

На правах рукописи

Волкова Мария Сергеевна

**ЛИМФАТИЧЕСКИЙ РЕГИОН МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В НОРМЕ,
ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ОПУХОЛИ, ХИМИОТЕРАПИИ И
ФИТОКОРРЕКЦИИ**
(анатомо-экспериментальное исследование)

14.03.01 – анатомия человека

03.03.04 –клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» (г. Новосибирск)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Асташов Вадим Васильевич
Ларионов Петр Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
(Омская государственная медицинская академия, заведующий кафедрой анатомии человека, г. Омск)

Путалова Ирина Николаевна

доктор медицинских наук
(Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, ведущий научный сотрудник лаборатории хронофизиологии, г. Новосибирск)

Литвиненко Галина Ивановна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита состоится «_____» _____ 2015 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05 при Новосибирском государственном медицинском университете (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://ngmu.ru/dissertation/357>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

А. В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. При исследовании механизмов биологических эффектов на организм неблагоприятных факторов окружающей среды существенная роль отводится лимфатической системе. Известно, что изменения морфологии и функционирования лимфатических узлов отражают влияние окружающей среды на лимфатическую систему. Морфофункциональное состояние «сторожевых» аксиллярных лимфатических узлов (ЛУ) I порядка при онкологической патологии, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ), до настоящего времени является прогностическим критерием. Состояние лимфатической системы, а именно изменения структуры и транспортной функции аксиллярных лимфоузлов I порядка, а также изменения в кровеносном и лимфатическом русле молочных желез (МЖ) при РМЖ, индуцированном канцерогенами, в доступной литературе не исследованы.

Заболеваемость РМЖ среди женщин составляет до 11 % от всей онкологической патологии. В 2012 году у 56 154 больных в РФ впервые верифицирован РМЖ. На долю смертности от РМЖ в РФ в 2011 году среди женщин пришлось 17,3 %.

Частота возникновения метастазов у больных, получавших комплексную или комбинированную терапию по поводу РМЖ, составляет 70,6 % случаев; у 50 % выявляются отдаленные метастазы. Структурные и функциональные нарушения в близлежащих к основному очагу опухоли лимфатических узлах предшествуют диссеминации опухолевых клеток. Состояние «сторожевых» аксиллярных лимфатических узлов I порядка при РМЖ в настоящее время и определяет прогноз заболевания. Более того, показано усиление лимфангиогенеза при РМЖ.

Предотвращение развития и лечение проявившихся побочных, в том числе и токсических эффектов противоопухолевых препаратов, – актуальная проблема химиотерапии онкологической патологии, в том числе и при РМЖ. Применение лекарственных веществ, в том числе и нетоксических антиканцерогенных фитосборов, в группах повышенного онкологического

риска является перспективным направлением в химиопрофилактике онкологической патологии. На фоне приема фитоадаптогенов отмечено: удлинение времени до развития спонтанных и индуцированных опухолей; снижение скорости роста и частоты возникновения опухолей, уровня метастазирования; увеличение безрецидивного периода в течение заболевания, продолжительности жизни; улучшение качества жизни.

Так фитосбор из пищевых волокон и лекарственных трав, разработанный в Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии, обладает противоопухолевым и антифлогогенным эффектом. Изучение морфологии лимфатического региона МЖ на фоне проведения комбинированной неоадьювантной полихимиотерапии с фитокомплексом как потенциального способа преодоления эндотоксикоза и побочных эффектов неоадьювантной полихимиотерапии при РМЖ является актуальной проблемой.

Цель исследования. Оценка структурной организации аксиллярных лимфатических узлов I порядка, молочной железы в норме и при экспериментальной опухоли молочной железы, индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной, у крыс-самок Wistar на фоне неоадьювантной полихимиотерапии, фитокоррекции и их комбинации.

Задачи исследования

1. Получить новые данные о структуре аксиллярных лимфатических узлов, кровеносных и лимфатических сосудов молочной железы в нормальных условиях жизнедеятельности.

2. Получить новые данные о структуре аксиллярных лимфатических узлов I порядка при опухоли молочной железы до и после неоадьювантной полихимиотерапии.

3. Изучить структуру аксиллярных лимфатических узлов I порядка при опухоли молочной железы при комбинации неоадьювантной полихимиотерапии с фитокоррекцией.

4. Исследовать структуру аксиллярных лимфатических узлов I порядка при опухоли молочной железы с фитокоррекцией.

Научная новизна исследования. Иммуногистохимическим

исследованием операционного материала МЖ у intactных крыс-самок Wistar показано преобладание площади кровеносных сосудов над площадью лимфатических сосудов в норме. При опухоли молочной железы (ОМЖ) у крыс-самок Wistar показано увеличение количества кровеносных и лимфатических сосудов по сравнению с нормой. Показано, что на фоне развития ОМЖ в аксиллярных лимфатических узлах I порядка выявлены структурные изменения, свидетельствующие о нарушении транспорта лимфы и противоопухолевого иммунного ответа, активации микроциркуляции в тканях.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что неоадьювантная полихимиотерапия приводит к развитию нарушений в структуре лимфатических узлов, а именно, подавлению транспортной и лимфопоэтической функций, уменьшению количества опухолевых клеток в лимфатических узлах и деструкции опухоли.

Впервые показано, что комбинация фитокомплекса и неоадьювантной полихимиотерапии при ОМЖ приводит к выраженной деструкции опухоли по сравнению с группой без фитокоррекции и сопровождается структурными преобразованиями в аксиллярных лимфатических узлах I порядка, свидетельствующими о лимфокоррегирующем действии фитокомплекса, активации клеточных эффекторов противоопухолевой резистентности, замедлении лимфотока и активации бласттрансформации, фагоцитоза.

Теоретическая и практическая значимость. Установлено, что некоторые особенности структуры аксиллярных лимфатических узлов при ОМЖ, морфофункциональной организации гемо- и лимфоциркуляторного русла в ОМЖ, по сравнению с нормой, может позволить персонализировать лекарственные препараты для проведения курсов неоадьювантной полихимиотерапии, а также вспомогательных методов и средств, способствующих коррекции функционирования лимфатической системы.

Морфологические данные, полученные в результате работы, свидетельствуют об активации противоопухолевой резистентности аксиллярных лимфатических узлов I порядка при ОМЖ на фоне сочетанного применения неоадьювантной полихимиотерапии и фитокомплекса, что

отражает необходимость дальнейшего изучения и внедрения такой комбинации цитостатиков с фитосбором в практическое здравоохранение.

Показано, что применение фитокомплекса в профилактических целях в течение длительного периода при формировании ОМЖ приводит к структурным изменениям в опухоли. Фитокомплекс обладает антиметастатической активностью, активизирует выраженность локального иммунного ответа, стимулирует процессы фагоцитоза в аксиллярных лимфатических узлах. Полученные в ходе исследования экспериментальные данные позволяют рекомендовать комбинацию неoadъювантной полихимиотерапии с фитокомплексом при РМЖ, а также использовать фитокомплекс для профилактики неопластической трансформации при доброкачественных фиброзно-кистозных гиперплазиях МЖ.

Положения, выносимые на защиту

1. В норме площадь кровеносных сосудов преобладает над площадью лимфатических сосудов микроциркуляторного русла МЖ у крыс-самок Wistar.

2. Введение N-метил-N-нитрозомочевина приводит к формированию злокачественной опухоли в МЖ, усилению локального кровотока и вызывает структурные преобразования в аксиллярных лимфатических узлах I порядка, тем самым свидетельствует о подавлении транспортной и лимфопоэтической функций.

3. Неoadъювантная полихимиотерапия приводит к паракортикальной гиперплазии, угнетению их транспортной функции, уменьшению площади В-зависимой зоны в аксиллярных лимфатических узлах I порядка, а также к деструкции ОМЖ. Применение фитокомплекса на фоне неoadъювантной полихимиотерапии активизирует дренажно-детоксикационную функцию аксиллярных лимфатических узлов I порядка.

4. Прием фитокомплекса у крыс-самок Wistar с индуцированной ОМЖ приводит к структурным преобразованиям в аксиллярных лимфатических узлах I порядка, что проявляется в замедлении лимфотока, увеличении Т-зависимой зоны, активации макрофагов и лимфопоэза, уменьшении количества атипичных клеток и сопровождается трансформацией структуры опухоли.

Апробация результатов исследования. Основные результаты исследования доложены и обсуждены на 7-й международной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)» (Ярославль, 2009), на Международном симпозиуме «Современные проблемы лимфологии» (Алматы, 2009), на 4-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2009), на научно-практической конференции «Роль и место санаторно-курортных и реабилитационных учреждений в системе медицинских кластеров Алтайского края», посвященной 65-летию санатория «Барнаульский» (Барнаул, 2010), на Internationaler Medizinischer Kongress «Euromedica – Hannover 2010» (Hannover, Germany, 2006), на Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии репродуктивной медицины» (Новосибирск, 2010), на 10-й Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии» (Новосибирск, 2011), на 4-м съезде лимфологов России (Москва, 2011), на 8-й Международной конференции «Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология (от ангиогенеза до центрального кровообращения)» (Ярославль, 2011).

Внедрение результатов исследования. Результаты работы внедрены в практику научно-исследовательской работы лаборатории ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск), в учебный процесс кафедры фундаментальной медицины медицинского факультета Новосибирского государственного университета, в практику работы Медико-диагностического центра «Аструм».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций основных результатов материалов диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка, 4 таблицы, состоит

из введения, главы обзора литературы, главы описаний материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы, содержащего 266 отечественных и иностранных источников.

Личное участие автора. Весь представленный материал получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ). Для исследования в качестве экспериментальных животных были выбраны крысы-самки Вистар в возрасте 3-4 месяцев, массой 220–250 г., взятые из вивария НИИКЭЛ. Работа выполнена на 100 животных, разделенных на группы (по 20 животных): 1-я – интактные животные (контроль); 2-я – экспериментальные животные с опухолью молочной железы; 3-я – экспериментальные животные с опухолью молочной в условиях химиотерапии; 4-я – экспериментальные животные с опухолью молочной железы в условиях химиотерапии на фоне коррекции фитокомплексом; 5-я – экспериментальные животные с энтеральным профилактическим введением фитокомплекса.

Моделирование экспериментальной ОМЖ производили с помощью канцерогенного агента N-метил-N-нитрозомочевина (МНМ) по описанной методике (Джигоев Ф. К., 1984, 1989; Дзодзикова М. Э., 2005). Животным (под эфирным наркозом) с помощью шприца подкожно в основание второй МЖ в дозе 2,5 мг на крысу вводили МНМ, разведенную в 0,2 мл дистиллированной воды для инъекций. Инъекции проводили 1 раз в неделю в течение 5 недель. Средний срок формирования опухолевого узла размером 1,0 x 1,5 (см) был равен $174,0 \pm 19,5$ суток. Спонтанного канцерогенеза за период проведения эксперимента (6 месяцев) в 1-й (контрольной) группе животных нами не наблюдалось.

Для химиотерапии опухоли (3-я экспериментальная группа) использовали схему ЦМФ (СМФ) (Циклофосфан, Метотрексат, Фторурацил); лекарственные препараты вводили после окончания 6-го месяца роста опухоли. Циклофосфан (ООО Компания ДЕКО, Россия) вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мг/м²,

ежедневно 14 дней (при пересчете на вес животного однократно вводили 0,3 мг циклофосфана, разведенного в 0,1 мл воды для инъекций). Метотрексат (Веро-метотрексат, ООО Лэнс-Фарм, Россия) вводили внутривенно в дозе 40 мг/м² ежедневно 8 дней (при пересчете на вес животного однократно вводили 0,04 мг метотрексата, разведенного в 0,1 мл воды для инъекций). Фторурацил (ООО Лэнс-Фарм, Россия) вводили внутривенно в дозе 600 мг/м² ежедневно 8 дней (при пересчете на вес животного однократно вводили 2,5 мг фторурацила, разведенного в 0,1 мл воды для инъекций). В 4-й (экспериментальной) группе при опухоли молочной железы на фоне химиотерапии в течение 15 дней в пищу животных добавляли фитокомплекс. В состав фитокомплекса (свидетельство о Государственной регистрации № 77.99.23.3.У.7134.7.09. от 27.07.2009) входят пищевые волокна (ржаные отруби), корень солодки голой, трава череды, морская капуста (ламинария), березовый гриб (чага), трава зверобоя, цветки календулы (ноготки). В 5-й (экспериментальной) группе с профилактическим введением фитокомплекса ежедневно, начиная сразу с окончания введения крысам МНМ, животным в пищу, смешивая со стандартным рационом вивария, добавляли фитокомплекс в течение всех 6 месяцев роста опухоли (при перерасчете на вес животных суточная доза фитокомплекса составляла 10 мг на 100 г массы тела животного). В качестве дополнительного контроля отдельной группе интактных животных в пищу добавляли фитокомплекс также 10 мг на 100 г массы тела животного в течение 15 дней. Нами не было отмечено никаких клинических признаков интоксикации, в лимфатических узлах при микроскопическом исследовании не наблюдали достоверных отличий от показателей интактных животных.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава СССР № 577 от 12.08.77 г.), с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС).

В качестве объектов для морфологических исследований были выбраны: МЖ – интактная, ОМЖ, аксиллярный регионарный лимфатический узел

I порядка (дистальный) для МЖ крыс.

Забранный материал фиксировали и обрабатывали по общепринятым гистологическим методикам, срединные парафиновые срезы органов окрашивали гематоксилином-эозином и азур II-эозином. Морфометрию лимфатических узлов, капсулы, краевого и мозговых синусов, лимфоидных узелков, паракортикальной зоны и мозговых тяжей проводили с помощью стандартной окулярной сетки (микроскоп МБС-10). Рассчитывали отношение относительной площади коркового вещества к площади мозгового вещества (индекс к/м) (Бородин Ю. И., 1969). Подсчитывали абсолютное количество клеток в структурных компонентах лимфатических узлов при помощи окулярной сетки площадью $2\,025\text{ мкм}^2$. Выделение структурных компонентов и клеточных элементов в лимфатических узлах проводили согласно Международной гистологической номенклатуре под редакцией В. В. Семченко (1999). При определении класса лимфоцитов пользовались классификацией М. Р. Сапина (1988). В опухоли производили подсчет относительной площади стромы (элементы соединительной ткани, сосуды) и паренхимы (атипичные опухолевые клетки) на срединных гистологических окрашенных срезах опухоли. Рассчитывали отношение относительной площади стромы опухоли к площади паренхимы. Атипичные опухолевые клетки и патологические митозы дифференцировали в соответствии с имеющимися современными представлениями и рекомендациями в паренхиме опухоли (Струков А. И., Серов В. В., Саркисов Д. С., 1990). Проводилось исследование периферического кровотока (под наркозом) в коже крыс у основания МЖ и на границе опухоли и здоровых тканей, что помогло оценить состояние перфузии тканей в нашем исследовании. Применяли серийный лазерный анализатор капиллярного кровотока (ЛАКК-01, НПП «Лазма», Россия) (Козлов В. И., 1998, 2002).

Проводили иммуногистохимическое исследование кровеносных и лимфатических сосудов МЖ и ОМЖ (срезы с замороженных фрагментов молочной железы и опухоли на криостате, толщиной 8 мкм). Для выявления кровеносных сосудов был использован изолектин Isolectin GS-IB4 from *Griffonia simplicifolia* меченная флуорофором Alexa Fluor 594 («INVITROGEN»,

USA) в разведении 1 : 200, от рабочей концентрации 0,001 на мл 10 часов на шейкере при комнатной температуре во влажной камере. Затем 1 час с официальным раствором АТ против маркера эндотелия лимфатических сосудов DLL-4 («INVITROGEN», USA), после чего использовались goat АТ ABCAM в разведении 1 : 300 против мышинных (двойное окрашивание), меченные FITC. В финале ядра докрашивали DAPY, получали многоканальные изображения с использованием программы AXIOVISION 3.1 три блок фильтра от ZEISS-00 – для красного спектра, 02-DAPY и 38 FITC FITC – для зеленого спектра (SYBR, «Green Reagents») (Бородин Ю. И. с соавт., 2010).

Все полученные в работе данные обрабатывались методом вариационной статистики с определением средней арифметической (M) и ее ошибки (m). Вероятность различий между группами данных считалась достоверной при значениях $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проводилась на компьютере Pentium в среде Windows с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel. В таблицах приведены значения $M \pm m$, указана достоверность различий между показателями по t -критерию Стьюдента (Гланц С., 1998; Лакин Г. Ф., 1990; Лапач С. Н., Чубенко Л. В., Бабич П. Н., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфофункциональное исследование подмышечных лимфатических узлов и МЖ в норме. В работе проведено исследование аксиллярных лимфатических узлов I порядка МЖ. Их анатомическую локализацию определяли методом инъекционной наливки тушью через вторую МЖ справа крыс-самок Вистар. При инъекции в первую очередь окрашивается наиболее каудально расположенный лимфатический узел (первого порядка) из 3-4 подмышечных лимфатических узлов крыс. Результаты проведенного нами исследования структурно-функциональной организации аксиллярных лимфатических узлов МЖ крыс-самок популяции Вистар в норме показало, что они относятся к фрагментированному типу по структурно-функциональной специализации (Бородин Ю. И., 1969) (к/м индекс – 0,59). Клеточный состав аксиллярных лимфатических узлов свидетельствует о физиологических

процессах пролиферации, бласттрансформации и макрофагальной реакции. В светлых центрах лимфоидных узелков число иммунобластов, средних, малых лимфоцитов, клеток на стадии митоза составляло 14,9 %, 17,8 %, 56,7 % и 1,73 % соответственно. Число макрофагов составляет 5,3 %, а ретикулярных клеток 3,57 % от общего числа клеток.

В паракортикальной зоне преобладали в основном малые лимфоциты, (81,53 %). Численность иммунобластов равна 2,25 %, средних лимфоцитов, макрофагов и ретикулярных клеток – 8,1 %, 4,33 % и 3,45 % соответственно. На тучные клетки приходилось 0,33 %. Мозговые тяжи были заполнены зрелыми плазматическими клетками (37,86 %) и малыми лимфоцитами (33,64 %). Число иммунобластов составляло 2,42 %, незрелых плазматических клеток – 5,45 %, а макрофагов и ретикулярных клеток соответственно 3,22 % и 5,39 % от общего числа клеток. В мозговых синусах лимфатических узлов число малых лимфоцитов составляло 34,87 %, количество зрелых и незрелых плазматических клеток 30,42 % и 8,74 % соответственно, а средних лимфоцитов – 10,47 %. Численность иммунобластов, макрофагов, ретикулярных, тучных клеток и нейтрофилов составляло соответственно 2,8 %, 2,64 %, 9,32 %, 0,5 % и 0,25 % от общего числа клеток.

В нашей работе мы исследовали вторую МЖ крыс. Проведенное нами иммуногистохимическое исследование сосудов МЖ в норме у крыс-самок показало, что площадь сечения кровеносных сосудов на тестовую площадь $38285 \mu\text{m}^2$ ($M \pm m$) составляет $198 \pm 16,0$, а лимфатических – $87 \pm 14,5 \mu\text{m}^2$. Исследование кровотока в коже в области МЖ intactных животных выявило преобладание в модуляции кровотока пассивного механизма над активным механизмом, среднее значение показателя микроциркуляции (М) составляло 17,52 пф.ед.

Морфофункциональное исследование аксиллярных лимфатических узлов при экспериментальной ОМЖ. Через 6 месяцев от начала введения МНМ в МЖ крыс визуально наблюдается образование экспериментальной ОМЖ. Структура опухоли представлена множеством железистых разнокалиберных структур. Железы выстланы эпителиальными клетками,

расположенными в один, а иногда – в 2, в 3 и более рядов. Наряду с железисто-солидными, криброзными и тубулярными структурами клетки опухоли формируют мелкие сосочковые структуры. Строма опухоли скудная, представлена небольшим количеством коллагеновых волокон. Клетки опухоли среднего размера, овальной или округлой формы, полиморфные, с умеренно гиперхромными ядрами, содержащими от 1 до 3-х ядрышек, много патологических митозов. Таким образом, опухоль по своему строению представляет собой аденокарциному. Результаты морфометрии опухолевой ткани свидетельствуют о преобладании паренхимы в опухоли ($59,22 \% \pm 1,42 \%$) над стромой ($40,78 \% \pm 1,18 \%$).

При ОМЖ нами выявлены метастазы во всех структурных компонентах лимфатического узла: опухолевые клетки составляют в светлых центрах – 1,53 %, в паракортикальной зоне – 1,96 %, в мозговых тяжах – 3,19 %, в мозговых синусах – 3,37 % от общего числа клеток. В лимфатических узлах выявлено, что площадь коркового вещества уменьшается на 25,8 %, а мозгового увеличивается – на 15,1 % в сравнении с интактными животными. Площадь лимфоидных узелков без светлых центров увеличивается на 73,3 % (см. таблица).

Таблица – Относительные размеры структурно-функциональных зон аксиллярных лимфатических узлов в норме, при опухоли молочной железы (ОМЖ) и в условиях химиотерапии (Х) и фитокоррекции (Ф), фитопрофилактики (ФП) ($M \pm m$) (%)

Структурно-функциональные зоны лимфатических узлов	Интактные животные	ОМЖ	ОМЖ + Х	ОМЖ + Х + Ф	ОМЖ + ФП
Светлый центр лимфоидных узелков	$2,07 \pm 0,1$	$2,87 \pm 0,16^*$	$2,24 \pm 0,14$	$2,89 \pm 0,26^*$	$1,04 \pm 0,06^{*\bullet}$
Мантий лимфоидных узелков со светлыми центрами	$3,75 \pm 0,12$	$3,25 \pm 0,22$	$2,52 \pm 0,12^{*\bullet}$	$4,69 \pm 0,21^{*\bullet}$	$2,06 \pm 0,11^{*\bullet}$

Продолжение таблицы

Структурно-функциональные зоны лимфатических узлов	Интактные животные	ОМЖ	ОМЖ + Х	ОМЖ + Х + Ф	ОМЖ + ФП
Лимфоидные узелки со светлыми центрами	5,82 ± 0,19	6,12 ± 0,29	4,76 ± 0,18*●	7,58 ± 0,31*●	3,1 ± 0,17*●
Лимфоидные узелки без светлых центров	0,75 ± 0,06	1,3 ± 0,08*	0,88 ± 0,04●	1,36 ± 0,13*	1,28 ± 0,06*
Корковое плато	1,27 ± 0,15	1,35 ± 0,06	1,42 ± 0,07	1,49 ± 0,1	1,1 ± 0,06●
Паракортикальная зона	27,23 ± 2,0	17,21 ± 1,4*	21,39 ± 0,37*●	31,11 ± 1,9●	27,14 ± 0,8●
Мозговые тяжи	36,28 ± 2,43	38,76 ± 1,62	44,02 ± 1,28*	32,14 ± 2,4	40,19 ± 1,48
Мозговые синусы	23,59 ± 1,24	30,16 ± 1,12*	23,0 ± 0,55●	21,41 ± 1,4●	23,34 ± 1,01●
Краевой синус	2,1 ± 0,12	2,44 ± 0,13	1,85 ± 0,11●	1,97 ± 0,15	1,51 ± 0,08*●
Капсула	2,7 ± 0,13	2,15 ± 0,08*	2,57 ± 0,08●	2,72 ± 0,17●	1,9 ± 0,06*
Трабекулы	0,25 ± 0,06	0,5 ± 0,07	0,08 ± 0,02●	0,21 ± 0,04●	0,45 ± 0,03*
В-зона	44,12 ± 2,51	47,52 ± 2,69	51,07 ± 2,52*	42,57 ± 2,23	45,67 ± 3,13
Корковое вещество	35,07 ± 1,98	25,98 ± 1,41*	28,45 ± 1,26*	41,54 ± 1,97*●	32,61 ± 2,02●
Мозговое вещество	59,87 ± 2,59	68,92 ± 2,19*	67,0 ± 1,75*	53,55 ± 2,39●	63,53 ± 2,58
Корково-мозговой индекс	0,59 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,51 ± 0,02

В нашем исследовании в аксиллярных лимфатических узлах обнаружены признаки синусного гистиоцитоза (Цыплаков Д. Э., 1997), увеличение площади мозговых синусов на 28 %. В лимфатических узлах выявлено уменьшение площади паракортикальной зоны на 36,8 % (см. таблица), на фоне усиления

процессов пролиферации клеток плазматического ряда увеличивалось количество незрелых плазматических клеток.

Наблюдалось увеличение числа макрофагов во всех структурных зонах лимфатических узлов, что может свидетельствовать об активации фазы распознавания и кооперации клеточного звена иммунитета (Olishevsky S., 2006). На основании проведенных исследований можно заключить, что структурные преобразования в регионарных к опухоли аксиллярных лимфатических узлах свидетельствуют о затруднении транспорта лимфы через них, о лимфостазе, гипоплазии паракортикальной зоны, умеренной фолликулярной реакции, что является характерными признаками угнетения местного противоопухолевого иммунитета (Цыплаков Д. Э., 1997).

Результаты исследования кровотока при ОМЖ показали высокую степень васкуляризации ОМЖ (повышение уровня микроциркуляции, вазомоторной активности микрососудов). Исследование кровеносных и лимфатических сосудов в ОМЖ показало, что площадь кровеносных сосудов превышает в 2,2 раза, лимфатических – почти в 3 раза значения у интактных животных.

Морфофункциональное исследование аксиллярных лимфатических узлов при экспериментальной ОМЖ в условиях химиотерапии. При введении цитостатиков наблюдалось изменение структуры опухоли, опухолевый узел был разделен на сегменты тонкими прослойками соединительной ткани, богато инфильтрированной лимфоцитами, плазматическими клетками, нейтрофильными лейкоцитами. В опухолевой ткани формируются кистозные полости, заполненные секретом. Клетки опухоли среднего, иногда крупного размера, со светлыми ядрами, содержащими от 1 до 2 ядрышек; цитоплазма клеток богато вакуолизирована. Встречаются клетки в разрушенном, фрагментированном состоянии. Результаты исследования опухоли при химиотерапии свидетельствуют о сохраняющемся преобладании паренхимы в опухоли ($56,46\% \pm 1,32\%$) над стромой ($43,47\% \pm 1,14\%$), но при этом в сравнении с группой без лечения площадь стромы возрастает на 6,5 %.

При химиотерапии ОМЖ у крыс тип структурно-функциональной

организации подмышечных лимфатических узлов соответствовал фрагментированному (к/м индекс – 0,42). В лимфатических узлах по сравнению с нелеченой группой отмечались структурные преобразования, свидетельствующие об активации клеточного звена иммунитета – увеличивалась площадь паракортикальной зоны на 24,3 % (см. таблица). Площадь синусов лимфатических узлов уменьшалась по сравнению с нелеченой группой (мозговых – на 23,7 % и краевого – на 24,2 %), достигая значений интактной группы; как и в работе Куликовой О. В. (2008), нами было выявлено уменьшение размеров лимфоидных узелков со светлыми центрами и без светлых центров.

В структурных компонентах лимфатических узлов при химиотерапии опухоли по сравнению с нелеченой группой уменьшается число опухолевых клеток: в светлых центрах лимфоидных узелков – на 80,4 %; в паракортикальной зоне – на 89,3 %; в мозговых тяжах – на 88,7 %; в мозговых синусах – на 69,1 %. В светлых центрах лимфоидных узелков, в сравнении с группой без лечения, число малых лимфоцитов увеличивается на 20,3 %, на фоне уменьшения числа незрелых лимфоидных клеток, количества клеток на стадии митоза. В мозговых тяжах лимфатических узлов при химиотерапии опухоли, в сравнении с группой без лечения, нами выявлено увеличение числа незрелых клеток лимфоидного ряда (увеличилось число иммунобластов в мозговых тяжах в 3,4 раза, количество незрелых плазмочитов и средних лимфоцитов), а количество макрофагов уменьшалось.

Результаты исследования кровотока в условиях химиотерапии опухоли выявили увеличение показателя микроциркуляции как по сравнению с интактной группой, так и группой без лечения.

Морфофункциональное исследование аксиллярных лимфатических узлов экспериментальной ОМЖ в условиях химиотерапии и фитокоррекции. В условиях сочетанного применения химиотерапии и фитокомплекса опухоль представляет собой кистозную полость с папиллярными разрастаниями, исходящими из стенки кисты. Строма ворсин скудная, эпителиальная выстилка представлена многорядным эпителием.

Эпителиальные клетки полиморфные, имеют светлое, базально расположенное ядро с одним или несколькими ядрышками, атипичные митозы. Клетки дистрофически изменены: «разреженность» ядра, фестончатость краев клеток, обильная вакуолизация и зернистость цитоплазмы. Строма в опухоли ($60,84 \% \pm 2,12 \%$) преобладает над паренхимой ($39,60 \% \pm 1,14 \%$), при этом в сравнении с группой без фитокоррекции площадь стромы возрастает на 54 %. Тип структурно-функциональной организации лимфатических узлов соответствует фрагментированному (к/м индекс – 0,78). Площадь коркового вещества лимфатических узлов увеличивается на 46 %, а мозгового уменьшается на 20 % в сравнении с группой с только химиотерапевтической коррекцией (см. таблица). По сравнению с группой с только химиотерапевтической коррекцией площадь паракортикальной зоны увеличилась на 45 %, а площадь В-зависимой зоны уменьшилась на 17 %, транспорт лимфы через лимфатический узел понижался (уменьшилась площадь мозговых синусов на 7 %, мозговых тяжей на 27 %). В мозговых тяжах лимфатических узлов возрастало число иммунобластов на 16 %, незрелых плазматических клеток на 34 %. В мозговом веществе лимфатических узлов обнаружено значительное увеличение численности фагоцитов по сравнению с группой без фитокоррекции: в мозговых тяжах количество нейтрофилов возросло в 11 раз, макрофагов на 32 %, а в мозговых синусах число нейтрофилов выросло в 14 раз, а макрофагов на 17 %.

Результаты исследования кровотока лазерной доплеровской флоуметрии в условиях сочетанной химиотерапии и фитокоррекции по сравнению с нелеченой группой выявили повышение уровня микроциркуляции на 30,7 %.

Морфофункциональное исследование аксиллярных лимфатических узлов при профилактическом применении фитокомплекса в условиях развития экспериментальной ОМЖ. Энтеральное введение фитокомплекса в условиях экспериментального канцерогенеза МЖ (в течение 6 месяцев) приводит к перестройке тканевой архитектоники опухоли. В строении опухоли преобладает площадь стромы ($54,82 \% \pm 1,92 \%$) над площадью паренхимы ($45,18 \% \pm 1,64 \%$), при этом в сравнении с группой без фитофилактики

площадь стромы возрастает на 21 %. Архитектоника опухоли характеризуется более высокой дифференцировкой и полиморфизмом клеточных и тканевых структур, дистрофическими изменениями ткани опухоли, свидетельствующих об изменении степени ее зрелости, замедлении темпов роста и метастазирования. По-видимому, биоантиоксиданты и фитоадаптогены, содержащиеся в лекарственных растениях фитокомплекса, оказывают ингибирующее влияние на канцерогенез, что проявляется снижением степени малигнизации, торможением неопластических изменений в молочной железе.

При применении фитокомплекса в динамике формирования ОМЖ в лимфатических узлах тип структурно-функциональной организации соответствует фрагментированному (к/м индекс – 0,51). По сравнению со 2-й группой площадь паракортикальной зоны увеличилась на 57,7 % при уменьшении площади лимфоидных узелков со светлыми центрами на 49,4 % (см. таблица). Транспорт лимфы через лимфатический узел понижается (уменьшалась площадь мозговых синусов – на 22,7 % и краевого синуса – на 38,1 %). По сравнению с группой с опухолевым ростом без фитопрофилактики в лимфатических узлах отмечается увеличение числа малых лимфоцитов в светлых центрах – на 22,2 %, в мозговых синусах – на 41,1 %, увеличение числа иммунобластов в мозговых тяжах – в 2,8 раза, количества нейтрофилов в мозговых тяжах – 7,2 раза и в мозговых синусах – в 12 раз.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что в норме регионарный аксиллярный лимфатический узел первого порядка по своей структурно-функциональной специализации относится к фрагментированному типу (К/М индекс – 0,59), а в строме молочной железы площадь сечения кровеносных сосудов ($198 \mu\text{m}^2 \pm 16,0 \mu\text{m}^2$) преобладает над площадью лимфатических сосудов ($87 \mu\text{m}^2 \pm 14,5 \mu\text{m}^2$), в коже у основания молочной железы преобладают респираторно-пульсовые флюктуации локального кровотока над вазоконстрикторными.

2. Введение N-метил-N-нитрозомочевина в молочную железу вызывает образование экспериментальной полиморфной злокачественной опухоли (аденокарцинома), с преобладанием паренхимы опухоли

(59,22 % $\pm$ 1,42 %) над стромой (40,78 % $\pm$ 1,18 %), приводит к усилению кровотока и вазомоторной активности микрососудов в пограничных с опухолью тканях. Площадь кровеносных сосудов опухоли (432,4 $\mu\text{m}^2 \pm 24,3 \mu\text{m}^2$) в 2,2 раза превышает значения в молочной железе в норме, а площадь лимфатических сосудов (249 $\mu\text{m}^2 \pm 19,2 \mu\text{m}^2$) в 2,8 раза.

3. При экспериментальной опухоли молочной железы в аксиллярных лимфатических узлах выявлены атипичные клетки (в светлых центрах – 1,53 %, в паракортикальной зоне – 1,96 %, в мозговых тяжах – 3,19 %) и структурные преобразования, свидетельствующие о развитии эндотоксикоза, угнетении клеточного (уменьшение размеров паракортикальной зоны на 36,8 %, количества незрелых лимфоидных клеток) и стимуляции гуморального звеньев иммунитета (увеличение площади лимфоидных узелков без светлых центров на 73,3 %, количества незрелых плазматических клеток в мозговых тяжах на 40 %), активации макрофагальной реакции на фоне отека и усиления лимфонакопления в лимфатических узлах (увеличение площади на 19,6 %, площади мозговых синусов на 28 %).

4. Введение цитостатиков при экспериментальной опухоли молочной железы приводит к структурным преобразованиям в аксиллярных лимфатических узлах, свидетельствующим об активации клеточного (гиперплазия паракортикальной зоны) и угнетении гуморального звеньев иммунитета (уменьшение площади лимфоидных узелков, количества иммунобластов на 37,5 %, клеток на стадии митоза – на 39,3 % в светлых центрах), транспортной функции (уменьшение размеров мозговых и краевого синусов) на фоне уменьшения количества атипичных клеток, что сопровождается деструкцией опухоли (дистрофия, увеличение стромы опухоли на 6,5 %), усилением кровотока в пограничных с опухолью тканях.

5. Сочетанное применение фитокомплекса и цитостатиков при экспериментальной опухоли молочной железы способствует уменьшению количества атипичных клеток в аксиллярных лимфатических узлах, оказывает лимфокорригирующее действие, выражающееся в увеличении коркового вещества на 46 %, паракортикальной гиперплазии, изменении лимфотока

(уменьшение площади мозговых тяжей на 27 %, мозговых синусов на 7 %), в активации процессов бласттрансформации (увеличение количества незрелых плазматических клеток) и фагоцитоза, что сопровождается деструкцией опухоли (кистозная трансформация, увеличение площади стромы на 54 %) и снижением кровотока в пограничной с опухолью тканях.

6. Применение фитокомплекса приводит к активации процессов лимфокоррекции и лимфопротекции в лимфатическом регионе опухоли молочной железы, выражающейся в изменении лимфотока в аксиллярных лимфатических узлах (уменьшение площади мозгового вещества, мозговых и краевого синусов (на 38 %) и увеличении Т-зависимой зоны, процессов бласттрансформации и лимфопоза, фагоцитоза и сокращения количества атипичных клеток, сопровождающихся дистрофией опухоли, увеличением площади стромы опухоли на 21 % и активацией кровотока в пограничных тканях (увеличение показателя микроциркуляции на 41,7 %).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Фитокомплекс целесообразно использовать в схеме терапии сопровождения (вспомогательной фитотерапии) пациентов, проходящих курсы полихимиотерапии при раке молочной железы для активации цитотоксических клеточных реакций и лимфокоррекции.

2. Фитокомплекс целесообразно использовать в качестве профилактического средства при доброкачественных фиброзно-кистозных гиперплазиях в качестве фитоадаптогена для повышения «состояния неспецифической повышенной сопротивляемости» организма.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лимфатические узлы при экспериментальной опухоли молочной железы в условиях диеткоррекции / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, В. И. Чепик // **Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.** – 2010. – Том 8, Выпуск 4. – С. 189–190.

2. Исследование лимфатических узлов при экспериментальном канцерогенезе молочной железы / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов,

О. В. Казаков, П. М. Ларионов, В. И. Чепик // **Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.** – 2011. – Том 9. Выпуск 1. – С. 152–158.

3. Регионарное лимфатическое русло при экспериментальной индукции опухоли молочной железы в условиях профилактической фитотерапии / В. В. Асташов, **М. С. Волкова**, О. В. Казаков, Е. Б. Иванова, П. М. Ларионов, В. И. Чепик, Н. С. Никитин // **Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие.** – 2012 – Том VII, № 2. – С.109–116.

4. Исследование перфузии при экспериментальном канцерогенезе молочной железы / О. В. Казаков, **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, В. И. Чепик // Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику) : материалы 7-й Международной конференции. – Ярославль, 2009. – С. 187.

5. Структурное исследование регионарных лимфатических узлов при экспериментальном канцерогенезе молочной железы / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, В. И. Чепик // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: материалы 4-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Новосибирск, 2009. – С. 50–51.

6. Лимфатические узлы при экспериментальном канцерогенезе молочной железы в условиях профилактического применения фитопрепарата «Берегиня» / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, В. И. Чепик // Создание лекарственных средств на основе продуктов природного происхождения : материалы Российской научно-практической конференции // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – Пермь. – 2010. – Том 7. – С. 42–44.

7. Investigation of the axillary and mesentery lymph nodes under experimental cancerogenesis of the breast cancer in the condition of chemotherapy / **M. S. Volkova**, V. V. Astashov, O. V. Kazakov, N. B. Isakova, Yu. A. Antsyreva // Internationaler kongress & fachmesse. – Hannover, 2010. – P. 97–98.

8. Исследование структуры опухоли молочной железы и регионарных лимфатических узлов при экспериментальном канцерогенезе молочной железы

/ **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, В. И. Чепик // 8-я Всероссийская конференция по патологии клетки : сборник научных трудов. – Москва, 2010. – С. 58–60.

9. Исследование перфузии в условиях химиотерапии экспериментального канцерогенеза молочной железы / О. В. Казаков, **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, В. И. Чепик // Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология (от ангиогенеза до центрального кровообращения) : материалы 8-й Международной конференции. – Ярославль, 2011. – С.159.

10. Регионарные лимфатические узлы при индуцированном канцерогенезе в молочной железе и в условиях применения фитотерапии / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, П. М. Ларионов, В. И. Чепик // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии : материалы 10-й Международной конференции. – Новосибирск, 2011. – С. 106–108.

11. Регионарные лимфатические узлы в условиях применения фитотерапии при индуцированном канцерогенезе / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, П. М. Ларионов, В. И. Чепик // 4-й съезд лимфологов России : материалы. – Москва, 2011. – С. 19–20.

12. Регионарные лимфатические узлы при экспериментальной опухоли молочной железы в условиях диеткоррекции фитопрепаратом с противоопухолевой активностью / **М. С. Волкова**, В. В. Асташов, О. В. Казаков, В. И. Чепик // Роль и место санаторно-курортных и реабилитационных учреждений в системе медицинских кластеров Алтайского края: материалы научно-практической конференции, посвященная 65-летию санатория «Барнаульский». – Барнаул, 2010. – С. 51–53.