

**М. С. Волкова¹, В. В. Асташов^{1,2}, О. В. Казаков¹,
П. М. Ларионов^{1,2}, В. И. Чепик¹**

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
ул. Академика Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия

² Новосибирский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: vwastashov@ngs.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

По стандартной гистологической методике проводилось структурное исследование подмышечных I порядка и брыжеечных лимфатических узлов, компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки на 6 месяце индуцированного (N-метил-N-нитрозомочевина) канцерогенеза молочной железы. Исследование выявило метастазы в подмышечных и брыжеечных лимфатических узлах. Структурные преобразования в подмышечных лимфатических узлах свидетельствуют об активации дренажа лимфы через лимфатический узел, угнетении T- и B-звеньев иммунитета. В брыжеечных лимфатических узлах выявлены структурные признаки, свидетельствующие об уменьшении площади B-зависимой зоны, активации детоксикационной функции (уменьшена площадь мозговых синусов, увеличена площадь T-зависимой зоны, увеличена активность процессов бласттрансформации клеток лимфоидного и плазматического рядов). Свидетельством повышения детоксикационной функции лимфатического узла также является увеличение числа зрелых и незрелых форм клеток лимфоидного ряда, макрофагов в компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки.

Ключевые слова: молочная железа, лимфатические узлы, опухоль.

Лимфатическая система, являясь одной из основных специализированных и саморегулирующихся систем, занимает важное место в комплексной оценке механизма биологического действия на организм различных дестабилизирующих факторов, принимает активное участие в жизнедеятельности органов и тканей, их эндоэкологии, пато- и саногенезе [1; 2]. Проблема патологии молочной железы является одной из наиболее актуальных в современной медицине, что обусловлено неуклонным ростом заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) во всем мире. Одним из звеньев генерализации неопластического процесса является метастазирование опухолевых клеток в лимфатические узлы. Исследование состояния регионарных лимфатических узлов является одним из ведущих прогностических факторов течения заболевания. Развитие злокачественной опухоли приводит к определенным морфологическим и функциональным

изменениям лимфатических узлов, имеющих четкую динамику [3–5]. При этом состояние регионарных лимфатических узлов является одним из ведущих прогностических факторов течения заболевания. Так, состояние сторожевых подмышечных (I порядка) лимфатических узлов при РМЖ до сих пор остается самым значимым фактором, определяющим прогноз заболевания [4]. Изучение брыжеечных лимфатических узлов и компактных лимфоидных фолликулов тонкой кишки позволило выявить структурные изменения, возникающие в отдаленном лимфатическом регионе при индукции канцерогенеза в молочной железе.

Цель исследования – изучить структурную организацию опухоли молочной железы, регионарных (подмышечных I порядка) и отдаленных (брыжеечных) лимфатических узлов, в компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки на 6-м месяце индуцированного канцерогенеза молочной железы.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 40 половозрелых (возраст 3 мес.) крысах-самках популяции Вистар. Сформировано две группы животных: 1-я группа – интактные крысы, 2-я – крысы с опухолью молочной железы. В качестве канцерогенного агента использовано вещество N-метил-N-нитрозомочевина (МНМ). Опухоль молочной железы индуцировали по описанной методике [6]. Эта модель по гистогенезу и морфологическим изменениям очень близка к РМЖ человека [7]. Крыс под эфирным наркозом фиксировали на операционном столике на спине. Выстригали шерсть в области второй молочной железы у основания правой передней конечности, кожу смазывали 70 % водным раствором этилового спирта. С помощью шприца подкожно в область железы в дозе 2,5 мг на крысу вводили МНМ, разведенную в 0,2 мл воды для инъекций. После этого кожу смазывали 5 % спиртовым раствором йода. Инъекции проводили 1 раз в нед. в течение 5 нед. Показатель выживаемости крыс составил 93,3 %. На 6-м месяце эксперимента пятикратное подкожное введение МНМ индуцировало развитие опухоли молочной железы у 90 % животных. Эвтаназия животных осуществлялась через 6 мес. роста опухоли под эфирным наркозом.

Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977.

Для гистологического исследования забирали подмышечные (I порядка) и брыжеечные лимфатические узлы (II порядка), пейеровы бляшки [8]. По стандартной гистологической методике выполняли проводку материала, заливали объекты исследования в парафиновые блоки, с которых затем изготавливали срединные гистологические срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азуром II и эозином [9]. Морфометрию срезов и подсчет клеточных элементов производили в отдельных структурно-функциональных зонах исследуемых лимфатических узлов (ЛУ) путем точечного счета с помощью стандартной сетки (256 точек), вмонтированной в окуляр микроскопа МБС-10. Подсчитывали абсолютное количество клеток при помощи окулярной сетки площадью

2 025 мкм² на микроскопе «Биолам» (Россия). Исследование цитоархитектоники структурных компонентов подмышечных и брыжеечных ЛУ проводилось с учетом локализации метастазов, а компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки – в центрах размножения и мантийной зоне.

Статистическую обработку данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок и определяли значимость отличий (*p*). Критический уровень значимости в данном исследовании принимался менее 0,05.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты морфометрических исследований структуры подмышечных и брыжеечных ЛУ при экспериментальной индукции злокачественной опухоли молочной железы представлены в табл. 1 и 2.

Оценивая полученные результаты, необходимо выделить следующие основные положения исследования. Показано, что через 6 мес. от начала индукции опухоли в молочной железе визуально наблюдалось образование опухолевого узла. Паренхима опухоли представлена крупными атипичными клетками вытянутой формы фибробластического типа. Присутствовали и другие полиморфные атипичные клетки (гигантские многоядерные клетки, патологические митозы), признаки воспалительной инфильтрации (нейтрофилы, плазмциты). Клетки опухоли инфильтрировали окружающую жировую клетчатку, формировались в пучки, которые изгибались, образуя «вихревые», «муаровые» структуры. Редко встречались поля фиброза, миксоматоз межтучного вещества, скопления гигантских атипичных многоядерных клеток. Строма опухоли скудная, представлена аргирофильными волокнами с прослойками коллагеновых волокон, выражена лимфоплазматическая инфильтрация, локализуемая преимущественно по ходу сосудов. В опухолевом поле встречались обширные очаги некроза и кровоизлияний, патологические митозы.

На шестом месяце экспериментального канцерогенеза в подмышечных ЛУ I порядка выявлены атипичные опухолевые клетки с локализацией во всех структурных компонентах узла (см. табл. 2). В структуре ЛУ

Таблица 1

Относительная площадь структурно-функциональных зон подмышечных I порядка и брыжеечных ЛУ в условиях опухоли молочной железы, % ($M \pm m$)

Структурно-функциональная зона	ЛУ	Животные	
		1-я группа	2-я группа
Герминативный центр	подмышечные	2,07 ± 0,10	2,87 ± 0,16 *
	брыжеечные	2,00 ± 0,17	1,87 ± 0,08
Мантий вторичных лимфоидных узелков	подмышечные	3,75 ± 0,12	3,25 ± 0,22
	брыжеечные	2,90 ± 0,14	3,14 ± 0,17
Вторичные лимфоидные узелки	подмышечные	5,82 ± 0,19	6,12 ± 0,29
	брыжеечные	4,90 ± 0,22	5,00 ± 0,20
Первичные лимфоидные узелки	подмышечные	0,75 ± 0,06	1,30 ± 0,08 *
	брыжеечные	1,37 ± 0,11	1,88 ± 0,07 *
Корковое плато	подмышечные	1,27 ± 0,15	1,35 ± 0,06
	брыжеечные	2,25 ± 0,15	3,17 ± 0,18 *
Паракортикальная зона	подмышечные	27,23 ± 2,00	17,21 ± 1,40 *
	брыжеечные	17,45 ± 0,64	28,21 ± 1,03 *
Мозговые тяжи	подмышечные	36,28 ± 2,43	38,76 ± 1,62
	брыжеечные	43,07 ± 1,25	33,24 ± 1,05 *
Мозговые синусы	подмышечные	23,59 ± 1,24	30,16 ± 1,12 *
	брыжеечные	27,89 ± 0,85	23,8 ± 0,93 *
Краевой синус	подмышечные	2,10 ± 0,12	2,44 ± 0,13
	брыжеечные	1,10 ± 0,11	1,91 ± 0,06 *
Капсула	подмышечные	2,70 ± 0,13	2,15 ± 0,08 *
	брыжеечные	1,49 ± 0,07	2,32 ± 0,07 *
Трабекулы	подмышечные	0,25 ± 0,06	0,50 ± 0,07
	брыжеечные	0,50 ± 0,07	0,46 ± 0,05
В-зависимая зона	подмышечные	44,12 ± 2,51	47,52 ± 2,69
	брыжеечные	51,58 ± 2,33	43,3 ± 2,16 *
Корковое вещество	подмышечные	35,07 ± 1,98	25,98 ± 1,41 *
	брыжеечные	25,97 ± 1,09	38,27 ± 1,67 *
Мозговое вещество	подмышечные	59,87 ± 2,59	68,92 ± 2,19 *
	брыжеечные	70,95 ± 1,85	57,04 ± 1,47 *
Корково-мозговой индекс	подмышечные	0,59 ± 0,02	0,38 ± 0,02
	брыжеечные	0,37 ± 0,02	0,67 ± 0,03

Примечание. * – отличия достоверны в сравнении с 1-й группой животных ($p < 0,05$).

обнаружено увеличение на 19,6 % общей площади срезов относительно 1-й группы животных. При этом увеличение площади мозговых синусов на 28 % может свидетельствовать о лимфонополнении синусной системы на фоне угнетения клеточного звена иммунитета (см. табл. 1). Уменьшение площади тимусзависимой зоны на 36,8 % сочеталось со снижением общего количества лимфоидных клеток и, как следствие, активированных цитотоксических лимфоцитов, являющихся основными противоопу-

холевыми элементами. Одновременно установлено снижение активности процессов пролиферации и бласттрансформации клеток лимфоидного и бласттрансформации плазматического рядов: уменьшалось число лимфобластов, средних и малых лимфоцитов, зрелых плазматических клеток (см. табл. 2). Значительно возросло количество макрофагов во всех структурных компонентах ЛУ.

В структурных компонентах брыжеечных ЛУ, как в узлах, удаленных от места ло-

Таблица 2

Цитоархитектоника структурно-функциональных зон подмышечных I порядка и брыжеечных ЛУ в условиях опухоли молочной железы, % ($M \pm m$)

Клеточные элементы	ЛУ	Животные	
		1-я группа	2-я группа
Герминативные центры вторичных лимфоидных узелков			
Лимфобласты	подмышечные	14,91 ± 0,59	11,36 ± 0,48 *
	брыжеечные	9,32 ± 0,40	7,97 ± 0,38 *
Средние лимфоциты	подмышечные	17,78 ± 0,59	17,55 ± 0,60
	брыжеечные	17,61 ± 0,65	6,79 ± 0,26 *
Малые лимфоциты	подмышечные	56,70 ± 1,19	49,1 ± 1,44 *
	брыжеечные	59,30 ± 1,38	67,08 ± 1,31 *
Макрофаги	подмышечные	5,30 ± 0,31	10,91 ± 0,52 *
	брыжеечные	6,46 ± 0,34	4,47 ± 0,28 *
Ретикулярные клетки	подмышечные	3,57 ± 0,28	8,11 ± 0,53 *
	брыжеечные	5,89 ± 0,31	7,22 ± 0,38 *
Митозы	подмышечные	1,73 ± 0,21	1,47 ± 0,23
	брыжеечные	1,41 ± 0,20	1,19 ± 0,21
Опухолевые клетки	подмышечные	–	1,53 ± 0,25
	брыжеечные	–	5,28 ± 0,43
Мозговые тяжи			
Средние лимфоциты	подмышечные	11,33 ± 0,58	9,43 ± 0,56
	брыжеечные	15,45 ± 0,55	10,15 ± 0,45 *
Малые лимфоциты	подмышечные	33,64 ± 1,37	35,39 ± 1,64
	брыжеечные	36,39 ± 0,73	41,4 ± 1,45 *
Плазмобласты	подмышечные	2,42 ± 0,23	2,93 ± 0,30
	брыжеечные	8,73 ± 0,37	2,69 ± 0,28 *
Незрелые плазматические клетки	подмышечные	5,45 ± 0,30	7,61 ± 0,32 *
	брыжеечные	5,30 ± 0,26	8,67 ± 0,40 *
Зрелые плазматические клетки	подмышечные	37,86 ± 1,39	27,33 ± 1,18 *
	брыжеечные	23,39 ± 0,74	20,23 ± 0,87
Макрофаги	подмышечные	3,22 ± 0,23	5,60 ± 0,35 *
	брыжеечные	3,53 ± 0,27	5,38 ± 0,39 *
Ретикулярные клетки	подмышечные	5,39 ± 0,34	7,74 ± 0,60 *
	брыжеечные	5,64 ± 0,34	7,80 ± 0,35 *
Митозы	подмышечные	0,56 ± 0,15	0,65 ± 0,17
	брыжеечные	1,47 ± 0,17	0,40 ± 0,14 *
Опухолевые клетки	подмышечные	–	3,19 ± 0,34
	брыжеечные	–	3,16 ± 0,28
Нейтрофилы	подмышечные	0,12 ± 0,08	0,13 ± 0,09
	брыжеечные	0,10 ± 0,06	0,13 ± 0,09
Мозговые синусы			
Средние лимфоциты	подмышечные	10,47 ± 0,45	7,22 ± 0,46 *
	брыжеечные	7,33 ± 0,39	8,79 ± 0,54
Малые лимфоциты	подмышечные	34,87 ± 1,20	22,15 ± 1,00 *
	брыжеечные	40,23 ± 1,60	37,53 ± 1,72
Плазмобласты	подмышечные	2,80 ± 0,28	6,02 ± 0,28 *
	брыжеечные	2,05 ± 0,24	2,97 ± 0,31

Окончание табл. 2

Клеточные элементы	ЛУ	Животные	
		1-я группа	2-я группа
Незрелые плазматические клетки	подмышечные	8,74 ± 0,48	9,31 ± 0,44
	брыжеечные	8,57 ± 0,46	10,43 ± 0,62
Зрелые плазматические клетки	подмышечные	30,42 ± 1,22	27,29 ± 1,13
	брыжеечные	31,53 ± 1,01	23,82 ± 0,93 *
Макрофаги	подмышечные	2,64 ± 0,31	4,82 ± 0,36 *
	брыжеечные	1,23 ± 0,18	1,84 ± 0,27
Ретикулярные клетки	подмышечные	9,32 ± 0,56	19,18 ± 0,92 *
	брыжеечные	8,43 ± 0,45	11,55 ± 0,68 *
Тучные клетки	подмышечные	0,50 ± 0,18	0,48 ± 0,17
	брыжеечные	0,41 ± 0,15	0,92 ± 0,26
Опухолевые клетки	подмышечные	–	3,37 ± 0,40
	брыжеечные	–	1,84 ± 0,27
Нейтрофилы	подмышечные	0,25 ± 0,13	0,16 ± 0,11
	брыжеечные	0,21 ± 0,11	0,31 ± 0,17

Примечание. * – отличия достоверны в сравнении с 1-й группой животных ($p < 0,05$).

кализации опухоли, так же как и в подмышечных ЛУ, выявлены метастазы во всех структурных компонентах изучаемого органа (см. табл. 2). Известно, что на начальных этапах опухолевого роста в организме может формироваться протективный Th1-зависимый цитотоксический иммунный ответ [10]. Основные события при этом происходят в паракортикальной зоне регионарных ЛУ: морфологически они проявляются увеличением площади данной зоны, ростом численности лимфоцитов, усилением пролиферативных процессов. В нашем случае, в отличие от подмышечных ЛУ, в брыжеечных узлах отмечены структурные признаки активации барьерной функции, которые выражались в снижении транспорта лимфы через ЛУ (уменьшена площадь мозговых синусов на 14,7%), увеличении площади тимусзависимой зоны (на 62%), численности зрелых эффекторных лимфоидных клеток (малых лимфоцитов) и незрелых плазматических клеток (на 63,6%), макрофагальной реакции. Все эти изменения происходили на фоне уменьшения площадей структурных компонентов ответственных за гуморальное звено иммунитета: В-зависимой зоны на 16, мозговых тяжей – на 22,8%. Выявленное увеличение площади Т-зоны на фоне уменьшения площади В-зо-

ны можно рассматривать благоприятно с точки зрения сохранения активности клеточного звена лимфоидной системы [11].

Выявленное в компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки увеличение площади центров размножения в 2 раза, в которых отмечалось увеличение количества малых лимфоцитов на 15% (1-я группа – 59,71 ± 1,35%), макрофагов – в 3,4 раза (1-я группа – 1,23 ± 0,18%), а в мантийной зоне увеличение числа лимфобластов в 3 раза (1-я группа – 0,85 ± 0,11%) и средних лимфоцитов на 33,6% (1-я группа – 4,73 ± 0,26%). Это может являться свидетельством антигенной стимуляции и активации детоксикационной функции периферических лимфоидных органов, ассоциированных с тонкой кишкой [12]. В данном случае, при совокупности морфологических преобразований в компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки и брыжеечных ЛУ (уменьшена площадь мозговых синусов, увеличена тимусзависимой зоны), этот факт свидетельствует в пользу повышения детоксикационной функции лимфатического узла.

Заключение

При анализе полученных экспериментальных данных выявлено, что первичная

опухоль молочной железы (через 6 мес. экспериментального канцерогенеза) по своему строению представляла собой плеоморфную фибросаркому, развивающуюся из стромы молочной железы, а в регионарных для молочной железы подмышечных ЛУ и удаленных, брыжеечных узлах выявлены вторичные опухолевые узлы (метастазы). Структурные преобразования в подмышечных ЛУ свидетельствуют об активации дренажа лимфы через них (увеличены площади мозговых синусов), угнетении Т- и В-звеньев иммунного ответа. В брыжеечных ЛУ выявлена структурная реакция, которая, с одной стороны, является результатом поражения их метастазами (уменьшение общей площади В-зависимой зоны), а с другой – активацией детоксикационной функции (уменьшение площади мозговых синусов, гиперплазия функционально-значимых отделов паренхимы лимфатических узлов ответственных за Т-звено иммунного ответа, повышение активности процессов бласттрансформации клеток лимфоидного и плазматического рядов). Выявленное увеличение числа зрелых и незрелых форм клеток лимфоидного ряда, макрофагов в компактных лимфоидных фолликулах тонкой кишки является свидетельством эндогенной антигенной стимуляции при канцерогенезе, структурным признаком, объясняющим активацию детоксикационной функции брыжеечных ЛУ. Полученные данные свидетельствуют о том, что при экспериментальном канцерогенезе молочной железы вторичные опухолевые узлы (метастазы) формируются как непосредственно в регионе локализации опухоли, так и в отдаленном регионе брюшной полости. Регионарный эндотоксикоз, формирующийся при экспериментальном канцерогенезе молочной железы, вызывал более выраженное повреждающее действие на структурную организацию регионарного к опухоли лимфатического узла (подмышечного), что, по-видимому, приводило к угнетению его барьерно-детоксикационной функции и генерализации процесса. Отдаленные от роста первичного опухолевого узла ЛУ (брыжеечные) и лимфоидные структуры (компактные лимфоидные фолликулы) подвержены менее выраженным структурным повреждениям, которые формируются преимущественно за счет вторичных опухоле-

вых очагов (метастазов), но не за счет регионарного лимфотоксикоза.

Список литературы

1. *Бородин Ю. И.* Институт лимфологии и проблемы лимфологии // Бюл. Сиб. отд. ния РАМН. 2001. № 4. С.5–11.
2. *Бородин Ю. И.* Регионарный лимфатический дренаж и лимфодетоксикация // Морфология. 2005. Т. 128. (4). С. 25–28.
3. *Летягин В. П.* Первичные опухоли молочной железы. Практическое руководство по лечению. М., 2004. С. 58–60.
4. *Kaufmann M., Sharl F.* Prognostic Factors in Breast Cancer // Eur. J. Cancer. 2000. Vol. 36. P. 293–306.
5. *Brancato B., Zappa M., Bricolo D., Catarzi S., Risso G., Bonardi R., Cariaggi P., Bianchin A., Bricolo P., Rosselli Del Turco M., Cataliotti L., Bianchi S., Ciatto S.* Role of Ultrasound-Guided Fine Needle Cytology of Axillary Lymph Nodes in Breast Carcinoma Staging / Radiol. Med. (Torino). 2004. Vol. 108 (4). P. 345–55.
6. *Джиоев Ф. К.* О влиянии зитазониума и двухсторонней овариэктомии на возникновение опухолей молочной железы, индуцированных у крыс N-нитрозо-N-метилмочевинной // Сб. науч. тр. СОГМИ. Красно-дар, 1989. С. 112–114.
7. *Shilkaitis A., Green A., Steele V., Lubet R., Kelloff G., Christov K.* Neoplastic Transformation of Mammary Epithelial Cells in Rats Is Associated with Decreased Apoptotic Cell Death // Carcinogenesis. 2000. Vol. 21, № 2. P. 227–233.
8. *Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л.* Анатомия крысы (лабораторные животные). СПб., 2001.
9. Микроскопическая техника / Под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова. М., 1996.
10. *Цыплаков Д. Э.* Рак и регионарные лимфатические узлы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 1997.
11. *Бородин Ю. И., Красильников С. Э., Юкляева Н. В., Обухова Л. А.* Структурные изменения в регионарных лимфатических узлах при раке шейки матки в условиях системного введения цитостатиков // Сибирский онкологический журнал. 2004. № 4. С. 63–65.

12. Spahn T. W., Muller M. K., Domschke W., Kucharzik T. Role of Lymphotoxins in the Development of Peyer's Patches and Mesenteric Lymph Nodes: Relevance to Intestinal Inflam-

mation and Treatment // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006. Vol. 1072. P. 187–193.

Материал поступил в редколлегию 28.10.2010

M. S. Volkova, V. V. Astashov, O. V. Kazakov, P. M. Larionov, V. I. Chepik

**INVESTIGATION OF LYMPH NODES
AT EXPERIMENTAL CANCEROGENESIS OF MAMMARY GLAND**

By standard histologic technique structural research axillary I order and mesentery lymph nodes, compact lymph follicles of small bowel was carried out on 6 month induced (N-metil-N-nitrozourea) cancerogenesis mammary gland. Investigation has revealed metastasizes in axillary and mesentery lymph nodes. Structural transformations in axillary lymph nodes testify to activation of drainage of lymph through lymph node, depression T- and B-links of immune. In mesentery lymph nodes revealed structural attributes the areas testifying to reduction B- dependent zone, activation detoxication functions (reduced areas of medullary sinus, increased area T-dependent zone, increased activity of processes blasttransformation cells lymphatic and plasmatic lines). The certificate of increase detoxication functions of lymph node also is increase of number of mature and unripe forms of cells lymphatic lines, macrophage in compact lymph follicles of small bowel.

Keywords: mammary gland, lymph nodes, tumor.