

The background of the entire page is a high-magnification scanning electron micrograph (SEM) of biological cells. The image shows numerous spherical cells with a granular, porous surface texture. Some cells are larger and more prominent, while others are smaller and scattered throughout the field of view. The overall color palette is a monochromatic teal or light blue, giving it a scientific and clinical appearance.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

НАО «ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ МАРАТА ОСПАНОВА»

Жексенова А.Н., Калдыбаева А.Т., Нургалиева Р.Е., Тухватшин Р.Р.,
Мукушева Г.Д., Жылкыбекова А.К., Егизбаева Д.К.

**ПОДХОД К СНИЖЕНИЮ ПОБОЧНОГО
ВЛИЯНИЯ ХИМИОТЕРАПИИ У ЖЕНЩИН ПРИ
РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Актобе 2020

УДК 618.19-006.6:615.032(035.3)

ББК 55.6я73

П 44

Рецензенты:

Койшибаев А.К. - к.м.н., доцент, руководитель кафедры онкологии НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова»
Кузденбаев М.С. – к.м.н., врач онколог ГККП на ПХВ «Клинико - диагностический поликлиники №4» г.Актобе

П 44 Подход к снижению побочного влияния химиотерапии у женщин при раке молочной железы: Монография / А.Н. Жексенова, Р.Е. Нургалиева, А.Т. Калдыбаева, Р.Р. Тухватшин, Г.Д. Мукушева, А.К. Жылкыбекова, Д.К. Егизбаева.– Актобе, 2020. - 52 с.

ISBN 978-601-7311-91-9

Настоящая монография описывает изучение токсичного действия химиотерапии в эксперименте у животных с РМЖ до и после применения интервальной гипоксической тренировки (ИГТ). Экстраполирование экспериментального исследования в клинические условия, как пилотного проекта, имеет перспективу. Применение химиотерапии с ИГТ позволит системно проводить лечение без снижения их дозировки и тем более отмены лечения. Это улучшит качество жизни при и после лечения у женщин с РМЖ, их быструю реабилитацию и возвращение к трудовой деятельности, это отразится в целом на экономической эффективности. Иммунологические реакции клеточного и гуморального звена, их корреляционные связи с биоценозом влагалища, а также варианты генетического маркера ВПЧ рассматриваются в качестве предикторов для оценки реагирования на химиотерапию при РМЖ.

Издание монографии рекомендовано решением Ученого совета НАО «ЗКМУ имени Марата Оспанова» от 17.09.2020 г. № 1(777)

Монография будет полезна онкологам, патофизиологам, физиологам, широкому кругу медицинских работников, специалистам практического здравоохранения.

УДК 618.19-006.6:615.032(035.3)

ISBN 978-601-7311-91-9

ББК 55.6я73

© Жексенова А.Н., Нургалиева Р.Е.,
Калдыбаева А.Т., Тухватшин Р.Р. и другие
2020

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Основная часть.....	14
1. Клинические особенности состояния пациенток с раком молочной железы.....	14
2. Моделирование на животных токсических эффектов химиотерапии при лечении рака молочной железы.....	38
3. Результат воздействия модифицированной интервальной гипоксической тренировки в сочетании с коррекцией углеводно- белкового обмена на токсические проявления химиотерапевтических препаратов у экспериментальных животных.....	41
4. Обоснование подхода снижения побочного влияния химиотерапии на организм женщин с РМЖ.....	43
Заключение.....	45
Список использованных источников.....	48

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ

ТНФ - больные с трижды негативным фенотипом - в данном случае, когда опухоль не содержит рецепторов стероидных гормонов (отрицательны по рецепторам эстрогенов и прогестерона), не имеет ни гиперэкспрессии Her2/neu, ни амплификации Her2/neu статуса.

ЭР, ПР, Her-2/neu, ki67 - рецепторный статус при раке молочной железы: стандартизованное иммуногистохимическое исследование. Выполняется только при наличии готового микропрепарата на предметном стекле и образца ткани в парафиновом блоке.

ОМЖ - опухоли молочной желез

РМЖ - рак молочной железы

ИГТ - интервальная гипоксическая тренировка

ЗН - злокачественное новообразование

ДМБА - диметилбензантрацен

TNM - международный противораковый союз

CD4+ - хелперные Т лимфоциты

CD8+ - цитотоксический лимфоцит

CD20+ - В лимфоциты

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ - аспартатаминотрансфераза

ПЦР - полимеразная цепная реакция

HbO₂ - оксигемоглобин

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения (далее - ВОЗ) сердечно-сосудистые и онкологические заболевания в совокупности явились причиной 71% случаев смерти в Европейском регионе. По прогнозам, заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований до 2020 года во всем мире увеличатся в 1,5-2 раза и рост онкологической заболеваемости в мире будет происходить в основном за счет рака легкого, колоректального рака у мужчин, а также рака шейки матки и рака молочной железы у женщин [1, 2].

Из всех случаев рака у женщин на долю рака молочной железы приходится 16%; в Европейском регионе РМЖ составляет 28% среди всех разновидностей онкологических патологий и он остается самым распространенным видом рака среди женщин во всем мире. РМЖ - наиболее часто встречаемый вид онкопатологии в 154 странах мира, при этом РМЖ является основной причиной смерти в 103 странах [3]. Среди неопластических процессов молочной железы, количество повторно диагностированных случаев заболевания выросло более чем на 20%, при этом уровень смертности вырос на 14% [4]. По данным GLOBOCAN, во всем мире в 2018 году было зарегистрировано около 2,1 миллиона новых случаев, что составляет почти 1 из 4 случаев заболевания раком среди женщин, при этом уровень заболеваемости выше в экономически развитых странах, а более высокая смертность присуща экономически менее развитым. Данные показатель оказался наиболее высоким в Австралии, Новой Зеландии, Северной Европе (в Великобритании, Швеции, Финляндии и Дании), Западной Европе (в Бельгии, Нидерландах и Франции), Южной Европе (в Италии) и Северной Америке [5, 6, 7].

В странах СНГ (Союза Независимых Государств) существует собственная статистика по настоящему кругу вопросов. Согласно статистике, ежегодно около 46,000 женщин заболели раком

молочной железы в России и среди онкологических заболеваний женщин неопластические процессы молочной железы занимали первое место (19,3%). Смертность женщин по причине рака молочной железы в общей структуре смертности стоит на третьем месте после болезней системы кровообращения, случаев травм и отравлений. В 2004 г. от этой причины умерло 22,800 женщин; по сравнению с 1990 г. этот показатель увеличился на 41,6%. При этом среди умерших от РМЖ около 30% женщин являются представителями трудоспособного возраста. Вместе с тем, за 20-летний период (1964-1984 гг.), отмечались темпы снижения роста смертности женщин от злокачественных опухолей молочной железы (с 5,4 до 1,8%). По Российской Федерации, в 2005 г., число умерших от причины РМЖ составило 22,600 или же 3,406 случаев на 100,000 женщин в возрасте 18 лет и старше [8, 9]. При сравнении распространенности изучаемой патологии Россия занимает срединное положение между такими странами как Китай или Япония, где показатели минимальные, и Австралией и Швейцарией, где, напротив, были зарегистрированы максимальные значения заболеваемости РМЖ [10, 11, 12]. Несмотря на то, что уже на протяжении многих десятилетий ведутся множественные исследования по поиску и разработке эффективных скрининговых программ выявления РМЖ на ранних стадиях заболевания и регулярно публикуются статистические данные, среди россиян доля лиц с III-IV стадиями заболевания среди первичных больных РМЖ остается на высоком уровне и составляет более 40% [13, 14, 15, 16].

В Казахстане за 15 лет (1999-2013) было зарегистрировано 45,891 фактов злокачественного образования в молочной железе, а количество летальных исходов от данной патологии составило 20,112 женщин. Наиболее многочисленными были группы в возрастном диапазоне от 45 до 65 лет – 25,041 (54,6%) [17]. За период с начала календарного 2016 года по 15 октября 2016 года в Казахстане зарегистрировано 3,476 диагностических заключений по онкологии молочных желез и заболеваемость на 100,000 населения составила 19,6 [18, 19, 20]. С 2004

года отмечается постепенное увеличение числа случаев выявления РМЖ у женщин от 18,528 до 22,965 к 2008 году. За этот временной отрезок в Республике Казахстан вновь выявлено и зарегистрировано 28,707 диагностических случаев рака груди у женщин.

В настоящее время на диспансерном учете в РК состоит 161 тыс. 113 онкологических больных. Ежегодно в РК отмечается увеличение количества впервые установленных онкологических заболеваний на 5-8% по всем регионам. Это объясняется как продолжающимся экологическим прессингом, так и мероприятиями государства, повысившими уровень и качество диагностики раковых заболеваний, учитывая, что на эти мероприятия государство увеличило финансирование с 10,4млрд.тг. в 2010 год до 35,5 млрд.тг. в 2016 год.

Известно, что ранняя диагностика раковых заболеваний (I, II стадии) позволяет во многих случаях достичь полного выздоровления, а в поздних случаях (III, IV) с помощью современных методов лечения стабилизировать состояние и увеличить продолжительность жизни онкобольного.

К сожалению, недостаточный уровень знаний в этой области и использования современных технологий диагностики и лечения онкологических заболеваний способствовал лишь незначительному росту показателя 5-летней выживаемости больных за последние 3 года.

Лекарственное обеспечение больных онкологическими заболеваниями за последние 10 лет увеличилось в 17 раз с 800 млн.тенге (2002 год) до 13,7 млрд.тенге (2011 год). Более чем в 2,5 раза увеличилось количество наименований лекарственных средств. На сегодня обеспеченность лекарственными препаратами онкологических больных составила 70% от потребности. Особенностью лекарственной терапии злокачественных новообразований являются длительность и непрерывность лечения, что предполагает использование лекарств в стационаре и продолжение лечения в амбулаторных условиях.

Однако, в обоих случаях использование химиотерапии сопровождается негативными побочными эффектами со стороны

внутренних органов (крови, сердца, почек, ЦНС, эндокринных систем), что значительно ухудшает состояние больного, вынуждая врача снижать дозы вводимого препарата, вплоть до его отмены, в ряде случаев возникает опасность развития вторичных опухолевых образований.

В чем состоит причина нежелательного побочного действия противоопухолевых лекарственных препаратов?

Для опухолевых клеток характерен быстрый рост и относительно быстрое деление. Противоопухолевые лекарственные препараты не только блокируют эти процессы, но и вызывают необратимое повреждение и гибель таких клеток. Однако многие нормальные клетки также быстро растут и делятся. К их числу относятся: клетки костного мозга, слизистой оболочки полости рта и желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы, волосяных фолликулов. Поэтому противоопухолевые лекарственные препараты вызывают повреждение и этих нормальных клеток, что и является причиной целого ряда осложнений, связанных с побочным действием химиотерапии. К числу проявлений таких осложнений относятся: тошнота и рвота, изъязвления слизистой оболочки ротовой полости, облысение, анемия, повышенная утомляемость. Побочным действием химиотерапии объясняется также высокая вероятность кровотечений и инфекционных осложнений. В процессе лечения могут проявиться и такие нежелательные его последствия, как нарушения функции почек, мочевого пузыря, нервной системы и других органов.

В частности анемия встречается при злокачественных заболеваниях, у большинства пациентов, получающих химиотерапию, являясь главным патогенетическим звеном развития вторичных осложнений.

Важную роль в развитии анемии играет химиотерапия, которая оказывает прямое подавляющее действие на кроветворение. Некоторые противоопухолевые препараты (например, содержащие платину) обладают нефротоксичностью и могут вызывать анемию за счет

снижения образования эритропоэтина в почках. Миелосупрессивный эффект цитотоксических препаратов может накапливаться при повторных циклах химиотерапии, что приводит к постепенному нарастанию анемии. Так, в исследовании ECAS частота анемии увеличилась с 19,5% в первом цикле химиотерапии до 46,7% в пятом цикле. Увеличение числа циклов химиотерапии сопровождалось также ростом доли больных с анемией 2-3-й степени (Новик А.В. 2009г.)

Основными методами лечения анемии при онкологических заболеваниях, в том числе связанной с химиотерапией, являются трансфузии эритроцитной массы и введение препаратов эритропоэтина, стимулирующих эритропоэз.

В тоже время, трансфузии эритроцитной массы могут вызывать различные осложнения, которые разделяют на следующие группы: острые иммунные (гемолитические, фебрильные негемолитические, аллергические и гемотрансфузионное острое поражение легких); острые неиммунные (бактериальные и вирусные инфекции, циркуляторная перегрузка, физический и/или химический гемолиз, эмболия, цитратная интоксикация, гиперкальциемия); отсроченные иммунные (гемолитические, болезнь «трансплантат против хозяина», посттрансфузионная пурпура) и неиммунные (гемосидероз). (Моисеев С.В., 2012 г.)

В нескольких ретроспективных исследованиях было показано, что трансфузии эритроцитной массы у пациентов, которым проводилось хирургическое лечение некоторых злокачественных опухолей, могут ассоциироваться с увеличением частоты рецидивов и снижением общей выживаемости. (SchrijversD. 2011)

Хотя рандомизированные клинические исследования подтвердили эффективность стимуляторов эритропоэза в лечении анемий у онкологических больных, в тех же исследованиях были установлены возможные нежелательные эффекты подобных препаратов, в частности увеличение риска тромбоэмболических осложнений. Злокачественные опухоли сами по себе, а также

химиотерапия ассоциируются с более высоким риском развития венозного тромбоза и легочной эмболии.

В 2007 г. Администрация США по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами (FDA) на основании результатов нескольких рандомизированных исследований рекомендовала внести в инструкцию по применению эритропоэтина альфа и дарбэпоэтина альфа предостережение, в котором лечение стимуляторами эритропоэза ассоциировалось со снижением общей выживаемости и/или локального контроля опухоли у пациентов с распространенным раком молочной железы, шейки матки, опухолями головы и шеи, лимфомами и немелкоклеточным раком легких. Относительный риск смерти составлял от 1,10 до 1,17, т.е. увеличился на 10-17%. (Моисеев С.В. 2012 г.).

Эти же, упомянутые выше, причины (высокая потенциальная и реальная токсичность противоопухолевой химиотерапии, высокая вероятность и даже практически неизбежность повреждения в той или иной степени здоровых клеток и тканей, особенно быстро делящихся, таких, как клетки кроветворной ткани, кожи и слизистых), ограничивают как разовую, так и курсовую, и суммарную за жизнь дозу химиопрепаратов, и общее количество курсов химиотерапии сверху (так называемая «дозолимитирующая токсичность») и служат причиной принципиального ограничения их эффективности сверху. Нередко бывает невозможно ввести больному теоретически эффективную при его заболевании дозу химиопрепаратов или провести необходимое при его заболевании количество курсов химиотерапии без вызывания неприемлемой, недопустимой токсичности, неприемлемых и недопустимых побочных эффектов и осложнений или без неприемлемо высокого летального риска.

В последние годы было проведено несколько фундаментальных научных исследований, в которых убедительно доказано целесообразность применения немедикаментозных технологий. Существует физический фактор, который известен достаточно давно,

его биологический потенциал достаточно высок и область его применения весьма широка - это гипоксия. Известен факт, что в условиях горной местности частота встречаемости онкологических заболеваний существенно ниже, чем на равнине. Так, гипоксическое воздействие с успехом было применено при лечении различных заболеваний органов дыхания, кровообращения и при нарушениях обмена веществ. Ф.З. Меерсон (1994-2003) применял гипоксию для профилактики нарушений в деятельности сердечно-сосудистой системы, а по данным Ткачук Е.Н. (1994) гипокситерапия является эффективным средством профилактики различных послеоперационных осложнений. В исследованиях С. И. Игисина [21, 22] показан гипоксический фактор проживания в горной местности и его связь с частотой развития раковых болезней.

Использование интервальной гипоксической тренировки приводит к нормализации артериального давления, улучшению показателей центральной гемодинамики, кислородной емкости за счет активации эритроцитарной системы и увеличения содержания гемоглобина в крови. Рост содержания гемоглобина в крови, частоты сердечных сокращений, улучшение микроциркуляции крови в тканях даже при неизменяющемся минутном объеме крови, а тем более при его увеличении, способствует повышению скорости транспорта кислорода артериальной кровью к тканям, т.е. усиливает доставку кислорода.

Предлагаемая нами методика основана на модификации ИГТ и заключается в том, что одновременно с введением химиопрепаратов применяется процедура вдыхания 10% гипоксической смеси. В результате создается относительная гипогликемия. Это тормозит включение срочных компенсаторных реакций в форме активации анаэробного гликолиза, позволяя гипоксии более выражено стимулировать включение адаптационных механизмов, в частности, активировать клетки костного мозга и увеличивать выработку эритроцитов. Как следствие, повышается оксигенация тканей и

окислительно-восстановительные процессы в органах и системах организма. Гипогликемия, по механизму обратной связи, позволит активизировать работу желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), посредством формирования чувства голода. Она приводит к увеличению выработки соляной кислоты желудком и ферментов поджелудочной железой, что способствует полноценному гидролизу и резорбции протеинов в просвете желудочно-кишечного тракта. Последнее не только предупреждает развитие относительного белкового голодания организма, но и предотвращает развитие тяжёлой интоксикации. Исключается дальнейший пассаж по пищеварительной трубке избыточного количества непереваренных полипептидов в составе химуса и дальнейшее его вовлечение в процесс естественного гниения, который сопровождается образованием ядовитых продуктов-аминов (путресцина, кадовирина, фенилэтиламина) фенола, крезола, скатола. Значительная часть этих веществ неизбежно будет поступать из кишечника в кровь, вследствие недостаточной обезвреживающей способности печени.

Методика имеет научную новизну и практическую значимость, так как на основании её впервые предлагается уменьшение токсического действия противораковых химиопрепаратов. Использование для лечения рака молочных желез ИГТ на фоне относительной гипогликемии позволит более полно выполнять схему лечения, не снижая протокольные дозы химиопрепаратов. Министерство здравоохранения РК выделяет значительные средства на лечение такого рода пациентов. Предлагаемая методика будет способствовать выздоровлению больного при I-II стадии и улучшать его состояние в III-IV стадии рака и кроме того будет оправдывать затраченные средства.

В отличие от направлений, связанных с поиском и разработкой новых онкопрепаратов, данное исследование предполагает оптимизацию применения существующих. Исследование позволит расширить арсенал онкологических препаратов, которые обладают

высоким противонеопластическим эффектом, но имеют выраженные токсические свойства, из-за которых исключены из лечебной практики.

В настоящее время, исследования в данной области проводятся в России, однако, они посвящены, в основном, исследованию ИГТ на радиобиологические процессы у облученных больных и не затрагивают изучение механизмов и разработку методов профилактики токсических эффектов химиотерапии при раке молочной железы [23, 24, 25].

Для реализации нового подхода снижения токсического влияния химиотерапии, в первую очередь, в клинике были изучены этиопатогенетические особенности их изолированного негативного воздействия на модели у экспериментальных животных с индуцированным РМЖ. После того как были получены достаточные сведения об исследуемых побочных эффектах, инициирована ИГТ для изучения ее влияния на них.

На основании сравнительного анализа результатов разрабатывались алгоритм диагностики, методы профилактики и лечение токсических эффектов химиотерапии.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Клинические особенности состояния пациенток с раком молочной железы

Клинико-функциональные особенности состояния пациенток проведены в сравнении между полученными показателями у больных женщин с РМЖ до приема химиотерапевтических лекарственных препаратов и после их приема. Обследованы 278 пациенток с РМЖ,

пациенты разделены на две группы: 141 - исследуемая, 137- контрольная группа, средний возраст - $59,4 \pm 9,3$ лет.

Проведены расчеты средних значений анализов, отражающих основные физиологические системы организма при поступлении женщины на лечение или до химиотерапии: ОАК-НВ-гемоглобин – $120 \pm 3,7$ г/л, эритроциты - $4,2 \pm 0,2$, тромбоциты - $218 \text{тыс} \pm 17,4$, лейкоциты - $8,2 \text{тыс} \pm 0,7$, СОЭ – $30 \text{ мм /ч} \pm 42$, гематокрит - $37,0 \pm 2,3$, сегментоядерные нейтрофилы % - $64,0 \pm 6,7$, эозинофилы - $2,0 \pm 0,01$, базофилы - $0,3 \pm 0,03$, моноциты - $2,3 \pm 0,2$, лимфоциты - $28,7 \pm 1,3$.

Биохимические анализы крови: общий белок $77,6 \pm 3,9$ г/л, мочевины $4,2 \pm 0,2$ ммоль/л, креатинин $52,8 \pm 1,2$, глюкоза $4,3 \pm 0,7$, АСТ $18,3 \pm 0,9$, АЛТ $24,1$, общий билирубин $7,6 \pm 1,0$, прямой билирубин $4,7 \pm 0,3$.

Коагулограмма крови: протромбиновый индекс $86,3 \pm 3,7\%$, протромбиновое время $13,7 \pm 2,1$ сек, тромбиновое время $22,9 \pm 1,3$ сек, фибриноген $1,8 \pm 0,02$ г/л, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), $46,8 \pm 2,7$ сек, международное нормализованное отношение (МНО) $0,85 \pm 0,04$, растворимые фибриномономерные комплексы (РФМК) $1-10 \times 12$ Ед/л. Общий анализ мочи: цвет-желтый, прозрачность-слабомутная, относительная плотность – $1015 \pm 16,2$, реакция-щелочная, белок $0,33 \pm 0,003$ г/л, лейкоциты 3 - 4 в поле зрения, слизь ++, бактерии +.

Артериальное давление в среднем $120/80 \pm 30/20$ мм рт.ст., пульс – $78 \pm 1,7$ в мин., частота дыхательных движений 18 в минуту, электрокардиограмма (ЭКГ) - синусовый ритм, частота сердечных сокращений $72 \pm 3,1$ в минуту.

УЗИ брюшной полости свидетельствовало в основном о хроническом панкреатите, хроническом холецистите и жировом гепатозе.

После лечения химическими онкопрепаратами у 78% больных наблюдались осложнения с выраженностью побочных проявлений от 0 степени до 4 степени. 1 степень - незначительные изменения, которые

не влияли на общую активность больного и не требовали вмешательства врача выявили у 21,2% наблюдаемых женщин; 2 степень отмечалась в умеренных изменениях, нарушающие нормальную активность и жизнедеятельность больного, лабораторные данные при этом существенно пострадали и требовали коррекции, данную степень наблюдали у 60,8% обследованных; 3 степень по характеристике - резкие нарушения, требующие активного лечения, отсрочки или прекращения химиотерапии проявилась у 9,7% женщин и 4 степень, когда применяемая химиотерапия стала опасной для жизни и требовала немедленной отмены введения химических лекарственных препаратов, эти признаки отмечены у 8,2% больных женщин. Из описания видно, что большая часть женщин проявила 2 степень побочных явлений, а 3 и 4 степень были почти у одинакового количества наблюдений.

Установлено, что у пациентов с РМЖ под влиянием химиотерапии наблюдается тенденция в сторону снижения гемоглобина и эритроцитов с высоким размахом $m\pm$, что свидетельствует об индивидуальной реакции организма, обусловленной интенсивностью ракового процесса и интоксикацией лекарственными препаратами.

Наличие в исследовании увеличения уровня лейкоцитов и тромбоцитов отражает перестройку в системе свертывания крови и наличие в организме воспалительного процесса (рисунок 1 и 2).

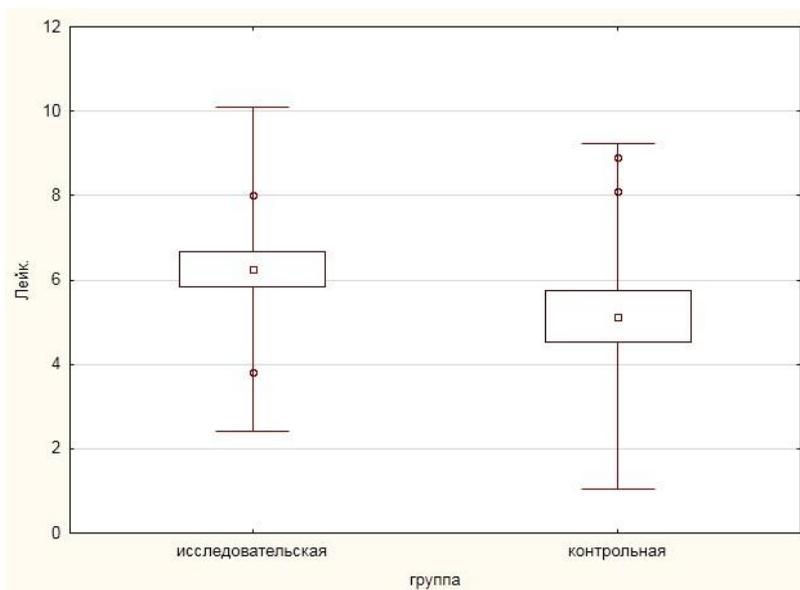


Рисунок 1- Показатели содержания лейкоцитов крови у пациентов с РМЖ между группами

Химиотерапия провоцировала к развитию относительной гипогликемии, другие показатели, как мочевины, креатинин и общий белок крови не имели достоверной динамики и имела разнонаправленные величины.

Выявлена динамика кишечной микрофлоры при РМЖ на фоне химиотерапии по среднему показателю бифидум, который снижался с 1,5 до 0,45 после лечения.

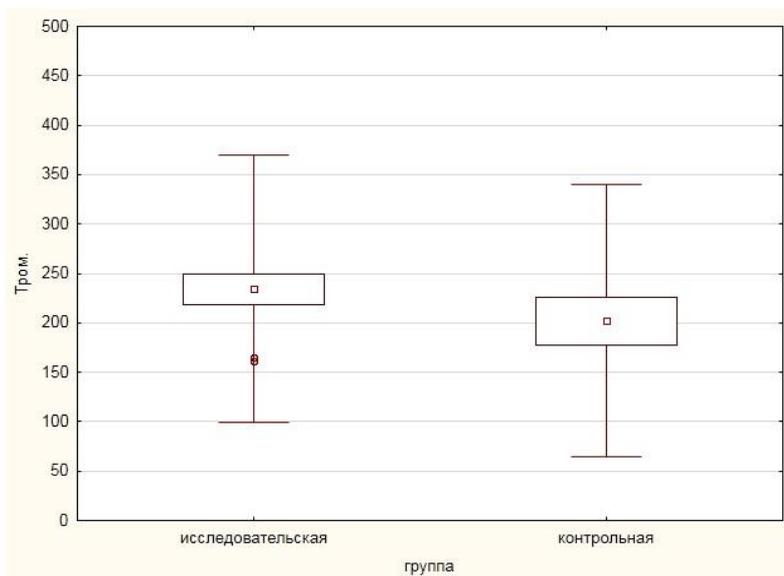


Рисунок 2 - Показатели содержания тромбоцитов крови у пациентов с РМЖ между группами

У больных с раком молочной железы после проведения химиотерапии в сравнения с контрольной группой установлены значительные изменения в показателях гуморального и клеточного иммунитета. При сравнении обследуемых групп с РМЖ отмечается достоверное различие по показателям Т-лимфоцитов CD3+ и CD4+ в исследуемой группе: CD3+ $72,4 \pm 15,7$; CD4+ $43,3 \pm 10$; а в контрольной группе: CD3+ $68,5 \pm 8,7$; CD4+ $37,1 \pm 8,4$ ($p \leq 0,05$), соответственно (рисунок 3 и 4).

По показателям CD8+ и CD3+HLA-DR+ в обеих группах обследованных имеется тенденция к незначительному повышению значений: в исследуемой группе – CD8+ $28,4 \pm 11,4$; CD3+HLA-DR+ $13,6 \pm 17,2$; в контрольной группе - CD8+ до $29,7 \pm 6,9$; CD3+HLA-DR+ $11,1 \pm 15,4$ без достоверности. При сравнении между группами уровень В-лимфоцитов (CD19+) имеет тенденцию к снижению в исследуемой

группе, а в контрольной группе в пределах нормы, с достоверной значимостью $p=0,000001$ (рисунок 5).

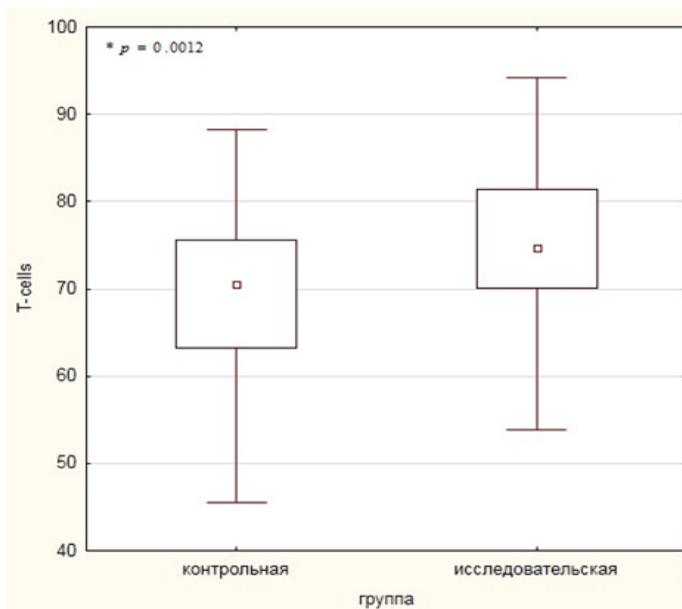


Рисунок 3 - Сравнительные показатели Tcells у пациентов с РМЖ между группами

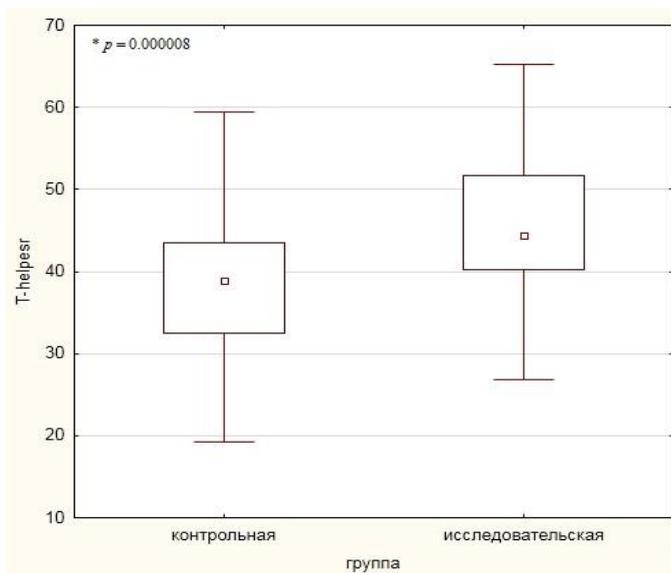


Рисунок 4 - Сравнительные показатели T-helper у пациентов с РМЖ между группами

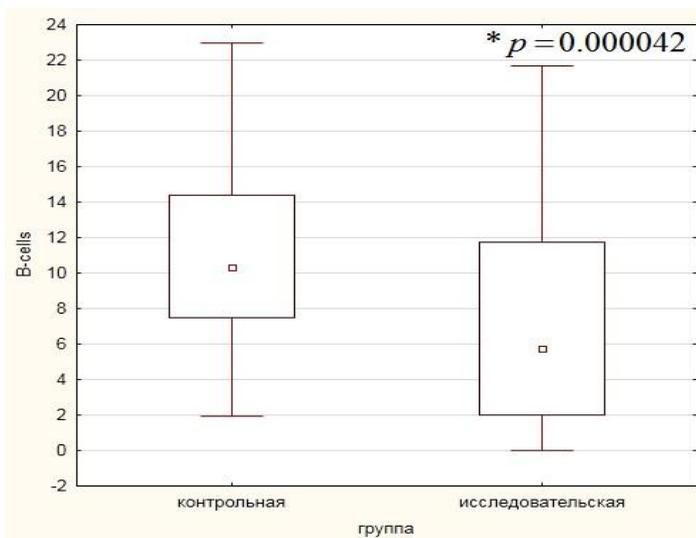


Рисунок 5- Сравнительные показатели B-cells у пациентов с РМЖ между группами

В обеих группах показатель NK-cells CD16+56+ характеризуется тенденцией к повышению ($15,1 \pm 7,8$; $16,1 \pm 8,5$), но достоверных отличий не отмечено.

Показатель иммунорегуляторный индекс (ИРИ) в исследуемой группе – $1,8 \pm 0,8\%$; в контрольной группе – $1,3 \pm 0,6$ и значения находятся в границах средних величин, но тем не менее найдено достоверное отличие $p=0,003$ (рисунок 6).

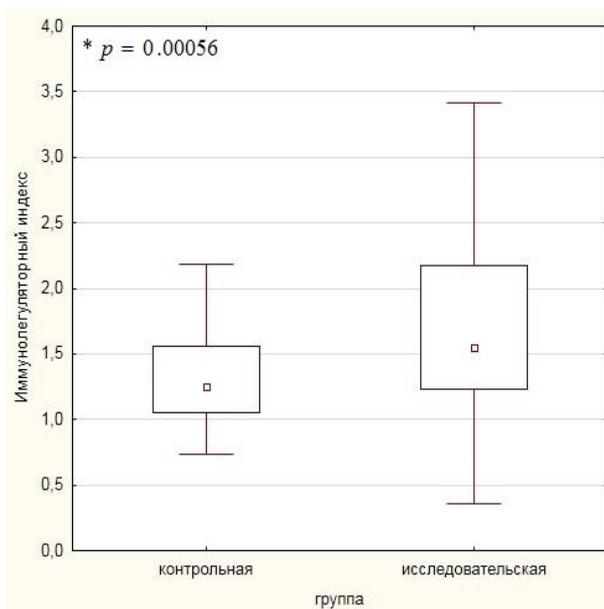


Рисунок 6- Сравнительные показатели иммунорегуляторного индекса у пациентов с РМЖ между группами

Активированные Т-лимфоциты CD3+HLA-DR+ без достоверной разницы с высоким размахом в сторону увеличения ($10 \pm 7,2$). Анализ гуморального иммунитета у пациенток в двух группах выявляет нормальные значения показателей IgA, на фоне развития дисглобулинемии со стороны IgG. При этом NK-клетки, Т-киллеры в пределах нормы, ИРИ ($p \leq 0,0005$).

Анализ иммунологического статуса выполнен по показателям клеточного иммунитета. Проточная цитометрия не показала значимых различий в содержании Т-цитотоксических клеток (CD4-CD8) у пациентов в обеих группах. CD3+HLA-DR⁺ (активированные Е-лимфоциты), Т-лимфоциты были значительно снижены у пациентов до химиотерапии. У пациентов после адъювантной терапией наблюдалось значительное снижение уровня IgG по сравнению с неадъювантной химиотерапией. Существенной разницы в IgA и IgM между группами не наблюдалось. Однако, у пациентов исследуемой группы было значительно увеличено количество Т-лимфоцитов (CD3-CD19), чем у пациентов без химиотерапии. Значительные различия наблюдались в В-лимфоцитах (CD3-CD19) у пациентов с химиотерапией и без химиотерапии ($7,8 \pm 5,4$ против $11,0 \pm 5,1$). Пациенты с РМЖ без химиотерапии продемонстрировали повышенные уровни NK-клеток по сравнению с получавшими химиотерапию. Анализ увеличенной субпопуляции Т-клеток показал, что статистически значимое увеличение количества Т-хелперов наблюдалось у исследуемой группы, по сравнению с контрольной.

Пациенты с химиотерапией имели значительное увеличение циркулирующих Т-лимфоцитов, клеток CD4 и CD8 и меньшее количество В-лимфоцитов, в то время как Т-хелперные Т-клетки поражались в большей степени у пациентов без химиотерапии. Количество NK- и Т-клеток увеличивалось у пациентов, получавших химиотерапию, что указывает на влияние химиотерапии на иммунный клеточный ответ (таблица 1).

Таблица 1 - Описательный статистический анализ различных параметров

Параметры	Пациенты до химиотерапии		Пациенты после химиотерапии	
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Среднее значение	Стандартное отклонение
Иммуноглобулин А (IgA)	2,76000	1,01792	2,31038	0,832044
Иммуноглобулин G (IgG)	13,52417	2,51382	14,0771	2,789357
Иммуноглобулин М (IgM)	1,31538	0,51308	1,24058	0,564969
Т-лимфоциты (CD3 + CD19-)	72,59440	16,75450	69,4413	9,021244
В-лимфоциты(CD3-CD19+)	7,83115	5,47270	11,0009	5,175140
Т-хелпер (CD4 + CD8-)	42,80554	12,59508	39,0514	7,312639
Т- цитотоксический (CD4-CD8+)	27,48438	11,12301	27,2127	6,044108
CD3+HLA-DR+ (активированные Е-лимфоциты)	6,94062	6,85196	5,91744	6,969219
NK (CD16 + 56 +) – естественные убийцы	11,48354	5,09788	15,4528	8,749276
Т- киллеры CD3 + / CD16	9,35135	6,45389	8,41179	6,236090

При оценке фагоцитарной активности лейкоцитов было установлено, что у больных с РМЖ после химиотерапии происходит достоверное снижение ($p=0,022$) спонтанного кислородзависимого теста (НСТ тест) (рисунок 7).

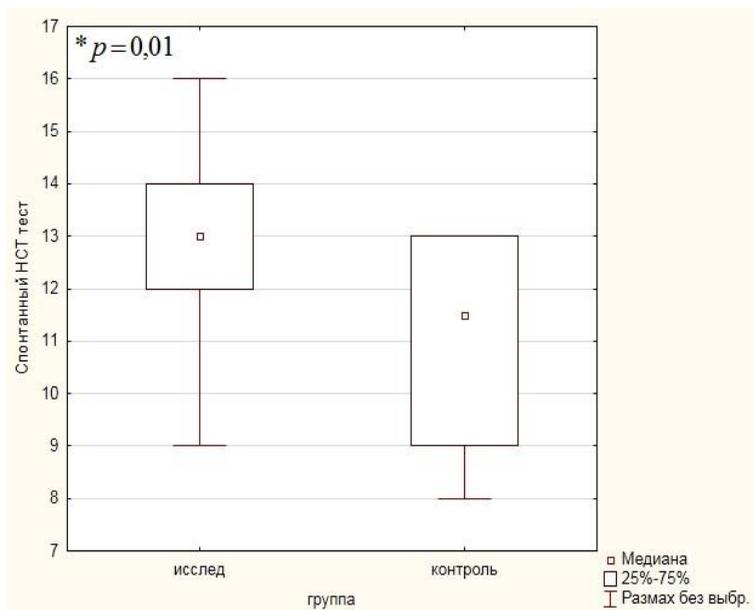


Рисунок 7- Показатели спонтанного НСТ теста у женщин с РМЖ после химиотерапии между группами.

Сложившаяся картина свидетельствует о снижении количества нейтрофилов в крови, которые активировали кислород-зависимые антибактериальные системы. Показатели стимулированного теста НСТ, когда лейкоциты простимулированы липополисахаридами, также как и первом случае оказались сниженными (рисунок 8).

Изложенное указывает на снижение резервной активности лейкоцитов и способности продуцировать активные формы кислорода в ответ на антигены.

По результатам исследования прослеживается главная причина развития заболеваний, связанных с нарушением нормального микробного пейзажа слизистых, что выражается в неблагополучии иммунобиологического гомеостаза макроорганизма при РМЖ на фоне химиотерапии и усугубляется иммунологическая несостоятельность

организма к инфекции, и общей реактивности на злокачественный опухолевый процесс.

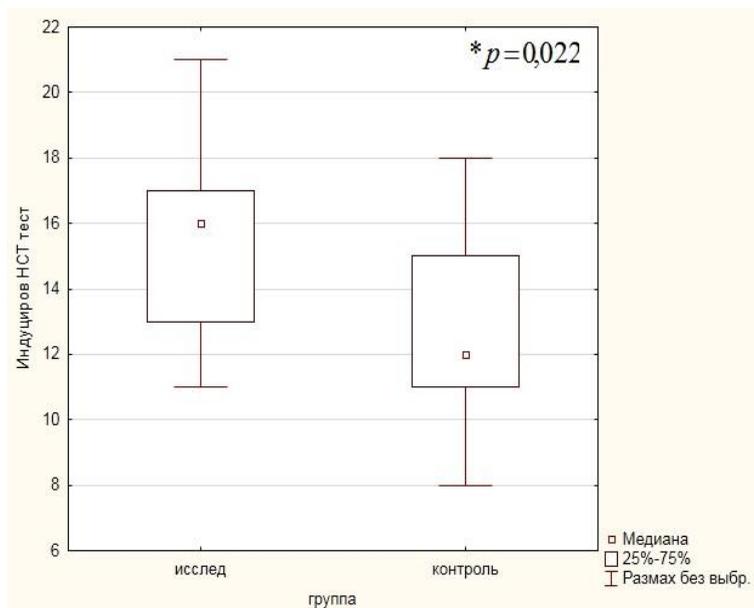


Рисунок 8 - Показатели индуцированного NST теста после химиотерапии между группами.

Учитывая, что у женщин при гинекологическом осмотре выявлен бактериальный вагинит, который сопровождался характерными симптомами в виде влагалищных выделений с неприятным «рыбьим» запахом, зудом и болью, нами проведено исследование биоценоза влагалища. Под влиянием химиотерапии состояние биоценоза влагалища изменяется в отрицательную сторону. Так, частота *Gardnerellavaginalis* и *Eubacterium*spp возрастает на 27,9% и 27,3%, соответственно. Частота встречаемости *Mobilincusspp* и *Streptococcus*spp на 39,7% и 88,8%; происходит снижение активности *Lactobacill*spp с 40% до 36,0%. В исследуемой группе, под влиянием онкохимиотерапии наблюдается развитие классического

бактериального вагиноза с характерными клиническими проявлениями.

Установлены достоверные различия по U критерию Манна–Уитни значимые на уровне $p < 0,05000$, по некоторым показателям биоценоза. Так, Streptococcus spp ($p < 0,05$) (диаграмма 1, Staphylococcus spp ($p = 0,04$); Sneathiaspp ($p = 0,03$), Gardnerellavaginalis ($p = 0,04$) (диаграмма 2), Eubacterium spp ($p = 0,032$) (диаграмма 3), Mobiluncus spp ($p = 0,015$) (диаграмма 4) имеют значимые различия.

* $p=0.04$

Streptococcus spp

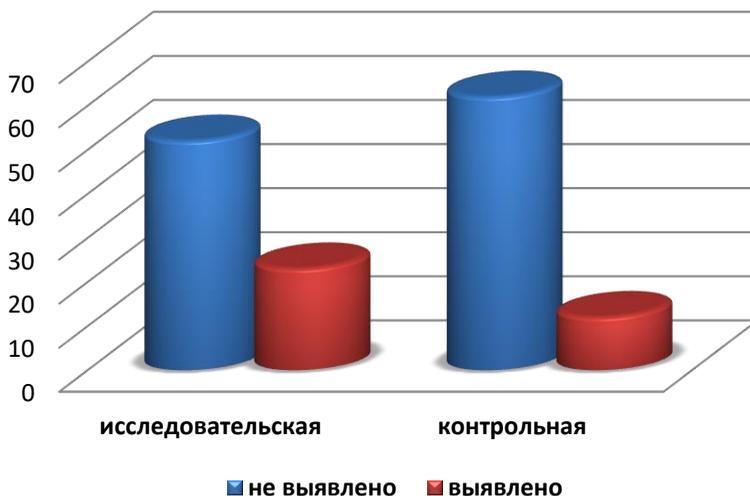


Диаграмма 1 - Показатели Streptococcus spp влагалища до и после химиотерапии

* $p=0.04$

Gardnerella vaginalis

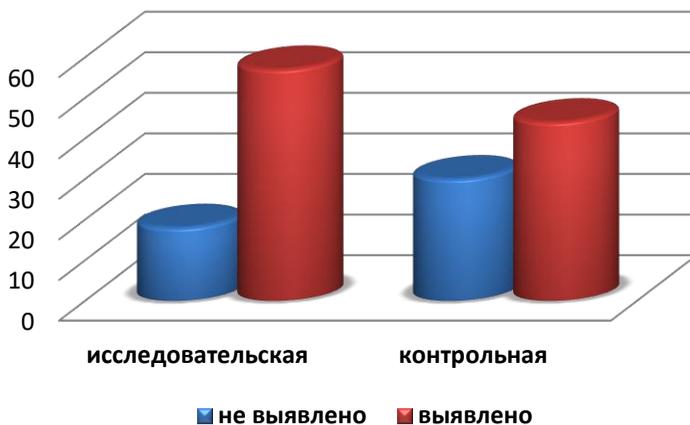


Диаграмма 2 - Показатели Gardnerellavaginalisвлагалища до и после химиотерапии

* $p=0.032$

Eubacterium spp

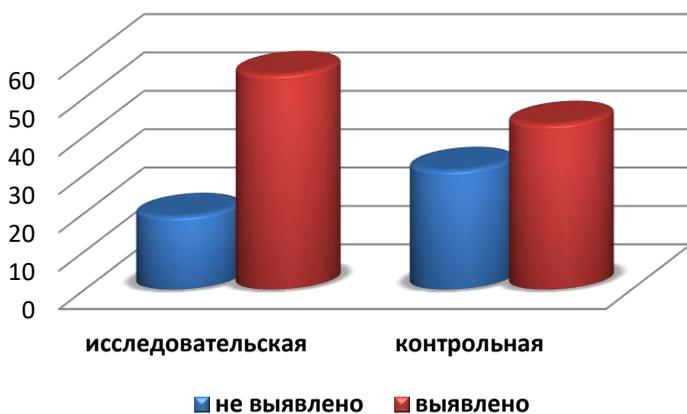


Диаграмма 3 - Показатели Eubacterium spp влагалища до и после химиотерапии

*p=0.015

Mobiluncus spp

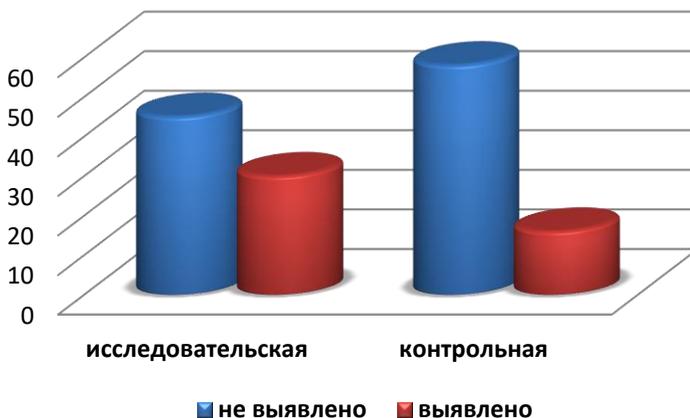


Диаграмма 4 - Показатели Mobiluncussppвлагалища до и после химиотерапии

В зависимости от молекулярной классификации методом иммуногистохимического анализа (ИГХ) биоценоза влагалища исследуемые женщины на 4 подтипа: Подтип LuminalA - 147 (53%), подтип LuminalB - 57 (21%), подтип Her2/Neu+ - 26 (9%) и подтип Triplenegative - 48 больных (17%). По молекулярной классификации для типов LuminalA и LuminalB прогноз заболевания являются более благоприятным в сравнении с остальными подтипами. Вошедшие в исследование женщины далее составили две группы наблюдения: в основную группу вошли 62,5%, которые получали комбинированное лечение (химиотерапию и гормонотерапию) и контрольную группу составили 37,4% пациенток. Результаты биоценоза влагалища в подтипах по молекулярной классификации указывают выраженный дисбиоз, обусловленный угнетением Lactobacillus spp., которому принадлежит главная роль в создании нормальной флоры во влагалище. В настоящем исследовании, не смотря на значительное

снижение общего количества *Lactobacillus* spp., у пациенток с разными подтипами РМЖ не наблюдалось статистически значимых изменений количества микроорганизмов к общей бактериальной массе.

По результатам сравнительного анализа среди представителей биоценоза влагалища превалирует представитель облигатно-анаэробной флоры *Peptostreptococcus* spp (рисунок 9). Между подтипами Luminal A и Luminal B ($p=0,02$); Luminal B и Her2/Neu+ ($p=0,01$) было значимое различие, это различие указывает о благоприятных исходах угнетения среднего значения логарифма отношения определяемого микроорганизма и в пограничном исходном состоянии привело к максимальному увеличению по отношению к величине общей бактериальной массы.

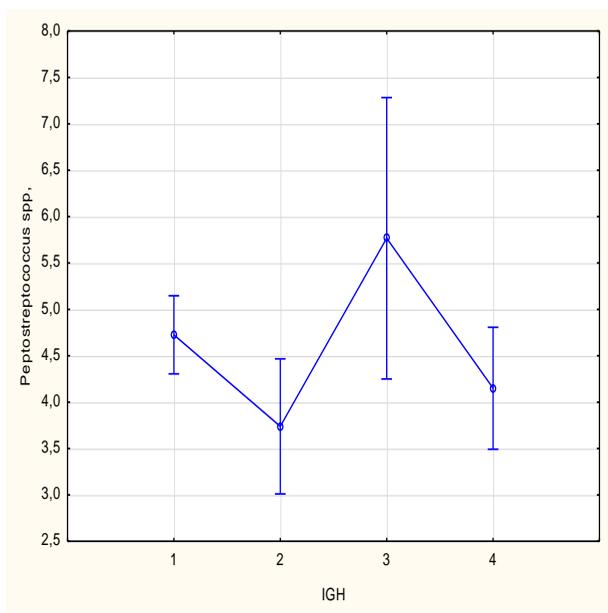


Рисунок 9 - Наличие представителя флоры *Peptostreptococcus* spp. в 4х подтипах РМЖ по ИГХ

Представитель той же группы облигатно-анаэробной флоры *Lachnobacterium*spp. (рисунок 10) между подтипами Luminal B и Tripplenegative ($p=0,01$) в пограничных зонах между благоприятным и неблагоприятными исходами имел значимое повышение логарифма отношения микроорганизма *Lachnobacterium*spp., который чувствителен к снижению неспецифического иммунитета.

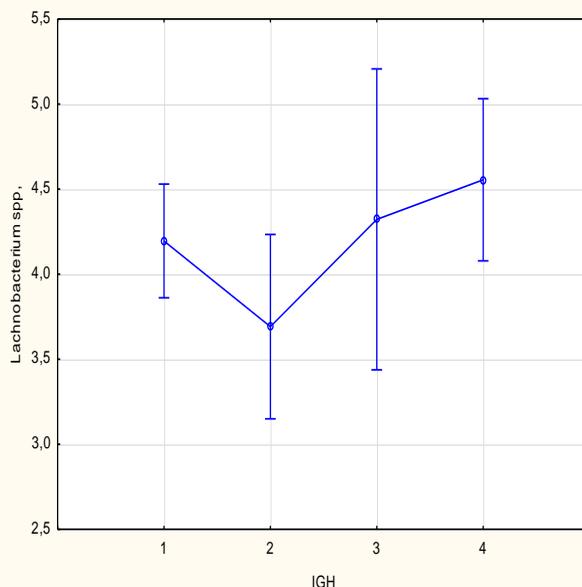


Рисунок 10 - Наличие представителя флоры *Lachnobacterium*spp в 4х подтипах РМЖ по ИГХ

Следующий сравнительный анализ выявил, что представитель факультативно-анаэробной флоры *Staphylococcus*spp. (рисунок 11) в неблагоприятных исходах между подтипами Her2/Neu+ и Tripplenegative ($p=0,02$); что указывает в подтипе Tripplenegative на возрастание среднего значения логарифма отношения определяемого микроорганизма

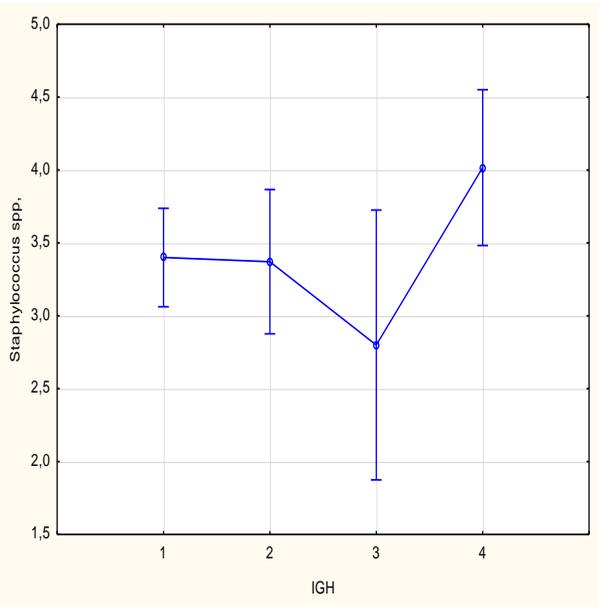


Рисунок 11 - Наличие представителя флоры *Staphylococcus* spp. в 4х подтипах РМЖ по ИГХ

Среди всех представителей групп Микоплазм, *Mycoplasma genitalium* (рисунок 12) в подтипах Her2/Neu+ и Triple negative ($p=0,04$) демонстрирует сходные с выше изложенными результатами по *Staphylococcus* spp.

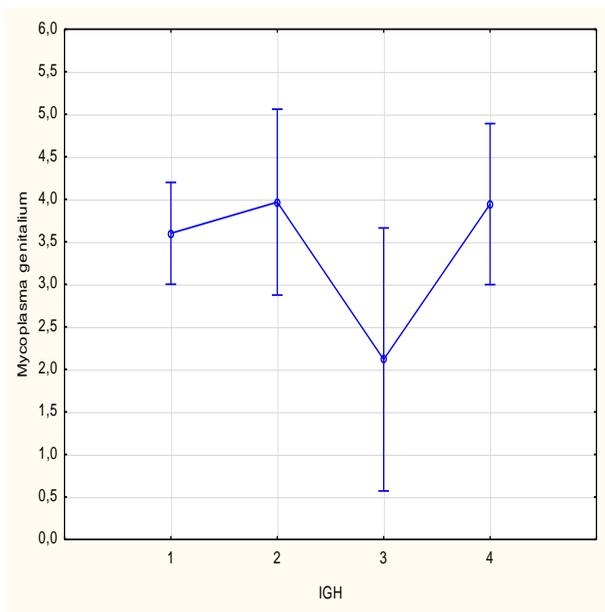


Рисунок 12 - Наличие представителя *Mycoplasma genitalium* в 4х подтипах РМЖ по ИГХ

Полученные результаты исследования указывают, что подтип РМЖ LuminalA наиболее часто встречаемый среди всех обследованных пациенток. По показателям биоценоза влагалища у женщин в различных подтипах РМЖ выявляется следующая картина: представитель нормофлоры *Lactobacillus* spp во всех 4-х подтипах не выявлен в нормальных значениях, что указывает на угнетение облигатной флоры; представители облигатно-анаэробной флоры *Peptostreptococcus* spp. и *Lachnobacterium* spp. имеют тенденции на значимые повышения в подтипах.

Было проведено исследование частоты встречаемости различных генотипов ВПЧ. Оказалось: в основном доминировал генотип ВПЧ-6 – 81%, далее ВПЧ-53 - 6,0%; и по 4,1% - ВПЧ-39, ВПЧ-45, ВПЧ-51 и ВПЧ-68. Остальные генотипы составили менее 3% (ВПЧ-3, ВПЧ-33, ВПЧ-73 и др).

При сравнении 2-х групп женщин с РМЖ до и после химиотерапии оказалось, что по-прежнему в обеих группах доминировали 2 генотипа: на первом месте ВПЧ-6 – по 83,7% и 78,6%, соответственно. На втором месте, по 4% случаев, были генотипы ВПЧ-31, ВПЧ-39, ВПЧ-51, ВПЧ-53. Причём, в исследовательской группе ВПЧ-31 встречался реже - на 32,5%, а ВПЧ-53 в 2 раза чаще, по сравнению с контрольной группой. Также, ВПЧ-45 и ВПЧ-68 наблюдались чаще в исследовательской, чем в контрольной группе на 96,2%, а ВПЧ-56 в 2 раза. Под влиянием химиотерапии изменяется соотношение различных генотипов ВПЧ у женщин с РМЖ в сторону превалированием генотипов высокого онкогенного риска, что необходимо учитывать при разработке методов лечения и разработке прогноза болезни.

Корреляционная связь между показателями иммунного статуса и показателями влагалищной флоры выявил достоверную связь между T-helper CD4 и CD8 и *Lactobacillus spp.2*, что видимо отражает динамику содержания *Lactobacillus spp.2* во влагалищной среде. В зависимости от общего состояния организма (в частности уровня эстрогенов) и активации воспалительного процесса, вызванного патогенной микрофлорой, после химиотерапии выявляется снижение лактобацилл. При исследовании корреляционных связей, достоверной она оказалась между *Eubacterium spp.2* и T-helper (CD4+CD16+56).

Из таблицы 2 видно чёткие корреляционные связи между двумя показателями иммунитета и *Megasphaera spp.2*, особенно выраженной со стороны гуморального звена иммунитета IgM и ИРИ (где $P=0,03$). Реакция иммунной системы, в виде повышения IgM, свидетельствует об ответе на инфекцию в лице *Megasphaera spp.2*, которая развивалась, видимо, после начала воздействия токсических химиопрепаратов на иммунную систему и свидетельствует об острой форме. Корреляционный анализ, выполненный между показателями иммунной системы и представителем влагалищной среды *Mobiluncus spp.1*

показывает высокодостоверную ($P=0.01$) корреляционную связь (таблица 3).

Таблица 2 - Корреляционный анализ между показателями клеточно – гуморального иммунитета и *Megasphaera*spp.2 у женщин с РМЖ после химиотерапии

Показатели	Спирмена R	t (N-2)	p - уровень
Иммуноглобулин А (IgA) &Megasphaera spp.2	- 0,356849	-1,90999	0,067671
Иммуноглобулин G (IgG) &Megasphaera spp.2	- 0,405754	-2,21970	0,035739*
Иммуноглобулин М (IgM) &Megasphaera spp.2	0,123202	0,62074	0,540390
Т-лимфоциты (CD3+CD19-) &Megasphaera spp.2	0,220353	1,12953	0,269398
В-лимфоциты (CD3-CD19+) &Megasphaera spp.2	0,027722	0,13867	0,890825
Т-helper (CD4+CD8-) & Megasphaera spp.2	0,214056	1,09568	0,283663
Т-цитотокс (CD4-CD8+) &Megasphaera spp.2	0,027548	0,13779	0,891507
ИРИ &Megasphaera spp.2	0,404695	2,21277	0,036271*
CD3+HLA-DR+ (активированные Е-лимфоциты) & Megasphaera spp.2	0,091382	0,45883	0,650319
CD3-HLA-DR+ & Megasphaera spp.2	0,203400	1,03872	0,308879
NK (CD16+56+) & Megasphaera spp.2	- 0,135007	- 0,68127	0,501961
Т-киллеры CD3+/CD16+56+ & Megasphaera spp.2	- 0,004905	- 0,02453	0,980628

Примечание - Отмеченные корреляции значимы на уровне $p<0,05$

Таблица 3 - Корреляционный анализ между показателями клеточно - гуморального иммунитета и Mobiluncus spp.1 у женщин с РМЖ после химиотерапии

Показатели	Спирмена R	t (N-2)	p-уровень
Иммуноглобулин А(IgA) & Mobiluncus spp.1	- 0,507814	-2,70132	0,013371*
Иммуноглобулин G(IgG) & Mobiluncus spp.1	- 0,126954	- 0,58652	0,563779
Иммуноглобулин М(IgM) & Mobiluncus spp.1	- 0,357057	- 1,75171	0,094417
Т-лимфоциты (CD3+CD19-) & Mobiluncus spp.1	- 0,062981	- 0,28919	0,775273
В-лимфоциты (CD3-CD19+) & Mobiluncus spp.1	0,051861	0,23798	0,814204
Т-helper(CD4+CD8-) & Mobiluncus spp.1	- 0,028274	- 0,12962	0,898101
Т-цитотокс(CD4-CD8+) & Mobiluncus spp.1	0,061493	0,28233	0,780453
ИРИ & Mobiluncus spp.1	- 0,239452	-1,13019	0,271142
CD3+HLA- DR + (активированные Е (-лимфоциты) & Mobiluncus spp.1	0,226136	1,06384	0,299480
CD3-HLA-DR+ & Mobiluncus spp.1	0,012652	0,05798	0,954310
NK(CD16+56+) & Mobiluncus spp.1	- 0,151824	- 0,70391	0,489224
Т-киллеры CD3+/CD16+56+ & Mobiluncus spp.1	0,339704	1,65515	0,112764

Примечание - Отмеченные корреляции значимы на уровне $p < 0,05$

Известно, что чаще всего этот микроорганизм влагалищной среды встречается при бактериальном вагинозе, а также нередко при остром эндометрите и остром сальпингоофорите. *Mobiluncus* способен с помощью ферментов муциназы, нейраминидазы повреждать ткани половых путей у женщин, а также прикрепляться к эпителиоцитам.

Аналогичный подход по оценке связей (таблица 4) между показателями иммунной системы и *Atopobium vaginae* 2 указывает на достоверную зависимость с показателями гуморального иммунитета – IgM и хелперным звеном иммунитета - Т-helper (CD4+CD8-). Корреляционная взаимосвязь была выявлена между клеточным иммунитетом и биоценозом влагалища: Т-лимфоцитами – *Atopobiumvaginae* $r = 0,4$ ($p < 0,02$), и это указывает на среднюю прямую корреляционную связь с достоверностью. Между Т-

Корреляционная взаимосвязь была выявлена между клеточным иммунитетом и биоценозом влагалища: Т-лимфоцитами – *Atopobium vaginae* $r = 0,4$ ($p < 0,02$), и это указывает на среднюю прямую корреляционную связь с достоверностью. Между Т-киллерами и *Eubacterium*spp. выявлена обратная корреляционная связь по значимости $r = -0,2$, ($p < 0,04$). Показатель клеточного звена – ИРИ показал с *Megasphaera*spp. прямую среднюю корреляционную связь $r = 0,4$ ($p < 0,03$). При анализе гуморального звена иммунитета корреляционные связи отмечены между IgG и *Megasphaera*spp. $r = -0,4$ ($p < 0,03$), обратная средняя, а также между IgA и *Mobiluncus*spp. $r = -0,5$ ($p < 0,01$) выявлена обратная сильная связь.

Таблица 4 - Корреляционный анализ между показателями клеточно - гуморальноиммунитета и *Atopobiumvaginae 2* у женщин с РМЖ после химиотерапии

Показатели	Спирмена R	t (N-2)	p-уровень
Иммуноглобулин А (IgA) & <i>Atopobium vaginae2</i>	0,137997	0,75032	0,459109
Иммуноглобулин G (IgG) & <i>Atopobium vaginae2</i>	0,336294	1,92300	0,064349
Иммуноглобулин М (IgM) & <i>Atopobium vaginae2</i>	0,415203	2,45781	0,020194*
Т-лимфоциты (CD3+CD19-) & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,085596	- 0,46265	0,647070
В-лимфоциты (CD3-CD19+) & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,096839	- 0,52396	0,604289
Т-helper (CD4+CD8-) & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,341848	- 1,95892	0,059800*
Т-цитотокс (CD4-CD8+) & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,014339	- 0,07723	0,938974
ИРИ & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,131464	- 0,71416	0,480840
CD3+HLA-DR+(активированные Е-лимфоциты) & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,075727	- 0,40898	0,685561
CD3-HLA-DR+ & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,135285	-0,73529	0,468066
NK(CD16+56+) & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,109227	- 0,59174	0,558607
Т-киллеры CD3+/CD16+56+ & <i>Atopobium vaginae2</i>	- 0,065455	- 0,35324	0,726463

Примечание - Отмеченные корреляции значимы на уровне $p < 0,05000$

Дополнительно, для более полной картины состояния бактериологического статуса обследованных женщин проведены анализ кала на бифидобактерии, аутофлора кожных покровов, мазок из молочной железы, а также бактериальный посев мочи. По исследованию кала на наличие бифидобактерий (норма бифидобактерии – 10^9 - 10^{10}) в исследовательской группе и контрольной в выбранной последовательности содержание нормальной микрофлоры толстого кишечника отмечалось у – 16% и 0%; заметное снижение количества бифидобактерии со степенью 10^6 - выявлено у 39% и 18%; со степенью 10^7 - у 16% больных и 38% и со степенью 10^8 получили у 29 % и 44%.

По результатам содержание микрофлоры молочной железы без патогенных изменений отмечалось у – 49%; *Staf.epid.* - выявлено у 18%, - *Staf. Aureus* - было у 30%. *Enterobacterium* – у 3%. В контрольной группе содержание микрофлоры молочной железы без патогенных изменений отмечалось у – 47%; *Staf.epid.* - выявлено у 28%; *Staf. Aureus* - было у 19% и *Enterobacterium* – 6% больных. В исследовательской группе и контрольной, соответственно содержание микрофлоры предплечья без патогенных изменений отмечалось у 50% и 57%; *Staf.epid.* - выявлено у 21% и 20 %; *Staf. Aureus* получен у 27% и 18% и *Enterobacterium* – у 2% и 5% больных. Исследование мочи на бактериальный посев в аналогичной последовательности указало на содержание микрофлоры мочи без патогенных изменений у 79% и 62%; *Enterobacteriaceae* - выявлено у 6% и 22 %; *Staf. Aureus* получен у 13% и 14%; *Stafilococcus* - по 1% больных.

Полученные результаты свидетельствуют о частичном дисбактериозе по аутофлоре и не выявляет определенную тенденцию по исследуемым показателям между группами, что предполагает о малой информативности аутофлоры при онкозаболевании.

2. Моделирование на животных токсических эффектов химиотерапии при лечении рака молочной железы

На первом этапе проведения экспериментов на лабораторных крысах отрабатывались методы по моделированию рака молочных желез, производили подбор химиотерапевтической дозы противоопухолевых препаратов, не приводящих животных к летальному исходу и опробировалась методика гипокситерапии. При этом интактная группа животных находилась в аналогических условиях вивария. Онкомодели индуцированного рака молочной железы у животных вызывался путем ведения per-os 7,12-диметилбензантрацена (ДМБА) с расчетом из расчета 1мл/20mg на животное массой тела 180-200 грамм на масляном растворе через желудочный зонд. Известно, что данное вещество способно образовывать токсичные и канцерогенные промежуточные эпоксиды, которые легко алкируют ДНК образуя ковалентно связанные ДНК-аддукты, тем самым вызывая мутации. ДМБА выступает в качестве инициатора опухолей, создающий для онкологических исследований удобные геномные мутации.

Всего в опыте было задействовано 100 белых лабораторных беспородных самок крыс массой 180-220 гр., в возрасте 6-8 месяцев. При исследовании учитывались требования «Правил проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в РК» (от 25.07.2007г. № 442), согласно которым утилизацию отходов осуществлять в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормами (от 13 января 2004 года N 19) «Санитарно-эпидемиологические требования к сбору, использованию, обезвреживанию, транспортировке, хранению и захоронению отходов медицинских организаций», зарегистрированных в реестре государственного регистра нормативно-правовых актов под N 2674. 32.

Животных поделили на 6 серий: 1 - интактная группа, 2 - контрольная группа с РМЖ, 3 - контрольная группа - с гипокситерапии, 4 - контрольная группа - действие химиотерапии, 5 группа с РМЖ и химиотерапией, 6 - опытная группа с РМЖ, химиотерапии и гипокситерапией. Животные 4, 5, 6 групп получали химиотерапию по схеме АС в виде доксорубина внутривнутрибрюшинно по 1,5 мг на 1 кг массы тела и циклофосфамида по 15 мг на 1 кг массы тела, разведенные физиологическим раствором. Животные группы 3 и 6 подвергались 30 сеансам гипокситерапии по 60 минут 3 раза в неделю, получая газовую смесь, содержащую 10% кислорода.

Оценивали общую летальность, летальность в процессе развития опухоли молочной железы, частоту полного излечения. Для животных с летальным исходом рассчитывалась продолжительность жизни, причем как средняя, так ее увеличение. На 7 день после введения 29% животным 7,12-ДМБА в дозе 20 мг препарата стали проявляться явления интоксикации – в начале беспокойные животные стали вялыми, не было груминга, шерсть выглядела неопрятно. К 15-30 дню – погибло 5% животных. На вскрытии явления некроза печени, геморрагии в других органах, изъязвления на протяжении кишечника, оставшиеся животные прослеживались до 15 недель. У 10% крыс развились опухоли молочных желез различной величины. У всех животных явления железодефицитной гипохромной анемии, лейкопении, лимфопении. Исследование препаратов костного мозга показали, снижение выработки эритробластов. В крови увеличение уровня билирубина, как общего, так и обеих фракций, что свидетельствует о гемолизе эритроцитов и нарушении работы печени.

Получена модель рака молочной железы, для использования в дальнейшем эксперименте. Часть животных получала химиотерапевтические препараты – 20% животных в виде доксорубина и циклофосфамида внутривнутрибрюшинно, для проверки их токсического действия на организм животных.

Через 15 дней 16% животных были забиты, при этом часть животных погибла в течение первых 10 дней. Умерщвление животных проводилось гуманным способом - эвтаназия эфиром, с учетом рекомендации, изложенных в «Руководстве по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» /под ред. Р.У Хабриева (2005г).

Изучалась морфологические изменения эритроцитов, связанные с регенеративными процессами – полихроматофилия и ретикулоцитоз. Взятие влагалищного и кишечного мазков у животных проводилось стандартными методами, соблюдая все правила асептики и антисептики. Окрашивание мазков Азур-эозином по Романовскому. Цитология полученных данных проводилась с помощью микроскопа под разнымиувеличениями и с использованием микроядерного теста.

Определение биохимических показателей крови, такие как глюкоза, холестерин, креатинин, мочевины, АлТ, АсТ, общий белок и фракции общего белка, билирубин, кальций, натрий, калий в крови осуществлялось на биохимическом анализаторе.

При изучении цитограммы костного мозга, костный мозг забирался специальной иглой после забоя животных, путем вскрытия грудины хирургическими ножницами. Для изучения костного мозга применялся метод комбинированной окраски мазков Май-Грюнвальда, Романовского-Гимзы по Паппенгейму. Для этого использован фиксатор Май-Грюнвальда с доокрашиванием свежеприготовленным водным раствором краски Романовского в течение 8-15 мин. Соотношение клеточных элементов в миелограмме определялось в процентах при подсчете на 500 клеток.

В костном мозге опустошение белого и красного ростков костного мозга проявилось развитием выраженной анемии у всех животных, в сочетании с лейко и лимфопенией. Известно, что под влиянием используемых препаратов, доксорубина и циклофосфида происходит угнетение выработки эритропоэтина в

почках, а также за счет непосредственного миелосупрессивного эффекта этих препаратов.

Таким образом показано, что вводимые препараты в указанной дозировке способны оказывать на животных, токсические действие на организм животных, аналогичное при терапии с больных раком молочной железы. После отработки конкретных моделей: модели развитие рака молочных желез; модели токсической онкохимиотерапии; модели гипоксической стимуляция красного роста костного мозга, далее продолжены основные эксперименты на животных разбитых на 6 групп для завершения поставленной цели.

3. Результат воздействия модифицированной интервальной гипоксической тренировки в сочетании с коррекцией углеводно-белкового обмена на токсические проявления химиотерапевтических препаратов у экспериментальных животных

Проводился эксперимент на животных по изучению влияния ИГТ в сочетании с коррекцией углеводно-белкового обмена или гипогликемией на морфофункциональное состояние органов и тканей, на фоне химиотерапии онкопрепаратами у 100 животных. Структура исследуемых органов у животных опытной группы, которые получали ИГТ сохранилась. В морфологической картине выступали гемодинамические сдвиги, более выраженные на микроциркуляторном уровне. В стенках влагалища отмечалось неравномерное истончение эпителия, в капиллярах стазы. В миометрии матки отмечены прослойки соединительной ткани, в которой превалируют волокна эластического типа. В слизистой местами были обнаружены скудные лимфоидные инфильтраты.

При анализе результатов лабораторного исследования у животных было установлено, что показатели в I - интактной группе практически по всем параметрам соответствовали исследуемому виду

животных. В группах II, V, VI с введением ДМБА, после затравки на 6-10 день эксперимента погибло около 10% животных.

У оставшихся животных на гистологических препаратах отмечался неопластический рост эпителия молочной железы в виде трубок, имеющих расширения в отдельных местах, что соответствовало признакам протоковой аденокарциномы. Часть тканей лимфоузлов характеризовались замещением опухолевой тканью коркового слоя, иногда и паракортикальной области. Местами наблюдается атрофические процессы с замещением соединительной ткани.

Биохимические анализы крови характеризовались разнонаправленными сдвигами во II – группе, и особенно значимыми в группах II, V, VI. В частности, на фоне уменьшения показателей общего билирубина и ферментов АЛТ и АСТ в группах животных с затравкой ДМБА и дополнительного воздействия сеансов гипоксотерапии происходит увеличение печеночных показателей до верхних границ нормы. Такая динамика свидетельствует о развитии менее тяжелых некротических процессов в печенной ткани.

Сеансы гипокситерапии в комплексе с углеводной диетой и введении пребиотиков снижают явления интоксикации и функциональную активность костного мозга. Анализ миелограммы костного мозга, полученный после применения сеансов гипоксотерапии, свидетельствует об увеличении количества эритробластов и нормоцитов полихроматофильного ряда. В меньшей степени, но все же увеличивается содержание клеток гранулоцитарного ряда. При затравке ДМБА, особенно на фоне химиотерапии, происходит раздражение костного мозга, что отражается на показателях уровня эритробластов, нормобластов базофильного и полихроматофильного ряда. Дополнительное воздействие на животных с ДМБА и химиотерапии сеансов гипокситерапии способствует стабилизации состояния костного мозга, приближая показатели к среднему уровню.

Кроме того, по общему анализу крови под влиянием гипоксотерапии, гипогликемии и пребиотиков наблюдается менее выраженное снижение уровня эритроцитов и гемоглобина в отличие от животных, получавших ДМБА и химиотерапию.

Таким образом, в экспериментальной части установлено, что у животных после химиотерапии происходят угнетение костного мозга с развитием токсической анемии и неоднозначные изменения биохимических показателей. Тогда как использование гипокситерапии, пребиотиков и ограничения в корме углеводов снижают смертность экспериментальных животных, нормализуют ряд показателей костно-мозгового кроветворения и самих показателей красной крови.

4. Обоснование подхода снижения побочного влияния химиотерапии на организм женщин с РМЖ

По полученным клинико-лабораторным и экспериментальным данным в качестве модели прогностических критериев 5-летней выживаемости больных с РМЖ предлагается модель комплексной оценки состояния организма по показателям красной крови, биохимическим параметрам, иммунологическим ответным реакциям и их корреляции с биоценозом влагалища на фоне химиотерапевтического лечения и применения ИГТ. Экстраполяция полученных статистических и экспериментальных результатов на пилотное клиническое исследование в априории позволяет прогнозировать снижение смертности от РМЖ и улучшение качества лечения и сроков реабилитации больных. Указанные критерии являются основой алгоритма диагностики токсических эффектов химиотерапии на организм больных женщин с РМЖ, однако, считаем верным акцентироваться на показателях красной крови, что обосновано данными экспериментальной части исследования. Профилактический и лечебный методы снижения токсических эффектов химиотерапии на организм женщин с РМЖ в предстоящем пилотном клиническом исследовании будут заключаться в циклично-фракционированном

режиме вдыхания 10% гипоксической смеси, при которой будет создаваться относительная гипогликемия, активизирующая анаэробный гликолиз и позволяющая гипоксии выразительно стимулировать включение механизмов, лимитирующих потребление глюкозы опухолевыми клетками и увеличивать выработку эритроцитов. Гипогликемия, по механизму типа обратной связи, позволит снизить активность анаэробных процессов в раковых тканях и уменьшить эндогенную интоксикацию за счёт полноценного окисления токсических веществ в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При развитии патологии РМЖ в процессе лечения возникают проблемы токсического действия применяемых химиопрепаратов, что влечет за собой снижение их дозировки или даже полностью отмены химиотерапию. В конечном итоге возникает сбой подобранной тактики лечения и соответственно нежелательные результаты болезни с ее прогрессированием.

В экспериментальной части на животных (крысах) отрабатывали модели развития рака молочных желез; токсической онкохимиотерапии; модели гипоксической стимуляции красного ростка костного мозга согласно цели и задачам. Модель токсической онкохимиотерапии отражала токсичность химических препаратов доксорубицина и циклофосфида у животных, которым смоделирован РМЖ. Она характеризовалась опустошением белого и красного ростков костного мозга и развитием выраженной анемии в сочетании с лейкопенией и лимфопенией, а также миелосупрессивным эффектом и угнетением выработки эритропоэтина в почках. На модели гипоксической стимуляции красного ростка костного мозга путём применения ИГТ у животных с РМЖ, получавшие также химиотерапию, наблюдалось увеличение количества эритробластов в костном мозге, а в крови - достоверное увеличенно количества эритроцитов и концентрации гемоглобина. При вскрытии каких-либо патологических отклонений не обнаружено.

Клинико-функциональные исследования женщин с РМЖ характеризовали негативное состояние всех систем организма женщин: наличие железодефицитной анемии, что проявляется снижением уровня эритроцитов и гемоглобина, биохимические нарушения показателей состояния печени и почек. Исследования иммунной системы выявило, что под влиянием химиотерапии происходит активация клеточного звена иммунитета, на фоне угнетения гуморального. Наблюдения за состоянием иммунного статуса свидетельствуют о том, что цитотоксические клетки, В-лимфоциты (CD3-CD19), Т-лимфоциты (CD3-CD19) и уровень НК в сыворотке

могут использоваться в качестве предиктора для определения ответа на химиотерапию при РМЖ.

Полученные результаты аутофлоры организма больных женщин с РМЖ в данном исследовании оказались малоинформативными.

Химиотерапия сопровождается нарушением биоценоза влажной среды у наблюдаемого контингента женщин с РМЖ. Изучение генотипов ВПЧ у женщин до лечения химиопрепаратами выявил некий баланс между генотипами ВПЧ, относящиеся к группе низкого и высокого онкогенного риска. После химиотерапии у них же были получены генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска, что указывает о влиянии химиотерапии на распределение генотипов, увеличивающих риск развития онкологических заболеваний.

Иммунологическая реактивность организма женщин после проведенной химиотерапии выражалась в корреляционной связи показателей реакции иммунной системы с определенными микроорганизмами.

Иммунологические реакции клеточного и гуморального звена, их корреляционные связи с биоценозом влажной среды, а также варианты генетического маркера ВПЧ рассматриваются в качестве предикторов для оценки реагирования на химиотерапию при РМЖ.

Достаточно объективными данными сопровождалась экспериментальная часть исследования по модели гипоксической стимуляции красного ростка костного мозга путем применения ИГТ у животных с РМЖ. Результаты считаем целесообразным внедрить в формате пилотного клинического исследования применения ИГТ при химиотерапии среди больных с РМЖ. Снижение токсичного влияния лекарственных препаратов с ИГТ позволит системно проводить лечение без снижения их дозировки и тем более отмены лечения. Кроме того, будет улучшено качество жизни во время и после курса лечения у женщин с РМЖ, обеспечена их быстрая реабилитация и возвращение к

трудовой деятельности. Все это, без сомнения, будет выражаться в экономической эффективности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ferlay J. Estimates of world wideburden of cancerin: GLOBOCAN 2008. / J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D.M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray // Int J. Cancer. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. doi: 10. 1002/ijc. 25516.
2. Федоров В.Э. Характеристика распространения рака молочной железы за рубежом (обзор литературы). / В.Э. Федоров, М. Ласкано, М.Ю. Чебуркаева // Международный научно-исследовательский журнал, № 4 (46), ч. 5, №4, DOI: 10. 18454/IRJ. 2016. 46. 293.
3. Lykkesfeldt A.E. Aurora kinase A as a possible marker of endocrine in early estrogen receptor for breast cancer. / A.E. Lykkesfeldt, B.R. Iversen, M.B. Jensen, B. Ejlersen, A. Giobbie-Hurder, B.E. Reiter, T. Kirkegaard, B.B. Rasmussen // Acta Oncol. -2018-, 57 (1): 67-73. DOI: 10. 1080/0284186X. 2017. 1404126.
4. Phi X.A. Women's screening accuracy at family risk of breast cancer without a known gene mutation: meta-analysis of individual patients./ X.A. Phi, N. Houssami, M.J. Hooning, C.C. Riedl, M.O. Leach, F. Sardanelli, E. Warner, I. Trop, S. Saadatmand, M.M.A. Tilanus-Linthorst, T.H. Helbich, E.R. van den Heuvel, H.J. de Koning, I.M. Obdeijn, G.H. de Bock // Eur J. Pak. 2017 November, 85: 31-38. DOI: 10. 1016/J. EJCA. 2017. 07. 055.
5. Wanqing Chen. Cancer incidence and mortality in China, 2014. / Chen Wanqing, Sun Kexin, Zheng Rongshou, Zeng Hongmei, Zhang Siwei, Xia Changfa, Yang Zhixun, Li He, Zou Xiaonong,

- He Jie. // Chinese Journal of Cancer Research. /Tom 30, №1 (February 2018) doi: 10. 21147 / j. issn. 1000-9604. 2018. 01. 01.
6. Xiaopan Li. Urban and rural inequities in cancer incidence, mortality and survival in Shanghai, China, in 2002 and 2015. / Li Xiaopan, Deng Yang, Tang Weina, Sun Qiao, Chen Yichen, Yang Chen, Yan Bei, Wang Yingying, Wang Jing, Wang Shuo, Yang Fan, Ding Yibo, Zhao Genming, Cao Guangwen. // Front Oncol. 2018; 8: 579. Published online 2018 Dec 3. doi: 10.3389/fonc.2018.00579.
 7. Manush Zendeheel. Subtypes of benign breast diseases as a risk factor for breast cancer: a systematic review and meta-analysis protocol. / Zendeheel Manush, Babak Niakan, Keshtka Abbasaly, Rafiei Elahe, Salamat Phatima. // Iran J of Med Sci Jan-2018; 43(1): 1-8.
 8. Нелюбина Л.А. Рак молочной железы: стратегии оценки и снижения риска заболевания. / Л.А. Нелюбина // Вестник ТГУ, -2014. -ISSN 1810-0198. Т. 19, вып. 6, с. 1919-1927.
 9. Ватанха, С.С.К. Магнитно-резонансная томография в диагностике непальпируемого рака молочной железы. / С.С.К. Ватанха, С.А.О. Сарыев // Казанский медицинский журнал - 2017. - № 1. - С. 34-37.
 10. Yunchun Dan. Induced abortion and breast cancer. / Dan Yunchun, Syuu Khua, Syahua Tan. // Medicine. (Baltimor). - 2018;97(3):e9613. DOI:10/097/МД. 0000000000009613.
 11. Зайтова Х.М. Факторы риска, влияющие на развитие рака молочной железы. / Х.М. Зайтова, А.Н. Биржанова, Е.Н. Туфуминов, И.Н. Махпиршаев, Д.М. Зиябеков, М.И. Сактаганов, Г. Б. Умутбаева // Медицина, №4, 2014, с. 31-34.

12. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы: генетическая и клиническая гетерогенность, молекулярная диагностика, хирургическая профилактика в группах риска/ Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева, И.К. Воротников, С.М. Портной, О.В. Крохина, В.А. Соболевский, Л.Г. Жукова, В.А. Хайленко, С.А. Тюляндин // Успехи молекулярной онкологии. 2014;1(2):16-25. <https://doi.org/10.17650/2313-805X>. 2014. 1. 2. 16-25.
13. Brinton L.A. Recent trends in breast cancer among young women in the United States. / L.A. Brinton, M. Sherman, J.D. Carreon, W.F. Anderson // J Natl Cancer Inst. 2008;100(22):1643–1648. doi: 10.1093/jnci/djn344.
14. Josef S. Hi-cap captures the putative target genes at 33 breast cancer risk loci. / S. Buckster Josef, L. Livi Olivia, Kh. Dryden Nickola, Mugwayer Sara, Johnson Nickola, Fedele Vita, Simigdala Nickiana, Ann Martin Lesly, Andrews Simon, U. Wingett Steven, Assiotis Ioannis, Fanfick Carry, Chaukhan Ritica, G. Rust Alistar, Orr Niick, Dudbridge Frank, Fletcher Olivia // Nat Commun. 2018; 9: 1028. DOI: 10.1038/s41467-018-03411-9.
15. Заридзе Д.Г. Профилактика злокачественных новообразований. V-Петербургский Международный онкологический форум. / Д.Г. Заридзе, Д.М. Максимович // Сборник, т. 4, №2(2017) DOI.org/10.17650/2313-805X-2017-4-2-8-25.
16. Xinan Yang. Bridging Cancer Biology with the Clinic: Relative Expression of a GRHL2-Mediated Gene-Set Pair Predicts Breast Cancer Metastasis. / Yang Xinan, Vasudevan Prabhakaran, Parekh Vishwas, Penev Aleks, M. Cunningham John // PLoS One.

- 2013; 8(2): e56195. Published online 2013 Feb 18. doi: 10.1371/journal.pone.0056195.
17. Исмаилова Г.Н. Рак молочной железы: современные подходы диагностики и лечения. / Г.Н. Исмаилова, Б.А. Ермакбаева, Б.Т. Жусупова, А.М. Исакова, Ж.А. Есмагамбетов, Г.М. Шаймарданова, Р.К. Кумисбекова // Клиническая медицина. - №4 (34)-2014 с. 10-19.
 18. Бекмухамбетов Е.Ж. Распространенность злокачественных новообразований в Актюбинской области Казахстана. / Е.Ж. Бекмухамбетов, А.А. Мамырбаев, Т.А. Джаркенов, К.Ж. Макенова, З. Имангазина // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015; 12.; том. 16 выпуск 18 с. 8149-8153.
 19. Бейсебаев Е.Н. Современные сравнительные аспекты эпидемиологии рака молочной железы (обзор литературы). / Е.Н. Бейсебаев // Вестник Каз НМУ №1- 2014. с. 78-82.
 20. Байсалбаева А.С. Особенности заболеваемости раком молочной железы в Восточно-Казахстанской области. / А.С. Байсалбаева, Н.С. Игисинов, Т.А. Адылханов // Медицина – 2016. - №5. – С. 30 – 34.
 21. Игисинов С.И. Влияние высокогорья, этнического состава и особенностей быта на развитие и течение рака пищевода: (На модели Кыргызстана). / С.И. Игисинов // Автореф. дис. д-ра мед. наук. – СПб. -1992. – С. 46.
 22. Игисинов Н.С. Тенденции заболеваемости раком шейки матки у женщин в Кыргызстане. / Н.С. Игисинов // Медицина и экология, 2007, № 1 С. 79–82.
 23. Братик А.В. Интервальная гипоксическая тренировка в восстановительном лечении больных с постмастэктомическим синдромом/ А.В. Братик, Т.Н.

Цыганова // Вестник новых медицинских технологий – 2012 – N 1.

24. Гредасов Г.Ю. Способ лечения онкологических больных и устройство для его осуществления. / Г.Ю. Гредасов, И.И. Павлюченко, О.Г. Дегтярева, В.Г. Гредасова // Изобретение. Патент Российской Федерации RU23267. -01. 2006.
25. Соколов А.В. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия в клинической практике (обзор литературы). / А.В. Соколов, Д.Р. Ракита, Н.Г. Кочеткова, В.Я. Гармаш // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, №3-4, 2001 г., С. 166-172.

Бумага 60x84 1/16.

Усл.пл-18,31

Офсетная печать

Тираж: 500 экз.

Отпечатано в ТОО «Литера-А»

Г.Актобе, ул.Пацаева, 45

Тел.: 54-22-49