

М.М. Островський, О.І. Дельцова, О.І. Гевка, С.Б. Геращенко
Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ

ВПЛИВ АРМАДІНУ НА ПЕРИФЕРІЙНИЙ НЕРВ ЗА КОРЕКЦІЇ ПАКЛІТАКСЕЛ-ІНДУКОВАНОЇ НЕЙРОПАТІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

e-mail: gera271261@gmail.com

При вивченні тонкої структури периферичного нерва при корекції паклітаксел-індукованої нейропатії армадіном встановлено, що на тлі експериментальної паклітаксел-індукованої нейропатії в периферичному нерві спостерігається відновлення його структур, яке протікає за 3 періоди. Перший період триває до 28 діб від початку введення армадіну і проявляється відновленням структур мієлінових нервових волокон. Серед них зустрічаються демієлінізовані нервові волокна з деструкцією осевого циліндра, їх шванноцити вакуолізовані, ендоневрій набряклий. На 21-28 добу стан мітохондрій нормалізується. У шванноцитах присутні морфологічні ознаки підвищеного білкового синтезу. Зберігається невелика кількість пошкоджених мієлінових нервових волокон. Характерними для третього періоду є новостворені нервові волокна дрібного і середнього калібру з нормальним станом морфологічних структур. Збільшується кількість нервових волокон великого калібру з ознаками дистрофічних процесів, присутністю вогнищ демієлінізації, прогресуючою атрофією осевих циліндрів, проявами зриву регенераторних процесів.

Ключові слова: паклітаксел, сідничний нерв, армадін.

Робота є фрагментом НДР «Морфо-функціональна характеристика уражень центральної і периферійної нервової систем, органів чуття, викликаних хіміопрепаратами, що застосовуються для лікування онкологічних захворювань, та розробка схем нейропротекторної терапії», № державної реєстрації 0117U000672.

Онкологічні захворювання, їхній патогенез та можливості лікування є важливою проблемою сучасної медичної науки. Проводяться численні клінічні та експериментальні дослідження, які розкривають нові аспекти застосування протипухлинних засобів, ураховуючи їхні позитивні та негативні впливи.

На сьогоднішній день одним із найпотужніших антибластомних лікарських засобів вважається паклітаксел, який належить до препаратів рослинного походження (алкалоїд із кори тисового дерева) і виявляє високу ефективність при лікуванні злоякісних пухлин різного походження. Однак паклітаксел окрім позитивного впливу спричиняє токсичну дію на непухлинні клітини. Одним із поширених ефектів клінічно встановлена нейротоксичність на всіх рівнях організації нервової системи [9, 10]. Тому розширюється коло експериментальних досліджень з впливу паклітакселу на структури периферійної нервової системи, висвітлення окремих механізмів патоморфогенезу токсичних нейропатій із метою запобігання глибоких деструктивних уражень провідникового компоненту периферійних нервів. Однак представлені в науковій літературі дані є недостатніми та часто суперечливими [5, 11]. Учені докладають чималих зусиль до розробки питань стратегії нейропротекторної та нейрокоригуючої терапії [6, 7]. На думку дослідників, більш глибоке розуміння патоморфогенезу токсичних нейропатій, викликаних антибластомними хіміопрепаратами, буде сприяти не тільки розробці нейропротекторних стратегій, але й нових хіміотерапевтичних середників із поліпшеним профілем нейротоксичності [1, 4].

Серед численних фармакологічних середників, які застосовуються для попередження та лікування токсичних нейропатій, нашу увагу привернув препарат армадін (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат, мембранопротектор, антиоксидант, який належить до засобів, що впливають на нервову систему), який виявив позитивний вплив на перебіг паклітаксел-індукованої ретинопатії в експерименті [2].

Метою роботи було вивчити тонку структуру периферійного нерва за корекції паклітаксел-індукованої нейропатії армадіном.

Матеріал і методи дослідження. В експерименті 80 білим щурам масою 150-200 г внутрішньоочеревинно вводили паклітаксел (Actavis, Румунія) у дозі 2 мг/кг маси тіла через одну добу 4 рази, сумарна доза – 8 мг/кг за методом R.S. Polomano et al. [8], після чого тварин рандомізували на дослідну (48 тварин, введення армадіну) і контрольну (32 тварини, введення води для ін'єкцій) групи. У дослідній групі тваринам вводили внутрішньоочеревинно армадін у дозі 10 мг/кг в 0,5 мл води для ін'єкцій протягом 10 днів. Тварини контрольної групи отримували внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій еквівалентного об'єму. У нормі електронномікроскопічну картину визначали на 10 інтактних тваринах.

В експерименті утриманні щурів та всі маніпуляції над ними проводили з дотриманням біоетичних вимог відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин,

які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Тварин виводили з експерименту шляхом знеживлення зі застосуванням ефірного наркозу. Матеріал для дослідження (сідничий нерв) проводили через 1, 7, 14, 21, 27, 60, 90 і 120 діб після останнього введення армადіну.

Підготовку препаратів для електронномікроскопічного дослідження здійснювали згідно загальноприйнятих методів. Препарати вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К, фотографували зображення при збільшенні 4800-16000 разів.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що для електронномікроскопічної картини на 1-у добу експерименту характерні: деформація мієлінової оболонки мієлінових нервових волокон (МНВ), порушення її ламелярної організації, розволокнення мієлінового шару по всьому периметру нервового волокна, відшнуровування ламелярних пластинок у вигляді концентричних кілець до набрялого навколоаксонного простору. Осьові циліндри деформовані. Аксолема має ознаки дисоціації. Аксоплазма містить гомогенізовані ділянки, у ній трапляються вакуолізовані мітохондрії.

У термін 14 діб ми спостерігали в сідничому нерві різні за морфологічною картиною МНВ - пошкоджені і непошкоджені та нервові волокна з ознаками відновлення структур. У пошкоджених МНВ мієлінова оболонка нерівномірно потовщена, розволокнена, без грубих порушень ламелярної будови. Їхні осьові циліндри містять розширені мішечки агранулярної ендоплазматичної сітки, вакуолізовані мітохондрії (рис. 1 а). Характерною рисою окремих є збереження явищ гіпертрофії та дезорганізації мієлінової оболонки, що розцінюються як прояви спотвореної регенерації. Серед МНВ трапляються демієлізовані з відсутністю мієлінової оболонкою і деструкцією осьового циліндра. Окремі з нервових волокон виявляють розволокнення пластинок мієліну по всьому периметру, або на 1/2 чи 1/4 окружності волокна, між ними визначаються інтрамієлінові вакуолі (рис. 1 б). Внутрішні пластинки мієліну щільно прилягають до аксолеми осьового циліндра. У шванноцитах МНВ визначається вакуолізація цитоплазми, в ендоневрії – набряк.

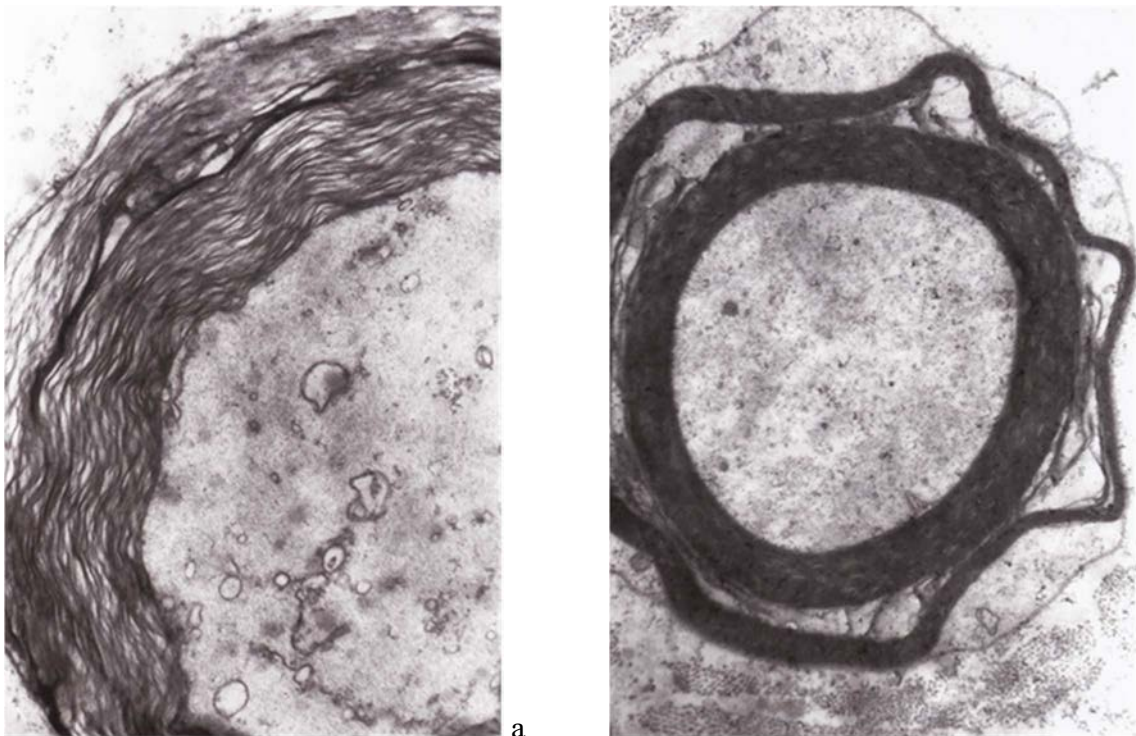


Рис. 1. Потовщення, розволокнення мієлінової оболонки, вакуолізація цистерн агранулярної ендоплазматичної сітки (АЕС) та мітохондрій (Міт) осьових циліндрів (а), розщеплення мієлінової оболонки (МО), формування інтрамієлярних вакуолей (В) мієлінових нервових волокон сідничих нервів щурів на 14-у добу після введення армадіну на тлі паклітаксел-індукованої периферійної нейропатії. Електронні мікрофотографії. Збільшення: а – х 6400, б – х 8000.

На 21-у добу більшість МНВ має нормальний вигляд. Вони набувають округлої форми, у мієліновій оболонці мієлінові пластинки розташовуються паралельно, інтрамієлінові вакуолі відсутні. В аксоплазмі осьових циліндрів у мітохондріях наявні короткі гребінці, їхня зовнішня

мітохондріальна мембрана безперервна. Мікрофіламенти орієнтовані впорядковано. Мікротрубочки розташовуються в аксоплазмі рівномірно.

Виражені зміни виявляються в нейролемоцитах. Їхня цитоплазма насичена мітохондріями, розширеними мішечками гранулярної ендоплазматичної сітки, гіпертрофованим пластинчастим комплексом, вільними рибосомами і полісомами. Зрідка трапляються ліпідні вакуолі. Тобто, у клітинах наявні ознаки підвищеного білкового синтезу, що має велике значення в реалізації регенераторних процесів у МНВ. Спостерігається зменшення набряку ендоневрію, але водночас тут з'являються колагенові волокна, які ідентифікуються групами.

В окремих МНВ у цей термін зберігається хвилястість мієлінових пластинок. У них інтрамієлінові вакуолі мають різні розміри. У таких волокнах аксоплазма осьових циліндрів набрякла, мітохондрії у стані вакуольної трансформації, мікротрубочки і мікрофіламенти утворюють скупчення з різною кількістю і розташовуються неупорядковано.

Вплив армادіну підтримується на 28-у добу експерименту. До позитивної дії армادіну можна віднести нормалізацію стану більшості МНВ. Їхня мієлінова оболонка характеризується властивими для нормальних нервових волокон ознаками: упорядкованістю мієлінових пластинок, відсутністю інтрамієлінових вакуоль (рис. 2 а). Аксон містить повноцінні мітохондрії з гребінцями нормальної довжини, правильно орієнтовані мікрофіламенти і мікротрубочки. У шванноцитах підтримується високий рівень синтетичних процесів, що слугує ознакою регенераторних реакцій у МНВ.

У МНВ, в яких у цей термін ідентифікуються ознаки пошкодження, визначається поглиблення дистрофічних процесів у мієліновій оболонці, хвилястість її мієлінових пластинок із розширеними міжламелярними просторами (рис. 2 б), в окремих ділянках спостерігаються ознаки демієлінізації.

В аксонах окремих МНВ виявляється набряк, вакуолізація мітохондрій, злипання мікротрубочок, хаотичне роташування мікрофіламентів. Привертає увагу розширення навколоаксонного простору з переміщенням до нього внутрішніх мієлінових пластинок. Часто осьові циліндри деформовані, а інколи атрофовані. Шванноцити таких МНВ у стані вакуольної дегенерації, ознаки регенераторних процесів у них мінімальні.

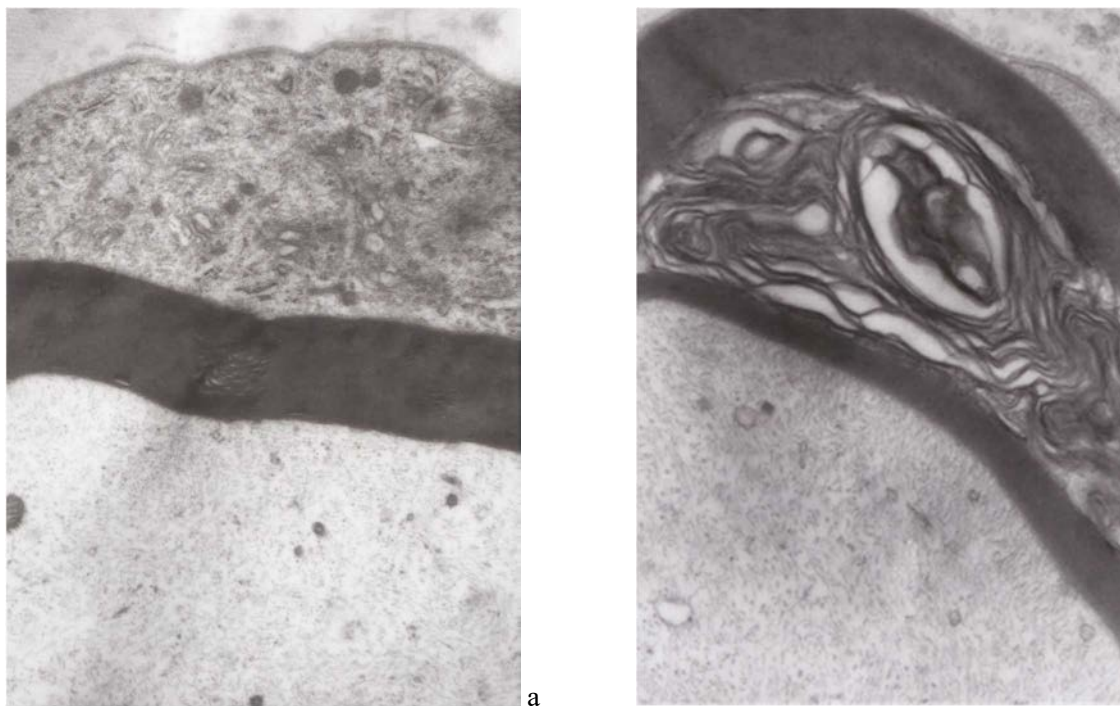


Рис. 2. Нормалізація структури мієлінової оболонки та органел нейролемоцита, упорядковане розміщення нейротубул та нейрофіламентів цитоплазми осьового циліндра (а), дезорганізація мієлінової оболонки окремих мієлінових нервових волокон сідничого нерва щура на 28-у добу після введення армادіну на тлі паклітаксел-індукованої периферійної нейропатії. Електронні мікрофотографії. Збільшення: а – х 9600, б – х 12000.

Наступна, 60-а доба експерименту виявляє картини з МНВ дрібного і середнього калібру з тонкою мієліновою оболонкою, нормальними за будовою осьовими циліндрами, які можна трактувати як новоутворені нервові волокна. У шванноцитах дещо зменшуються прояви синтетичних процесів: частина мішечків гранулярної ендоплазматичної сітки сплющується, у

комплексі Гольджі переважає пластинчастий і обмежується вакуольний компонент (рис. 3 а). У цитоплазмі трапляються вакуолі. Водночас зростає кількість МНВ великого калібру, в яких поглиблюються дистрофічні і деструктивні процеси: деформація нервових волокон, великі інтрамієлінові вакуолі з виникненням вогнищ демієлінізації. Часто спотворені химерні мієлінові пластинки формують інтрамієлінові включення (рис. 3 б).

Осьовий циліндр деформується в значному ступені, відтискається в один бік і утворюється велика порожнина між мієліновим шаром і аксолемою з уламками пластинок мієліну. В аксоплазмі осьового циліндра мітохондрій мало, мікрофіламенти і мікротрубочки дезорганізовані і дезорієнтовані, утворюють скупчення, між якими розташовуються ділянки набряку. Загалом, осьові циліндри зменшуються в розмірах і дегенерують. Тобто, у цей термін присутні нормальні й новоутворені МНВ і водночас значно пошкоджені. Структурні компоненти останніх демонструють ознаки зриву компенсаторних і регенераторних процесів.

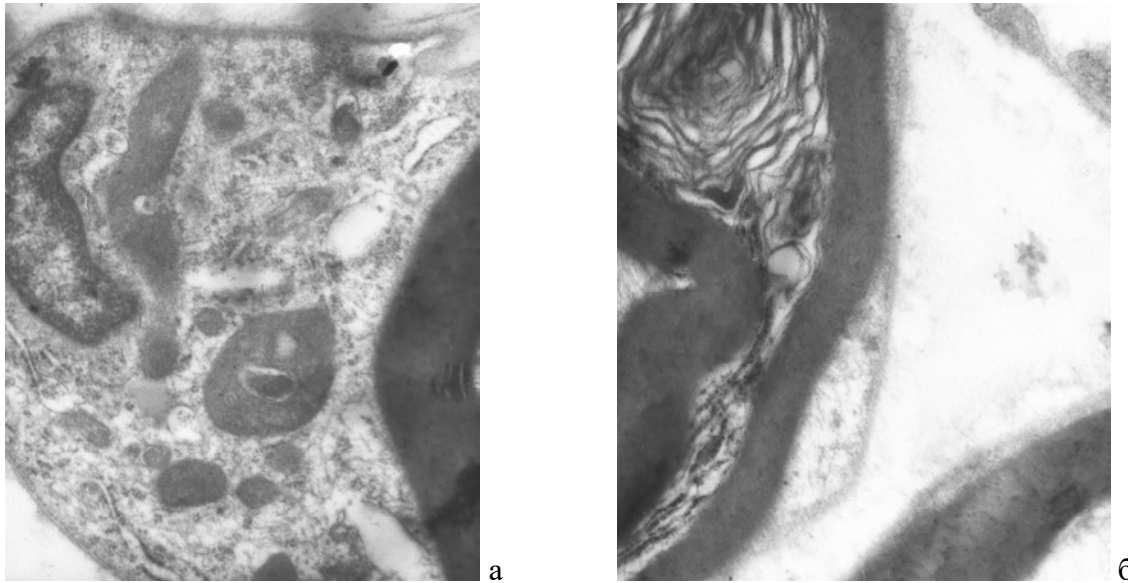


Рис. 3. Порушення структури шванноцитів (а) та мієлінової оболонки (б) мієлінових нервових волокон сідничного нерва на 60-у добу після введення арматину на тлі паклітаксел-індукованої периферійної нейропатії. Електронні мікрофотографії. Збільшення: а, б – х 5000.

Із продовженням терміну експерименту до 90 діб пошкоджених нервових волокон стає більше, ніж на 60-у добу. Так частіше спостерігаються деформовані МНВ, в яких у мієліновому шарі виявляються вакуолі. Мієлінова оболонка місцями гіпертрофована. Зростає кількість МНВ із пошкодженням осьових циліндрів, в яких виявляються різноманітні за розмірами і формою розширення навколоаксонного простору (рисю 4 а). Трапляються випадки, коли розширень кілька, але вони невеликі, і такі, в яких розширення досягають 1/2 периметру осьового циліндру. Такий процес розпочинається утворенням складок аксолеми, які впинаються в аксоплазму осьового циліндра і фрагментують його. При цьому відбувається деформація аксона і зменшення площі його перерізу. У фрагментах аксоплазми спостерігаються дрібні і вакуолізовані мітохондрії, дезорганізовані мікротрубочки і мікрофіламенти.

Шванноцити, переважно, дистрофічно змінені, їхня цитоплазма вакуолізована і набрякла. У цей термін в ендоневрії накопичуються пучки колагенових волокон та їхні продуценти – фібробласти з високою синтетичною активністю (розширені мішечки гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, мітохондрії).

120-а доба визначається електронномікроскопічною картиною, в якій як і на початку введення арматину спостерігаються нормальні МНВ, але все частіше в полі зору трапляються пошкоджені МНВ. У першу чергу, привертає увагу гіпертрофія мієлінової оболонки, за рахунок чого її зовнішні і внутрішні контури деформуються з утворенням великих випинань і заглиблень (рис. 4 б).

Найбільшим змінам підлягають мієлінові пластинки зовнішніх ділянок мієлінового шару. Мієлінові пластинки хвилясті, перемижуються з інтрамієліновими вакуолями. Подекуди зовнішні пластинки відокремлюються від внутрішніх і утворюють подвійний шар мієлінової оболонки. Навколоаксонний простір значно розширений і в ньому додатково можна визначити великі вакуолі, оболонкою яких служать ділянки аксолеми. Відбувається фрагментація осьового циліндра з його деформацією, гомогенізація аксоплазми, органили практично відсутні. Трапляються демієлізовані

МНВ з ознаками дегенерації. У нормальних за морфологічною картиною МНВ мієлінова оболонка не виявляє порушень. осьовий циліндр містить мітохондрії, мішечки гранулярної ендоплазматичної сітки, мікротрубочки і мікрофіламенти. Однак і в таких нервових волокнах трапляються набряк навколоаксонного простору, шванноцити МНВ мають великі округлі ядра з гетерохромним хроматином. Цитоплазма лежить навколо мієлінової оболонки невеликими ділянками, у ній мітохондрії, розширені мішечки гранулярної ендоплазматичної сітки, вакуолі, вільні рибосоми і полісоми. Ендоневрій насичений колагеновими волокнами.

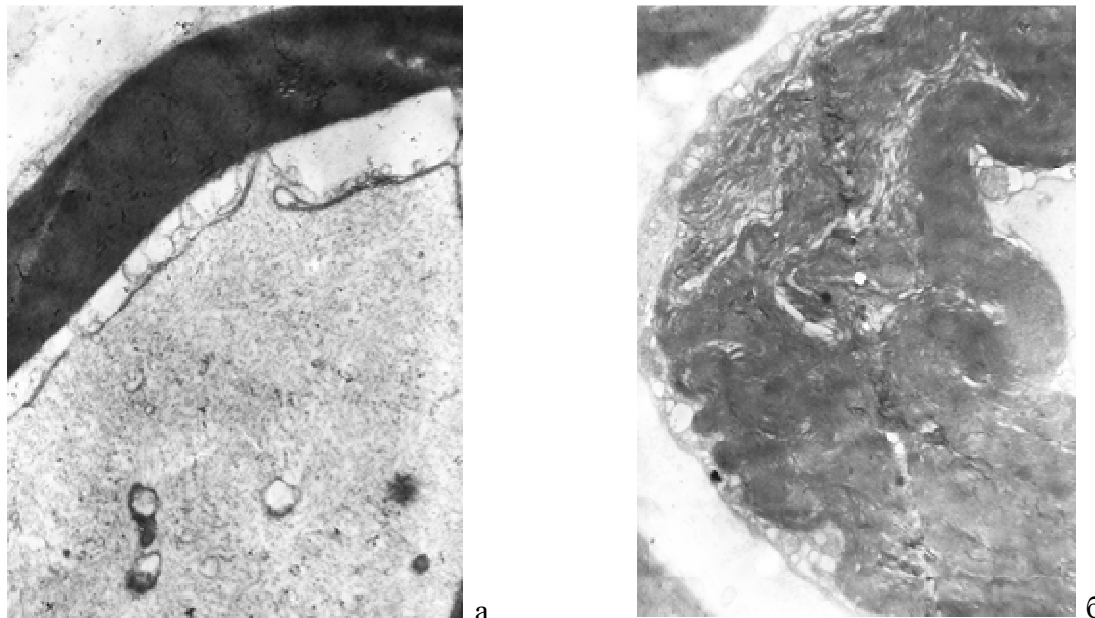


Рис. 4. Вакуолізація мітохондрій (Міт), дезорганізація нейрофіламентів осьового циліндра (ОЦ), виражений периаksonальний набряк, глибокі порушення структури мієлінової оболонки (МО) мієлінових нервових волокон на 90-у (а) та 120-у (б) доби після введення армадіну на тлі паклітаксел-індукованої периферійної нейропатії. Електронні мікрофотографії. Збільшення: а – х 9600, б – х 6400.

Як бачимо, функціональна недостатність мітохондрій, які забезпечують енергією метаболічні процеси в клітинах, відіграють значну роль у ефективності відновлення пошкоджених структур [12].

Виявлені морфологічні зміни в периферійному нерві є наслідком позитивного впливу на нього армадіну, що завдячуються, ймовірно, фармакологічним властивостям препарату. Армадін (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат) – мембранопротектор, антиоксидант, належить до засобів, що впливають на нервову систему, є інгібітором вільнорадикальних процесів, мембранопротектором, чинить антигіпоксичну дію, покращує мікроциркуляцію та реологічні властивості крові; спричиняє посилення компенсаторної активації аеробного гліколізу та зниження ступеня пригнічення окисних процесів у циклі Кребса в умовах гіпоксії з підвищенням вмісту аденозинтрифосфату (АТФ) і креатинфосфату, активацію енергосинтезувальних функцій мітохондрій, стабілізацію клітинних мембран [3]. Отримані нами результати підтверджують думку про те, що армадін (синонім: мексидол) сприяє відновленню структур периферійного нерва при токсичній паклітаксел-індукованій нейропатії.

Висновки

1. Встановлено, що після введення армадіну на фоні експериментальної паклітаксел-індукованої нейропатії в мієлінових нервових волокнах сідничного нерва спостерігається відновлення його структур, яке перебігає 3 періодами.

2. Перший період триває до 28-ї доби від початку введення армадіну і проявляється поступовим відновленням структур мієлінових нервових волокон. На 14-у добу стан більшості мієлінових нервових волокон наближається до нормального. Серед них трапляються демієлінізовані нервові волокна з деструкцією осьового циліндра, їхні шванноцити вакуолізовані, ендоневрій набряклий. На 21-28-у доби стан мітохондрій нормалізується. У шванноцитах присутні морфологічні ознаки підвищеного білкового синтезу. Зберігається невелика кількість пошкоджених мієлінових нервових волокон.

3. Із 60-ї до 90-ї доби (другий період) виявляються новоутворені нервові волокна дрібного і середнього калібру з нормальним станом морфологічних структур. Зростає кількість нервових

волокон крупного калібру з ознаками дистрофічних процесів, наявності вогнищ демієлінізації, деформацією і прогресуючою атрофією осевих циліндрів.

4. Характерними для 90-ї та 120-ї доби (третій період) є поява і збільшення кількості пошкоджених мієлінових нервових волокон з їхньою гіпертрофією і деформацією, розширенням навколоаксонного простору, фрагментацією осевого циліндра, тобто проявами зриву регенераційних процесів. В ендоневрії – велика кількість активних фібробластів і колагенових волокон.

Перспективи подальших досліджень полягають у тому, що включення армадіну, як мембранопротектора і антиоксиданта, в експерименті продемонструвало позитивний вплив на морфо-функціональний стан мієлінових нервових волокон, що дозволяє прогнозувати позитивні результати використання армадіну при паклітаксел-індукованій нейропатії в клініці.

Список літератури

1. Gevka OI. Patomorfogeneza paklitaksel-indukovanoyi peryferiynoyi neyropatii. Svit medytsyny ta biolohiyi. 2014;2(44):105-10. [in Ukrainian]
2. Dovha NZ. Ultrastrukturni zminy v sitkivtsi oka pry korektsiyi paklitaksel-indukovanoyi retynotoksychnosti antyoksydantnym preparatom. Ukrayinskyi zhurnal medytsyny, biolohiyi ta sportu. 2017;5(7):20-25. [in Ukrainian]
3. Gevka OI. Electron microscopic changes of sciatic nerves in rats with experimental peripheral neuropathy caused by paclitaxel. Pharma Inn J. 2014; 3(1):36-48.
4. Hanai A, Ishiguro H, Sozu T, Tsuda M, Yano , Nakagawa T et al. Effects of Cryotherapy on Objective and Subjective Symptoms of Paclitaxel-Induced Neuropathy: Prospective Self-Controlled Trial. 2018; Natl Cancer Inst. 2018 Feb 1; 110(2):141-8.
5. Matsui A, Tatibana A, Suzuki N, Hirata M, Oishi Y, Hamaguchi Y et al. Evaluation of Efficacy and Safety of Upfront Weekly Nanoparticle Albumin-bound Paclitaxel for HER2-negative Breast Cancer. Anticancer Res. 2017 Nov; 37(11):6481-8.
6. Miao H, Xu J, Xu D, Ma X, Zhao X, Liu L. Nociceptive behavior induced by chemotherapeutic paclitaxel and beneficial role of antioxidative pathways. Physiol Res. 2019; 68(3): 491-500.
7. Polomano RC, Mannes FJ, Clark US. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, Paclitaxel. Pain. 2001; 94(3):293-304.
8. Speck RM, DeMichele, Farrar JT. Scope of symptoms and self-management strategies for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in breast cancer patients. Support Care Cancell. 2012; 20(10):2433-9.
9. Stubblefield MD, McNeely MI, Alfano CM. A prospective surveillance model for physical rehabilitation of women with breast cancer. Cancer. 2012; 118(8 Suppl):2250-60.
10. Wozniak KM, Nomoto K, Lapidus RG. Comparison of neuropathy-inducing effects of eribulin mesylate, paclitaxel and ixabepilone in mice. Cancer Res. 2011; 71(11):3952-62.
11. Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. Exp Neurol. 2011; 232(2):154-61.

Реферати

ВЛИЯНИЕ АРМАДИНА НА ПЕРИФЕРИЧЕСКИЙ НЕРВ ПРИ КОРРЕКЦИИ ПАКЛИТАКСЕЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕЙРОПАТИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Островский Н.Н., Дельцова Е.И., Гевка О.И., Герашенко С.Б.

При изучении тонкой структуры периферического нерва при коррекции паклитаксел-индуцированной нейропатии армадином установлено, что на фоне экспериментальной паклитаксел-индуцированной нейропатии в периферическом нерве наблюдается восстановление его структур, которое протекает в 3 периода. Первый период длится до 28 сут от начала введения армадина и проявляется восстановлением структур миєлиновых нервных волокон. Среди них встречаются демиелинизированные нервные волокна с деструкцией осевого цилиндра, их шванноциты вакуолизированы, эндоневрий отекает. На 21-28 сут состояние митохондрий нормализуется. В шванноцитах присутствуют морфологические признаки повышенного белкового синтеза. Сохраняется небольшое количество поврежденных миєлиновых нервных волокон. Характерными третьего периода являются новообразованные нервные волокна мелкого и среднего калибра с нормальным состоянием морфологических структур. Увеличивается количество нервных волокон крупного калибра с признаками дистрофических процессов, присутствием очагов демиелинизации, прогрессирующей атрофией осевых цилиндров, проявлениями срыва регенераторных процессов.

Ключевые слова: паклитаксел, седалищный нерв, армадин.
Статья надійшла 12.01.2019 р.

THE INFLUENCE OF ARMADINE ON THE PERIPHERAL NERVE IN THE CORRECTION OF PACLITAXEL-INDUCED NEUROPATHY IN THE EXPERIMENT

Ostrovskiy M.M., Deltsova O.I., Gevka O.I., Herashchenko S.B.

In the study of the subtle structure of the peripheral nerve in the correction of paclitaxel-induced neuropathy with armadine, it was established that, restoration of experimental paclitaxel-induced neuropathy in the peripheral nerve occurs in 3 periods. The first period lasts up to 28 days from and manifested by the restoration of the myelin nerve fibers. Among them there are demyelinated nerve fibers with destruction of the axial cylinder, their Schwann cells are vacuolated, the endoneurium is swollen. On the 21st-28th days the condition of mitochondria is normalized. Morphological signs of increased protein synthesis are present in Schwann cells. A small amount of damaged myelin nerve fibers remains. Characteristic of the third period are the newly formed nerve fibers of small and medium caliber with normal state of morphological structures. The number of nerve fibers of large caliber with signs of dystrophic processes increases, progressing atrophy of axial cylinders, manifestations of failure of regenerative processes.

Key words: paclitaxel, sciatic nerve, Armadin.
Рецензент Єрошенко Г.А.