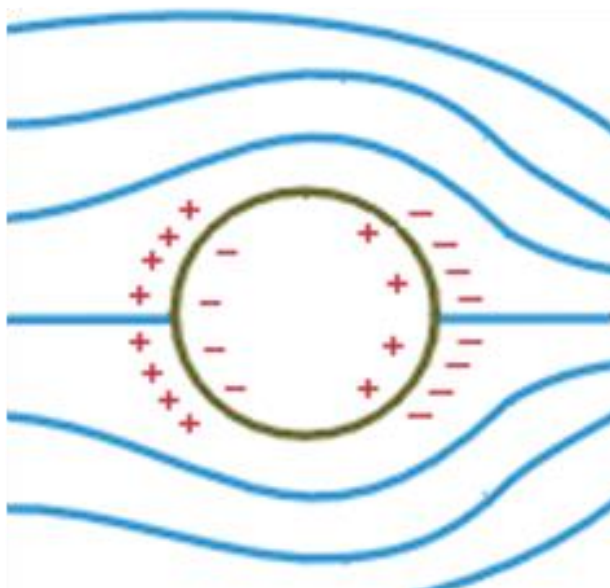


Рисунок 3.14 – Графическое изображение экзосомы в электрическом поле

По пройденному пути и совершённой работе экзосомами, возможно определить такие характеристики, как потенциал, концентрация, размер, и

сравнить со значениями нормы, в результате чего, выявить патологический процесс даже на ранней стадии.

3.3 Описание этапов процесса диагностики рака яичников

Проводят сбор периферической крови в вакутейнер или другие пробирки для сбора и консервирования крови.



Рисунок 3.15 – Изображение этапа забора крови у пациента

Кровь разделяют на плазму и клеточную фракцию путем центрифугирования при 300 g в течение 10 мин. Клеточную фракцию крови подвергают последовательной обработке буферным раствором PBS (10 mM фосфатный буфер, 0,15 M NaCl, pH 7,5), содержащим 5 mM ЭДТА (5 мин инкубация с последующим центрифугированием 20 минут при 300 g, сбор супернатанта №1), затем обработке клеток равным объемом 0,15-0,35% раствора трипсина в PBS (5 минут инкубация, добавление ингибитора трипсина, перемешивание с последующим центрифугированием 20 минут при 300 g, сбор супернатанта №2).



Рисунок 3.16 – Графическое изображение последовательности этапов

Плазму и полученные супернатанты из клеточной фракции, содержащие экзосомы, связанные с поверхностью форменных элементов, объединяют и используют в качестве исходного материала для получения суммарного пула экзосом крови. Для этого из объединенного образца удаляют клеточный дебрис центрифугированием при 15000-20000 g в течение 10-20 минут, частицы неэкзосомального происхождения удаляют путем фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм, экзосомы осаждают ультрацентрифугированием при 100000-160000 g в течение 60-120 минут.

В результате получают суммарный пул экзосом крови, который включает экзосомы плазмы и экзосомы, связанные с поверхностью клеток крови, что позволяет повысить выход целевого продукта и в последующем повысить чувствительность диагностических систем путем увеличения количества диагностического материала в анализе.

После извлечения экзосом необходимо провести их анализ по таким параметрам, как: потенциал, концентрацию, диаметр. Для этого мы используем электрохимическую ячейку. В результате процесса получаем визуализацию везикул на экране и необходимые нам параметры

3.4 Основные результаты и выводы по разделу 3

1 Разработанный алгоритм получения джоульметрического сигнала для оценки литогенности желчи прост и понятен в использовании. Учитывая основные особенности желчи, необходимо ее разведение дистиллированной водой для получения гомогенной смеси, а так же для снижения эффекта обволакивания жирными кислотами электродов, что может привести к нарушению прохождения электрохимической реакции. Операции по забору желчи, ее разведению и размещению в ячейке, как видно из алгоритма, ручные, однако все дальнейшие этапы по получению и обработке сигнала, а также по принятию окончательного диагностического решения автоматизированы, что сокращает время проведения процедуры до 2 - 4 минуты.

2 Полученный алгоритм в дальнейшем позволяет сформировать задачу создания и поиска основных компонентов прибора для оценки литогенности желчи, сформулировать требования к экспериментальному образцу, что позволит избежать ошибок при конструировании и программировании диагностического средства.

3 Исходя из проведенных исследований, необходимо отметить, что введение в исследование литогенности желчи модифицированного четырехэлектродного датчика позволяет контролировать отсутствие воздуха в датчике, производить дезинфекцию и стерилизацию рабочей части устройства, менять силиконовую трубку при работе с обсемененным материалом, а также снижать уровень шума на более высоких выходных напряжениях. Считаем использование нового датчика более рациональным для решения задач по оценке электрохимических свойств желчи.

4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЖОУЛЬМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ЭКЗОСОМ

4.1 Результаты экспериментального исследования экзосом больных раком яичников

Работа выполнена на клинической базе Университетской клиники города Фрайбург (Германия) – в отделении гинекологии, исследования проводились в научно-исследовательской лаборатории по работе с экстрацеллюлярными везикулами.

Для оценки состояния экзосом были предоставлены следующие материалы:

- образцы замороженной культуры OVCAR-8
- показатели экзосом РЯ в норме

Использовались образцы замороженной клеточной культуры OVCAR-8 от 09.07.15, с пассажем 5, полученных при биопсии рака яичников. Для независимого анализа производилось 3 посадки культуры в различные промежутки времени.

Для культивирования использовались:

- культуральные чашки объемом 75 см²;
- питательная среда RPMI 1640 с L-глутамином и инкубационными условиями 37°C и 5% CO₂;
- пассажирование производилось с использованием 0,05% раствора трипсина и EDTA. Изображение клеточной культуры представлено на рисунке 4.1.

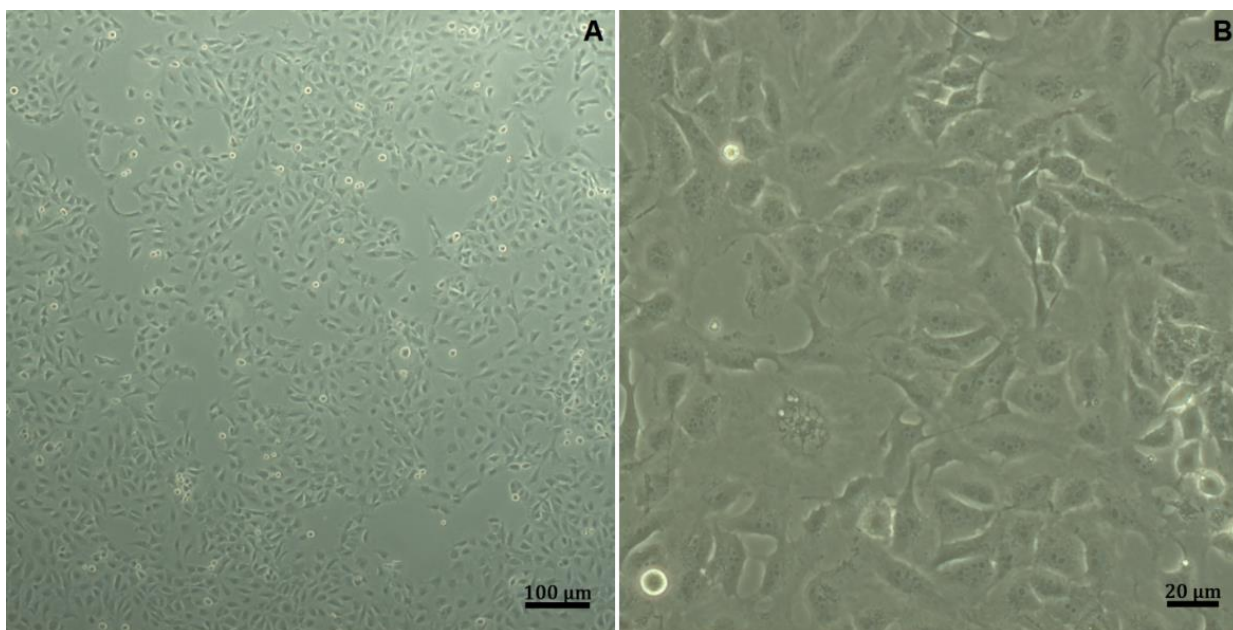


Рисунок 4.1 – Клетки OVCAR-8 день 3; А – увеличение x5, В – увеличение x20

При достижении показателей роста 80-85% был произведен перенос клеточной линии в трехмерную среду «3D CoSeedis» со 100 ячейками на см² от производителя Applied Biomedical Concepts (рисунок 4.2) с предварительной суточной эквilibрацией.

На протяжении 7 дней клетки культивировались в данной трехмерной среде.

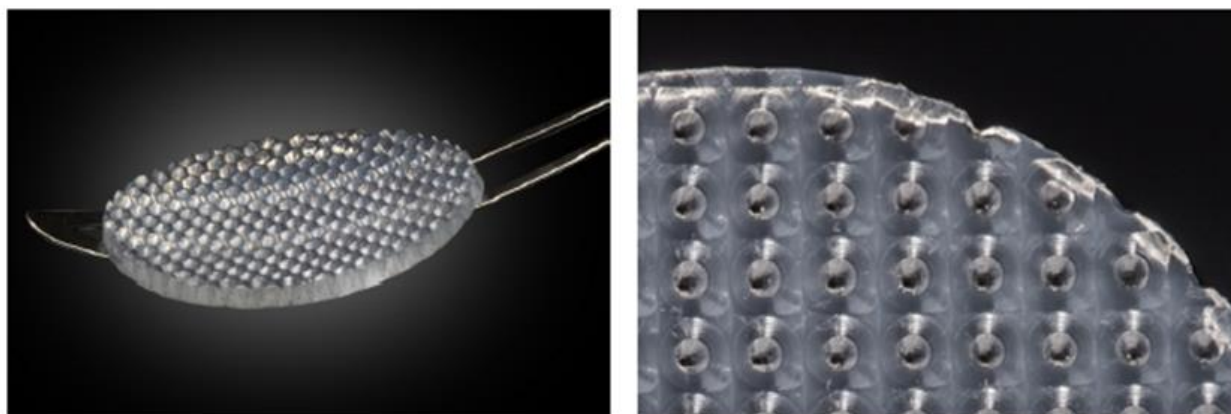


Рисунок 4.2 – Макроизображения «3D CoSeedis»

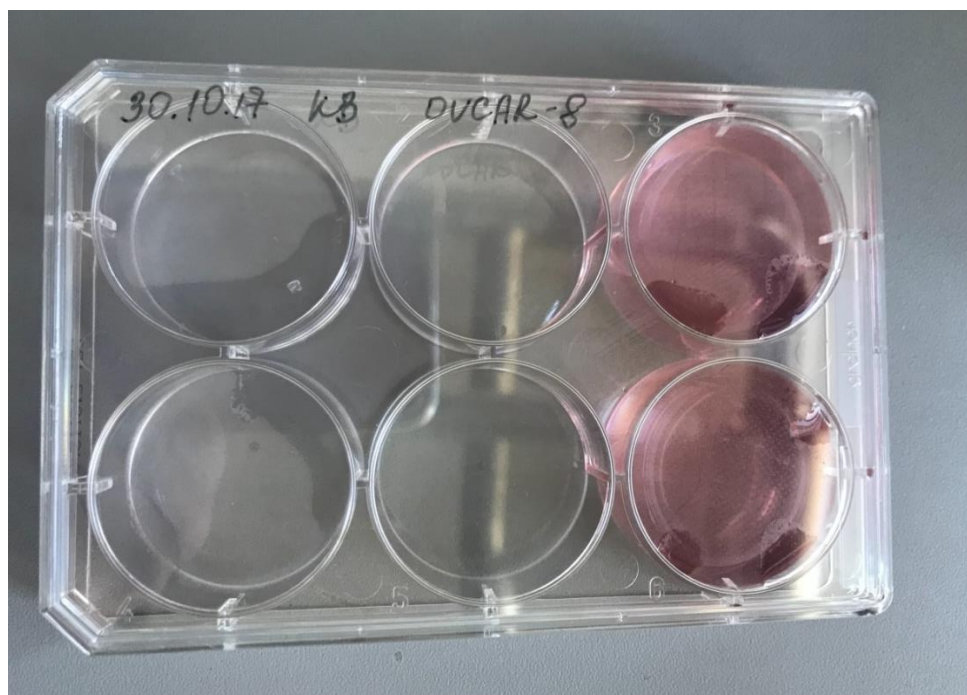


Рисунок 4.3 – Внешний вид «3D CoSeedis».

Данный вид выращивания клеточных культур предпочтительнее, так как данные условия наиболее приближены к условиям в организме человека. Изображение клеточной трехмерной культуры, выполненное при помощи электронного микроскопа, представлено на рисунке 4.4. Было выбрано 3 дня для показательной разницы роста клеток.

Для получения фракций экстрацеллюлярных везикул использовался протокол изолирования экзосом. Алгоритм протокола заключается в последовательном центрифугировании образцов клеточных культур при различных параметрах скорости, от 800G до ультрацентрифугирования с использованием центрифуг Megafuge 16R, Avanti J-301 и Optima LE-80K соответственно. При этом на каждом из этапов центрифугирования формировались соответствующие фракции экстрацеллюлярных везикул с различными размерами и массой, условно названные EV5, EV12 и EV120 (экзосомы), а также свободноциркулирующая жидкость после ультрацентрифугирования. Схематично протокол изолирования экзосом изображен на рисунке 4.5.

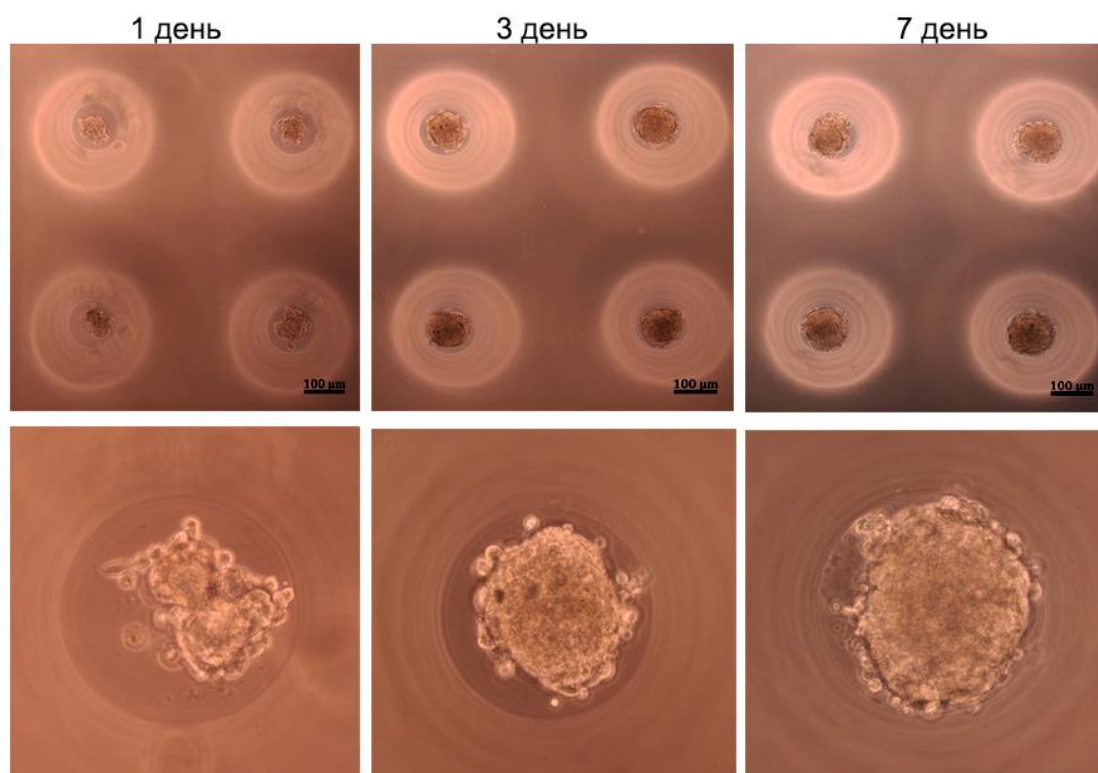


Рисунок 4.4 – Клетки OVCAR-8 в трехмерной среде

После процедуры криоконсервирования, некоторое количество экзосом деформируются, поэтому сразу после процедуры изолирования проводилась обработка образцов глутаральдегидом и ацетатом уранила для электронной микроскопии (рисунок 4.6), измерение физических параметров экзосом на устройствах для анализа траекторий наночастиц и динамического рассеяния света.

Для данного этапа использовались ParticleMetrix NANO-flex® - 180° DLS и ParticleMetrix NTA ZetaView.

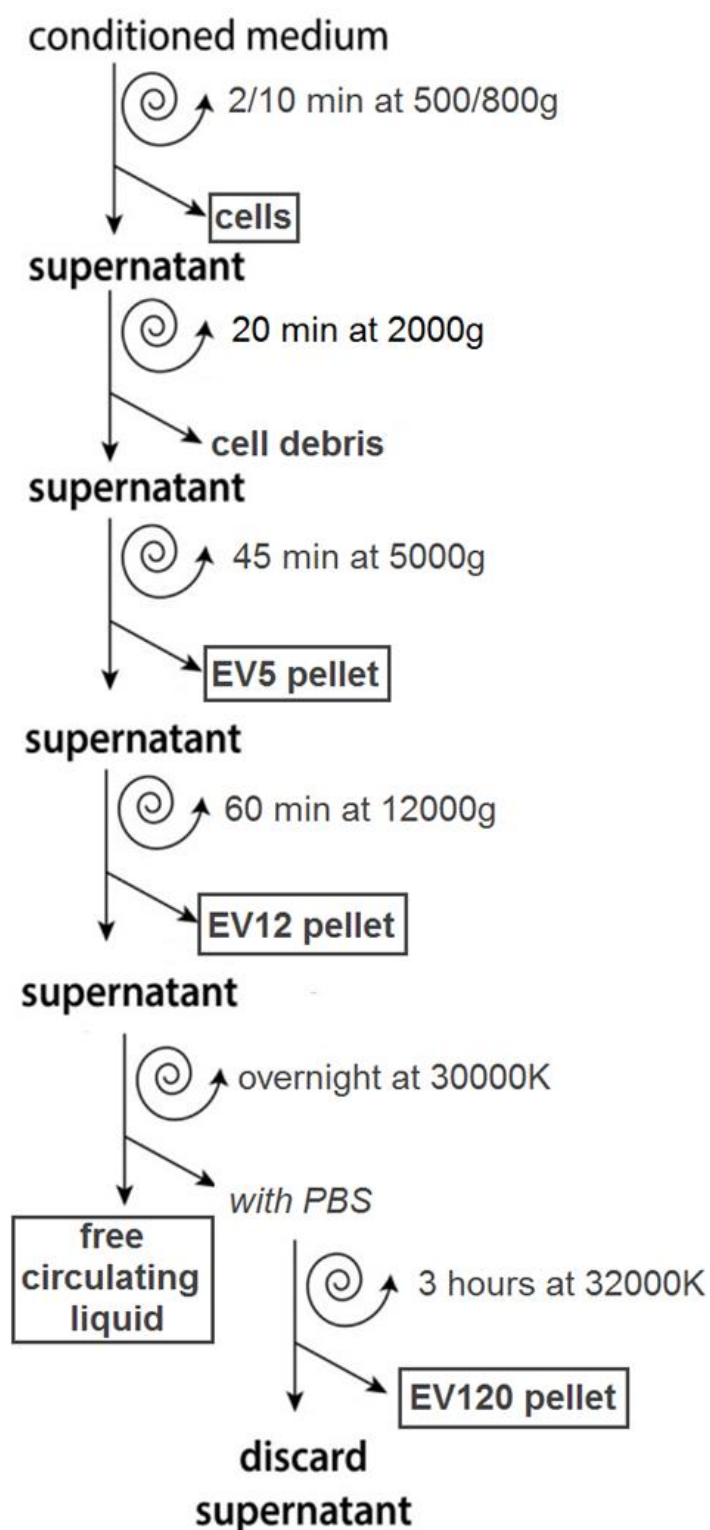


Рисунок 4.5 – Дифференциальное центрифугирование, используемое для получения различных фракций экстрацеллюлярных везикул

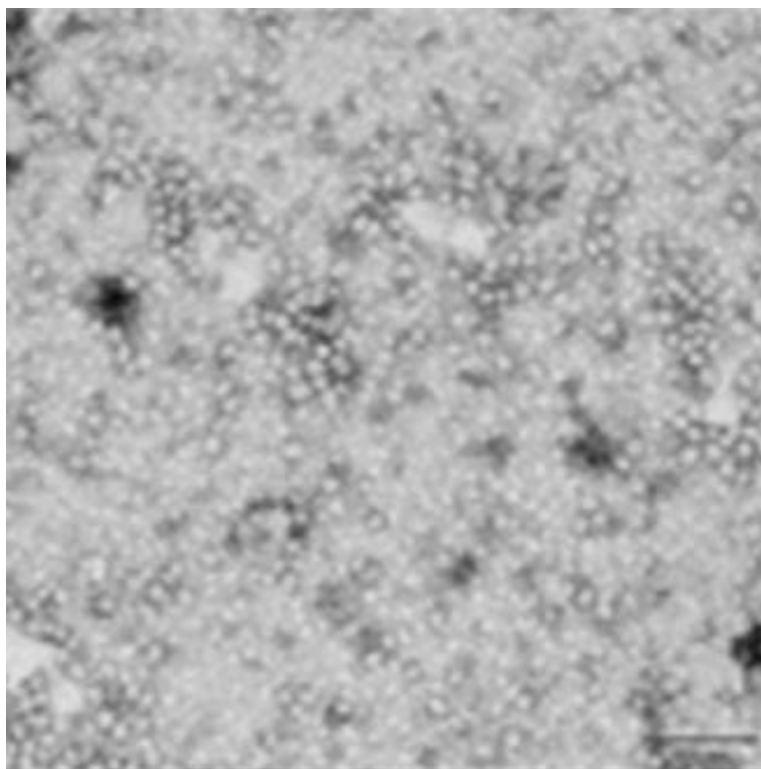


Рисунок 4.6 – Фото образца EV120 OVCAR-8, выполненное с помощью электронной микроскопии



Рисунок 4.7 – Изображение системы ParticleMetrix NANO-flex® - 180 DLS

Система для характеристики коллоидных растворов методом динамического рассеяния света предназначена для работы в пределах диапазона частиц размером от 0.8 нм до 6.5 мкм. Рассчитана для материалов, концентрация которых изменяется от ppm до 40% объемных, в зависимости от типа вещества. Минимум образца - 1 капля. Nanotrac® применяет принцип 180°гетеродинного обратного отражения, запатентованный Microtrac Inc., характеризуется ее высоким разрешением в Нано диапазоне.

Таблица 4.1 – Технические характеристики система ParticleMetrix NANO-flex® - 180° DLS

Метод измерения	Динамическое светорассеяние (спектроскопия биения света), угол рассеяния – 180°, лазер служит источником несущего сигнала при гетеродинировании
Аналитический метод	Расчет размеров частиц по спектральной плотности мощности доплеровских сдвигов
Диапазон размеров	От 0.8 до 6500 нм
Оптический зонд	Одномодовое оптоволокно с сапфировым окном на выходном торце. Диаметр зонда 8 мм, длина – 1 м. Регулируемая подставка под ёмкость с образцом
Источник	Лазер, 780 нм, 5 мВт
Вид образцов	Растворы полимеров, дисперсии и суспензии в органических растворителях и воде
Управление	Сетевой адаптер на 24 В (масса 1 кг). На входе: 100–240 В, 50/60 Гц, 90 вольт-ампер

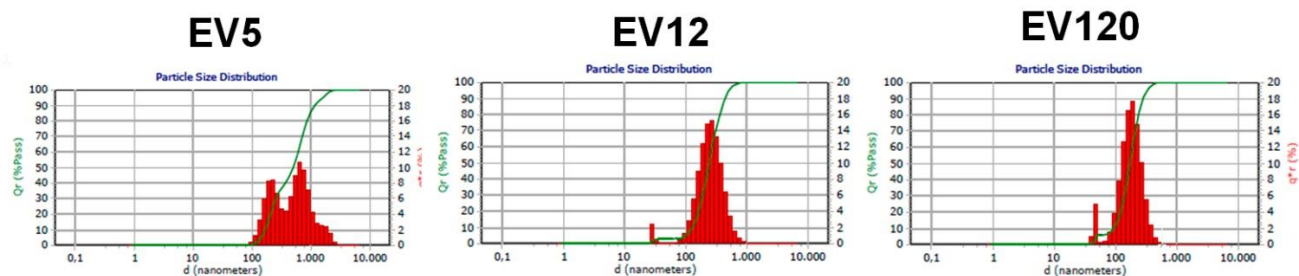
Исследование образцов с широким распределением частиц по размерам является преимуществом анализатора размеров NANO-flex. Образцы с высокой

Данная система использовалась для распределения концентрации и частиц по размерам в коллоидном растворе. Результаты обрабатываются автоматически и представляются в формате PDF (рисунок 4.8). Некоторые технические характеристики приведены в таблице 4.8.

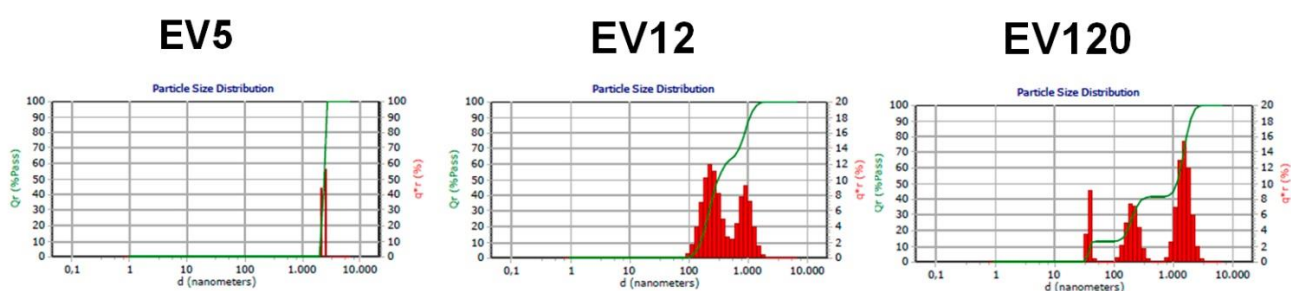


56

Образец № 1



Образец № 2



Образец № 3

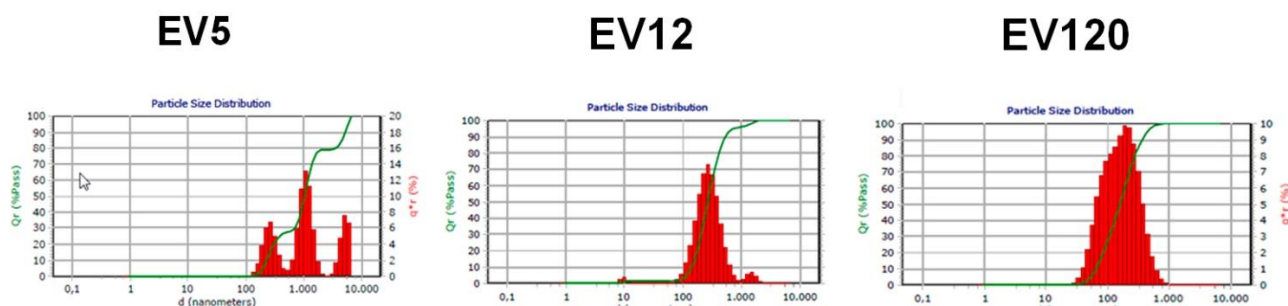


Рисунок 4.9 – Изображение графиков по результатам DLS

На графиках наглядно представлены результаты. По данным видно, что во всех онкообразцах преобладает концентрации фракции EV120 (экзосомы). Что подтверждает предположение о корреляции концентрации экзосом и развитием патологического процесса. Подробные данные по каждому из образцов приведены в приложении 1.

Следующим этапом является анализ экзосом данных образцов на ParticleMetrix NTA ZetaView. Система использовалась для оценки электрического потенциала экзосом имеющихся образцов, измерения концентрации и диаметра экзосом.



Рисунок 4.10 – Изображение системы ParticleMetrix NTA ZetaView

Результаты представляются в формате PDF (рисунок 4.11), а так же числовые подробные данные в Excel, по которым вручную оформляются графики. Некоторые технические характеристики приведены в таблице.

Видеомикроскоп Zetaview визуализирует результаты, полученные при измерении светорассеяния на броуновских частицах во внешнем электрическом поле. Принцип работы микроанализатора основывается на классическом микроэлектрофорезе, дополненном современными моделями для анализа межфазового взаимодействия коллоидных частиц. Сканируемое поле может содержать до нескольких тысяч индивидуальных агрегатов (размером от 80 нм до 10 мкм), для которых строится мультимодальное распределение по размерам и зета-потенциалу.

Таблица 4.2 – Технические характеристики система ParticleMetrix NTA ZetaView

Измеряемые параметры	Зета-потенциал (микроэлектрофорез), гидродинамический диаметр (фотооптическая съемка частиц, находящихся в броуновском движении)
Измерительный модуль	Лазерный видеомикроскоп с возможностью индивидуального мониторинга движения частиц. Автоматическая юстировка и фокусировка
Оптическая система	10 линз и цифровая камера с разрешением 640 x 480 (30 и 60 кадров в секунду). Красный твердотельный лазер, 650 нм (модель PMX 101) Синий твердотельный лазер, 405 нм (модель PMX 102)
Вид образца	Водные дисперсии, растворы в полярных средах (мин. объем 3 мл)
Программное обеспечение	Управление измерениями и юстировкой. Индивидуальный мониторинг движения отдельных частиц. Определение зета-потенциала, расчет распределения частиц по размерам. Расчет статистических показателей. Экспорт и печать результатов
Метод измерения	Измерение электрофоретической подвижности с пересчетом в зета-потенциал по уравнению Смолуховского. Расчет размеров частиц по формуле Стокса
Обработка результатов	Результаты в виде видео- и текстовых файлов, pdf-отчеты, сводные диаграммы и т.д.

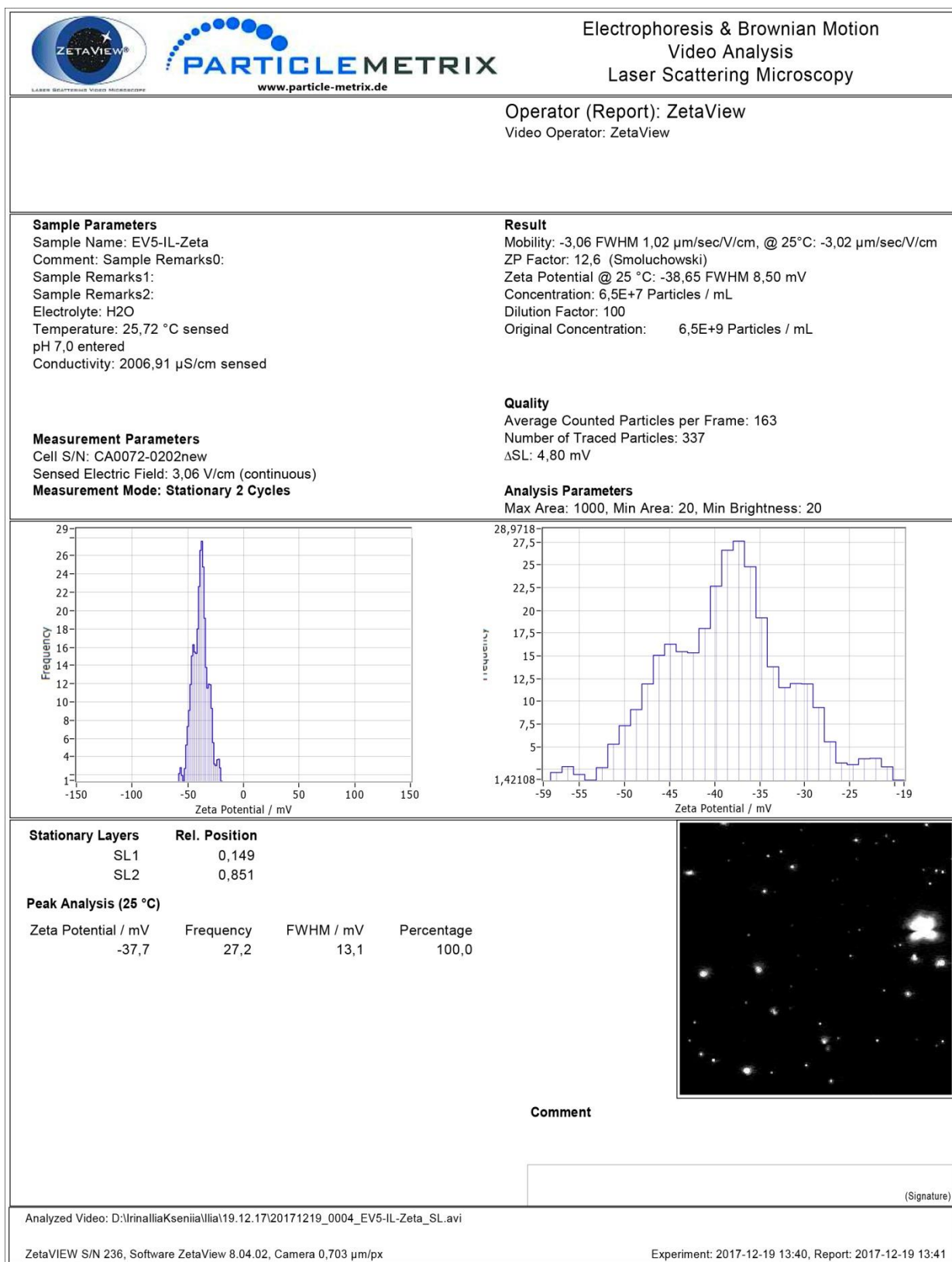
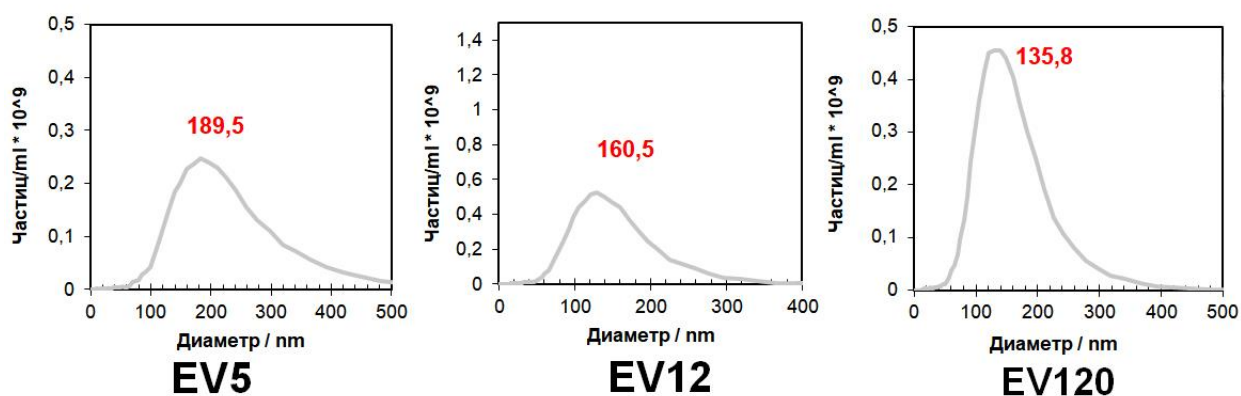


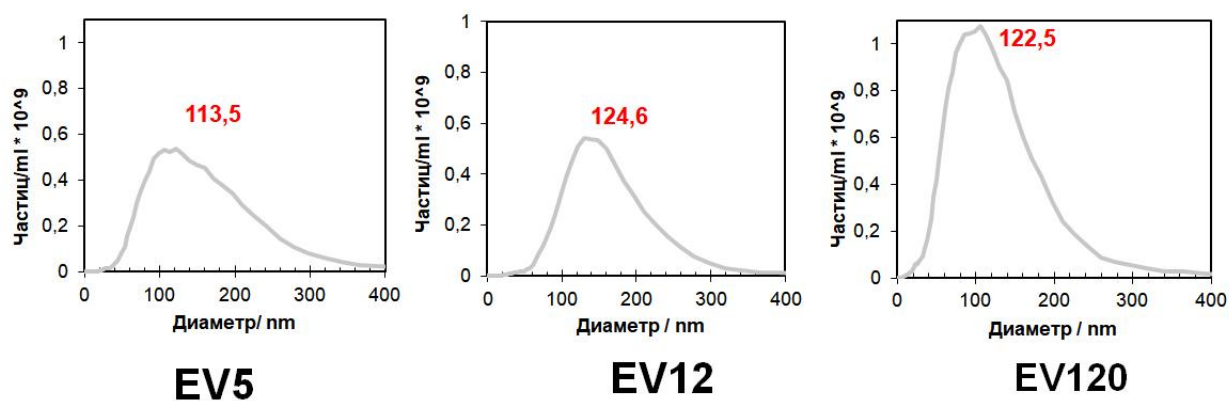
Рисунок 4.11 – Изображение представления результатов АТН

Ниже приведены сравнительные результаты по трем анализируемым образцам (рисунок 4.12).

Образец № 1



Образец № 2



Образец № 3

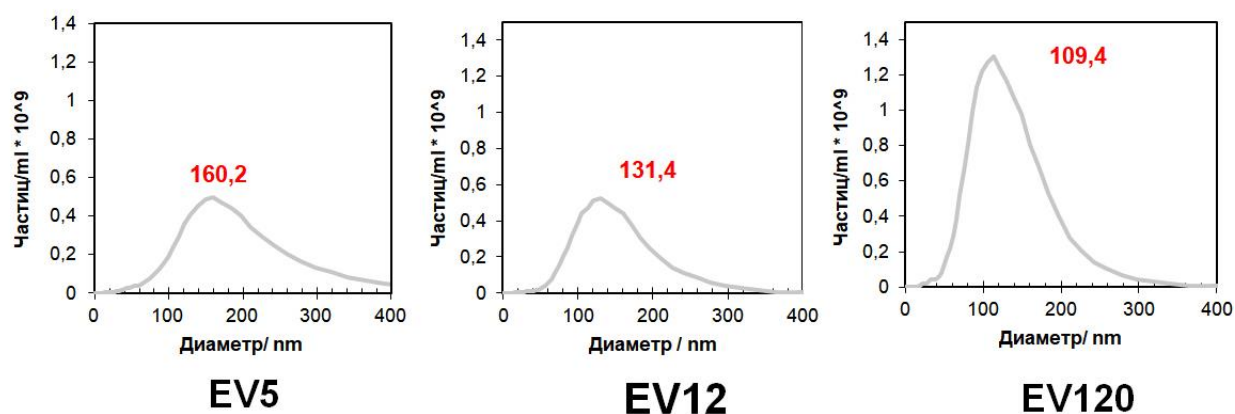


Рисунок 4.12– Изображение графиков по результатам АТН

Полученные графики распределения концентрации и размеров везикул позволяют утверждать, что при наличии онкопроцесса концентрация и размер

фракции EV120 (экзосом) возрастает. Подробные данные анализа методом АТЧ представлены в приложении 2. Так же было произведено измерение электрического потенциала данных проб, результаты представлены в таблице 4.1.3. Данные нормы предоставлены сотрудниками научной лаборатории по изучению экстрацеллюлярных везикул Университетской клиники города Фрайбург, Германия.

Таблица 4.3 – Результаты измерений электрического потенциала и мобильности экзосом исследуемых образцов

	Норма		Образец №1		Образец №2		Образец №3	
	EV12	EV120	EV12	EV120	EV12	EV120	EV12	EV120
Потенциал (mV)	61,8	64,1	36,9	36,5	34,4	34,1	33,5	36,1
Мобильность	10,1	11,7	3,06	2,79	2,98	2,64	2,81	2,76

На основании полученных данных делаем вывод, что при наличии онкопатологии яичников, электрический потенциал экзосом изменяется, а именно – повышается. Следовательно, данный критерий является значимым в диагностике РЯ.

4.2 Результаты экспериментального исследования работоспособности анализатора экзосом на основе джоульметрического метода

Работа выполнена на базе кафедры «Медицинская кибернетика и информатика» Медицинского института Пензенского государственного университета (МИ ПГУ).

Работа анализатора совершается под действием постоянного тока. Управление генератором и корректировка сигналов при помощи ПК.

Для эксперимента была разработана электрохимическая ячейка в виде предметного стекла (**рисунок 1.27**), на котором располагаются два активных электрода.

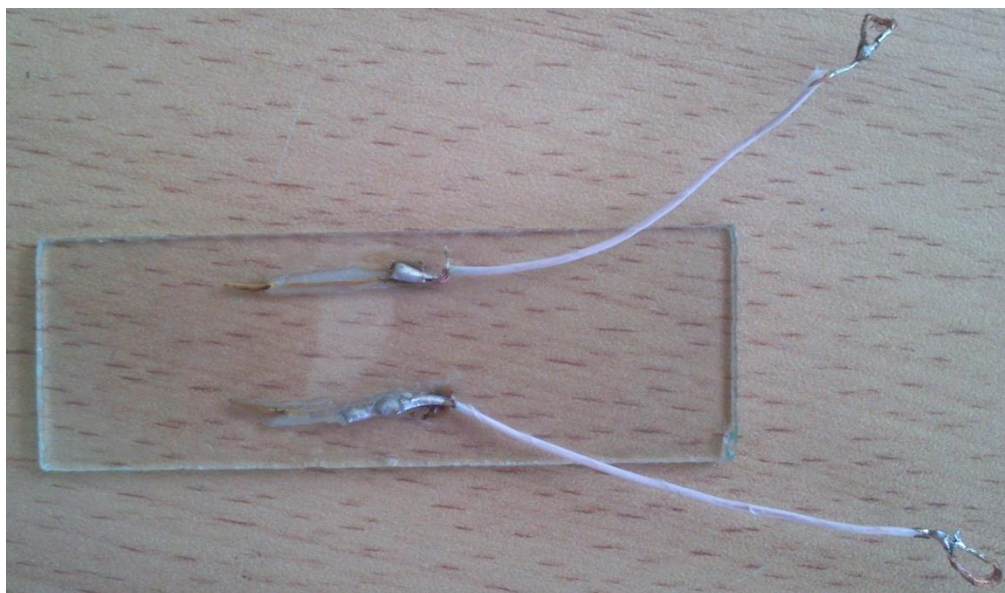


Рисунок 4.13– Изображение электрохимической ячейки

Взаимное расположение электродов подбирается таким образом, чтобы двойные электрические слои, образующиеся у их поверхности, не перекрывали друг друга.

Основной недостаток твердых электродов заключается в загрязнении их поверхности и образовании пленки из продуктов реакций в процессе работы. Кроме того, с течением времени электроды могут адсорбировать поверхностно-активные вещества. Это ухудшает воспроизводимость результатов. В связи с этим необходимо проводить тщательную предварительную механическую обработку поверхности электродов перед началом их использования.

Проверка работоспособности данного комплекса и отработка методики проведения эксперимента направленного на идентификацию частиц в электрическом поле проводилась на хлореллах, в связи с отсутствием материала экзосом. Общий вид комплекса изображен на рисунке 4.13.

Качество получаемых результатов при использовании разработанного метода во многом определяется режимами работы формирователя входных воздействий, а точнее, его способностью обеспечить стабильный, вне зависимости от состояния объекта и внешних условий сигнал заданной формы.



Рисунок 4.13 – Внешний вид электрокинетического анализатора

В измерительной ячейке на клетки воздействовали однородным постоянным электрическим полем со следующими параметрами: напряженность электрического поля 105 В/м, градиент напряженности электрического поля 1011 В/м², частотный диапазон $5 \cdot 10^4 - 10^6$ Гц.

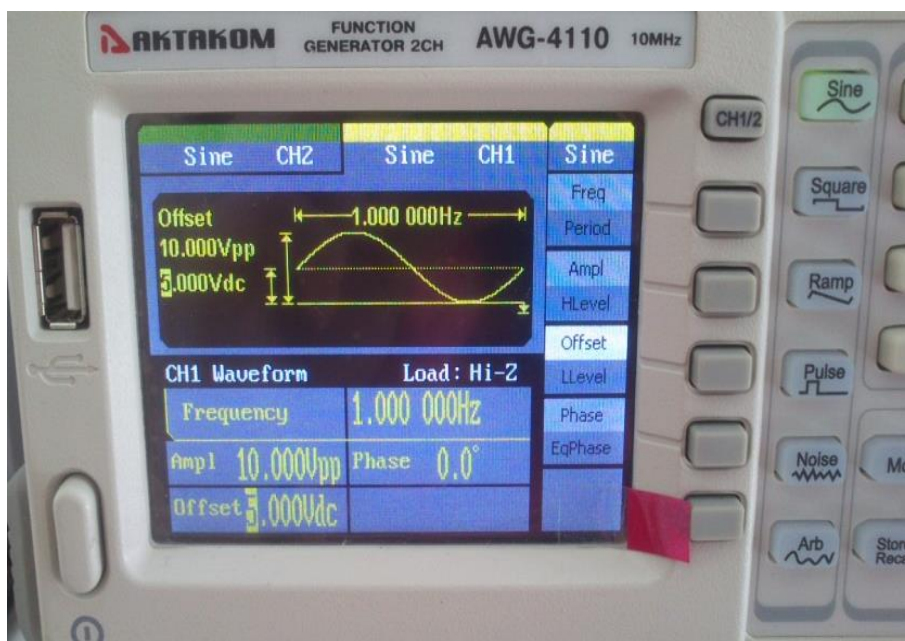


Рисунок 4.14 – Фото дисплея с заданными параметрами

Анализируемый материал (хлореллы) поместили в электрохимическую ячейку. В норме, в процессе воздействия поля, возникает их упорядоченное перемещение в направлении поля с определенной скоростью. Результат визуализации представлен на рисунках 4.14 и 4.15.

С помощью программы AVerTV 6 на ПК, перемещения частиц визуализируются, сохраняются и в дальнейшем обрабатываются.

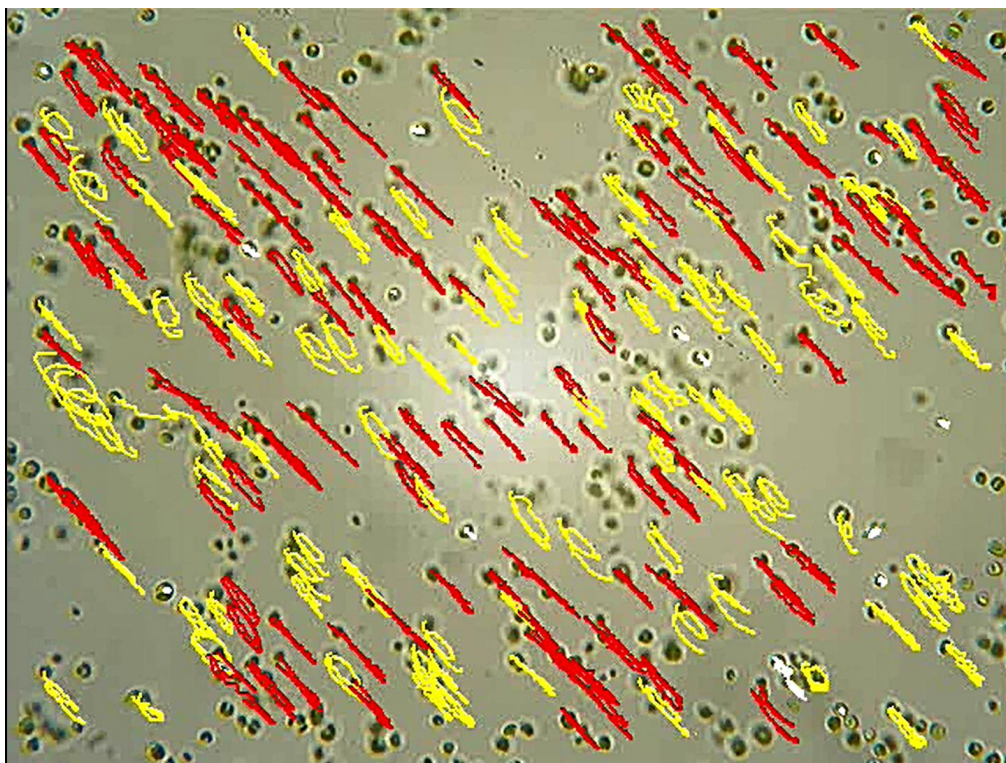


Рисунок 4.15 – Изображение динамики перемещения хлорелл

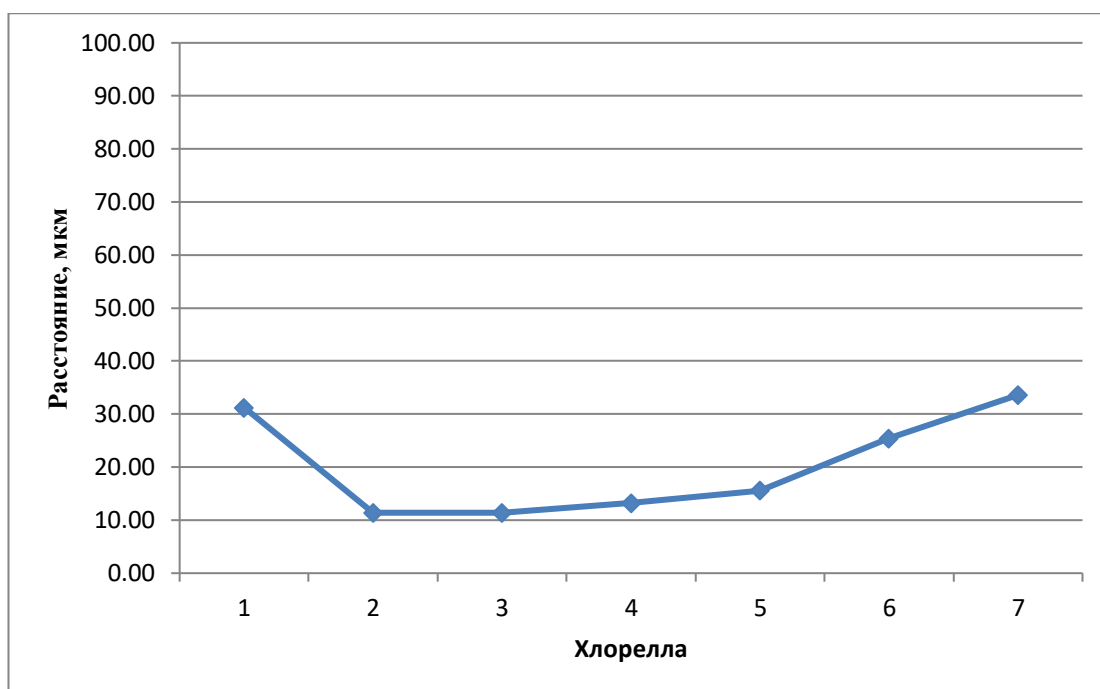


Рисунок 4.16 – Изображение гистограммы амплитуд хлорелл

Из представленной гистограммы видно, что за одно и то же время в зависимости от размера, клетки проходят с разной скоростью разное расстояние.

А как было уже исследовано, при онкопроцессе размер экзосом увеличивается и под действием постоянного тока скорость перемещения также меняется. Из этого следует, что по размеру экзосом можно определить наличие онкопроцесса.

Получив значения разности потенциалов при исследовании экзосом имеющихся проб, необходимо вывести зависимость данного значения от работы, измеряемой методом джоульметрии, для того, чтобы понять в какую сторону будет отклонение данного значения при онкопатологии. Для этого используем основную формулу 3.1. А так как потенциалов и есть напряжение между двумя точками, то отсюда следует:

$$U = \varphi_1 - \varphi_2$$

$$A(t) = \int_{t_0}^t I(t) (\varphi_1 - \varphi_2) dt$$

Исходя из данной зависимости, видно, что, если при онкопатологии разность потенциалов возрастает, то и при измерении работы на джоульметрическом анализаторе показатель работы так же будет отклонен от нормы.

Таким образом, экспериментально доказана работоспособность данного джоульметрического анализатора, и можно утверждать, что данный комплекс пригоден для анализа экзосом при ранней диагностике рака яичников.

4.3 Основные результаты и выводы по разделу 4

1 Проанализированы экзосомы исследуемых образцов опухолевых клеток рака яичников. По результатам исследования, приходим к заключению, что при онкопроцессе коррелируют такие показатели как: потенциал, концентрация, размер экзосом. А значит, данные показатели могут использоваться для ранней диагностики рака яичников.

2 Разработана методика для анализа экзосом с измерением показателя работы с помощью джоульметрического метода. Проверена работоспособность данного комплекса на препарате хлорелл.

3 Исходя из полученных результатов можно утверждать, что данный комплекс наиболее актуален и продуктивен при ранней диагностике рака яичников, а так же при других онкопатологиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ иностранной литературы по нозологии рака яичников. Рак яичников является одним из самых распространенных заболеваний в развитых странах и занимает третье место по распространенности.

Проведен сравнительный анализ методов анализа экзосом.. Большинство существующих методов оценки экзосом имеют существенные недостатки, которые затрудняют их применение в клинической практике. Джоульметрия в отличие от других методов контроля биологических объектов эффективна и проста в реализации.

Разработана методика получения и обработки джоульметрического сигнала для оценки состояния экзосом по таким параметрам, как работа, размер, концентрация.

Проведено экспериментальное исследование на базе Университетской клиники города Фрайбург. Исследовались 3 пассажа клеток с РЯ. А именно, были извлечены и проанализированы экзосомы данных образцов. По результатам исследования, приходим к заключению, что при онкопроцессе коррелируют такие показатели как: концентрация, размер экзосом, потенциал.

Проведено экспериментальное исследование на базе кафедры «Медицинская кибернетика и информатика» Пензенского государственного университета Медицинского института. Осуществлялась проверка работоспособности джоульметрического анализатора и отработка разработанной методики на хлореллах. А так же выведена зависимость работы от разности потенциалов, в следствие чего, определено 3 показателя для идентификации опухолевых экзосом: работа, размер, концентрация.

По результатам исследования, приходим к заключению, что джоульметрический метод применим для ранней диагностики рака яичников.

Результаты в полной мере соответствуют поставленным задачам дипломной работы. Перспективами применения разработанной методики является создание джоульметрического прибора, позволяющего

автоматизированно осуществлять дифференциальную диагностику рака яичников и других онкопатологий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Channa NA, Khand FD, Khand TU, Leghari MH, Memon AN. Analysis of human gallstone by fourier transform infrared (FTIR) Pak J Med Sci. 2007; 23: 546–50;
2. Bouchier TA. Gallstones. Proc R Soc Med. 1977; 70: 597–9. [PMC free article];
3. Berci G. Historical overview of surgical treatment of biliary stone disease. In: MacFadyen BV, Arregui M, Eubanks S, Olsen DO, Peters JH, Soper NJ, et al., editors. Laparoscopic Surgery of the Abdomen. New York: Springer; 2004. pp. 139–42;
4. Gordon-Taylor G. On gallstones and their sufferers. Br J Surg. 1937; 25: 241–51;
5. Hadidy S, Turki J, Misri HT. Cholelithiasis in the Syrian population. A prospective study of 189 patients. Am J Surg. 1987; 153: 392–3;
6. Sampliner RE, Bennett PH, Comess LJ, Rose FA, Burch TA. Gallbladder disease in pima indians. Demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. N Engl J Med. 1970; 283: 1358–64;
7. Acalovschi M. Cholesterol gallstones: From epidemiology to prevention. Postgrad Med J. 2001; 77: 221–9. [PMC free article];
- 8 7. Kesimer M., Gupta R. Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering //Methods. – 2015. – 87. – P. 59–63.
8. Zhang W., Peng P., Kuang Y. et al. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. Tumour biology // the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine – 2015.
9. Rieu S, Geminard C, Rabesandratana H, et al. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. Eur J. Biochem. 2000;267(2):583–590. 10.1046/j.1432-1327.2000.01036.x.

10. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004;104(10):3257–3266. doi: 10.1182/blood-2004-03-0824.
11. Григорьева А.Е., Тамкович С.Н., Еремина А.В., и др. Экзосомы слезной жидкости здоровых людей: выделение, идентификация и характеристика // Биомедицинская химия. — 2016 — Т.62. — №1 — С. 99–106.
12. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161–1172. doi: 10.1084/jem.183.3.1161.
13. Lai, R. C., R. W. Yeo, et al. (2012). "Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell." *Biotechnol Adv*.
14. Ramachandran, S. and V. Palanisamy (2012). "Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(2): 286-293.
15. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20083–20090. doi: 10.1074/jbc.M301642200.
16. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, et al. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1010–1020.
17. Marhaba R., Klingbeil P., Nuebel T. et al. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 2008;8(8):784–804.
18. Park J. E., Tan H. S., Datta A. et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(6):1085–99.
19. Ichim T. E., Zhong Z., Kaushal S. et al. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 2008;6:37.
20. Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R. S. et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3794–9.

21. Graves L. E., Ariztia E. V., Navari J. R. et al. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 2004;64(19):7045–9.
22. Safaei R., Larson B. J., Cheng T. C. et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1595–604.
23. Shedden K., Xie X. T., Chandaroy P. et al. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003;63(15):4331–7.
24. Skog, J., Würdinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6.
25. Viswanathan M., Sangiliyandi G., Vinod S. S. et al. Genomic instability and tumor-specific alterations in oral squamous cell carcinomas assessed by inter-(simple sequence repeat) PCR. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):1057–62.
26. Camussi G., Deregibus M. C., Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(1):7–12.
27. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752–60.
28. Hao S., Ye Z., Li F. et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol* 2006;28(2):126–31.
29. Jung T., Castellana D., Klingbeil P. et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* 2009;11(10):1093–105.
30. Simpson R.J., Lim J.W., Moritz R.L., Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009;6(3):267–83.
31. Keller S., Ridinger J., Rupp A.K. et al. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* 2011;9:86.

32. Keller S., Konig A.-K., Marme F., Runz S., Wolterink S., Koensgen D., Mustea A., Sehouli J., Altevogt P. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes // *Cancer Lett.* 2009. Vol. 278. P. 73–81. doi: 10.1016/j.canlet.2008.12.028.
33. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. MicroRNA signature of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer // *Gynecol. Oncol.* 2008. Vol. 110 (1). P. 13–21. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
34. Runz S., Keller S., Rupp C., Stoeck A., Issa Y., Koensgen D., Mustea A., Sehouli J., Kristiansen G., Altevogt P. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM // *Gynecol. Oncol.* 2007. Vol. 107. P. 563–571.
36. Moerman CJ, Smeets FW, Kromhout D. Dietary risk factors for clinically diagnosed gallstones in middle-aged men. A 25-year follow-up study (the Zutphen Study) *Ann Epidemiol.* 1994; 4: 248–54;
35. Семина С. Е., Багров Д. В., Красильников М. А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):50–5.;
36. Harding C., Heuser J., Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 1984;35(2):256–63;
44. Diehl AK, Sugarek NJ, Todd KH. Clinical evaluation for gallstone disease: Usefulness of symptoms and signs in diagnosis. *Am J Med.* 1990; 89: 29–33;
45. Messing B, Bories C, Kunstlinger F, Bernier JJ. Does total parenteral nutrition induce gallbladder sludge formation and lithiasis? *Gastroenterology.* 1983; 84: 1012–9;
46. Liddle RA, Goldstein RB, Saxton J. Gallstone formation during weight-reduction dieting. *Arch Intern Med.* 1989; 149: 1750–3;
47. Koppiseti S, Jenigiri B, Terron MP, Tengattini S, Tamura H, Flores LJ, et al. Reactive oxygen species and the hypomotility of the gall bladder as targets for the treatment of gallstones with melatonin: A review. *Dig Dis Sci.* 2008; 53: 2592–603;

48. Duane WC. Pathogenesis of gallstones: Implications for management. *Hosp Pract.* 1990; 25: 65–76. 79;
49. Donovan JM, Carey MC. Physical-chemical basis of gallstone formation. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991; 20: 47–66;
50. Apstein MD. Pathophysiology of gallstones and other diseases of the biliary tract. In: Chopra S, May RJ, editors. *Pathophysiology of Gastrointestinal Diseases.* Boston: Little, Brown; 1989. pp. 489–528;
51. Holzbach RT, Busch N. Nucleation and growth of cholesterol crystals. Kinetic determinants in supersaturated native bile. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991; 20: 67–84;
52. Beckingham IJ. Gallstone disease. *Br Med J.* 2001; 322: 91–4. [PMC free article];
53. Channa NA. Gallstone disease: A review. *Pak Armed Forces Med J* Issue Year: 2008 Issue Number: 2 Issue Month: June;
54. Trotman BW. Pigment gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991; 20: 111–26;
55. Euzane WC. Pathogenesis of gallstones. *Hosp Pract.* 1990; 25: 65–76. 79;
56. Johnston DE, Kaplan MM. Pathogenesis and treatment of gallstones. *N Engl J Med.* 1993; 328: 412–21;
57. Stewart L, Oesterle AL, Erdan I, Griffiss JM, Way LW. Pathogenesis of pigment gallstones in Western societies: The central role of bacteria. *J Gastrointest Surg.* 2002; 6: 891–903;
58. Trotman BW, Bernstein SE, Bove KE, Wirt GD. Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia: Description and characteristics of a mouse model. *J Clin Invest.* 1980; 65: 1301–8. [PMC free article];
59. Everson GT, McKinley C, Kern F., Jr Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen (Premarin) and dietary cholesterol on hepatic lipid metabolism. *J Clin Invest.* 1991; 87: 237–46. [PMC free article];
60. Yio XY, Jin BW, Yin FZ, Li XJ. Bile secretory immunoglobulin A in biliary infection and cholelithiasis. *Gastroenterology.* 1992; 102: 1000–8;

61. Strasberg SM, Toth JL, Gallinger S, Harvey PR. High protein and total lipid concentration are associated with reduced metastability of bile in an early stage of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology*. 1990; 98: 739–46;
62. Carey MC, Cahalane MJ. Whither biliary sludge? *Gastroenterology*. 1988; 95: 508–23;
63. Lee SP, Nicholls JF, Park HZ. Biliary sludge as a cause of acute pancreatitis. *N Engl J Med*. 1992; 326: 589–93;
64. Maringhini A, Marcenò MP, Lanzarone F, Caltagirone M, Fusco G, Di Cuonzo G, et al. Sludge and stones in gallbladder after pregnancy. Prevalence and risk factors. *J Hepatol*. 1987; 5: 218–23;
65. Bolondi L, Gaiani S, Testa S, Labò G. Gall bladder sludge formation during prolonged fasting after gastrointestinal tract surgery. *Gut*. 1985; 26: 734–8. [PMC free article];
66. Shiffman ML, Keith FB, Moore EW. Pathogenesis of ceftriaxone-associated biliary sludge: In vitro studies of calcium-ceftriaxone binding and solubility. *Gastroenterology*. 1990; 99: 1772–8;
67. Lopez AJ, O’Keefe P, Morrissey M, Pickleman J. Ceftriaxone-induced cholelithiasis. *Ann Intern Med*. 1991; 115: 712–4;
68. Moore EW. Biliary calcium and gallstone formation. *Hepatology*. 1990; 12: 206S–14;
69. Gleeson D, Hood KA, Murphy GM, Dowling RH. Calcium and carbonate ion concentrations in gallbladder and hepatic bile. *Gastroenterology*. 1992; 102: 1707–16;
70. Everson GT. Gallbladder function in gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 1991; 20: 85–110;
71. Gray M, Jacobson T. Are somatostatin analogues (octreotide and lanreotide) effective in promoting healing of enterocutaneous fistulas? *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2002; 29: 228–33;

72. Tsai CJ, Leitzmann MF, Hu FB, Willett WC, Giovannucci EL. Frequent nut consumption and decreased risk of cholecystectomy in women. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80: 76–81;
73. Morán S, Uribe M, Prado ME, de la Mora G, Muñoz RM, Pérez MF, et al. Effects of fiber administration in the prevention of gallstones in obese patients on a reducing diet. A clinical trial. *Rev Gastroenterol Mex*. 1997; 62: 266–72;
74. Marcus SN, Heaton KW. Effects of a new, concentrated wheat fibre preparation on intestinal transit, deoxycholic acid metabolism and the composition of bile. *Gut*. 1986; 27: 893–900. [PMC free article];
75. Hayes KC, Livingston A, Trautwein EA. Dietary impact on biliary lipids and gallstones. *Annu Rev Nutr*. 1992; 12: 299–326;
76. Burkitt DP, Tunstall M. Gall-stones: Geographical and chronological features. *J Trop Med Hyg*. 1975; 78: 140–4;
77. Rigas B, Torosis J, McDougall CJ, Vener KJ, Spiro HM. The circadian rhythm of biliary colic. *J Clin Gastroenterol*. 1990; 12: 409–14;
78. Fitzgerald JE, Fitzgerald LA, Maxwell-Armstrong CA, Brooks AJ. Recurrent gallstone ileus: Time to change our surgery? *J Dig Dis*. 2009; 10: 149–51;
79. Johnson LW, Sehon JK, Lee WC, Zibari GB, McDonald JC. Mirizzi's syndrome: Experience from a multi-institutional review. *Am Surg*. 2001; 67: 11–4;
80. Sanders G, Kingsnorth AN. Gallstones. *BMJ*. 2007; 335: 295–9. [PMC free article];
81. Hayes N, Saha S. Recurrent gallstone ileus. *Clin Med Res*. 2012; 10: 236–9. [PMC free article];
82. Fink-Bennett D, DeRidder P, Kolozsi WZ, Gordon R, Jaros R. Cholecystokinin cholescintigraphy: Detection of abnormal gallbladder motor function in patients with chronic acalculous gallbladder disease. *J Nucl Med*. 1991; 32: 1695–9;
83. McSherry CK, Ferstenberg H, Calhoun WF, Lahman E, Virshup M. The natural history of diagnosed gallstone disease in symptomatic and asymptomatic patients. *Ann Surg*. 1985; 202: 59–63. [PMC free article];

84. Ransohoff DF, Gracie WA. Management of patients with symptomatic gallstones: A quantitative analysis. *Am J Med.* 1990; 88: 154–60;
85. Pokorny WJ, Saleem M, O’Gorman RB, McGill CW, Harberg FJ. Cholelithiasis and cholecystitis in childhood. *Am J Surg.* 1984; 148: 742–4;

ПРИЛОЖЕНИЕ А

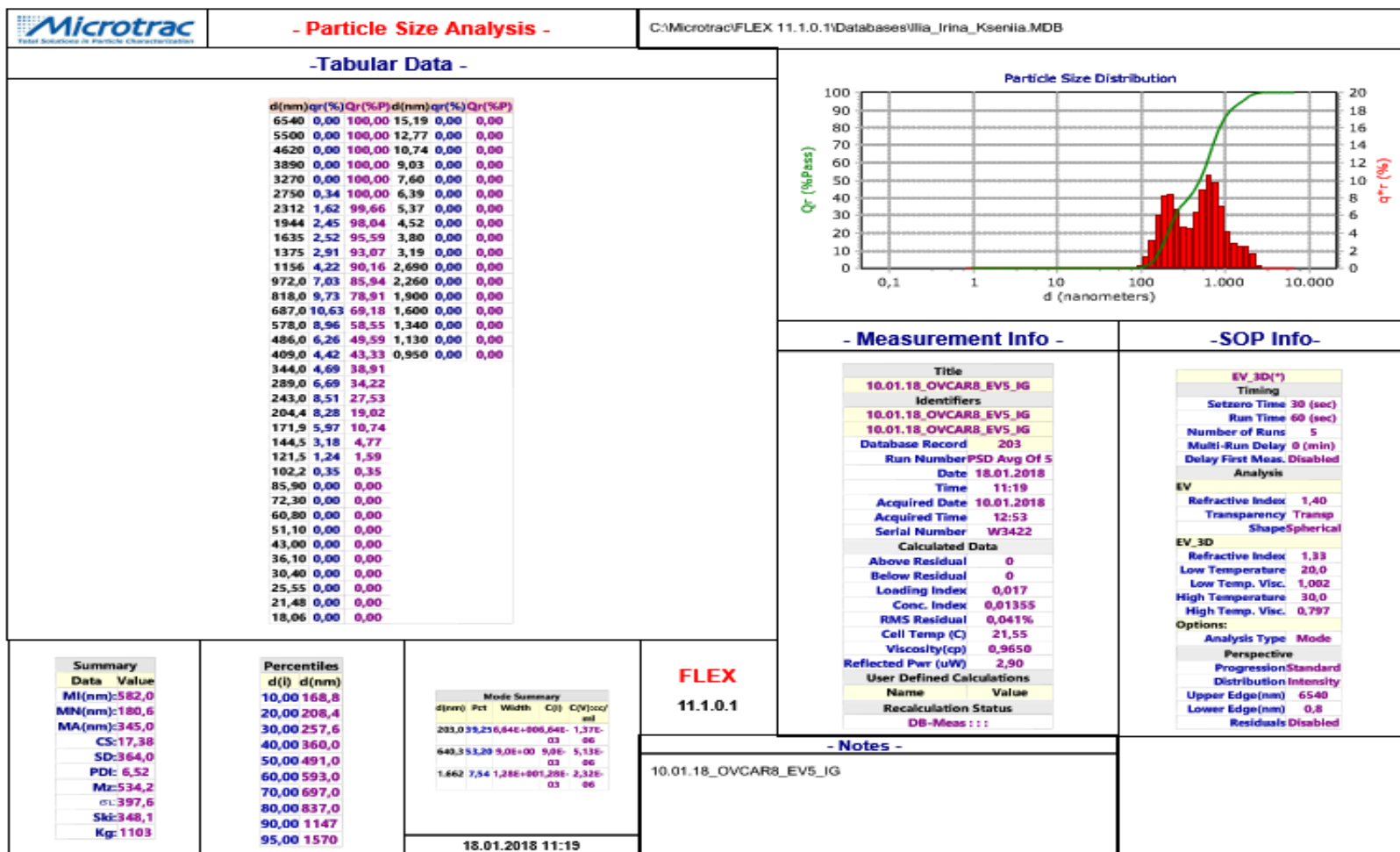


Рисунок А 1

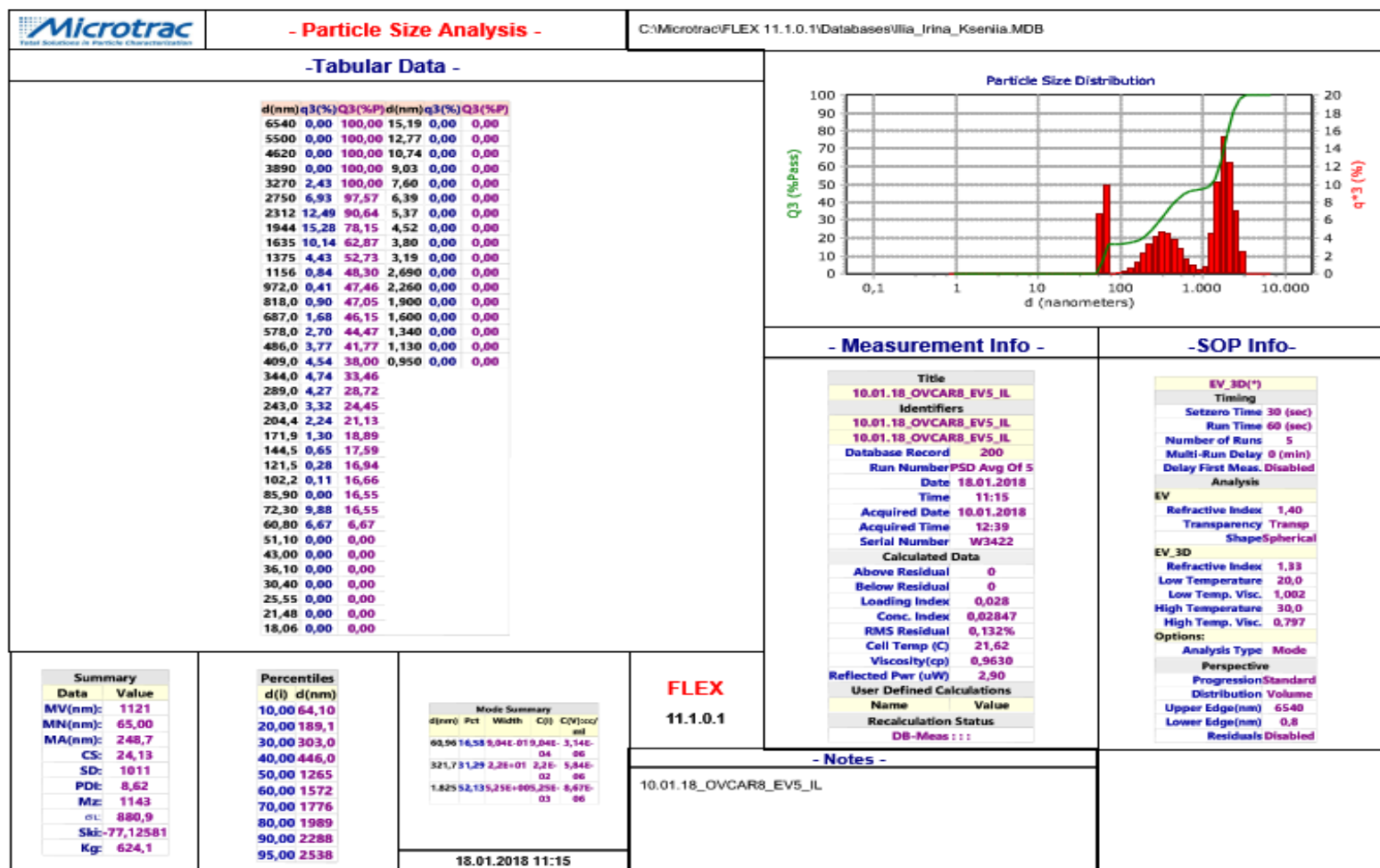


Рисунок А 2

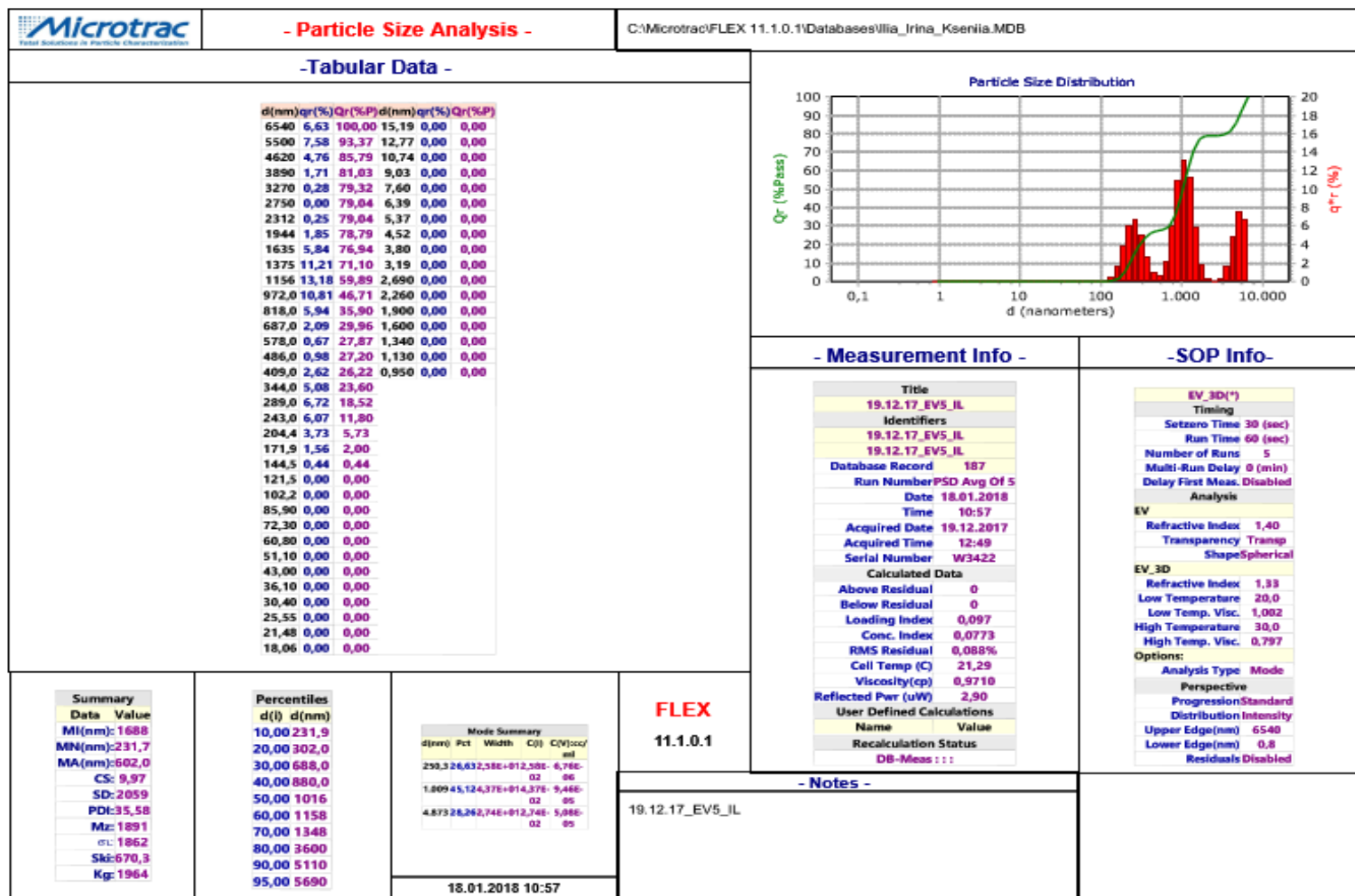


Рисунок А 3

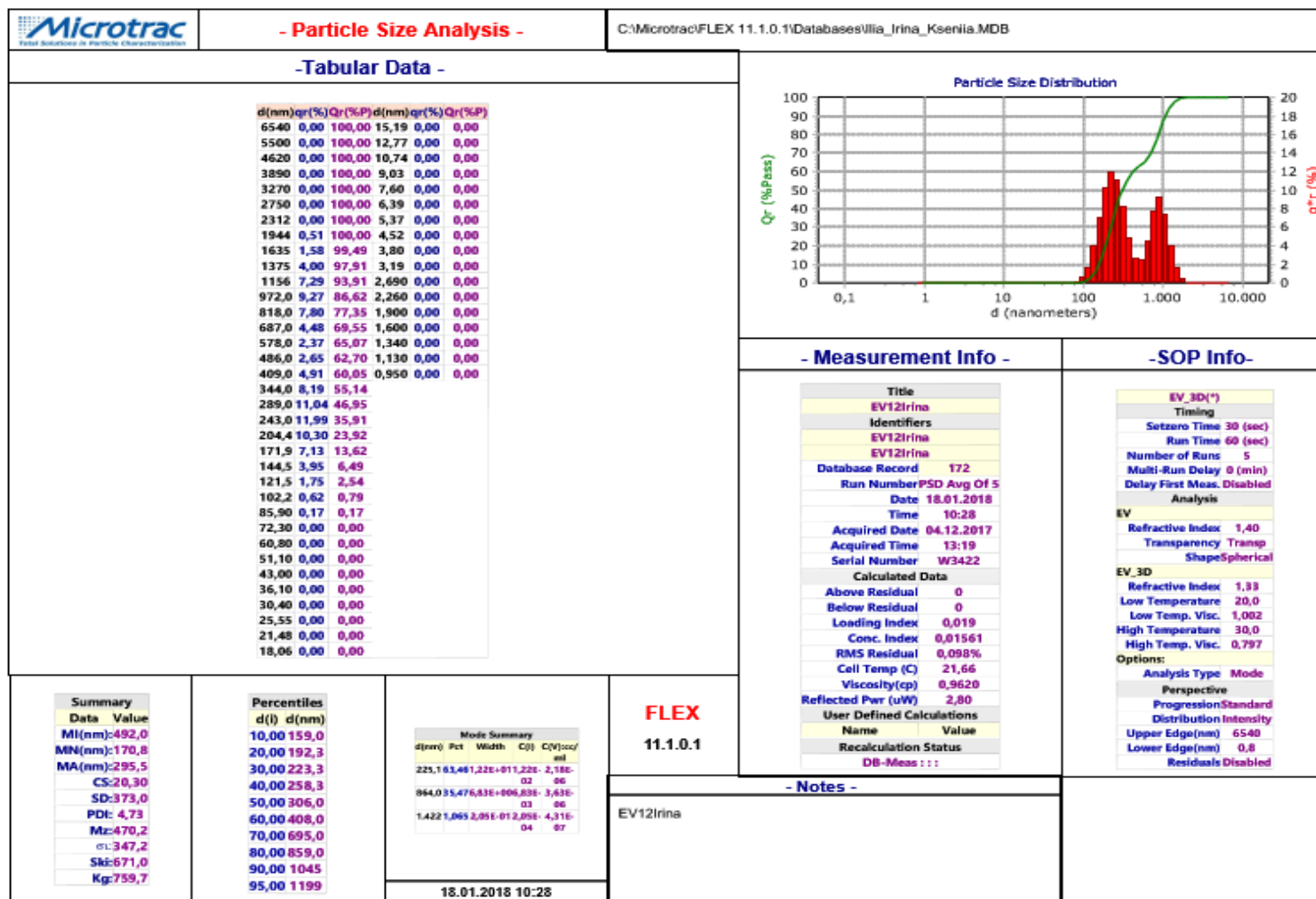


Рисунок А 4

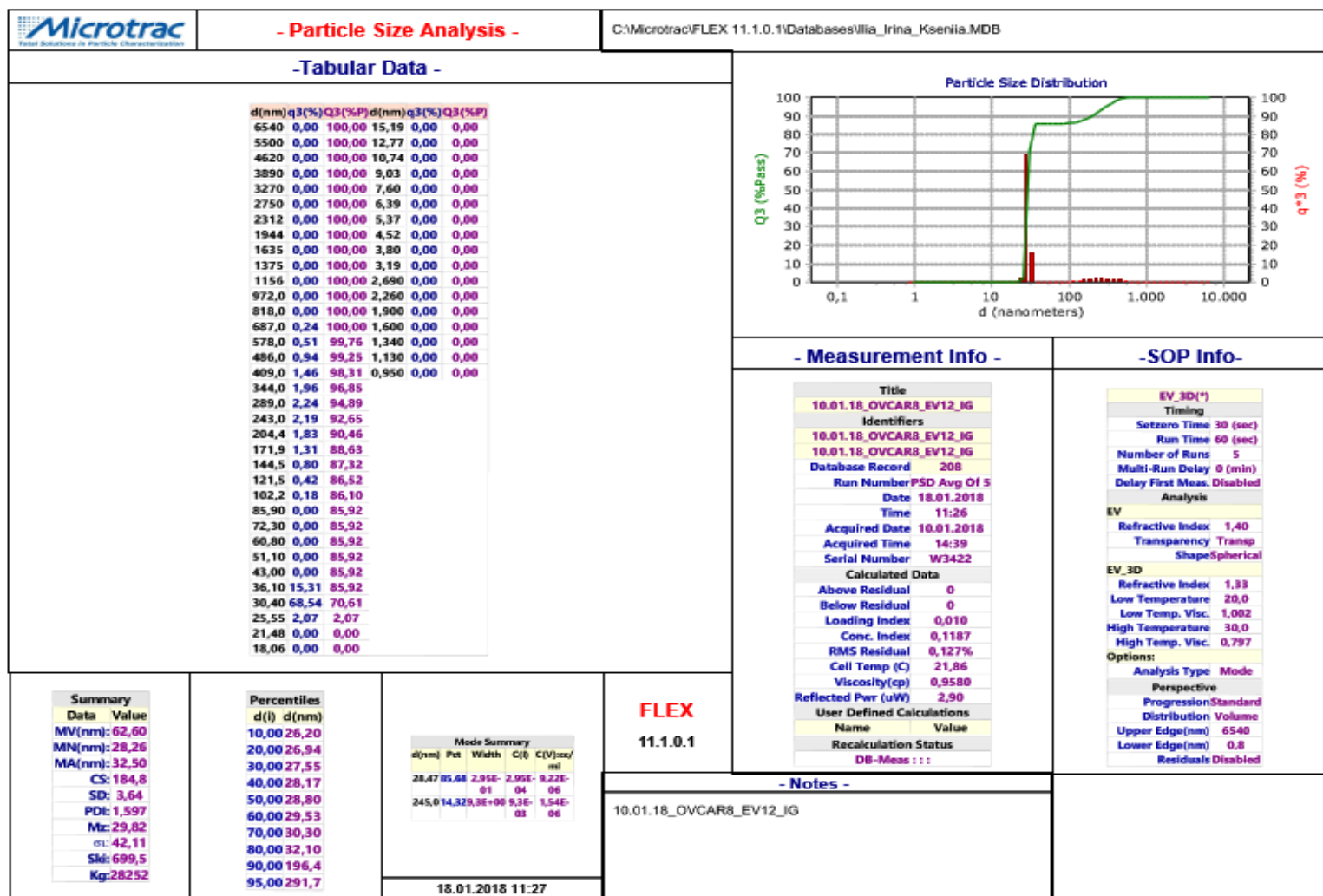


Рисунок А 5

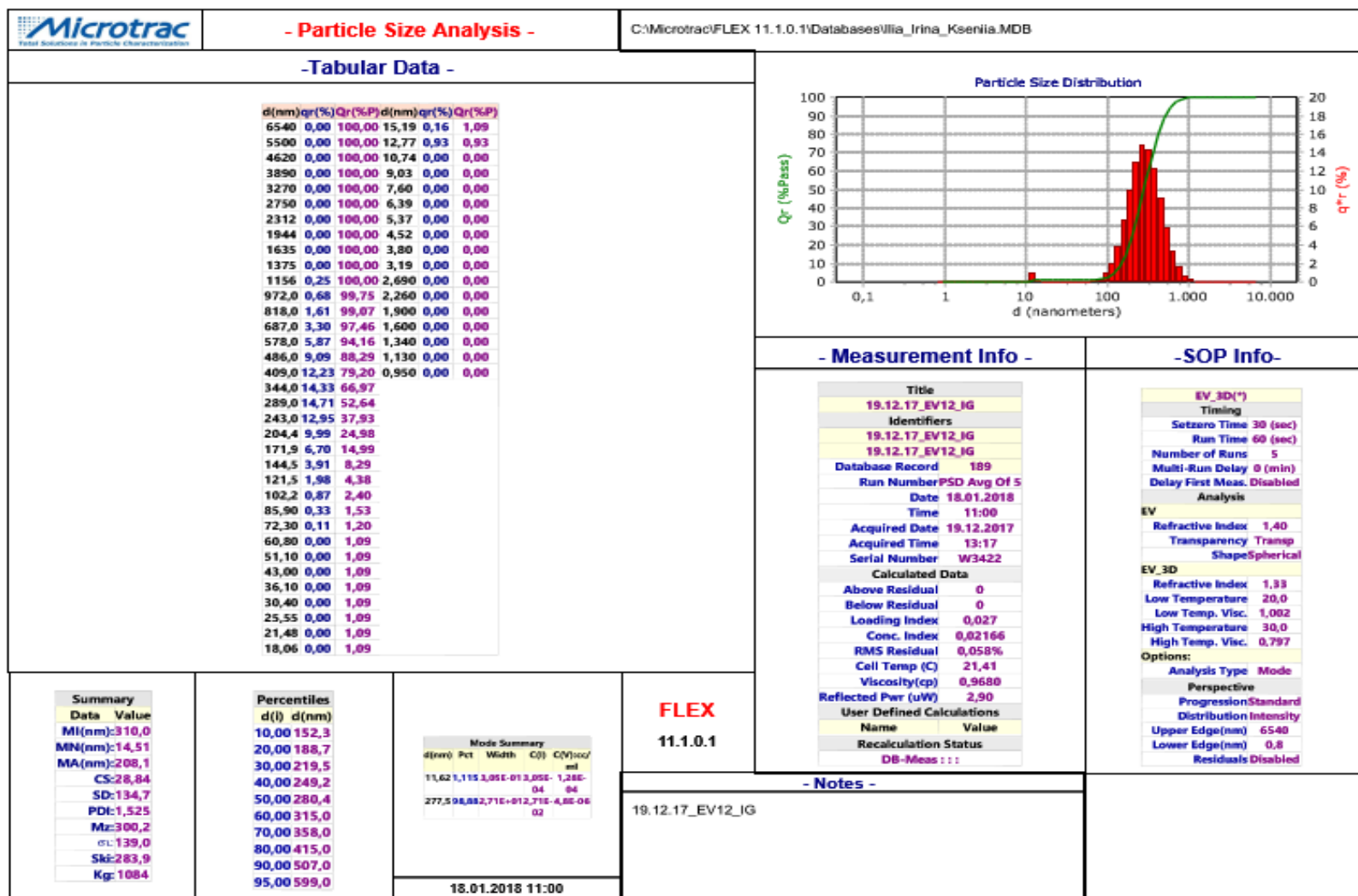


Рисунок А 6

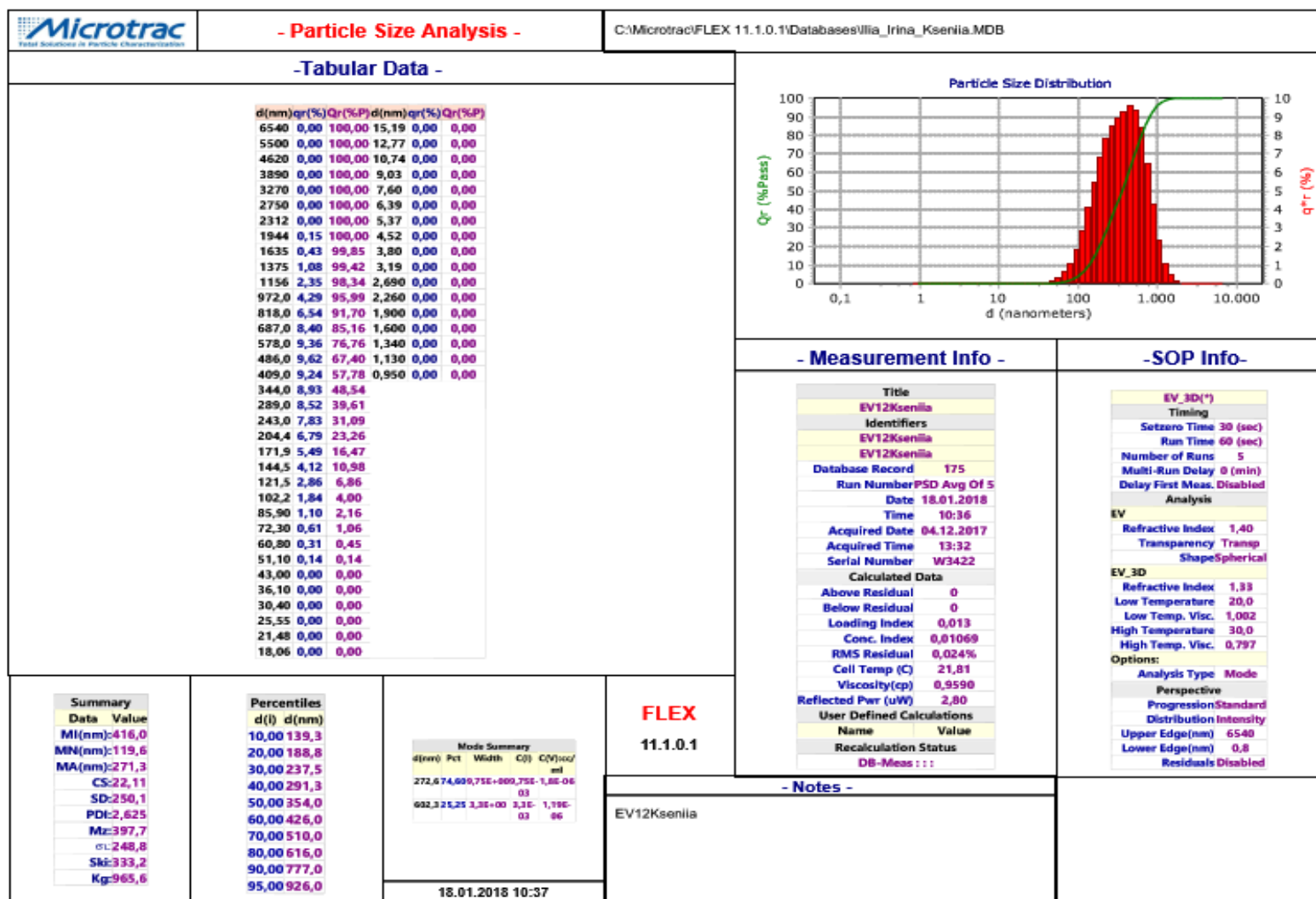


Рисунок А 7

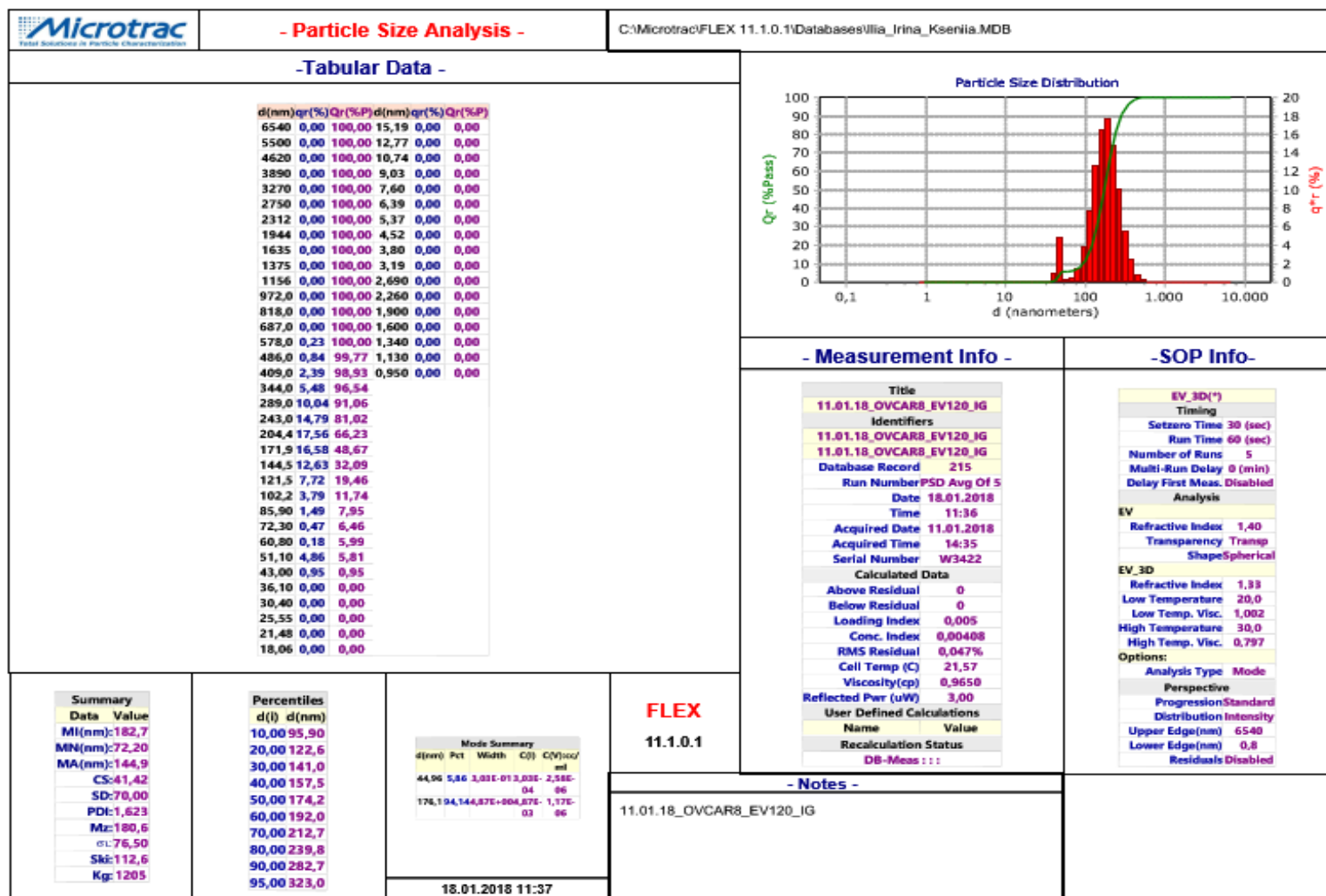


Рисунок А 8

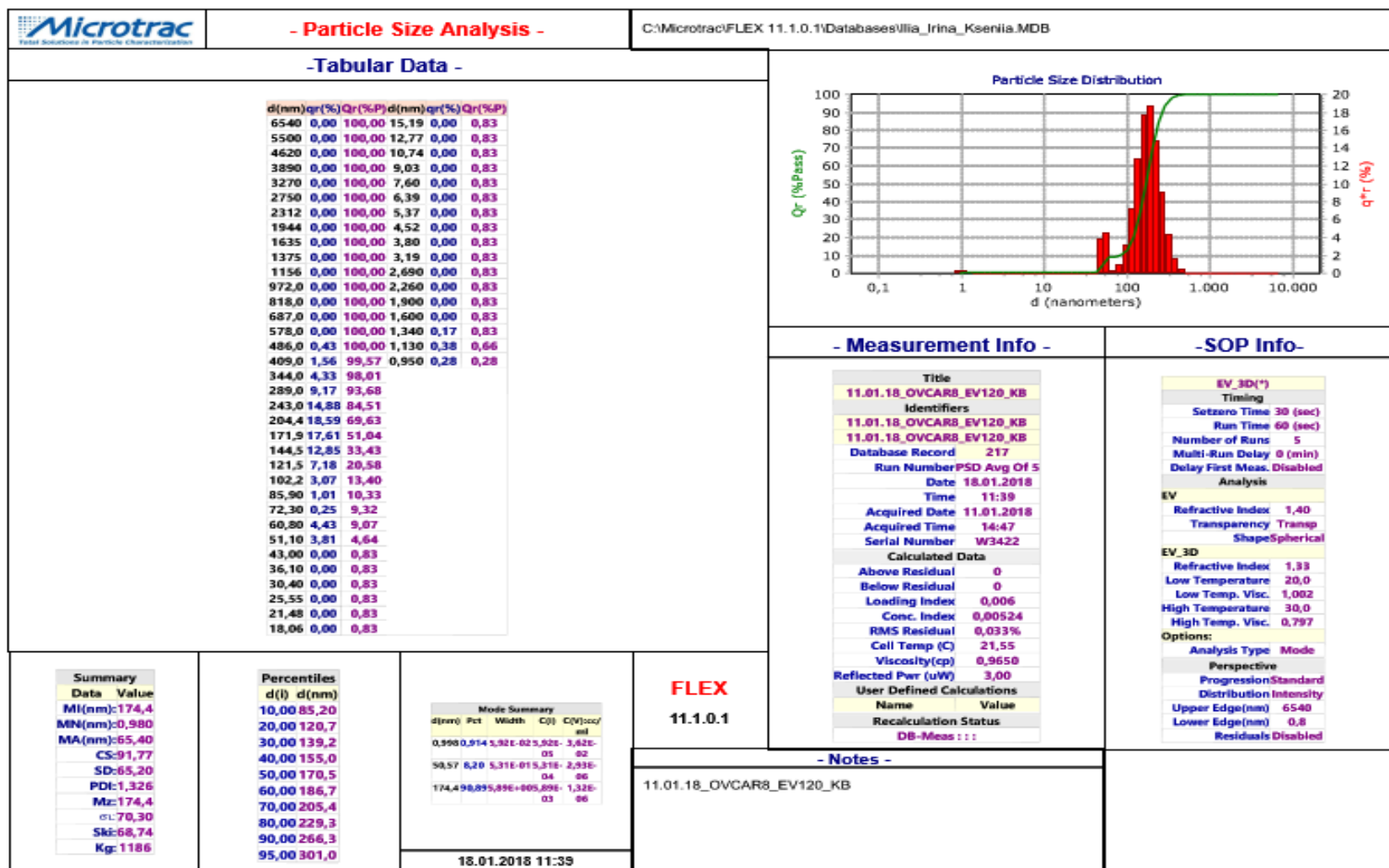


Рисунок А 9

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

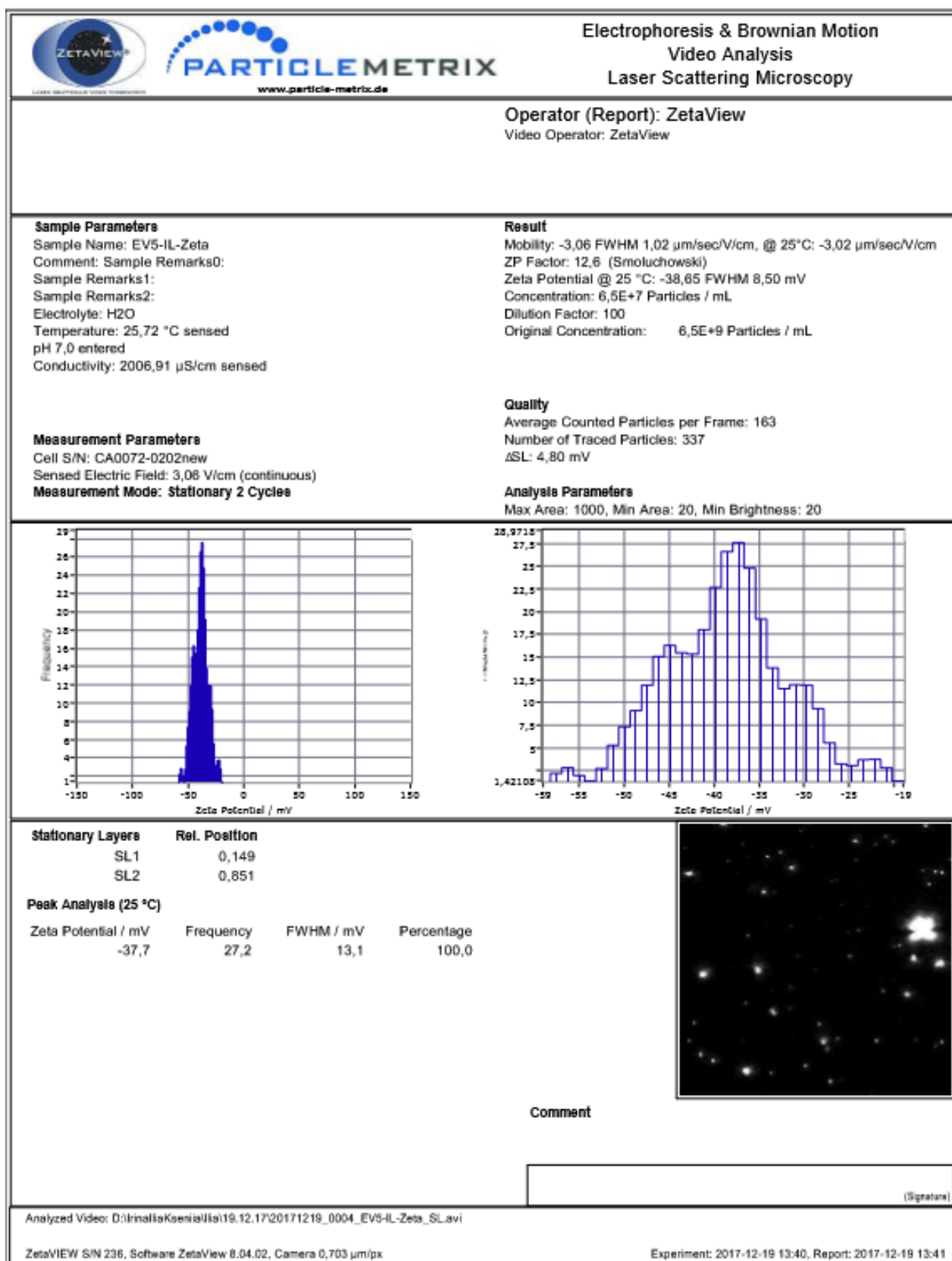


Рисунок Б 1 – Изображение результатов NTA EV5 образца 1



Electrophoresis & Brownian Motion
Video Analysis
Laser Scattering Microscopy

Operator (Report): ZetaView
Video Operator: ZetaView

Sample Parameters

Sample Name: EV5-IG-Zeta
Comment: Sample Remarks0:
Sample Remarks1:
Sample Remarks2:
Electrolyte: H2O
Temperature: 25,97 °C sensed
pH 7,0 entered
Conductivity: 1983,77 µS/cm sensed

Result

Mobility: -3,25 FWHM 1,16 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -3,19 µm/sec/V/cm
ZP Factor: 12,6 (Smoluchowski)
Zeta Potential @ 25 °C: -40,91 FWHM 7,83 mV
Concentration: 6,5E+7 Particles / mL
Dilution Factor: 100
Original Concentration: 6,5E+9 Particles / mL

Measurement Parameters

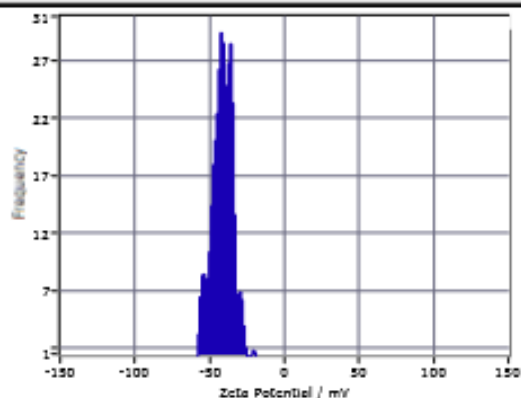
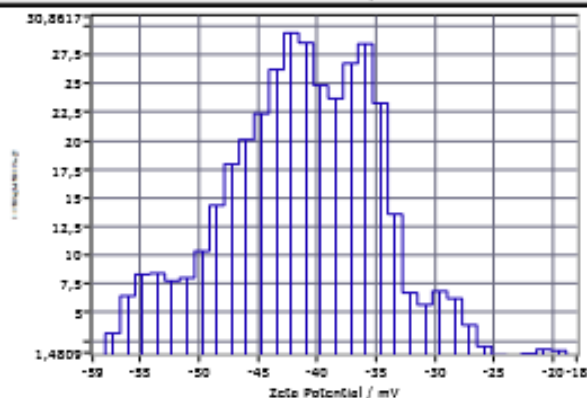
Cell S/N: CA0072-D0202new
Sensed Electric Field: 3,23 V/cm (continuous)
Measurement Mode: Stationary 2 Cycles

Quality

Average Counted Particles per Frame: 161
Number of Traced Particles: 395
ΔSL: 4,98 mV

Analysis Parameters

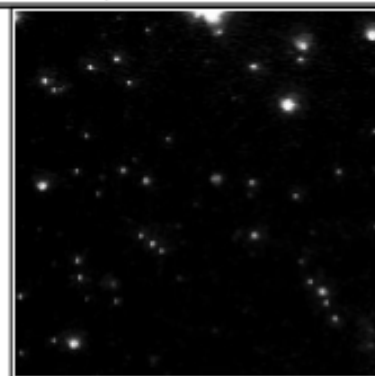
Max Area: 1000, Min Area: 20, Min Brightness: 30



Stationary Layers	Rel. Position
SL1	0,149
SL2	0,851

Peak Analysis (25 °C)

Zeta Potential / mV	Frequency	FWHM / mV	Percentage
-41,1	28,6	14,8	100,0



Comment

(Signature)

Analyzed Video: D:\Irina\Ksenia\Irina\19.12.17 2 right\20171219_0006_EV5-IG-Zeta_SL.avi

ZetaVIEW S/N 236, Software ZetaView 8.04.02, Camera 0,703 µm/px

Experiment: 2017-12-19 13:55, Report: 2017-12-19 13:56

Рисунок Б 2 – Изображение результатов NTA EV12 образца 1

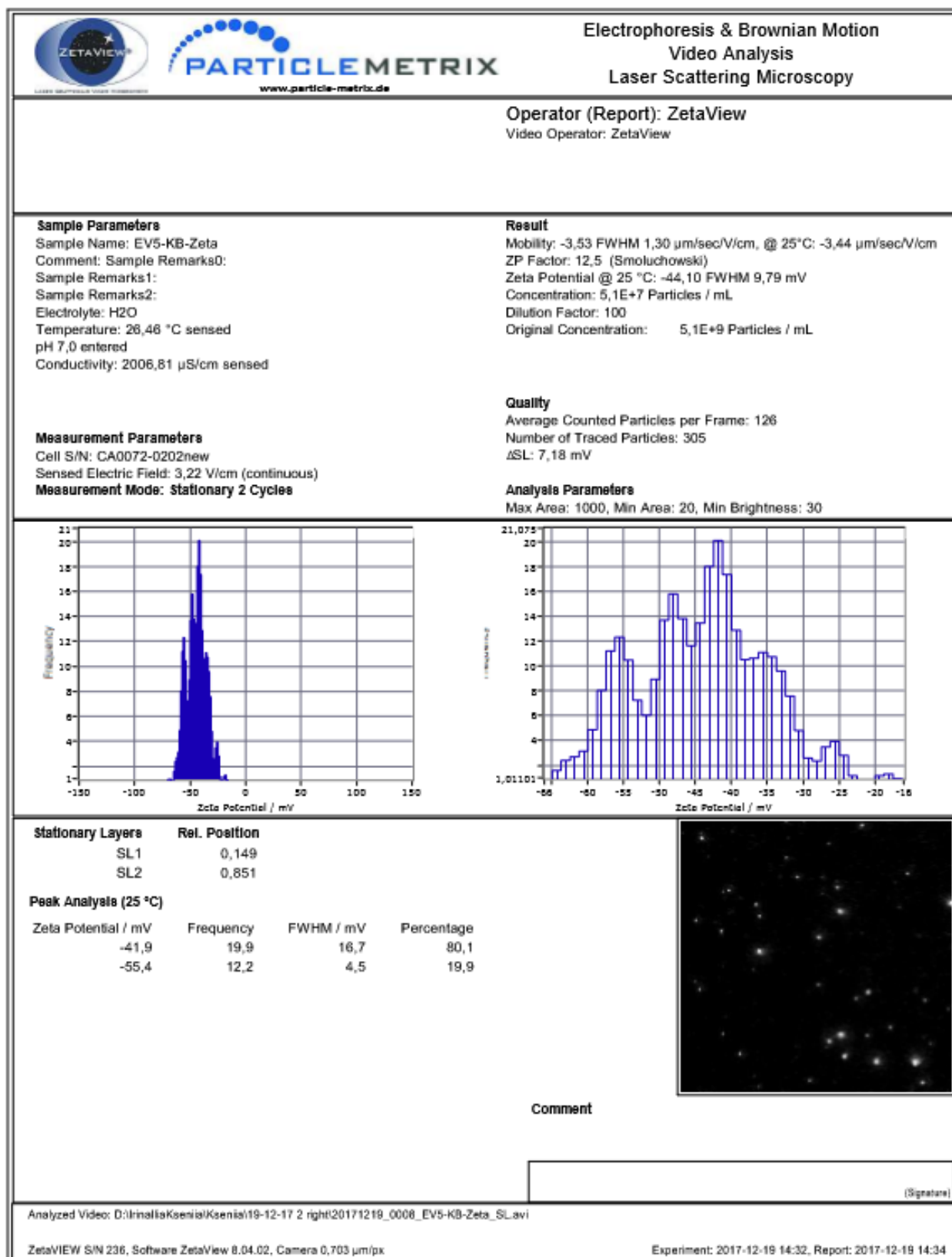


Рисунок Б 3 – Изображение результатов NTA EV120 образца 1

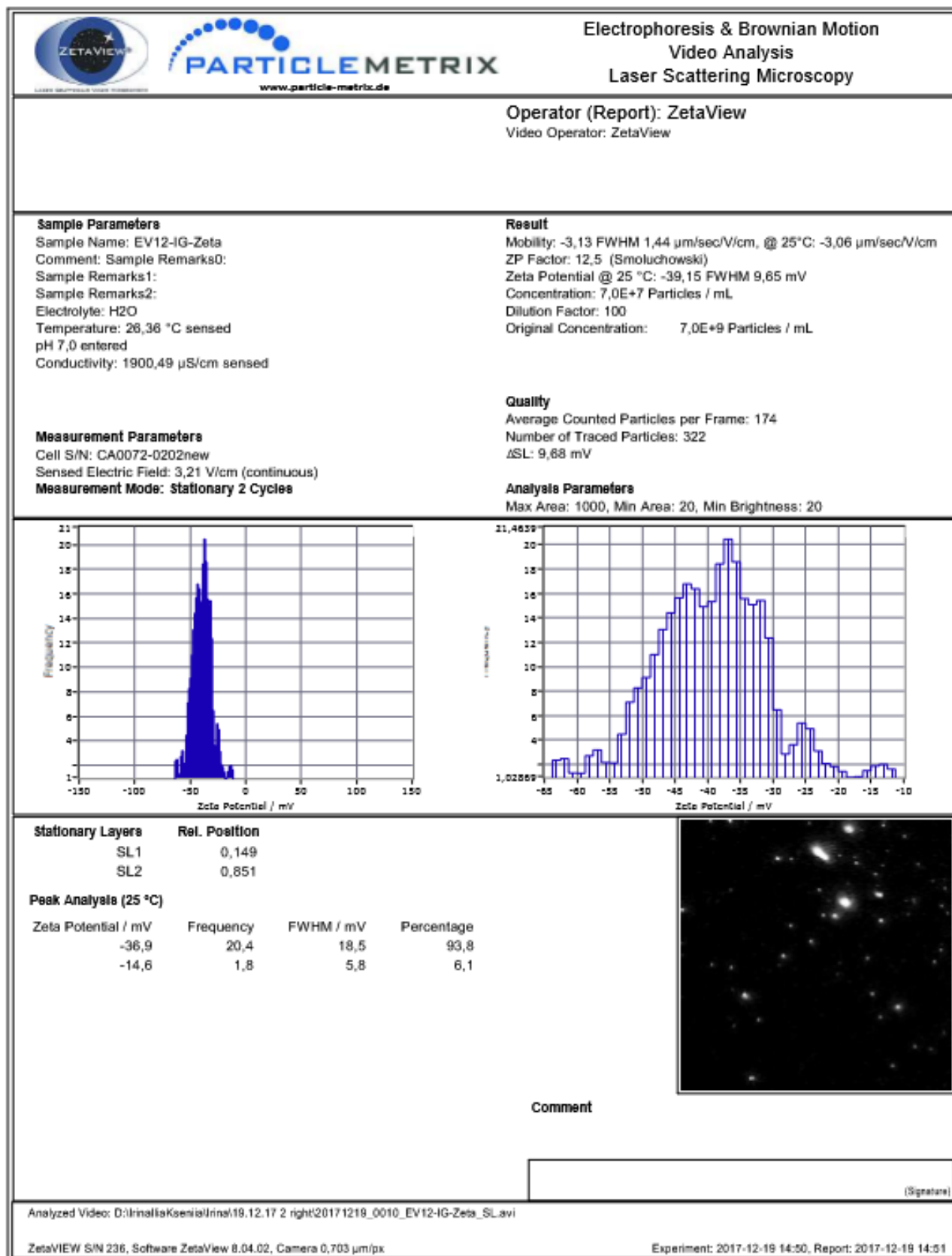


Рисунок Б 4 – Изображение результатов NTA EV5 образца 2



Electrophoresis & Brownian Motion
Video Analysis
Laser Scattering Microscopy

Operator (Report): ZetaView

Video Operator: ZetaView

Sample Parameters

Sample Name: EV12-KB-Zeta
Comment: Sample Remarks0:
Sample Remarks1:
Sample Remarks2:
Electrolyte: H2O
Temperature: 26,22 °C sensed
pH 7,0 entered
Conductivity: 1908,79 µS/cm sensed

Result

Mobility: -2,87 FWHM 0,49 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -2,81 µm/sec/V/cm
ZP Factor: 12,5 (Smoluchowski)
Zeta Potential @ 25 °C: -35,95 FWHM 8,82 mV
Concentration: 6,1E+7 Particles / mL
Dilution Factor: 100
Original Concentration: 6,1E+9 Particles / mL

Measurement Parameters

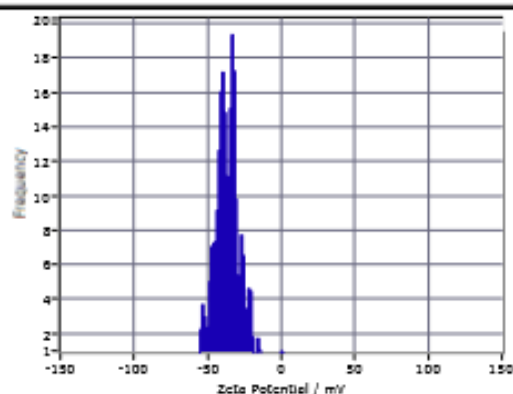
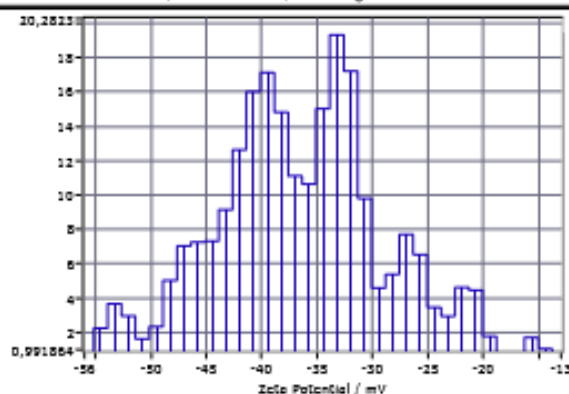
Cell S/N: CA0072-0202new
Sensed Electric Field: 3,20 V/cm (continuous)
Measurement Mode: Stationary 2 Cycles

Quality

Average Counted Particles per Frame: 151
Number of Traced Particles: 240
ΔSL: 9,83 mV

Analysis Parameters

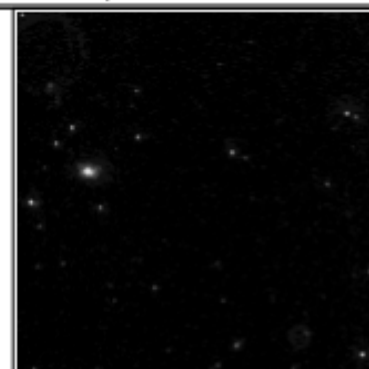
Max Area: 1000, Min Area: 20, Min Brightness: 20



Stationary Layers	Rel. Position
SL1	0,149
SL2	0,851

Peak Analysis (25 °C)

Zeta Potential / mV	Frequency	FWHM / mV	Percentage
-33,5	18,4	6,3	54,3
-39,3	16,8	5,4	45,6



Comment

(Signature)

Analyzed Video: D:\Irina\Ksenia\Ksenia\19-12-17 2 right\20171219_0012_EV12-KB-Zeta_SL.avi

ZetaVIEW S/N 236, Software ZetaView 8.04.02, Camera 0,703 µm/px

Experiment: 2017-12-19 15:02, Report: 2017-12-19 15:04

Рисунок Б 5 – Изображение результатов NTA EV12 образца 2

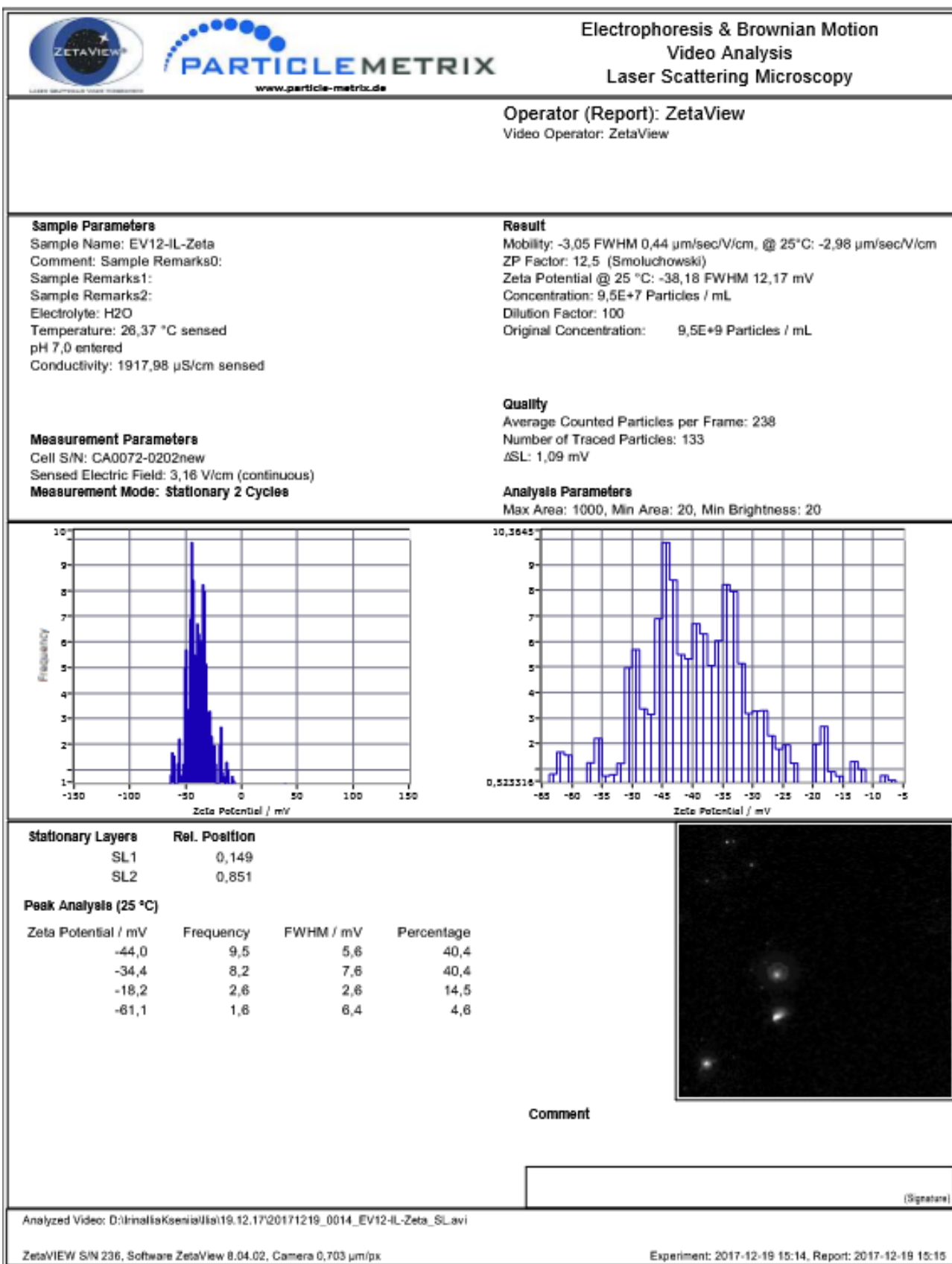


Рисунок Б 6 – Изображение результатов NTA EV120 образца 2



Electrophoresis & Brownian Motion
Video Analysis
Laser Scattering Microscopy

Operator (Report): ZetaView
Video Operator: ZetaView

Sample Parameters

Sample Name: EV120-IG-Zeta
Comment: Sample Remarks0:
Sample Remarks1:
Sample Remarks2:
Electrolyte: H2O
Temperature: 24,37 °C sensed
pH 7,0 entered
Conductivity: 1743,43 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sensed

Result

Mobility: -2,76 FWHM 1,78 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C: -2,79 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP Factor: 13,0 (Smoluchowski)
Zeta Potential @ 25 °C: -35,76 FWHM 10,23 mV
Concentration: 1,5E+8 Particles / mL
Dilution Factor: 1
Original Concentration: 1,5E+8 Particles / mL

Measurement Parameters

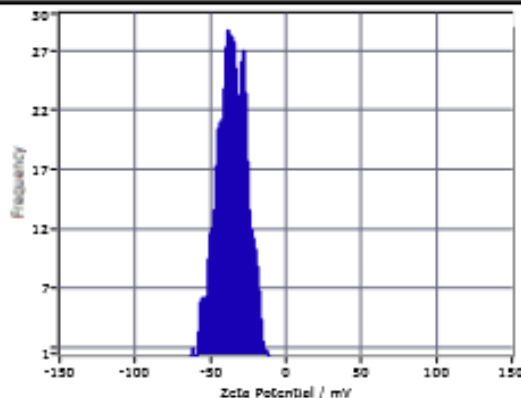
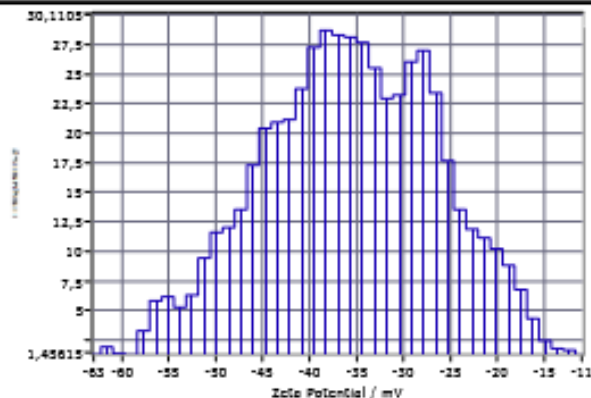
Cell S/N: CA0072-0202new
Sensed Electric Field: 3,18 V/cm (continuous)
Measurement Mode: Stationary 2 Cycles

Quality

Average Counted Particles per Frame: 373
Number of Traced Particles: 566
 ΔSL : 2,56 mV

Analysis Parameters

Max Area: 1000, Min Area: 10, Min Brightness: 20



Stationary Layers	Rel. Position
SL1	0,149
SL2	0,851

Peak Analysis (25 °C)

Zeta Potential / mV	Frequency	FWHM / mV	Percentage
-36,5	28,2	22,8	100,0



Comment

(Signature)

Analyzed Video: D:\Irina\Ksenia\Irina\19.12.17 2 right\20171220_0002_EV120-IG-Zeta_SL.avi

ZetaVIEW S/N 236, Software ZetaView 8.04.02, Camera 0,703 $\mu\text{m}/\text{px}$

Experiment: 2017-12-20 14:32, Report: 2017-12-20 14:33

Рисунок Б 7 – Изображение результатов NTA EV5 образца 3



Electrophoresis & Brownian Motion
Video Analysis
Laser Scattering Microscopy

Operator (Report): ZetaView

Video Operator: ZetaView

Sample Parameters

Sample Name: EV120-KB-Zeta
Comment: Sample Remarks0:
Sample Remarks1:
Sample Remarks2:
Electrolyte: H2O
Temperature: 24,42 °C sensed
pH 7,0 entered
Conductivity: 1793,66 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sensed

Result

Mobility: -2,73 FWHM 1,57 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C: -2,76 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP Factor: 12,9 (Smoluchowski)
Zeta Potential @ 25 °C: -35,29 FWHM 9,80 mV
Concentration: 1,6E+8 Particles / mL
Dilution Factor: 1
Original Concentration: 1,6E+8 Particles / mL

Measurement Parameters

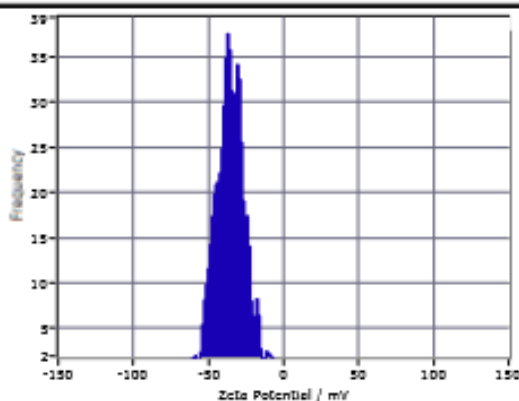
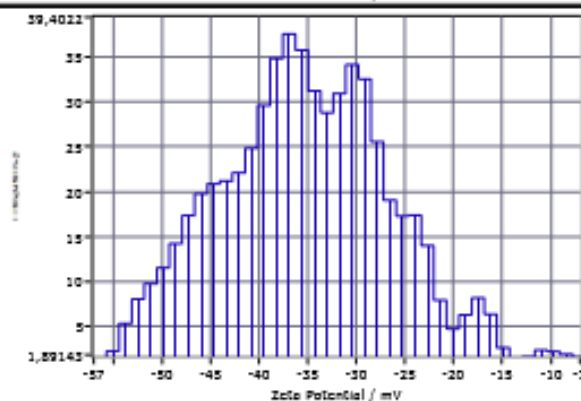
Cell S/N: CA0072-0202new
Sensed Electric Field: 3,18 V/cm (continuous)
Measurement Mode: Stationary 2 Cycles

Quality

Average Counted Particles per Frame: 411
Number of Traced Particles: 624
 ΔSL : 1,73 mV

Analysis Parameters

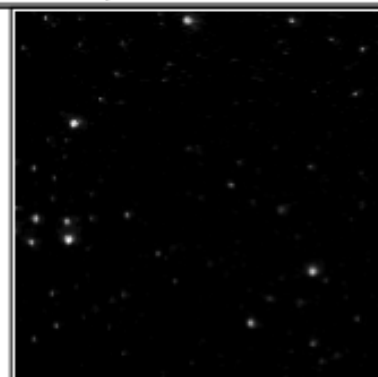
Max Area: 1000, Min Area: 10, Min Brightness: 20



Stationary Layers	Rel. Position
SL1	0,149
SL2	0,851

Peak Analysis (25 °C)

Zeta Potential / mV	Frequency	FWHM / mV	Percentage
-36,1	36,5	20,2	96,9
-10,9	2,4	5,8	3,1



Comment

(Signature)

Analyzed Video: D:\Inra\Ils\Ksenia\19-12-17 2 right\20171220_0004_EV120-KB-Zeta_SL.avi

ZetaVIEW S/N 236, Software ZetaView 8.04.02, Camera 0,703 $\mu\text{m}/\text{px}$

Experiment: 2017-12-20 14:42, Report: 2017-12-20 14:43

Рисунок Б 8 – Изображение результатов NTA EV12 образца 3



Electrophoresis & Brownian Motion
Video Analysis
Laser Scattering Microscopy

Operator (Report): ZetaView

Video Operator: ZetaView

Sample Parameters

Sample Name: EV120-IL-Zeta
Comment: Sample Remarks0:
Sample Remarks1:
Sample Remarks2:
Electrolyte: H2O
Temperature: 24,48 °C sensed
pH 7,0 entered
Conductivity: 1800,83 µS/cm sensed

Result

Mobility: -2,62 FWHM 1,51 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -2,64 µm/sec/V/cm
ZP Factor: 12,9 (Smoluchowski)
Zeta Potential @ 25 °C: -33,87 FWHM 10,26 mV
Concentration: 2,3E+8 Particles / mL
Dilution Factor: 1
Original Concentration: 2,3E+8 Particles / mL

Measurement Parameters

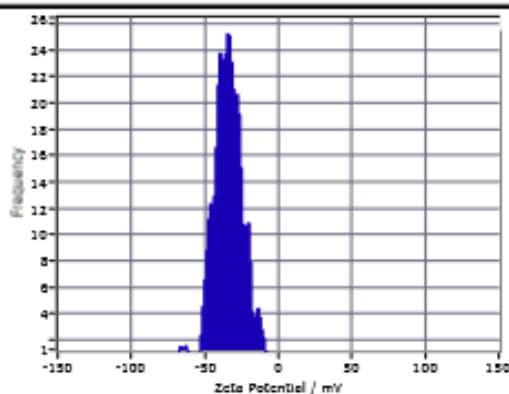
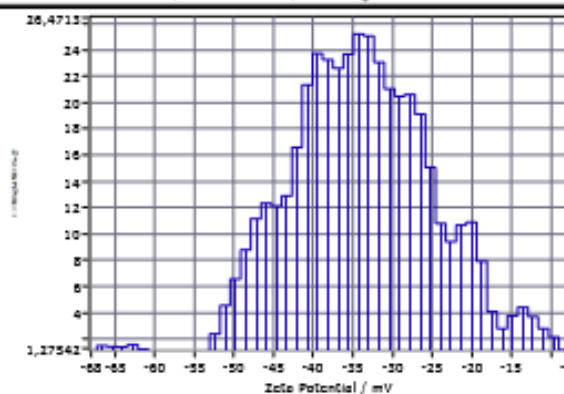
Cell S/N: CA0072-0202new
Sensed Electric Field: 3,15 V/cm (continuous)
Measurement Mode: Stationary 2 Cycles

Quality

Average Counted Particles per Frame: 562
Number of Traced Particles: 458
ΔSL: 3,93 mV

Analysis Parameters

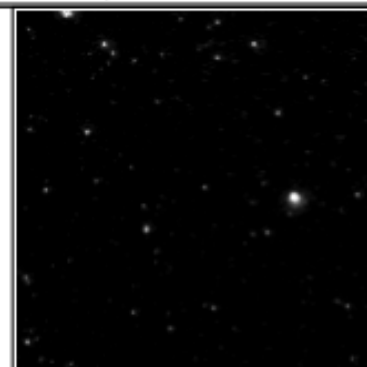
Max Area: 1000, Min Area: 10, Min Brightness: 20



Stationary Layers	Rel. Position
SL1	0,149
SL2	0,851

Peak Analysis (25 °C)

Zeta Potential / mV	Frequency	FWHM / mV	Percentage
-34,1	25,2	19,3	97,2
-64,4	1,4	7,1	2,8



Comment

(Signature)

Analyzed Video: D:\InalliaKsenia\19.12.17\20171220_0006_EV120-IL-Zeta_SL.avi

ZetaVIEW S/N 236, Software ZetaView 8.04.02, Camera 0,703 µm/px

Experiment: 2017-12-20 14:53, Report: 2017-12-20 14:54

Рисунок Б 9– Изображение результатов NTA EV120 образца 3