

**С.Б.Герашченко**

Івано-Франківський державний медичний університет

УДК [611.832:615.065]-616-092.9

## **ПОРУШЕННЯ НЕЙРО-СУДИННО-ДЕСМАЛЬНИХ СПІВВІДНОШЕНЬ ПЕРИФЕРІЙНИХ НЕРВІВ, СПИННОМОЗКОВИХ ВУЗЛІВ ТА РУХОВИХ СЕГМЕНТАРНИХ ЦЕНТРІВ ПРИ ЕТОПОЗИД-ІНДУКОВАНІЙ НЕЙРОПАТІЇ**

**Ключові слова:** етопозид, нейропатія, периферійний нерв, спинномозковий вузол, спинний мозок.

*Надійшла: 01.11.2006*

*Прийнята: 09.11.2006*

**Резюме.** Метою роботи було встановлення закономірностей патоморфогенезу токсичної нейропатії, викликаной етопозидом, з урахуванням усього комплексу нейро-судинно-десмальних взаємовідношень периферійних нервів, їх рухових і чутливих сегментарних центрів. У дослідях на 86 білих щурах встановлено, що експериментальна етопозид-індукована периферійна нейропатія, викликана одноразовим довшим введенням препарату в дозі 22 мг/кг маси тіла, є первинною прогресуючою аксонопатією. У роботі використано комплекс морфофункціональних методик, які включають нейрогістологічні та електронномікроскопічні способи досліджень, маркерні гістохімічні методики вивчення проникності судин гемомікроциркуляторного русла на світлооптичному та ультраструктурному рівнях. При виборі методик дослідження враховано рекомендації Міжгалузового Комітету з Нейротоксикології (Interagency Committee on Neurotoxicology). У морфогенезі захворювання ми пропонуємо виділити наступні стадії - фазу первинної аксональної реакції (3 доба дослідів), фазу порушення системи мікроциркуляції периферійних нервів та їх сегментарних центрів (7 доба експерименту), фазу дегенеративних змін (15 доба спостереження). Слід вказати на деяку умовність встановлених термінів кожної стадії, оскільки прогресування нейропатії супроводжується не стільки докорінною зміною характеру патологічного процесу, скільки появою численних популяцій нейронів, в яких своєрідно поєднуються процеси альтерації і компенсації. Внаслідок цього протягом усього терміну спостереження патоморфологічна картина відзначається значною гетерогенністю і мозаїчністю.

**Gerashchenko S.B. Neuro-vascular-desmal relationship disturbances in peripheral nerves, dorsal root ganglions and motor segmental centers in the etoposide-induced neuropathy.**

**Summary.** The purpose of work was to determine the mechanisms of pathologic morphogenesis of the toxic neuropathy caused by etoposide taking into consideration all complex the neuro-vascular-desmal relationship disturbances in peripheral nerves, their motor and sensor segmental centers. It has been shown in the experiments on 86 white rats that single intravenous injection of etoposide at dose of 22 mg/kg body weight induce peripheral neuropathy. The complex of morphologic methods included the neurohistological and electronic microscopic methods of the research, the histochemical markers for study transmissivity of the vessels of the circulatory bed on the light microscopic and ultrastructural levels was used. The recommendations of the Interagency Committee of Neurotoxicology were considered to choose the methods of the research. The presence of 3 stages of morphogenesis has been established - phase of primary axonal reaction (3d day of experiment), phase of disturbance of the microcirculation of peripheral nerves and their segmental centers (7th day of experiment), phase of degenerative changes (15th day). Etoposide-induced neuropathy features are determined by a singularity of interdependent reactive changes, alteration and compensation processes in sensory and motor neurons, glial cells, microcirculatory bed and connective tissue.

**Key words:** etoposide, neuropathy, peripheral nerve, dorsal root ganglion, spinal cord.

Етопозид (Е) – протипухлинний препарат, напівсинтетичний глікозид, належить до похідних подофіллотоксину, який отримали з коренів подофілла щитоподібного (*Podophyllum peltatum* L.), ефективний при лікуванні дрібноклітинного раку легень, лімфогранульоматозу і неходжкінських лімфом, пухлин головного мозку. Препарат гальмує вступ клітин у мітоз. Побічною дією цього середника може бути значне пригнічення кровотворення, особливо гранулоцитопенія, нейтропенія, анемія, тромбоцитопенія. Шлунково-кишкові

розлади проявляються нудотою, блювотою, діареєю. Досить часто зустрічаються порушення функції нирок і алопеція. Такі симптоми характерні як для дорослих, так і для дітей (Kung F. et al., 1993). Як правило, Е використовується в комплексній хіміотерапії разом із цисплатином, вінкристином та іншими препаратами. Його токсичний вплив на нервову систему проявляється по-різному. Помірно виражена нейротоксичність була побічною дією цитостатика при лікуванні 26 пацієнтів з неходжкінськими лімфомами (McMaster M. et al.,

1991). За даними інших авторів (Malgrage B. et al., 1994), при терапії Е при цій же хворобі з 168 хворих ранні ускладнення - енцефалопатію, психіатричні симптоми, розлади мозкового кровообігу - мали 39% хворих. Ці токсичні ефекти були середньої важкості в 47 хворих і фатальні - у 18. Пізніми проявами в 21% випадків у хворих були енцефалопатія, периферійні нейропатії, церебральні крововиливи і компресія спинного мозку. Winick N. et al. (1992) привернули увагу до випадків несподівано гострої нейротоксичності препарату. Rybak M. et al. (1993), Somlo G. et al. (1994) повідомили про нечасті прояви нейротоксичності при лікуванні Е. Водночас Daugaard G. et al. (1992), Langer C. et al. (1993) вказували на те, що токсичний вплив цитостатика на периферійну нервову систему спостерігався в 60% пацієнтів при лікуванні захворювань крові і перитонеальної мезотеліоми. Рідкісними випадками побічної дії Е було запалення орбітальної ділянки, проптоз, зорова нейропатія і тотальна зовнішня офтальмоплегія (Lauer A. et al., 1999), які зникли лише через 2 міс після припинення терапії. Високі дози препарату індукують дистальну сенсорну полінейропатію (Chu C. et al., 2000; Imrie K. et al., 1994). Неврологічні симптоми починаються з другого тижня і на восьмому тижні досягають II-III ступеня важкості, переходять у хронічну форму з повільною регресією протягом кількох місяців.

Bregman C. et al. (1994), зацікавившись побічними ефектами Е, провели серію дослідів на мишах із доведеним введенням препарату в дозі 44 і 88 мг/кг маси тіла та вивченням матеріалу на світлооптичному і електронномікроскопічному рівнях. Ними описана клінічна симптоматологія експериментальної Е-індукованої периферійної нейропатії. Це прогресуюча атаксія, порушення рефлексів, парези передніх і задніх кінцівок, які проявляються на восьму добу експерименту. Морфологічно виявляється дегенерація дорсальних корінців спинномозкових вузлів і аксональна дегенерація в дистальних і проксимальних ділянках периферійних нервів, дорсальних корінців і дорсальних канатиках спинного мозку. При вивченні в світловому мікроскопі аксональна дегенерація характеризувалась зморщенням, набуханням і фрагментацією осьових циліндрів, що супроводжувалось вторинною демієлінізацією. Дегенеративні зміни в тілах нервових клітин чутливих вузлів включали ексцентричність ядер, вакуолізацію, центральний хроматоліз і периферійне згрупування тілець Ніссля. Ультраструктурно в перикаріонах нейронів визначались фокальні інтенсивні розширення гранулярної ендоплазматичної сітки, набухання мітохондрій, збільшення числа фаголізосом і агрегація мікрофіламентів з утворенням глобулярних філаментозних тілець. Аксональні зміни мали місце як первинні ураження в мієлінових нервових волокнах великого калібру. Вони проявлялись набуханням або зморщенням аксона, потоншенням мієлінової оболонки і зменшенням числа органел.

Підводячи підсумок аналізу літературних да-

них щодо впливу Е на периферійні нерви, слід вказати, що описані результати як клінічних наслідків, так і морфологічних досліджень побічної дії цього препарату є винятково обмеженими. Морфогенез таких уражень до цього часу не розкритий, хоча Е широко застосовується в протипухлинній хіміотерапії. Виходячи з вищезазначеного, метою проведеного дослідження було встановлення закономірностей патоморфогенезу токсичної нейропатії, викликаной етопозидом, з урахуванням усього комплексу нейро-судинно-десмальних взаємодій периферійних нервів, їх рухових і чутливих сегментарних центрів.

Для вирішення задач у роботі використано комплекс морфофункціональних методик, які включають нейрогістологічні та електронномікроскопічні способи досліджень, маркерні гістохімічні методики вивчення проникності судин гемомікроциркуляторного русла на світлооптичному та ультраструктурному рівнях. При виборі методик дослідження враховано рекомендації Міжгалузового Комітету з Нейротоксикології (Interagency Committee on Neurotoxicology) (Erinoff L., 1995).

Нейротоксичний вплив Е вивчали на експериментальній моделі, запропонованій Bregman C. et al. (1994), яка передбачає одноразове доведення препарату в дозі 22 мг/кг маси тварини. Об'єктом світлооптичного дослідження з наступним морфометричним аналізом служили сідничі нерви, спинномозкові вузли L<sub>2</sub>-L<sub>5</sub> та попереково-крижовий відділ спинного мозку (сегменти L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>) 86 білих нелінійних щурів (*Rattus norvegicus* L.).

Морфометричне дослідження проводили за допомогою аналізатора зображень на базі програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00) та Image J в інтерактивному режимі. Зображення фрагментів сідничого нерва, отримані шляхом послідовного сканування поперечних "напівтонких" зрізів сідничого нерва, забарвлених толудіновим синім, записувались у вигляді окремих \*.tff-файлів із наступною реконструкцією. В інтерактивному режимі вимірювались площа поперечного перерізу нервового стовбура, кількість мієлінових нервових волокон та мікрогемосудин. Визначались площа волокон (S<sub>v</sub>) та осьових циліндрів (S<sub>a</sub>), периметр волокон (P<sub>v</sub>) та осьових циліндрів (P<sub>a</sub>) в інтернодальних ділянках, площа поперечного перерізу ендоневральних кровоносних судин (S<sub>c</sub>) та їх просвіту (S<sub>n</sub>). Обчислювались коефіцієнти форми нервового волокна та аксона ( $C=4\pi S/P^2$ ) (Usson Y. et al., 1987), площа мієлінової оболонки ( $S_m=S_3-S_v$ , де S<sub>3</sub> і S<sub>v</sub> – площі фігур, обмежених зовнішньою і внутрішньою поверхнями мієлінової оболонки) та співвідношення площ осьового циліндра і мієлінового нервового волокна (g<sub>s</sub>). У кожному препараті вимірювались метричні показники всіх волокон, які були зрізані строго поперечно (Геращенко С.Б., 2001).

Морфометричний аналіз препаратів спинномозкових вузлів, забарвлених за методом Ніссля, проводився в інтерактивному режимі шляхом сканування послідовних зображень усіх перикаріонів чутливих нейронів, які містять ядереця, та ядер

мантийних гліоцитів, що їх оточують. Визначались показники площі (S) та периметра (P) профільного поля перикаріона аферентного нейрона, його ядра і ядерця, відповідно, коефіцієнти їх форми та показники співвідношення площ ядра і клітини, ядерця і ядра. Вимірювались площа та периметр ядер гліальних клітин і, відповідно, їх коефіцієнт форми. Крім цього, визначався відсоток нейронів із ексцентрично розміщеними ядерцями (Tomita K. et. al., 1986), мультиноклеолярних клітин і кількість гліоцитів, які безпосередньо межують із перикаріонами. Досліджувались аналогічні метричні параметри тіл рухових нейронів, які формують еферентний компонент сідничного нерва і належать до всіх шести нейронних субпопуляцій IX пластини (за Рекседом) сірої речовини попереково-крижового відділу спинного мозку (передньобічної, задньобічної, задньоприсередньої, передньоприсередньої, центральної і присередньої) на рівні L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>. Дослідженню підлягали перикаріони мотонейронів, в яких візуалізувалось ядерце, і ядра гліоцитів, які знаходяться на віддалі не більше, ніж 1,5 діаметра гліальної клітини, від тіла мотонейрона. В якості маркера проникності мікрогемосудин використовувалась високоочищена пероксидаза з коренів хрому (RZ 2,7, активність 686 - 692 од/мг).

Нами встановлено, що одноразове доведення введення Е в дозі 22 мг/кг маси тіла викликає в експериментальних тварин, починаючи з 7 доби дослідження, зниження рухової активності, на 15 добу – парези тазових кінцівок, що відповідає II – III ступеню нейротоксичності (згідно рекомендацій

ВООЗ і Міжнародного протиракового союзу для оцінки ступеня побічних проявів хіміотерапії) (Блохин Н.Н., Переводчикова Н.И., 1984).

Формування Е-індукованої периферійної нейропатії перебігає в декілька етапів. Первинною реакцією нервових волокон на введення препарату (3 доба дослідження) є порушення структури осьових циліндрів мієлінових і безмієлінових нервових волокон. За допомогою методів морфометричного аналізу доведено, що в патологічний процес втягується вся популяція мієлінових нервових провідників, а особливості змін метричних показників вказують на порушення конфігурації осьових циліндрів у процесі дезорганізації мієлоархітекtonіки сідничного нерва в ранні терміни дослідження. Перекалібрування проявляється зростанням частки волокон площею поперечного перерізу 20,0-40,0 мкм<sup>2</sup> до 55,7±1,4% (у контролі - 44,5±1,0%, p<0,05) і зменшенням відсотка волокон, які належать до метричних популяцій 40,0-60,0 мкм<sup>2</sup> і 60,0-80,0 мкм<sup>2</sup>, кількість яких складає, відповідно, 15,4±2,1% і 3,0±0,4% (у контролі 22,4±2,2% і 9,4±1,0%, p<0,05). При цьому у вказаних метричних популяціях відбувається порушення метричних співвідношень осьових циліндрів і мієлінової оболонки – на фоні збільшення площі аксонів виявлено відносне зменшення площі поперечного перерізу мієлінової оболонки, що знайшло своє відображення в достовірному зростанні величини показника g<sub>s</sub>. Вивчення змін показника коефіцієнта форми мієлінових нервових волокон і їх осьових циліндрів свідчить про переважну деформацію останніх (табл.1).

Таблиця 1  
Морфометрична характеристика мієлінових нервових волокон на 3 добу Е-індукованої периферійної нейропатії (M±m, n=15)

Площа мієлінових нервових волокон (S <sub>B</sub> )	Коефіцієнт форми мієлінових нервових волокон		Коефіцієнт форми осьових циліндрів	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
S <sub>B</sub> <20,0 мкм <sup>2</sup>	0,80±0,005	0,76±0,007*	0,74±0,009	0,66±0,010*
20,0≤S <sub>B</sub> <40,0 мкм <sup>2</sup>	0,77±0,004	0,71±0,005*	0,67±0,006	0,56±0,007*
40,0≤S <sub>B</sub> <60,0 мкм <sup>2</sup>	0,75±0,005	0,66±0,010*	0,63±0,008	0,51±0,013*
60,0≤S <sub>B</sub> <80,0 мкм <sup>2</sup>	0,75±0,008	0,65±0,013*	0,64±0,013	0,53±0,018*
80,0≤S <sub>B</sub> <100,0 мкм <sup>2</sup>	0,73±0,020	0,63±0,027*	0,64±0,030	0,51±0,037*
100,0≤S <sub>B</sub> <120,0 мкм <sup>2</sup>	-	0,67±0,028	-	0,57±0,032

\* - відмінність достовірна (p<0,05)

Електронномікроскопічне дослідження показало, що деформація аксонів мієлінових нервових волокон супроводжується порушеннями мембранних і немембранних органел аксоплазми. Збільшення щільності розміщення, зростання абсолютної кількості, порушення орієнтації і тонкої структури мікротрубочок і нейрофіламентів, виявлені нами, дозволяють пояснити феномен сповільнення ретроградного аксонного транспорту в периферійному нерві під впливом подофіллотоксину, виявлений Paulson J., McClure W. (1975) у дослідях in vitro. Зміни мієлінової оболонки у вказаний термін експерименту проявляються перева-

жно в порушенні конфігурації, яке відбувається за рахунок формування випинань та інвагінацій різної глибини. В окремих волокнах визначається відшнуровування фрагментів мієлінової оболонки, які мають вигляд включень концентричної будови, що вільно лежать в аксоплазмі осьового циліндра (рис.1). У більшості мієлінових нервових волокон порушується тонка організація ламелярної будови за рахунок утворення інтрамієлінових вакуолей невеликих розмірів. У безмієлінових нервових волокнах спостерігається набряк аксоплазми та зниження кількості немембранних органел (рис.2). У клітинах Шванна виявляються



однотипні морфологічні зміни. Спостерігається розширення і деформація елементів апарату Гольджі, цистерн ендоплазматичної сітки, дегрануляція елементів гранулярної ендоплазматичної сітки і поверхневі ураження мітохондрій.

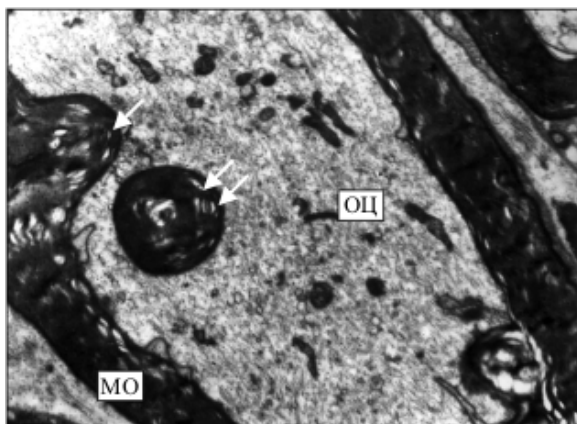


Рис.1. Порушення конфігурації (↓) та відшнуровування фрагментів мієлінової оболонки з переміщенням в аксон мієлінового нервового волокна (↓↓) сідничного нерва на 3 добу експерименту. Електронна мікрофотографія.  $\times 7000$ : МО – мієлінова оболонка, ОЦ – осьовий циліндр.

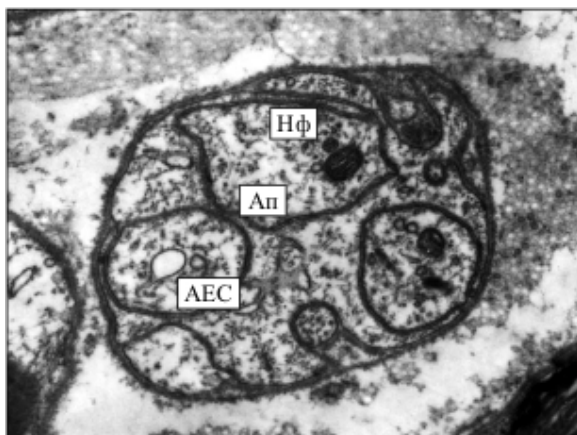


Рис.2. Просвітлення аксоплазми (Ап), розширення цистерн агранулярної ендоплазматичної сітки (АЕС), порушення орієнтації нейрофіламентів (Нф) безмієлінового нервового волокна сідничного нерва на 3 добу експерименту. Електронна мікрофотографія.  $\times 20000$ .

Зміни провідникового компоненту сідничного нерва супроводжуються повнокрів'ям мікрогемосудин та незначним підвищенням проникності гемато-ендоневрального бар'єру для рідини і крупномолекулярних білків (рис.3).

Для перикаріонів рухових і чутливих нейронів властиві помірно виражені порушення структури мітохондрій, гранулярної ендоплазматичної сітки і апарату Гольджі (рис.4). Гемомікроциркуляторне русло рухових сегментарних центрів суттєвих змін не зазнає, у спинномозкових вузлах відзначається зростання проникності гемокapілярів.

Структурно-функціональні зміни сідничного нерва і його рухового та чутливого сегментарних

центрів на 3 добу досліду узгоджуються з результатами досліджень, присвячених вивченню механізмів дії препарату на нервові клітини в культурі. Встановлено, що Е індукує розрив одинарних і подвійних ниток ДНК внаслідок пригнічення топоізомерази II, що проявляється порушенням ультраструктури білоксинтезуючого апарату перикаріонів нейронів (Holm B. et al., 1996; Nagao T. et al., 1999).

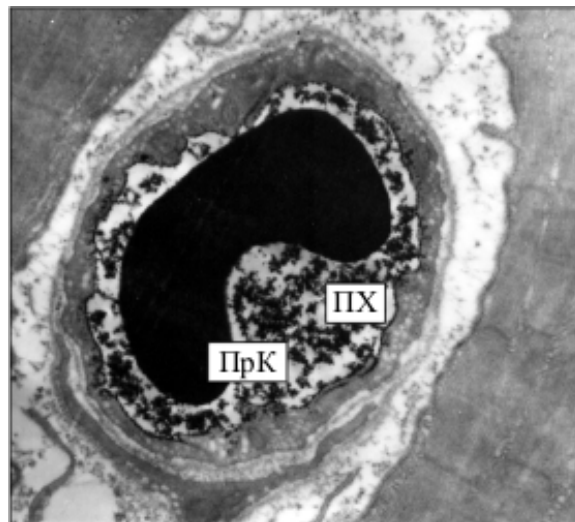


Рис.3. Транспорт пероксидази хрому (ПХ) через стінку капіляра ендоневрію сідничного нерва на 3 добу експерименту. Електронна мікрофотографія.  $\times 12000$ : ПрК – просвіт капіляра.

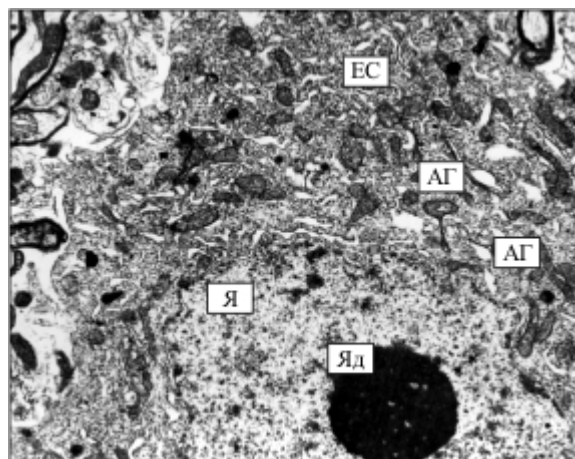


Рис.4. Помірні зміни ультраструктури перикаріонів мотонейронів на 3 добу Е-індукованої периферійної нейропатії. Електронна мікрофотографія.  $\times 5000$ : Я – ядро, Яд – ядерце, ЕС – ендоплазматична сітка, АГ – апарат Гольджі.

Водночас у наших дослідах у нервових клітинах визначались неглибокі дистрофічні зміни, на відміну від виявлених деякими авторами в експериментах *in vitro* явищ апоптозу нейроцитів (Kerokoski P. et al., 2001; Kuusisto E. et al., 2001; Nakajima M. et al., 1994; Solovyan V. et al., 1998). Компенсаторні реакції нейроцитів на пошкодження ДНК окремі дослідники пояснюють активацією антиапоптотичних факторів, зокрема теломерази і білка Bcl-X(L) (Kim J. et al., 2001; Lu C. et al.,

2001; Takakura A. et al., 2000).

Таким чином, Е-індукована периферійна нейропатія розвивається як первинна аксонопатія, яка супроводжується компенсаторними змінами перикаріонів, що ефективно забезпечують збереження структурної і функціональної цілісності аферентних і еферентних нейронів у ранні терміни досліджу.

Подальше прогресування Е-індукованої периферійної нейропатії пов'язано з набряком ендоневрію, який спочатку виникає в дрібних гілках сідничного нерва (3 доба), згодом розповсюджується на субепіневральні ділянки велико- і малогомілкової порцій та периваскулярно (7 доба), а на 15 добу експерименту захоплює найдрібніші прошарки сполучної тканини.

Середнє значення площі капілярів суттєво не змінюється і становить  $89,4 \pm 4,3 \text{ мкм}^2$  (у контролі –  $92,9 \pm 6,8 \text{ мкм}^2$ ,  $p > 0,05$ ), однак площа їх просвіту значно зменшується і складає  $13,0 \pm 0,6 \text{ мкм}^2$  (у контролі –  $40,7 \pm 1,9 \text{ мкм}^2$ ,  $p < 0,05$ ). При цьому спостерігається зростання площі ендотеліального шару до  $76,3 \pm 3,8 \text{ мкм}^2$  (у контролі –  $52,3 \pm 2,6 \text{ мкм}^2$ ,  $p < 0,05$ ).

При електронномікроскопічному дослідженні виявлено, що ядра ендотеліальних клітин гемокапілярів ендоневрію набувають неправильної форми, хроматин розподілений нерівномірно. Значно зростає рухомість люменальної плазмолемми. Вона утворює численні випинання, які мають вигляд високих пальцеподібних або вітрилоподібних утворень, локалізованих упродовж люменальної плазмолемми з переважанням у зоні міжендотеліальних контактів. Останні зберігають свою будову, однак дещо зменшується довжина зони, влаштованої за типом “щільного контакту”. Привертає увагу зростання числа перицито-ендотеліальних контактів, базальна мембрана потовщена, місцями дисоційована. У навколядерній зоні ендотеліоцитів виявляються поодинокі вакуолі, зростає число лізосом. Більшість мітохондрій набухає, у них визначаються явища вогнищевої деструкції зовнішньої мембрани, вкорочення і розплавлення крист, просвітлення матриксу. Цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки розширені, з ділянками дегрануляції та руйнування мембран. Елементи агранулярної ендоплазматичної сітки та апарату Гольджі розширені, деякі вакуольно трансформовані. Кількість мікропіноцитозних везикул збільшується.

Значно зростає проникність стінки капілярів. За рахунок підвищеної рухомості люменальної плазмолемми відбувається захоплення доведеної пероксидази хрому у вигляді великих вакуолей. Підвищення концентрації маркера спостерігається в зоні розширених міжендотеліальних контактів та в цитоплазмі перицитів. Свідченням зростання вмісту трассера в ендоневральній сполучній тканині є збільшення кількості макрофагів, що захопили пероксидазу, та поява в їх цитоплазмі гігантських гомогенних безструктурних включень (рис.5).

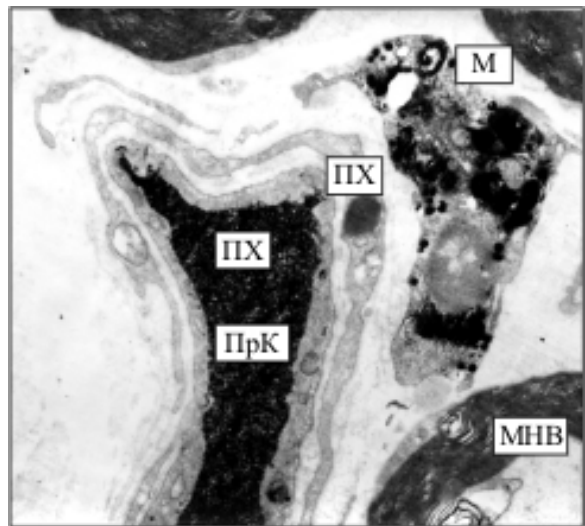


Рис.5. Ультраструктурна характеристика шляхів транспорту пероксидази хрому (ПХ) через стінку гемокапіляра і захоплення трассера макрофагами; гігантські ПХ-вмісні вакуолі в цитоплазмі макрофагів сідничного нерва на 7 добу експерименту. Електронна мікрофотографія.  $\times 8000$ : ПрК – просвіт капіляра, МНВ – мієлінове нервово волокно, М – макрофаг.

Характер морфологічних змін ендоневральних гемокапілярів, викликаних Е, нагадує структурні порушення мікрогемосудин периферійних нервів, які викликаються іонізуючою радіацією (Lundborg G., 1978) та адриаміцином (Boegman R. et al., 1985). У зв'язку з цим можна припустити, що токсична дія препарату на гемокапіляри ендоневрію зумовлена вільнорадикальним пошкодженням мембранних органел ендотеліоцитів, що приводить до зниження рівня метаболізму клітин і порушення процесів трансендотеліального транспорту (Lipp H., 1995). Водночас важливим патогенетичним моментом підвищення проникності клітин ендотелію слід вважати зниження синтезу білків, які забезпечують регуляцію гемато-нейронального бар'єру (Sandt I. et al., 2001). Зростання проникності мікрогемосудин зумовлює порушення осмотичної рівноваги в системі осьовий циліндр – нейролеммоцит – сполучнотканинна строма нерва і виступає важливим фактором виникнення вазогенного набряку нервових волокон (Olsson Y., 1984).

Вищеописані зміни системи ендоневральної мікроциркуляції на 7 добу досліджу спричиняють набухання осьових циліндрів багатьох мієлінових нервових волокон різного діаметра, яка поєднується з вакуольною трансформацією органел і набряком цитоплазми нейролеммоцитів (рис.6). Це, в свою чергу, викликає перекалібрування волокон за рахунок збільшення частки найдрібніших із них, зменшення кількості волокон середнього діаметра і появи нервових провідників площею перерізу понад  $100,0 \text{ мкм}^2$ , які не зустрічаються в контрольних тварин (табл.2).

Таблиця 2

Розподіл мієлінових нервових волокон сідничного нерва щурів за величиною показника площі волокна на 7 добу Е-індукованої периферійної нейропатії ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Площа мієлінових нервових волокон ( $S_v$ )	Контроль	Дослід
$S_v < 20,0 \text{ мкм}^2$	$20,8 \pm 1,6\%$	$28,9 \pm 0,7\%*$
$20,0 \leq S_v < 40,0 \text{ мкм}^2$	$44,7 \pm 0,8\%$	$41,3 \pm 2,3\%$
$40,0 \leq S_v < 60,0 \text{ мкм}^2$	$22,6 \pm 1,7\%$	$16,3 \pm 1,2\%*$
$60,0 \leq S_v < 80,0 \text{ мкм}^2$	$9,1 \pm 1,1\%$	$6,0 \pm 0,6\%*$
$80,0 \leq S_v < 100,0 \text{ мкм}^2$	$2,8 \pm 0,7\%$	$4,1 \pm 0,6\%$
$100,0 \leq S_v < 120,0 \text{ мкм}^2$		$2,3 \pm 0,75\%$
$S_v \geq 120,0 \text{ мкм}^2$		$2,8 \pm 1,75\%$

\* - відмінність достовірна ( $p < 0,05$ )

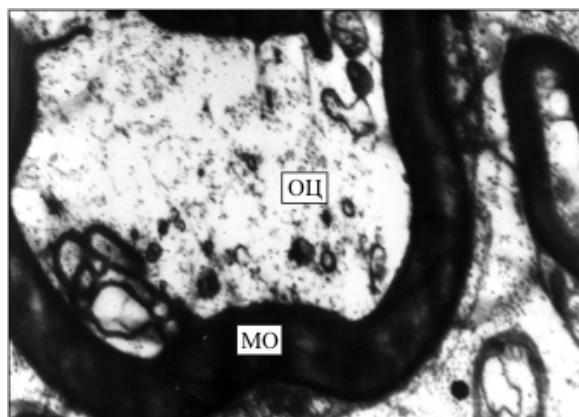


Рис.6. Набряк аксоплазми осевого цилиндра (ОЦ) та деформація мієлінової оболонки (МО) мієлінового нервового волокна сідничного нерва на 7 добу експерименту. Електронна мікрофотографія.  $\times 6000$ .

Водночас за цих умов нами морфометрично і статистично доведено, що перекалібрування і зміна форми мієлінових нервових волокон зумовлені поєднаним зростанням діаметру аксонів при відносно збережених метричних параметрах і ультраструктурній організації мієлінової оболонки.

Поряд із цим, зростає проникність стінки гемокapілярів рухового сегментарного центра для крупномолекулярних білків (рис.7), посилюються процеси трансендотеліального транспорту в спинномозкових вузлах (рис.8). Отримані в нашій роботі докази порушення гемато-енцефалічного бар'єру вентральних рогів сірої речовини спинного мозку та гемато-ендонеурального бар'єру сідничного нерва співзвучні з результатами досліджень Savaraj N. et al. (1987) і Spigelman M. et al. (1986), які виявили порушення бар'єрної функції мікрогемосудин головного мозку під впливом Е.

Дезорганізація транспортних механізмів у системі гомомікроциркуляції рухового і чутливого сегментарних центрів посилює дистрофічні зміни в нейронах та їх гліальному оточенні, викликаючи деструкцію органел, які забезпечують процеси біосинтезу, внутрішньоклітинного транспорту та енергетичний метаболізм. Усе це приводить до того, що в осевих циліндрах мієлінових нервових волокон виникає деструкція мембранних і немембранних органел, дезорганізація елементів цитос-

келету.

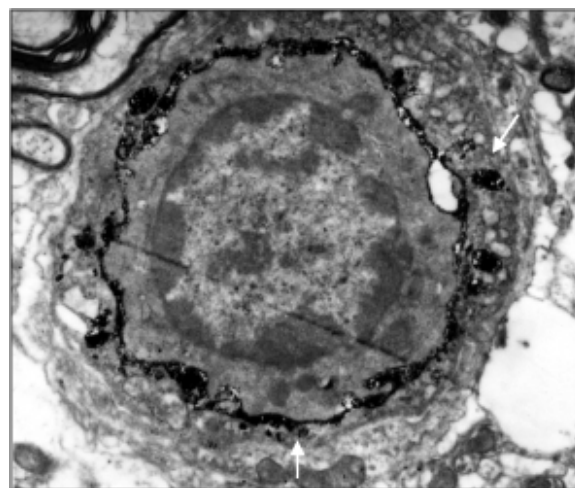


Рис.7. Захоплення і транспорт пероксидази хрому ( $\downarrow$ ) через гемато-енцефалічний бар'єр еферентного сегментарного центра сідничного нерва на 7 добу дослід. Електронна мікрофотографія.  $\times 10000$ .

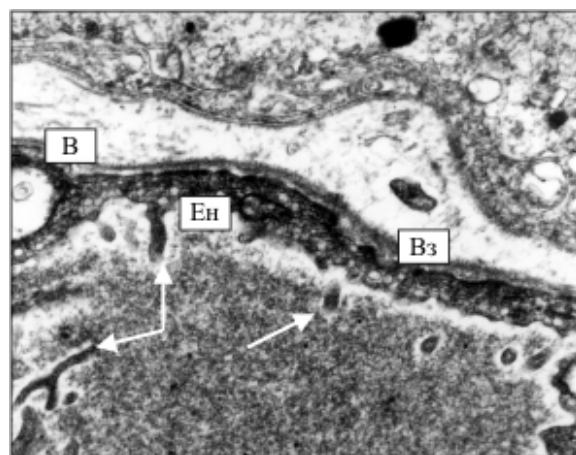


Рис.8. Випинання люменальної плазмолеми ( $\downarrow$ ), мікрофагоцитоз (Вз), вакуолізація (В) і потоншення ендотеліального вистелення (Ен) в гемокapілярі спинномозкового вузла на 7 добу експерименту. Електронна мікрофотографія.  $\times 15000$ .

Патоморфологічні зміни рухових і чутливих нейронів, виявлені нами на 7 добу експерименту, в основному, співпадають із результатами досліджень Bregman C. et al. (1994), доповнюючи їх даними про зміни в системі мікроциркуляції. Вод-



ночас вищеназвані автори обстоюють думку про переважне ураження мієлінових волокон великого діаметру, відносну стійкість безмієлінових нервових волокон до токсичної дії Е та відсутність пошкоджень рухової ланки периферійних нервів. На противагу цьому, результати проведеного нами дослідження реєструють зміни в усіх субпопуляціях мієлінових, порушення будови безмієлінових нервових волокон уже на ранніх стадіях Е-індукованої нейропатії та прогресуючі порушення структури рухових нейронів, які поєднуються зі змінами гліальних клітин у ділянці еферентного сегментарного центру.

На наступному етапі експерименту (15 доба) констатується поліморфізм морфологічних змін як рухових, так і чутливих нейронів. Суттєвою відмінністю від попереднього терміну є поява численних мієлінових волокон з ознаками атрофії, дегенерації або розпаду осьових циліндрів, руйнування клітин Шванна, деструкції мієлінової оболонки (рис.9). Наростають явища демієлінізації, спостерігається спотворення регенераторних процесів у нейролеммоцитах, що проявляється гіпертрофією та гіперплазією мієлінової оболонки. Ці результати підтверджуються даними морфометричного, у т.ч. кореляційного аналізу, які засвідчують появу численної популяції волокон із різко порушеними основними метричними показниками та їх співвідношеннями.

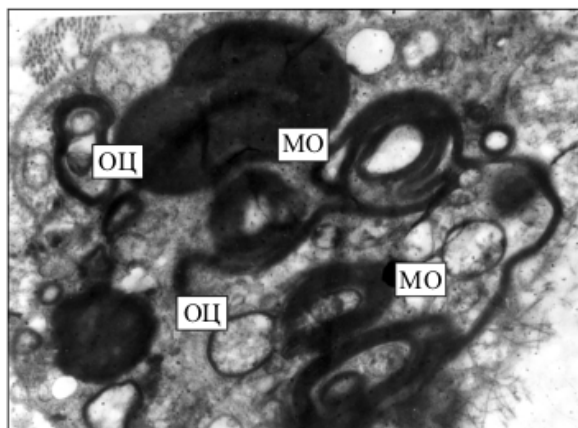


Рис.9. Фрагментація осьових циліндрів (ОЦ) і розпад мієлінової оболонки (МО) мієлінових нервових волокон сідничного нерва на 15 добу Е-індукованої периферійної нейропатії. Електронна мікрофотографія.  $\times 12000$ .

Характер порушень гемомікроциркуляторного русла рухового сегментарного центра сідничного нерва та спинномозкових вузлів, які мали місце в попередній термін, на 15 добу зберігається, проникність підвищується (рис.11). На відміну від спинномозкових вузлів та спинного мозку, гемокapіляри ендоневрію сідничного нерва характеризуються зниженням інтенсивності трансендотеліального транспорту. Однак набряк сполучної тканини залишається через неефективність механізмів, які забезпечують всмоктування рідини.

Структурні зміни перикаріонів еферентних і аферентних нейронів поглиблюються. При цьому сенсорні нейрони спинномозкових вузлів за-

знають глибокої деструкції, частина з них зморщується і деформується. Довкола таких нейроцитів спостерігається посилена проліферація мантийних гліоцитів (рис.10). Для деяких із перикаріонів характерні зміни, що визначаються при уоллерівській дегенерації їх відростків. У рухових нейронах виявляється переважно активація білоксинтезуючого апарату та пошкодження мітохондрій.

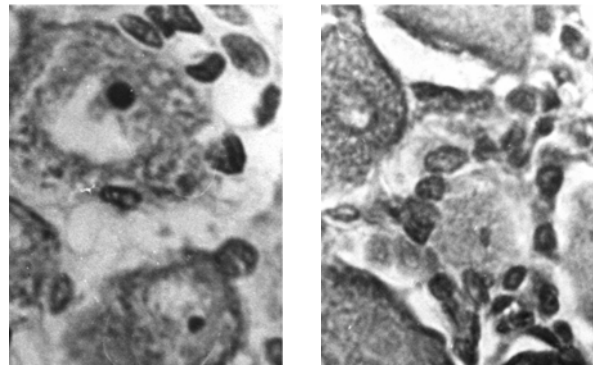


Рис.10. Деформація перикаріонів, хроматоліз речовини Ніссля аферентних нейронів (а), проліферація мантийних гліоцитів (б) спинномозкових вузлів на 15 добу Е-індукованої периферійної нейропатії. Забарвлення за методом Ніссля.  $\times 68$ .

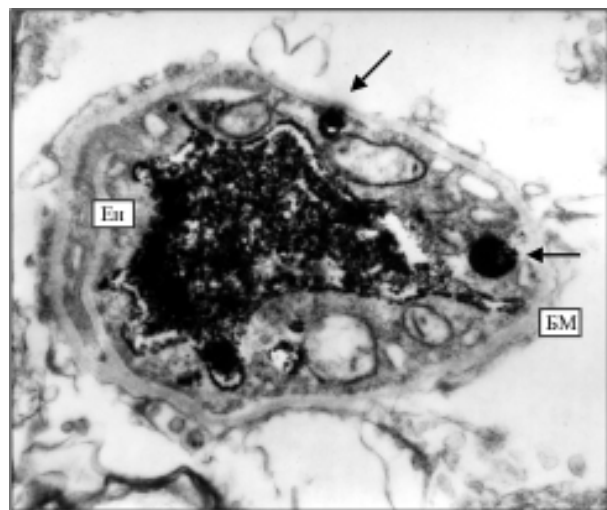


Рис.11. Транспорт пероксидази хрому в ендотеліоцитах (Ен) та вихід маркера в базальну мембрану (БМ) (↓) в гемокapілярі еферентного сегментарного центра сідничного нерва на 15 добу досліді. Електронна мікрофотографія.  $\times 20000$ .

**Висновки.** Таким чином, експериментальна Е-індукована периферійна нейропатія, викликана одноразовим довшим введенням препарату в дозі 22 мг/кг маси тіла, є первинною прогресуючою аксонопатією. У морфогенезі захворювання ми пропонуємо виділити наступні стадії - фазу первинної аксональної реакції (3 доба досліді), фазу порушення системи мікроциркуляції периферійних нервів та їх сегментарних центрів (7 доба експерименту), фазу дегенеративних змін (15 доба спостереження). Слід вказати на деяку умов-

ність встановлених термінів кожної стадії, оскільки прогресування нейропатії супроводжується не стільки докорінною зміною характеру патологічного процесу, скільки появою численних популяцій нейронів, в яких своєрідно поєднуються процеси альтерації і компенсації. Внаслідок цього протягом усього терміну спостереження патоморфологічна картина відзначається значною гетерогенністю і мозаїчністю.

**Перспективи подальших досліджень.** Отри-

Отримані дані можуть служити підґрунтям для вивчення механізмів синергічної нейротоксичності при поєднаному використанні антибластомних препаратів різних класів, основою для пошуку ефективних нейропротекторних середників, здатних знизити побічний вплив цитостатиків на периферійну нервову систему, що сприятиме покращенню якості життя хворих на злоякісні пухлини в умовах сучасної комплексної хіміотерапії.

#### Літературні джерела

Блохин Н.Н., Переводчикова Н.И. Химиотерапия опухолевых заболеваний.- М.: Медицина, 1984.- 304 с.

Герашенко С.Б. Комп'ютерний морфометричний аналіз мілоархітекτονіки периферійних нервів // Галицький лікар. вісн.- 2001.- Т.8, №3.- С.31-34.

A brief-duration combination chemotherapy for elderly patients with poor-prognosis non-Hodgkins-lymphoma / McMaster M., Johnson D., Greep J., Wolff S. // Cancer.- 1991.- Vol.67, №6.- P.1487-1492.

Chu C., Huang C., Chu N. Sensory neuropathy due to Bajiaolian (Podophyllotoxin) intoxication // Eur. Neurol.- 2000.- Vol.44, №2.- P.121-123.

Comparison of CNS penetration, tissue distribution, and pharmacology of VP 16-213 by intracarotid and intravenous administration in dogs / Savaraj N., Lu K., Feun L. et al. // Canc. Invest.- 1987.- Vol.5, №1.- P.11-16.

Daugaard G., Rorth M. Treatment of poor-risk germ-cell tumors with high-dose cisplatin and etoposide combined with bleomycin // Ann.Oncol.- 1992.- Vol.3, №4.- P.277-282.

Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration / Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Imai K. // Teratog. Carcinog. Mutagen.- 1999.- Vol.19, №3.- P.233-241.

Distinct mode of apoptosis induced by genotoxic agent etoposide and serum withdrawal in neuroblastoma cells / Solovyan V., Bezvenyuk Z., Huotari V. et al. // Mol. Brain. Res.- 1998.- Vol.62, №1.- P. 43-55.

Erinoff L. General considerations in assessing neurotoxicity using neuroanatomical methods // Neurochemistry international.- 1995.- Vol.26, №2.- P.111-114.

Etoposide induced blood-brain barrier disruption in rats: duration of opening and histological sequelae / Spigelman M., Zappulla R., Strauchen J. et al. // Cancer Res.- 1986.- Vol.46, №3.- P.1453-1457.

Etoposide-induced and BMY-40481-induced sensory neuropathy in mice / Bregman C., Buroker R., Hirth R. et al. // Toxicol. Pathol.- 1994.- Vol.22, №5.- P.528-535.

Etoposide induces programmed death in neurons cultured from the fetal rat central nervous system / Nakajima M., Kashiwagi K., Ohta J. et al. // Brain Res.- 1994.- Vol.641, №2.- P.350-352.

High-dose cisplatin, etoposide, and cyclophosphamide with autologous stem-cell reinfusion in patients with responsive metastatic or high-risk primary breast-cancer / Somlo G., Doroshow J., Forman S. et al. // Cancer.- 1994.- Vol.73, №1.- P.125-134.

Holm B., Jensen P., Sehested M. ICRF-187 rescue in etoposide treatment in vivo. A model targeting high-dose topoisomerase II poisons to CNS tumors // Cancer Chemother. Pharmacol.- 1996.- Vol.38, №3.- P.203-209.

Ifosfamide etoposide combination in the treatment of recurrent malignant solid tumors of childhood – A pediatric oncology group phase-II study / Kung F., Pratt C., Vega R. et al. // Cancer.- 1993.- Vol.71, №5.- P.1898-1903.

Image-analysis of neuritic regeneration by adult-rat dorsal root ganglion neurons in culture – quantification of the neurotoxicity of anticancer agents and of its prevention by nerve growth-factor or basic fibroblast growth-factor but not brain-derived neurotrophic factor neurotrophin-3 / Malgrage B., Delree P., Rigo J. et al. // J. Neurosci. Meth.- 1994.- Vol.53, №1.- P.111-122.

Intraperitoneal cisplatin and etoposide in peritoneal mesothelioma – favorable outcome with a multimodality approach / Langer C., Rosenblum N., Hogan M. et al. // Cancer Chemother. Pharmacol.- 1993.- Vol.32, №3.- P.204-208.

Involvement of a small GTP-binding protein (G protein) regulator, small G protein GDP dissociation stimulator, in antiapoptotic cell survival signaling / Takakura A., Miyoshi J., Ishizaki H. et al. // Molec. Biol. of the Cell.- 2000.- Vol.11, №5.- P.1875-1886.

Kuusisto E., Suuronen T., Salminen A. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 2001.- Vol.280, №1.- P.223-228.

Lipp H. Prevention and Management of Anticancer Drug Toxicity.- Universitätsverlag: Iena, 1995.- 130 p.

Lu C., Fu W., Mattson M. Telomerase protects developing neurons against DNA damage-induced cell death // Dev. Brain. Res.- 2001.- Vol.131, №1-2.- P.167-171.

Lundborg G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function // J. Bone Joint Surg.- 1978.- Vol.57, №7.- P.938-948.

Neurotoxicity of adriamycin and misonidazole in



the mouse / Boegman R., Scarth B., Dragovic L., Robertson D. // *Exper. Neurol.*- 1985.- Vol.87, №1.- P.1-8.

Paulson J., McClure W. Microtubules and axoplasmic transport. Inhibition of transport by podophyllotoxin: an interaction with microtubule protein // *J. Cell Biol.*- 1975.- Vol.67, № 2.- P.461-467.

Peripheral neuropathy following high-dose etoposide and autologous bone-marrow transplantation / Imrie K., Couture F., Turner C. et al. // *Bone Marrow Transp.*- 1994.- Vol.13, №1.- P.77-79.

P-glycoprotein inhibition leads to enhanced disruptive effects by anti-microtubule cytostatics at the in vitro blood-brain barrier / Sandt I., Gaillard P., Voorwinden H. et al. // *Pharm. Res.*- 2001.- Vol.18, №5.- P.587-592.

Phase-II trial of etoposide and cisplatin in patients with refractory and relapsed non-Hodgkins-lymphoma – Cancer and leukemia group-B study 8351 / Ryback M., Anderson J., Kaplan R. et al. // *Med. Pediat. Oncol.*- 1993.- Vol.21, №6.- P.441-445.

Severe ocular and orbital toxicity after intracarotid etoposide phosphate and carboplatin therapy / Lauer A., Wobig J., Schults W. et al. // *Am. J. Ophthalmol.*- 1999.- Vol.127, №2.- P.230-233.

Temporospatial sequence of cellular events

associated with etoposide-induced neuronal cell death: role of antiapoptotic protein / Kim J., Han B., Choi W. et al. // *J. Neurosci. Res.*- 2001.- Vol.66, №6.- P.1074-1082.

The levels of cdk5 and p35 proteins and tau phosphorylation are reduced during neuronal apoptosis / Kerokoski P., Suuronen T., Salminen A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 2001.- Vol.280, №4.- P.998-1002.

Tomiwa K., Nolan C., Cavanagh J. The effects of cisplatin on rat spinal ganglia: a study by light and electron microscopy and by morphometry // *Acta Neuropathol. (Berl.)*.- 1986.- Vol.69, №3-4.- P.295-308.

Unexpected acute neurologic toxicity in the treatment of children with acute lymphoblastic-leukemia / Winick N., Bowman W., Kamen B. et al. // *J. Nat. Cancer Inst.*- 1992.- Vol.84, №4.- P.252-256.

Usson Y., Torch S., Drouet d'Aubigny G. A method for automatic classification of large and small myelinated fibre populations in peripheral nerves // *J. Neurosci. Methods.*- 1987.- Vol.20, №3.- P.237-248.

Vascular Permeability in the Peripheral Nervous System / Dyck P., Thomas P., Lambert E., Bunge R. // *Peripheral Neuropathy.*- Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1984.- Vol.1.- P.579-597.

## **Геращенко С.Б. Нарушение нейро-сосудисто-десмальных соотношений периферических нервов, спинномозговых узлов и двигательных сегментарных центров при этопозид-индуцированной нейропатии**

**Резюме.** Целью работы было установление закономерностей патоморфогенеза токсической нейропатии, вызванной этопозидом, с учетом всего комплекса нейро-сосудисто-десмальных взаимоотношений периферических нервов, их двигательных и чувствительных сегментарных центров. В опытах на 86 белых шкурах установлено, что экспериментальная этопозид-индуцированная периферическая нейропатия, вызванная однократным дозированным введением препарата в дозе 22 мг/кг массы тела, является первичной прогрессирующей аксонопатией. В работе использован комплекс морфофункциональных методик, включающий в себя нейрогистологические и электроно-микроскопические методы исследований, маркерные гистохимические методики изучения проницаемости сосудов гемомикроциркуляторного русла на светооптическом и ультраструктурном уровнях. При выборе методик исследования учтены рекомендации Межотраслевого Комитета с Нейротоксикологии (Interagency Committee on Neurotoxicology). В морфогенезе заболевания мы предлагаем выделить следующие стадии - фазу первичной аксональной реакции (3 сутки опыта), фазу нарушения системы микроциркуляции периферических нервов и их сегментарных центров (7 сутки эксперимента), фазу дегенеративных изменений (15 сутки наблюдения). Следует указать на некоторую условность установленных сроков каждой стадии, поскольку прогрессирования нейропатии сопровождается не столько коренным изменением характера патологического процесса, сколько появлением многочисленных популяций нейронов, в которых своеобразно объединяются процессы альтерации и компенсации. Вследствие этого на протяжении всего срока наблюдения патоморфологическая картина отмечается значительной гетерогенностью и мозаичностью.

**Ключевые слова:** этопозид, нейропатия, периферический нерв, спинномозговой узел, спинной мозг.