

РАЗДЕЛ 1 ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ ПРОСТАТЫ

ЛОМШАКОВ А.А.¹, БОРОДИН Ю.И.¹, АСТАШОВ В.В.², КАЗАКОВ О.В.¹

MORPHOLOGICAL EXAMINATION OF REGIONAL LYMPH NODES IN EXPERIMENTAL PROSTATE CANCER

LOMSHAKOV A.A., BORODIN YU.I., ASTASHOV V.V., KAZAKOV O.V.

¹Лаборатория физиологии протективной системы (зав. лабораторией – доктор медицинских наук А.Ф. Повещенко) ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, Новосибирск; ²Лаборатория экспериментальной фармакологии (зав. лабораторией – профессор В.В.Асташов) ЗАО «Исследовательский институт химического раз-нообразия», Москва.

В исследовании с помощью гистологических и гистохимических методов изучено количество лимфатических и кровеносных сосудов в простате, структура тазовых и почечных лимфатических узлов при экспериментальной опухоли в простате у мышей линии СВА при трансплантации асцитной опухоли Эрлиха через 5 и 18 суток. На 5 сутки, в лимфатических узлах метастазов не обнаружено, выявлены характерные морфологические преобразования: паракортикальная гиперплазия, синусный гистиоцитоз, активация бласттрансформации. На 18 сутки в простате обнаружено полное замещение нормальной ткани атипичными клетками, в лимфатических узлах определяются метастазы, в тазовых лимфатических узлах обнаружена фолликулярная реакция, усиление транспортной функции, на фоне увеличения числа лимфатических сосудов в простате; в почечных лимфатических узлах выявлена паракортикальная гиперплазия, сокращение размеров мозговых синусов.

Ключевые слова: лимфатические узлы, лимфатические сосуды, экспериментальная опухоль простаты.

In a study using histological and histochemical methods studied the amount of lymphatic and blood vessels in the prostate, pelvic structure and renal lymph nodes in experimental tumors in the prostate in CBA mice with Ehrlich's ascites tumor transplantation at 5 and 18 days. On day 5, lymph node metastases

were found, revealed characteristic morphological transformation: paracortical hyperplasia, sinus histiocytosis, activation of blast transformation. On day 18 in the prostate detected complete replacement of normal tissue with atypical cells in the lymph nodes are determined by metastases in the pelvic lymph nodes detected follicular response, increased transport function, against the backdrop of increasing the number of lymphatic vessels in the prostate; in the renal lymph nodes revealed paracortical hyperplasia, reducing the size of the cerebral sinuses.

Keywords: lymph nodes, lymph vessels, experimental prostate tumor.

Введение. Рак простаты является причиной почти 10 % смертей мужчин от рака и одной из главных причин смерти у пожилых мужчин. В России до 70% больных раком предстательной железы обращаются к врачу уже в 3-4 стадии заболевания, при наличии метастазов [1]. Принципиальным моментом генерализации злокачественного роста является метастазирование опухолевых клеток в лимфатические узлы. В значительной степени это связано с прогностической ролью регионарных лимфатических узлов, подверженных структурным изменениям при злокачественном опухолевом процессе, а также обеспечивающих барьерно-детоксикационную функцию в лимфатических регионах [2, 3]. Структурная организация лимфатических узлов при раке простаты является одним из самых важных факторов, определяющих прогноз заболевания [4], выявление метастазов в лимфатических узлах важнейшей задачей определения стадии рака простаты [5]. Исследование регионарных лимфатических узлов и количества кровеносных и лимфатических сосудов простаты при трансплантационной индукции канцерогенеза, позволит нам выявить характерные изменения их структурной организации, зависящие от стадии опухолевого процесса, лимфогенного метастазирования, что имеет важное значение в

оценке действия противоопухолевых соединений и препаратов.

Цель исследования - выявить структурные преобразование в опухоли простаты, тазовых и почечных лимфатических узлах в различные сроки формирования экспериментальной злокачественной опухоли простаты.

Материал и методы исследования. В работе использовали половозрелых 14 недельных самцов-мышей СВА в количестве 45 особей (ви-варий ФГБУ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск). Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава СССР №577 от 12.08.77 г. Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС). Экспериментальная модель злокачественного опухолевого роста в простате создавалась путем инокуляции (под эфирным наркозом) разведенного клеточного штамма трансплантируемой асцитной опухоли Эрлиха (ОЭ) в паренхиму простаты: инъекциями вводили 0,2 мл асцитической жидкости содержащей $500-550 \times 10^3$ атипичных опухолевых клеток [6]. Экспериментальные животные были разделены на 3 экспериментальные группы:

1. интактные животные;
2. экспериментальная опухоль простаты (5 сутки);
3. экспериментальная опухоль простаты (18 сутки). Эвтаназия животных осуществлялась под эфирным наркозом на 5-е и 18-н сутки роста опухоли.

Для гистологического исследования забирали простату, фрагменты опухолевой ткани, тазовые (каудальные) и почечные лимфатические узлы, являющиеся по своему анатомо-топографическому расположению регионарными лимфатическими узлами I порядка для органов малого таза и простаты у мышей [7]. По стандартной гистологической методике выполняли проводку материала, заливали объекты исследования в парафиновые блоки, с которых делали срединные гистологические срезы толщиной 5 - 7 мкм [8] Срезы окрашивали гематоксилин - эозином и азур II – эозином. Гистологические препараты изучали на световых микроскопах Leica (Германия), МБС-10 при увеличении 32, 400 и 1000 раз, с помощью окулярной тестовой системы производили морфометрию срезов и подсчет клеточных элементов в опухоли и отдельных структурно - функциональных зонах лимфатических узлов, определяли соотношение паренхиматозного и соединительно-тканного компонента в опухолевой ткани [9]. В качестве главного гистохимического маркера

лимфатических эндотелиоцитов использовали 5'- нуклеотидазу (5Н), а для эндотелиоцитов кровеносных капилляров щелочную фосфатазу (ЩФ). Образцы ткани простаты подвергались быстрому замораживанию в жидком азоте. Далее, на криостатном микротоме (MICROM HM 550) выполняли резку образцов на срезы толщиной 7 мкм и проводили постфиксацию в смеси ацетон/спирт 95% в течение 5 минут. На полученных срезах ткани простаты лимфатические и кровеносные микрососуды выявляли двухэтапным методом гистохимического окрашивания образца. В препаратах простаты, после гистохимического окрашивания, определяли среднее количество лимфатических и кровеносных сосудов в строме простаты и опухоли на площади 92927 мкм^2 [10]. Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок и определяли значимость различий (p – стандартная ошибка среднего). Критический уровень значимости в данном исследовании принимался $p < 0,05$ [11].

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты микроскопического исследования простаты у мышей показали, что она представлена железистой паренхимой, разделенной соединительнотканными перегородками, выводными протоками заключенными в капсулу (рис. 1). В строме простаты в условиях физиологической жизнедеятельности животных (интактные животные, контроль) среднее количество кровеносных сосудов (артериолы) составляет $129,6 \pm 12,7$, лимфатических сосудов $30,2 \pm 1,28$ на исследованной площади. Микроскопически выявлено, что на 5 сутки индуцированного канцерогенеза простаты формируется опухолевый узел диаметром 1,5–2 мм, состоящий из полиморфных атипичных клеток (рис. 2).

Морфометрия стромы простаты на 5-е сутки эксперимента, свидетельствует, что количество кровеносных сосудов на площади среза уменьшается, в сравнении с интактными животными на 16%, лимфатических на 15%.

В тазовых лимфатических узлах на 5-е сутки, в сравнении с интактными животными, наблюдали увеличение площади тимусзависимой (паракортикальной) зоны на 74,9%, в почечных – на 30%. В тазовых лимфатических узлах уменьшалась площадь первичных и вторичных лимфоидных узелков – на 64,2%, мозговых тяжей – на 18%, В-зоны – на 25,4% (рис. 3 и 4). В почечных лимфатических узлах на данном этапе эксперимента выявлено увеличение размеров вторичных лимфоидных узелков на 77%, как за счет возрастания площади светлого центра, так и мантия, площадь коркового плато увеличилась на 85%. Размеры мозговых тяжей почечных лимфатических узлов уменьшились на 11%, мозговых синусов на 14 %, В-зоны на 5%.

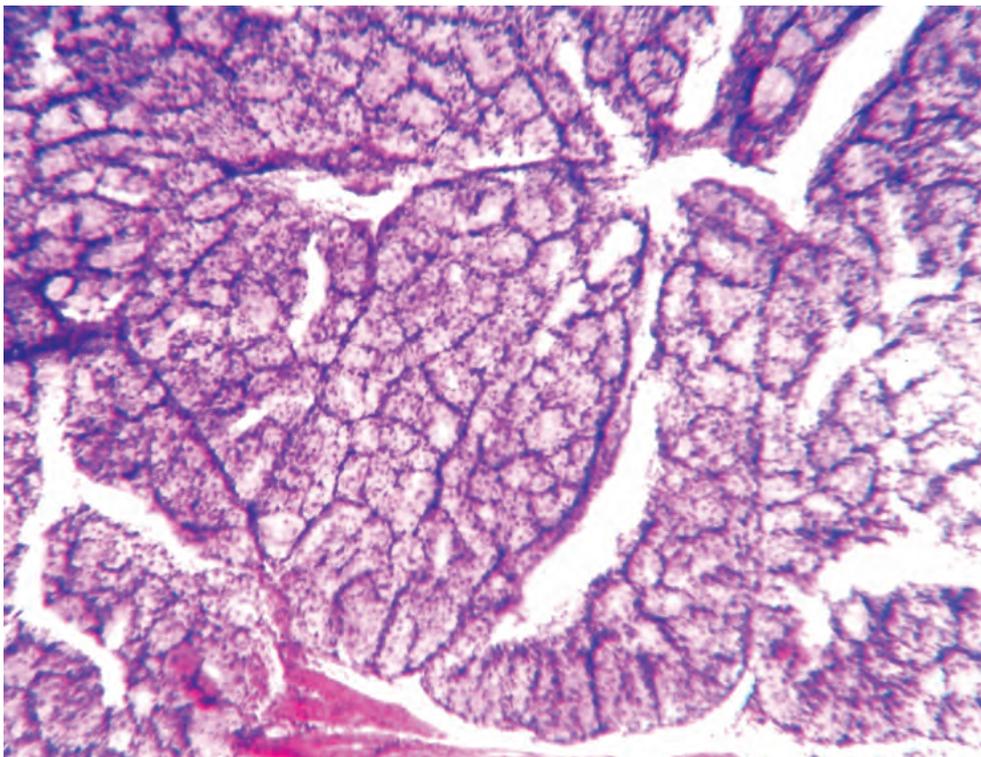


Рис. 1. Простата у интактной мыши. Контроль. Железистая паренхима с соединительнотканными перегородками и выводные протоки. Гематоксилин-эозин. Ув. 100

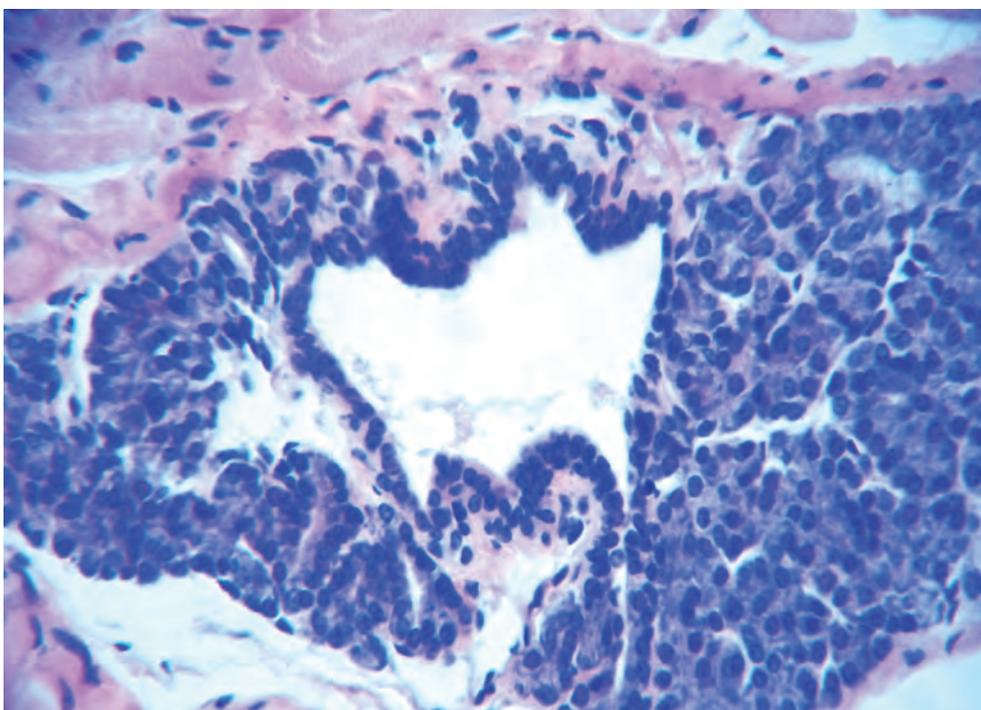
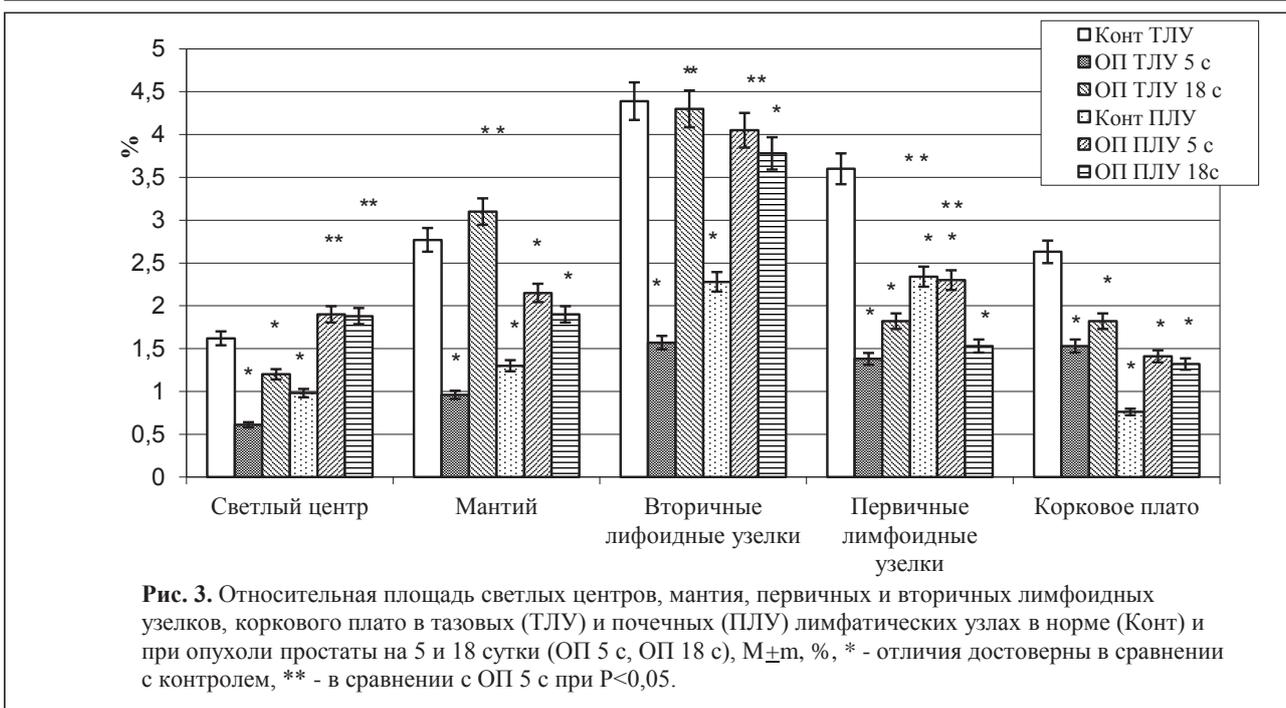
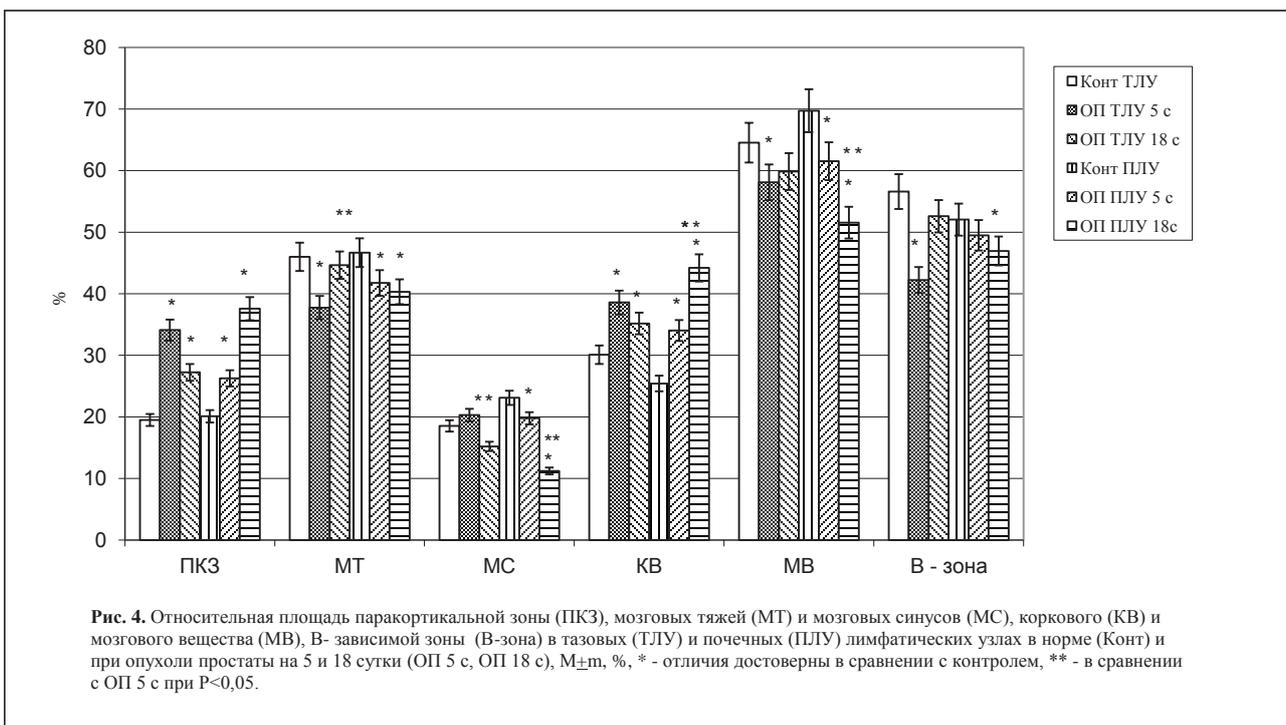


Рис. 2. Опухоль простаты у мышей. 5 сутки. Солидными пласты полиморфных клеток, разделенных тонкими прослойками соединительной ткани. Гематоксилин-эозин. Ув. 400



В структурных компонентах тазовых лимфатических узлов ответственных за гуморальное звено иммунитета (рис. 5) на 5 сутки роста опухоли выявлено увеличение числа зрелых форм клеток лимфоидного ряда (малых лимфоцитов в светлых центрах – на 13%) и незрелых форм клеток плазматического ряда (иммунобластов в мозговых тяжах – в 3,2 раза, незрелых плазматических клеток на 25% в мозговых синусах). Выраженная макрофа-

гальная реакция отмечается только в мозговых тяжах (увеличивалось число макрофагов – на 69,7%) (рис.7). В почечных лимфатических узлах наблюдалась противоположная картина (рис.5), свидетельствующая об активации процессов пролиферации: в светлых центрах численность иммунобластов увеличивалась на 18%, средних лимфоцитов на 53%, клеток на стадии митоза в 2 раза, а количество малых лимфоцитов умень-



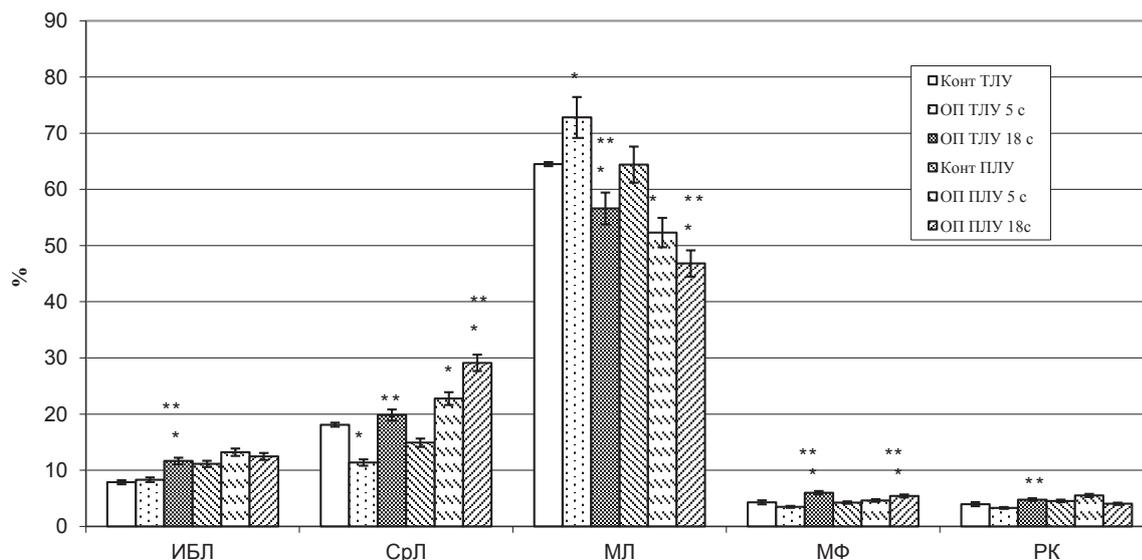


Рис. 5. Клеточный состав светлых центров вторичных лимфоидных узлов (ИБЛ - иммунобласты, СрЛ - средние лимфоциты, МЛ - малые лимфоциты, МФ - макрофаги, РК - ретикулярные клетки в тазовых (ТЛУ) и почечных (ПЛУ) лимфатических узлах в норме (Конт) и при опухоли простаты на 5 и 18 сутки (ОП 5 с, ОП 18 с), М+м, %, * - отличия достоверны в сравнении с контролем, ** - в сравнении с ОП 5 с при $P < 0,05$.

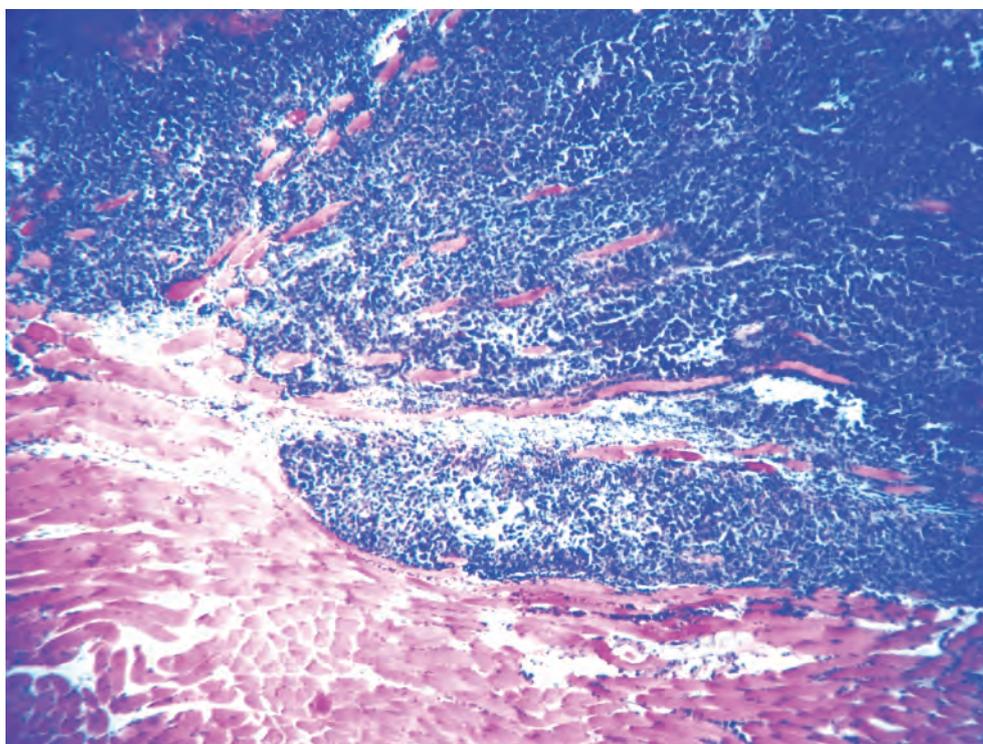
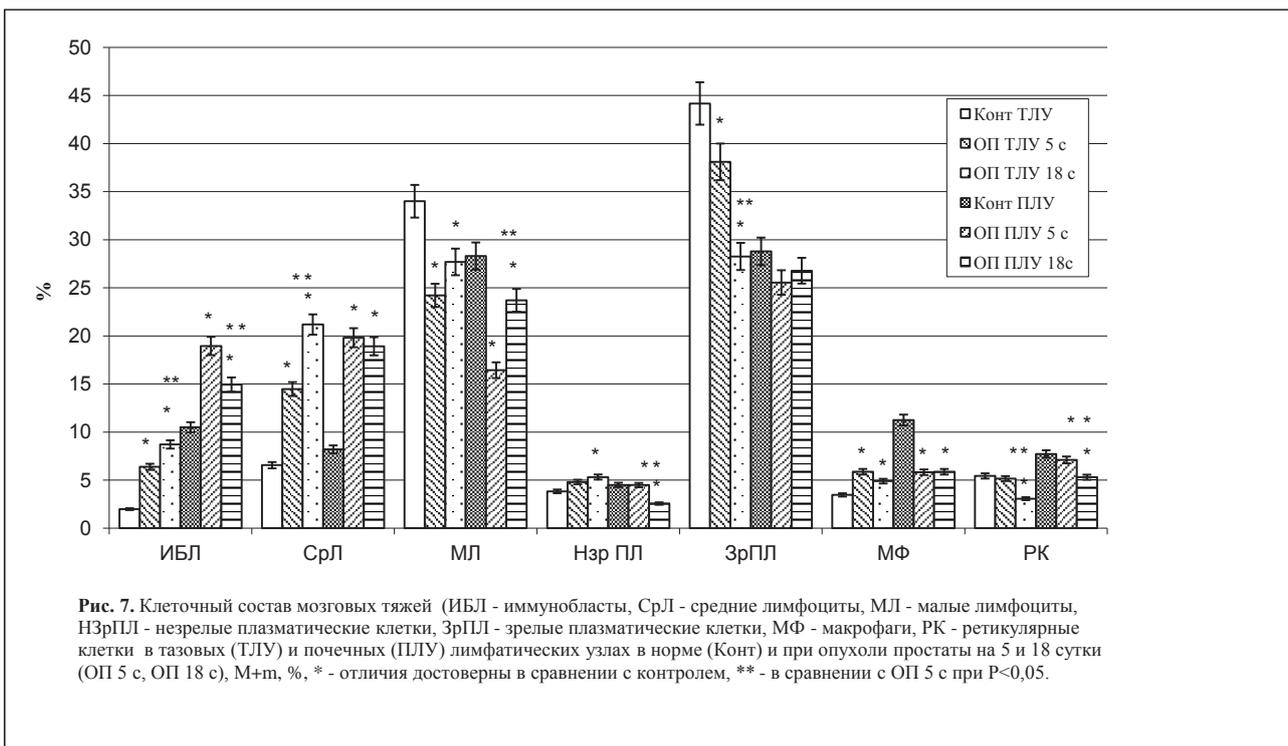


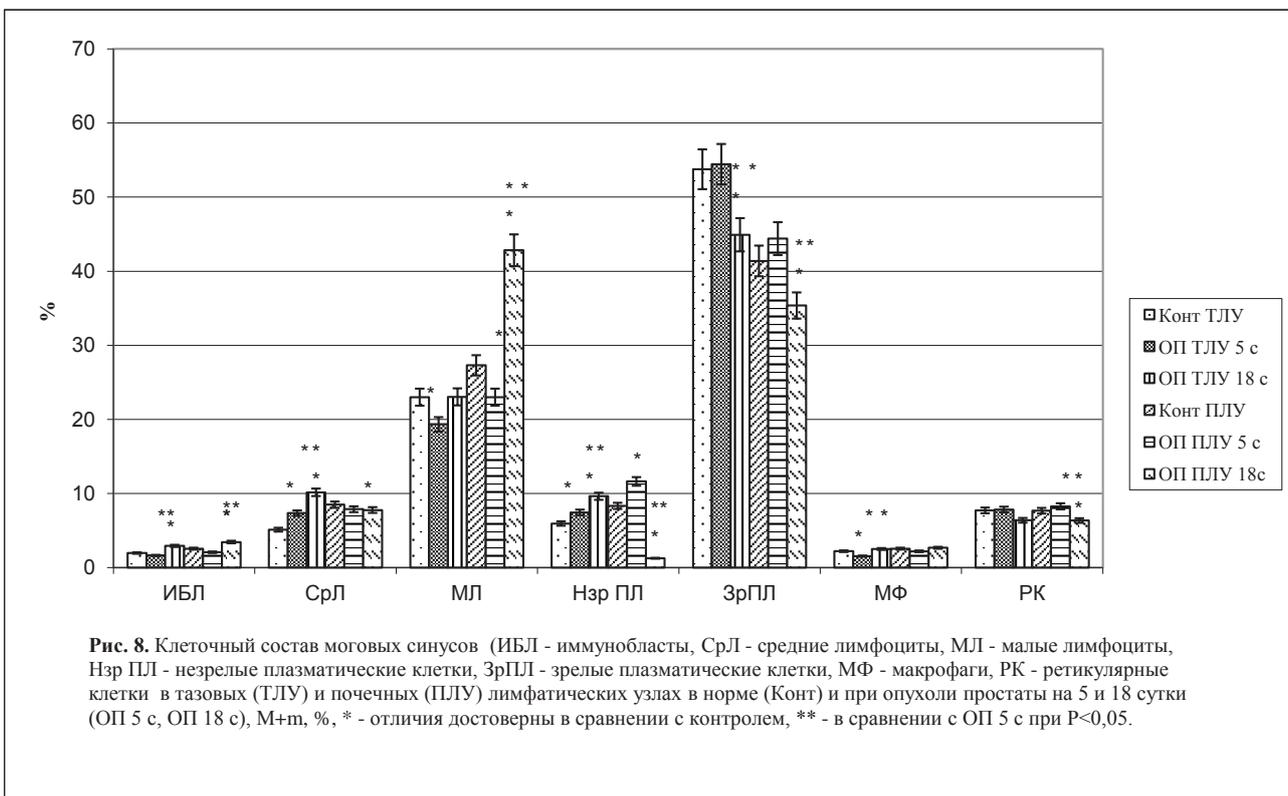
Рис. 6. Опухоль простаты у мышей. 18 сутки. Опухоль по структуре соответствует низкодифференцированной солидно-трабекулярной аденокарциноме с выраженными признаками анаплазии и инфильтрирующим ростом, строма опухоли, представлена аргирофильными волокнами с прослойками коллагеновых волокон. Гематоксилин-эозин. Ув.200



шалось на 19%. В мозговых тязях увеличивалось число незрелых лимфоидных клеток (иммунобластов на 80%, средних лимфоцитов в 2,4), а количество макрофагов уменьшилось на 48%. Для клеточного состава мозговых синусов характерно было увеличение числа незрелых и зрелых плаз-

матических клеток, на фоне уменьшения числа тучных клеток (рис. 8) .

На 18 сутки роста опухоли (2-ая экспериментальная группа) на гистологических срезах простаты мышей выявлено практически полное замещение ее структурных компонентов атипич-



ными полиморфными клетками (паренхима опухоли - $82,3 \pm 0,63$ %, строма опухоли - $17,7 \pm 0,43$ %, стромально-перенхиматозный индекс - $0,22 \pm 0,01$, ядерно-цитоплазматический индекс - $1,66 \pm 0,3$). Строма опухоли скудная, с прослойками коллагеновых волокон. Хорошо выражена лимфоплазмоцитарная инфильтрация, локализуемая преимущественно, по ходу сосудов, много очагов некрозов и кровоизлияний. Паренхима опухоли представлена крупными атипичными клетками, отличающимися выраженным полиморфизмом, овальной, иногда вытянутой или полигональной формы с гиперхромными ядрами (рис. 6).

На 18-е сутки эксперимента, в строме опухоли количество кровеносных сосудов, по сравнению с интактными животными, уменьшилось на 29%, лимфатических на 7%, а по сравнению с 5 сутками эксперимента количество артериол уменьшилось на 16,3%, лимфатических сосудов - увеличилось на 8,5%.

На 18-е сутки опухолевого роста в краевом и мозговых синусах лимфатических узлов выявлены метастазы опухоли - крупные атипичные клетки, отличающиеся выраженным полиморфизмом. По сравнению с интактными животными, в тазовых и почечных лимфатических узлах выраженные признаки паракортикальной гиперплазии - площадь паракортикальной зоны увеличивалась на 40 % и 87% в сравнении с интактными животными (рис.4), при этом в почечных лимфатических узлах площадь паракортикальной зоны возрастала и по сравнению с 5 сутками опухолевого роста, а в тазовых уменьшалась. В почечных лимфатических узлах в сравнении с интактными животными уменьшились размеры мозговых тяжей на 14%, мозговых синусов на 52%. В целом, в данном лимфатическом узле размеры коркового вещества увеличились в сравнении с 5 сутками роста опухоли на 30%, а в тазовых лимфатических узлах уменьшились на 9%. соответственно корково-мозговой индекс тазовых лимфатических узлов уменьшился, а почечных увеличился. Площадь В-зависимой зоны в почечных лимфатических узлах, по сравнению с 5 сутками роста опухоли уменьшилась на 6 %, а в тазовых наоборот, увеличилась на 24% (рис. 4).

Определяются кардинальные изменения в цитоархитектонике тазовых лимфатических узлов на 18 сутки эксперимента, в сравнении с интактными животными, свидетельствующие об активации пролиферативных процессов и выраженной макрофагальной реакции в В-зависимой зоне лимфатических узлов: в светлых центрах возрастает число иммунобластов на 48%, макрофагов на 40%, а мозговых тяжях - количество иммунобластов увеличивается в 4 раза, незрелых плазматических клеток на 40%, макрофагов на 41% (рис. 5, 7). По

сравнению с 5 сутками опухолевого роста в светлых центрах лимфоидных узелков тазовых лимфатических узлов возрастает число незрелых клеток лимфоидного ряда (иммунобластов на 40%, клеток на стадии митоза на 48%, средних лимфоцитов на 74%), макрофагов на 72%, ретикулярных клеток на 45%; в мозговых тяжях и мозговых синусах, также наблюдалось увеличение иммунобластов на 36% и 78% соответственно, средних лимфоцитов на 46% и 38%, незрелых плазматических клеток на 10% и 28% соответственно, но при этом уменьшалось количество ретикулярных клеток на 40% и 19%, зрелых плазматических клеток на 26% и 19% соответственно. В мозговых синусах данных лимфатических узлов численность макрофагов в сравнении с 5 сутками эксперимента возрастала на 84%, а в мозговых тяжях наоборот, уменьшалась на 17% (рис. 8).

В клеточном составе светлых центров почечных лимфатических узлов (рис.5), по сравнению с интактными животными увеличивалось число иммунобластов на 12%, средних лимфоцитов на 95%, клеток на стадии митоза в 2,8 раза, макрофагов на 28%, на фоне снижения количества малых лимфоцитов на 28%. В сравнении с 5 сутками роста опухоли, в светлом центре лимфоидных узелков возрастает численность макрофагов (на 17%) незрелых лимфоидных клеток (клеток на стадии митоза на 17%, средних лимфоцитов на 27%). В мозговых тяжях (рис. 7) почечных лимфатических узлов на 18 сутки роста опухоли, по сравнению с интактными животными возрастало количество иммунобластов на 42%, средних лимфоцитов в 2,3 раза, на фоне уменьшения числа плазматических клеток (незрелых плазмоцитов на 44%, зрелых плазмоцитов на 7%), макрофагов на 48%, ретикулярных клеток на 32%. По сравнению с 5 сутками роста опухоли, количество иммунобластов в мозговых тяжях почечных лимфатических узлов наоборот уменьшается на 21%, численность малых лимфоцитов возрастает на 44%, количество незрелых плазматических и ретикулярных клеток уменьшается на 43 и 26% соответственно. В мозговых синусах почечных лимфатических узлов (рис. 8), в сравнении с интактными животными уменьшается количество плазматических клеток (незрелых плазматических клеток на 75%, зрелых - на 15%). В сравнении с 5 сутками опухолевого роста в синусах отмечено значительное сокращение числа этих клеток (незрелых плазматических клеток на 90%, зрелых на 21%), сопровождающееся увеличением количества иммунобластов на 66%, малых лимфоцитов на 86% и уменьшением численности ретикулярных и тучных клеток.

Таким образом, на 5-е сутки роста опухоли в региональных лимфатических узлах простаты обнаружены однонаправленные изменения в их

структурной организации, выражающиеся в увеличении площади коркового вещества: в тазовых лимфатических узлах преимущественно за счет размеров паракортикальной зоны (паракортикальная гиперплазия), в почечных, как за счет площади вторичных лимфоидных узелков и коркового плато, так и за счет размеров паракортикальной зоны. В цитоархитектонике светлого центра и мозговых тяжей почечных лимфатических узлов на данном этапе эксперимента, в сравнении с тазовыми лимфатическими узлами, отмечается выраженное увеличение численности незрелых лимфоидных клеток (клетки на стадии митоза, иммунобласты, средние лимфоциты), что свидетельствует об активации процессов пролиферации. В светлых центрах тазовых лимфатических узлах, наоборот наблюдалось сокращение числа незрелых лимфоидных клеток, на фоне возрастания количества зрелых (малые лимфоциты), сопровождающееся увеличением количества макрофагов.

На 18-е сутки с момента индукции злокачественной опухоли простаты в тазовых и почечных лимфатических определяются атипичные опухолевые клетки, в сравнении с интактными животными сохраняется паракортикальная гиперплазия, которая в почечных лимфатических узлах нарастает. В сравнении с I-ой стадией канцерогенеза (5 сутки роста опухоли, отсутствие метастазов в лимфатических узлах) структурные преобразования исследуемых лимфатических узлов разнонаправлены, что, по-видимому, обусловлено их анатомической локализацией и регионом лимфосбора. В тазовых лимфатических узлах размеры коркового вещества уменьшались, увеличивалась площадь В-зависимой зоны, преимущественно за счет возрастания размеров мозговых тяжей, что свидетельствует об активации их транспортной функции. В почечных лимфатических, наоборот, размеры мозговых тяжей и синусов значительно уменьшились, значение корково-мозгового индекса возросло, что может свидетельствовать о снижении транспортного потенциала лимфатического узла, замедлении тока лимфы, активации процессов лимфопоэза. Характерным для цитоархитектоники обеих групп лимфатических узлов, в сравнении с 5 сутками эксперимента, является увеличение числа незрелых лимфоидных клеток, а в тазовых лимфатических узлах активация макрофагальной реакции.

На основании полученных данных можно заключить следующее: а) на ранней стадии канцерогенеза (5-е сутки роста опухоли, I стадия) простаты структурные преобразования в региональных лимфатических узлах простаты свидетельствуют снижении их транспортной функции, активации барьерно-фильтрационной функции

(паракортикальная гиперплазия, активация процессов пролиферации макрофагальной реакции) являющихся показательными для I стадии канцерогенеза [12]; б) на поздней стадии канцерогенеза (18-е сутки роста опухоли, II-III стадия) сопровождающейся метастазированием и увеличением числа лимфатических сосудов в ткани опухоли, по-видимому, происходит перераспределение лимфотока и изменение структурно специализации лимфатических узлов: в тазовых лимфатических узлах, являющихся магистральными в регионе лимфосбора в малом тазу, наблюдается фолликулярная реакция, усиливается транспортная функция (синусный гистиоцитоз), что, по-видимому, обусловлено увеличением объема поступающей лимфы из опухолевой ткани (увеличение числа лимфатических сосудов в опухоли); в почечных лимфатических узлах выявлена выраженная паракортикальная гиперплазия определяется характерная синусная реакция на метастазирование – сокращение размеров мозговых синусов, что приводит к изменению структурно-функциональной специализации лимфатического узла.

Результаты проведенных нами исследований позволяют заключить, что в динамике роста опухоли простаты комплексная реакция регионарного лимфатического аппарата (лимфатические сосуды и узлы) обусловлена стадией опухолевого процесса, наличием метастазов в лимфатических узлах и их анатомической локализацией. На стадии метастазирования опухоли структурные преобразования в лимфатических узлах сопряжены с дилатацией лимфатических сосудов и увеличением их числа в строме опухоли [6].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Матвеев В.Б. Рак предстательной железы. - М. - 1999. - 153с.
2. Бородин Ю.И. Лимфология как наука: некоторые итоги и перспективы // Проблемы клинической и экспериментальной лимфологии: Материалы Международной конференции, Новосибирск, 1996. С. 31-42.
3. Clayton F., Hopkins C.L. Pathologic correlates of prognosis in lymph-node positive breast carcinoma // *Cancer*, 1993. - №71. P. 1780-90.
4. Алексеев Б.Я., Русаков И.Г., Франк Г.А., Андреева Ю.Ю., Белова Е.А., Беспалов П.Д., Нюшко К.М. Определение сторожевых лимфатических узлов у больных раком предстательной железы // *Российский онкологический журнал*. 5. 2006. С. 16-22
5. Harisinghani M.G., Barentsz J., Hahn P.F., Deserno W.M., Tabatabaei S., van de Kaa C.H., de la Rosette J., Weissleder R.. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer // *N Engl J. Med.* 2003. 348(25). P. 2491-9
6. Асташов, В.В. Лимфатические узлы и сосуды

при экспериментальной опухоли простаты / В.В. Асташов, А.А. Ломшаков, П.М. Ларионов, О.В. Казаков, Н.Б. Исакова, В.Б. Прохожев // Вестник НГУ. Серия: Биология, медицина. - 2011. - Т.9., №2. - С. 118-125

7. Мичурин И.Е. Регионарные лимфатические узлы яичка в норме, при экспериментальном опухолевом росте в яичке и его лечении цитостатиками и фитопрепаратами / дисс...канд.мед.наук, 14.00.02 – Новосибирск, 2004 – 129 с.

8. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л.. Микроскопическая техника: Руководство.-М.: Медицина - 1996. - 544 с.

9. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство.-М.: Медицина-1990.-384с.

10. Kato S, Itonaga I, Ji RC and Miura M Enzyme triple staining for differentiation of lymphatics from venous and arterial capillaries. // Lymphology - №29 - p. 15–19.

11. Лапач С.Н., Чубенко Л.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. - К.: МОРИОН - 2001. - 408 с.

12. Цыплаков Д.Э., Петров С.В. Рак и регионарные лимфатические узлы (иммуногистохимическое и

ультраструктурное исследование) // Архив патологии. - 1997. - №1. - С. 12-19.

Авторская справка:

1. Ломшаков Андрей Александрович, кандидат медицинских наук, докторант ФГБУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН (НИИКЭЛ, 630117, Новосибирск-117, ул. Тимакова, 2) a.lomshakov@gmail.com

2. Бородин Юрий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, Главный научный сотрудник, Советник при дирекции ФГБУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН

3. Асташов Вадим Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, Заведующий Лабораторией экспериментальной фармакологии ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия», vastashov3@gmail.com

4. Казаков Олег Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории протективных систем ФГБУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН