

УДК 611.822+611.892+615.277+616-091.8

РОЛЬ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН СЕГМЕНТАРНИХ ЦЕНТРІВ СІДНИЧОГО НЕРВА В РОЗВИТКУ ПАКЛІТАКСЕЛ-ІНДУКОВАНОЇ ПЕРИФЕРІЙНОЇ НЕЙРОПАТІЇ

Гевка О.І.

Івано-Франківський національний медичний університет

Дане дослідження демонструє морфогенез пошкодження сегментарних центрів сідничого нерва в динаміці розвитку периферійної нейропатії, зумовленої паклітакселом. Хіміопрепарат вводили внутрішньоочеревинно щурам у дозі 2 мг/кг через день 4 рази. Зміни нейронів спинномозкових вузлів L2-S1 та поперекового відділу спинного мозку білих щурів були об'єктом експерименту протягом 120 діб. Отриманий матеріал вивчали за допомогою світлової мікроскопії з використанням комп'ютерного морфометричного аналізу та електронної мікроскопії. Результати свідчать про суттєву роль морфологічних змін у структурах нервових клітин (вакуольна трансформація мітохондрій, деформація каріолеми, мультифокальна сегрегація ядерця та ін.) чутливого та рухового сегментарних центрів у розвитку паклітаксел-індукованої нейропатії.

Ключові слова: паклітаксел, спинномозковий вузол, спинний мозок, периферійна нейропатія.

Постановка проблеми. Хіміотерапія, поряд з хірургічними способами та променевою терапією, є одним з основних методів лікування злоякісних пухлин. Однак переважній більшості хіміопрепаратів притаманний ряд токсичних впливів на різні органи і системи організму. Існує група антибластомних середників – таксани, яка викликає побічні ураження периферійної нервової системи. Серед них препарат паклітаксел (П) – антимітоген рослинного походження, алкалоїд, виділений із кори тисового дерева (*Taxus brevifolia*). Численними клінічними дослідженнями доведена його висока ефективність у боротьбі з різними пухлинними захворюваннями [1, 2, 3]. Проте небажана нейротоксичність середника негативно впливає на загальний стан пацієнтів, що значно обмежує його використання [4, 5].

Аналіз останніх досліджень і публікацій показав, що більшість дослідників пояснюють пе-

риферійну нейротоксичність П порушенням нормальних процесів динамічної реорганізації мікротрубочкового апарату клітини. Це дозозалежний ефект, який може виникати в 57%-83% хворих, які отримують П, досягаючи важкого ступеня в 2%-33% [6]. П-індуковані ураження проявляються, переважно, симетричними сенсорними нейропатіями (оніміння, пекучий, інколи нестерпний, біль, парестезії в дистальних відділах кінцівок по типу «рукавичок та шкарпеток») [4, 7, 8] та рідше порушеннями рухових функцій [9]. Водночас систематичні експериментальні дослідження динаміки розвитку токсичних нейропатій, викликаних П, нечисленні. Більшість експериментів спрямовані на вивчення порушень у провідниковому компоненті [10, 11, 12, 13], тоді як рухові та чутливі сегментарні центри залишаються поза увагою. Важливими для розуміння процесів патоморфогенезу П-індукованої нейро-

патії стали роботи Peters C.M. et al., які детальніше продемонстрували ураження нейронів та інших клітин периферійної нервової системи, мікрогліальну активацію на рівні спинного мозку, макрофагальну активацію в спинномозковому вузлі і в периферійному нерві [14, 15]. У своїх дослідженнях Jamieson et al. [16] описали збільшення розмірів ядерця у нервових клітинах спінальних гангліїв L5, а дослідники K. M. Wozniak, et al. [17] довели дозозалежний ефект пошкодження перикаріонів чутливих нейронів та мієлінових волокон сідничного нерва, відсутність ознак регенеративного процесу. Поряд із цим, консенсусу щодо патоморфогенезу П-індукованих нейропатій не досягнуто через відсутність чіткого розуміння змін, які виникають у периферійних нервах, їхніх чутливих та рухових сегментарних центрах у динаміці розвитку захворювання та протягом періоду реконвалесценції.

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми. Незважаючи на вже проведені дослідження, ефективних нейропротекторних схем, здатних суттєво вплинути на перебіг П-індукованих нейропатій, не розроблено. Це зумовлено недостатністю знань про механізми патоморфогенезу, патологічну анатомію ятрогенних уражень периферійної нервової системи, які виникають під впливом П. Морфологічні дослідження проблеми периферійної нейротоксичності П обмежуються, переважно, вивченням якісних аспектів ураження провідникового компоненту периферійних нервів та рідко перикаріонів їхніх сегментарних центрів. Отримані результати інколи мають суперечливий характер. У зв'язку з вищезазначеним, важливим і актуальним завданням нейротоксикології є вивчення морфологічних основ виникнення і розвитку структурних змін у нервовій системі з використанням уніфікованих підходів і сучасних комплексних методик.

Мета статті. Головною метою цієї роботи є встановлення закономірностей структурної перебудови чутливого та рухового сегментарних центрів сідничного нерва на етапах морфогенезу П-індукованої периферійної нейропатії.

Виклад основного матеріалу. Дослідження проводилися на білих рандомбредних щурах-самцях, масою 150-200 г. Тварини були розподілені на 3 групи. Першій групі щурів вводили хіміопрепарат Паклітаксел (Actavis, Румунія) внутрішньоочередивно, попередньо розчинивши в ізотонічному розчині NaCl, у дозі 2 мг/кг маси тіла тварини через одну добу для досягнення дози 8 мг/кг за С. Polomano et al. [18]. Тваринам 2-ї групи (контрольної) у відповідні терміни вводили внутрішньоочередивно тільки ізотонічний розчин NaCl еквівалентного об'єму (0,2 мл). Третя група представлена інтактними тваринами для встановлення показників норми. Усі маніпуляції проводилися з дотриманням правил асептики та антисептики. Забір матеріалу для гістологічного та електронномікроскопічного дослідження проводився на 1-у, 7-у, 15-у, 27-у, 60-у, 90-у та 120-у добу після останнього введення П. Тварин було виведено з експерименту шляхом повного знеживлення з застосуванням ефірного наркозу. Матеріалом для досліджень слугували спинномозкові вузли (СМВ) L2-S1 та IX пластини сірої

речовини попереково-крижового відділу спинного мозку (СМ) (L2-S1). Фіксацію та обробку матеріалу для світлової та електронної мікроскопії проводили згідно загальноприйнятих методик. Зрізи СМ і СМВ забарвлювали крезіловим фіолетовим за Нісслем, галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном. Поперечні зрізи товщиною 1 мкм, виготовлені з блоків фрагментів СМВ та СМ, призначених для електронномікроскопічного дослідження, забарвлювали толуїдиновим синім. Ультратонкі зрізи вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

Морфометричне дослідження проводили з використанням аналізатора зображень, який складається з мікроскопа Люмам Р-8 із мікрофотонасадкою МФН-10-1, оптичного перехідного пристрою, телевізійної камери Косом, фрейм-граббера з програмним забезпеченням Fly video серії EZ та персонального комп'ютера. Для вимірювання метричних характеристик використовували програмне забезпечення UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00) в інтерактивному режимі. Для калібрування аналізатора зображень застосовували тестовий зразок «МИРА» (ГК 7.216.028-01, виробництво НДІ «Квант»). Вимірювали периметр та площу профілів перикаріонів нейронів СМ і СМВ та їхніх ядер. Для обчислення похідних параметрів – коефіцієнтів форми профілів нервових клітин ($K_n = 4\pi S_n / P_n^2$) та їхніх ядер ($K_y = 4\pi S_y / P_y^2$), ядерно-клітинного співвідношення S_y/S_n , а також с. татистичної обробки результатів вимірювань використовували електронні таблиці Microsoft Excel 2000 та програми StatPlus і Statistica 6.0 for Windows. У зв'язку з тим, що розподіл метричних показників у варіаційних рядах відрізнявся від нормального (критерії Колмогорова-Смірнова/Лілліфорса, Шапіро-Уїлка, Фішера, д'Агостіно), достовірність відмінностей показників між групами оцінювалася за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

При світлооптичному та електронномікроскопічному дослідженні зрізів попереково-крижового відділу СМ відмічаємо хвилеподібний характер морфологічних змін мотонейронів протягом експерименту. На першу добу після введення П у цитоплазмі рухових нейронів визначалися незначно виражені реактивні зміни, які проявлялися активацією білоксинтезуального апарату. Однак, починаючи з сьомої доби досліду, наростали дистрофічні явища, які супроводжувалися редукцією та вогнищевою атрофією гранулярної ендоплазматичної сітки, розширенням просвіту цистерн гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, диктіосом апарату Гольджі. Поряд із цим, спостерігалася руйнування мітохондрій, накопичення великої кількості лізосом. Вищеписані явища досягали максимуму на 27-у добу експерименту. На 60-у та 90-у доби вираженість дистрофічних змін дещо зменшувалася. Зростала кількість профілів ендоплазматичної сітки, проліферація елементів апарату Гольджі, відновлювалася структура мітохондрій. Частою знахідкою були нейрони з великою кількістю рибосом у цитоплазмі. Проте траплялися численні перикаріони з помірно вираженими ознаками дистрофічних змін. На 120-у добу визначалося відновлення структури більшості нейронів. Отримані

нами дані не дають підстав ставити під сумнів твердження Scripture C.D. et al. про переважно сенсорний характер П-індукованої периферійної нейропатії [19], оскільки виявлені зміни мотонейронів носять поверхневий характер і відображають реакцію структур рухового сегментарного центру на можливі зміни в аксонах. Поряд із цим, ми не спостерігали ознак активації мікроглії в СМВ, описаних Peters S.M. et al. при довенному введенні П [14]. Аналіз морфометричних параметрів рухових нейронів СН у динаміці розвитку П-індукованої нейропатії демонструє зміни середніх значень площі профілю перикаріонів мотонейронів. До 27-ї доби досліджу величина показника достовірно зменшується, у порівнянні з контролем (1-а доба – $(747,37 \pm 25,20)$ мкм²; 7-а доба – $(684,25 \pm 45,26)$ мкм²; 15-а доба – $(568,17 \pm 17,13)$ мкм²; 27-а доба – $(442,83 \pm 35,68)$ мкм²; у контролі – $(920,29 \pm 21,39)$ мкм², ($p < 0,05$)). У подальшому характер розподілу наближається до показників контролю (на 60-у добу – $(689,67 \pm 24,97)$ мкм²; на 90-у добу $(758,67 \pm 21,70)$ мкм²; на 120-у добу – $(924,89 \pm 23,30)$ мкм²). Аналогічна динаміка змін притаманна середнім значенням показника площі профілю ядра.

Дослідження СМВ на світловому та електронномікроскопічному рівні демонструє, що на першу добу значна частина псевдооднопольних нейронів не зазнала суттєвих змін. Разом із тим спостерігалися нейрони великого діаметра з вакуольною трансформацією мітохондрій, набряком нейроплазми та атрофією гранулярної ендоплазматичної сітки. Сьома доба після введення П відзначалася зростанням кількості перикаріонів із деформованими обрисами. У них визначалися мітохондрії округлої форми різних розмірів зі збереженими кристами та дрібногранулярним матриксом, в окремих наявні ділянки просвітлення. Варто відмітити, що у «темних» чутливих нейронах зміни ультраструктури органел більш виражені, а вогнищевий хроматоліз частіше знаходимо у «світлих». Розвивався перивазальний набряк сполучнотканинної стромы вузла. Дезорганізація білоксинтезального апарату, глибокі структурні порушення мітохондрій, активація процесів автофагії виявлялися протягом 60 днів після припинення введення препарату. У мантийних гліюцитах розвивалися дистрофічні зміни, важкість яких корелювала з ступенем пошкодження нейронів. У терміни 90 і 120 днів у нейронах і гліюцитах ідентифікувалися ознаки процесів внутрішньоклітинної регенерації. Отримані нами дані доповнюють результати досліджень S.M. Jamieson et al., які виявили в СМВ пошкодження переважно сенсорних нейронів великого діаметру [16]. Поряд із цим, ми не спостерігали явищ макрогліального сателітозу в СМВ описаних Peters S.M. et al. [14].

Морфометричний аналіз у динаміці експерименту дозволив установити чіткі зміни метричних показників СМВ. Уже на першу добу експери-

менту визначалися зростання середнього значення показника площі перикаріонів псевдооднопольних нейронів до $(522,82 \pm 18,03)$ мкм², у контролі – $(410,58 \pm 11,81)$ мкм², $p < 0,001$. На сьому добу досліджу величина цього показника склала $(473,05 \pm 17,64)$ мкм², що вище контрольних показників ($p < 0,001$), але достовірно не відрізнялася від попереднього терміну. 15-а доба характеризувалася різким зменшенням площі профілю нейронів СМВ до $(369,56 \pm 9,40)$ мкм², $p < 0,001$. На 27-у та 60-у доби спостерігалось поступове зростання кількості нейронів великого діаметра зі значним зростанням середніх значень площі профілю перикаріонів, що склало, відповідно, $(450,82 \pm 12,57)$ мкм² та $(902,55 \pm 42,09)$ мкм². На 90-у добу метричні параметри перикаріонів СМВ нормалізувалися, площа зменшилася до $(447,51 \pm 8,82)$ мкм²; на 120-у добу її величина достовірно не відрізнялася від контролю – $(443,43 \pm 9,77)$ мкм².

Висновки і пропозиції. Периферійна нейропатія є ятрогеним ураженням, яке спостерігається в більшості онкологічних хворих, що лікуються хіміопрепаратом П. Незважаючи на численні клінічні та експериментальні дослідження, відсутня єдина концепція патоморфогенезу П-індукованих нейропатій. Як наслідок цього, досі не розроблено ефективних методів лікування та запобігання уражень периферійних нервів при цьому захворюванні. П зумовлює в рухових сегментарних центрах на початкових етапах експерименту помірно виражені дистрофічні процеси, які до 27-ї доби нарастають в перикаріонах мотонейронів спинного мозку. На 60-у – 90-у добу настає відносна стабілізація морфо-функціонального стану еферентних нейронів, а на 120-у добу досліджу в них відбувається поєднання компенсаторних реакцій та процесів автофагії. П справляє виражений токсичний вплив на перикаріони аферентних нейронів СМВ (дезорганізація білоксинтезального апарату, глибокі структурні порушення мітохондрій, активація процесів автофагії) протягом 60 днів після припинення введення препарату. У мантийних гліюцитах розвиваються дистрофічні зміни, важкість яких корелює зі ступенем пошкодження нейронів. У терміни 90 і 120 днів у нейронах і гліюцитах визначаються процеси внутрішньоклітинної регенерації.

Необхідно розглядати П-індуковану нейропатію як повільно-прогресуюче захворювання, в основі якого лежать комплексні порушення як чутливого так і рухового сегментарних центрів сідничного нерва. Напрямоком більш детальних досліджень мають стати нейральні, гліальні, капілярні та десмальні компоненти периферійного нерва та його сегментарних центрів. Така інформація може бути використана як теоретичне підґрунтя для пошуку ефективних схем для запобігання та лікування нейротоксичних ефектів паклітакселу в експерименті та клініці.

Список літератури:

1. Дмитренко К. О. Таксани: Чи знайдена оптимальна хіміотерапія хворих раком молочної залози? / К. О. Дмитренко // Український медичний альманах. – 2008. – Т. 11, № 1. – С. 45-50.
2. Оптимізація лікування розпространеного рака яєчників / Ж. Мартынова, Т. Харитоновна, И. Бокин [и др.] // Врач. – 2008. – № 8. – С. 35-36.

3. Щодо питання ефективності застосування паклітакса при лікуванні хворих на рак порожнини носа та навколосових пазух / Е. В. Лукач, Ю. О. Серезко, В. Я. Діхтярук [та ін.] // Ринологія. – 2012. – № 2. – С. 39-43.
4. Kuroi K. Neurotoxicity of Taxanes: Symptoms and Quality of Life Assessment / K. Kuroi, K. Shimozuma // *Breast Cancer*. – 2004. – Vol. 11, № 1. – P. 92-99.
5. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats / E. Persohn, A. Canta, S. Schoepfer [et al.] // *Eur. J. Cancer*. – 2005. – Vol. 56, № 10. – P. 1460-1466.
6. A prospective surveillance model for physical rehabilitation of women with breast cancer: chemotherapy-induced peripheral neuropathy / M. D. Stubblefield, M. L. McNeely, C. M. Alfano [et al.] // *Cancer*. – 2012. – Vol. 118 (8 Suppl). – P. 2250-2260.
7. Canta A. RAT in vivo models of taxanes' peripheral neurotoxicity following chronic intravenous administration / A. Canta, F. Lanzani, S. Galbiati // *J. Periph. Nervous System*. – 2004 – Vol. 9, № 2 – P. 101-104.
8. Painful Peripheral Neuropathy Following Treatment With Docetaxel for Breast Cancer / M. A. Wampler, D. Hamolsky, K. Hamel [et al.] // *Clin. J. Oncol. Nurs*. – 2005. – Vol. 9, № 2 – P. 189-193.
9. Mielke S. Association of Paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer / S. Mielke, A. Sparreboom, S. Steinberg // *Clin. Cancer Res*. – 2005. – Vol. 11 (13). – P. 4843-4850.
10. Cavaletti G. Effect on peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat / G. Cavaletti, E. Cavaletti, P. Montaguti // *Neurotoxicology*. – 1997. – Vol. 18 (1). – P. 137-145.
11. Cavaletti G. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of Taxol / G. Cavaletti, G. Tredici, M. Braga // *Exp. Neurol*. – 1995. – Vol. 133 (1). – P. 64-72.
12. Flatters S. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondria dysfunction / S. J. Flatters, G. Bennett // *Pain*. – 2006. – Vol. 122 (3). – P. 245-257.
13. Flatters S. J. L. Ethosuximide reverses paclitaxel – and vincristine-induced painful peripheral neuropathy / S. J. L. Flatters, G. J. Bennett // *Pain*. – 2004. – Vol. 109. – P. 150-161.
14. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat / C. M. Peters, J. M. Jimenez-Andrade, M. A. Kuskowski [et al.] // *Brain Res*. – 2007. – Vol. 1168. – P. 46-59.
15. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells / C. M. Peters, J. M. Jimenez-Andrade, B. M. Jonas [et al.] // *Exp. Neurol*. – 2007. – Vol. 203 (1). – P. 42-54.
16. Nucleolar enlargement, nuclear eccentricity and altered cell body immunostaining characteristics of large-sized sensory neurons following treatment of rats with paclitaxel / S. M. Jamieson, J. J. Liu, B. Connor [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2007. – Vol. 28 (6). – P. 1092-1098.
17. Comparison of neuropathy-inducing effects of eribulin mesylate, paclitaxel, and ixabepilone in mice / K. M. Wozniak, K. Nomoto, R. G. Lapidus [et al.] // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71 (11). – P. 3952-3962.
18. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, Paclitaxel / R. C. Polomano, A. J. Mannes, U. S. Clark [et al.] // *Pain*. – 2001. – Vol. 94 (3). – P. 293-304.
19. Scripture C. D. Peripheral neuropathy induced by Paclitaxel: Recent insights and future perspectives / C. D. Scripture, W. D. Figg, A. Sparreboom // *Curr. Neuropharmacol*. – 2006. – Vol. 4. – P. 165-172.

Гевка О.И.

Ивано-Франковский национальный медицинский университет

РОЛЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕГМЕНТАРНЫХ ЦЕНТРОВ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА В РАЗВИТИИ ПАКЛИТАКСЕЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

Аннотация

Данное исследование демонстрирует морфогенез повреждения сегментарных центров седалищного нерва в динамике развития периферической нейропатии, обусловленной паклитакселом. Химиопрепарат вводили внутривенно крысам в дозе 2 мг / кг через день 4 раза. Изменения нейронов спинномозговых узлов L2-S1 и поясничного отдела спинного мозга белых крыс были объектом эксперимента в течение 120 суток. Полученный материал изучали с помощью световой микроскопии с использованием компьютерного морфометрического анализа и электронной микроскопии. Результаты свидетельствуют о существенной роли морфологических изменений в структурах нервных клеток (вакуольная трансформация митохондрий, деформация кариолемы, мультифокальная сегрегация ядрышек и др.) чувствительного и двигательного сегментарных центров в развитии паклитаксел-индуцированной нейропатии.

Ключевые слова: паклитаксел, спинномозговой узел, спинной мозг, периферическая нейропатия.

Gevka O.I.

Ivano-Frankivsk National Medical University

**THE ROLE OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN SEGMENTAL CENTERS
OF THE SCIATIC NERVE IN THE DEVELOPMENT
OF PERIPHERAL PACLITAXEL-INDUCED NEUROPATHY**

Summary

This paper presents morphological changes of the segmental centres of sciatic nerve during peripheral neuropathy, caused by paclitaxel. Chemotherapy was administered to rats intraperitoneally at a dose of 2 mg/kg 4 times every other day. Changes in neurons of the dorsal root ganglia L2-S1 and lumbar spinal cord L2-S1 of white rats were the objects of the experiment for 120 days. The material was studied using light microscopy with computer morphometric analysis and electron microscopy. The results indicate the important role of morphological changes in neurons (vacuolic transformation of mitochondria, deformation of nucleolemma, multifocal nucleolar segregation, etc.) of sensitive and motor centers of the sciatic nerve in the development of paclitaxel-induced neuropathy.

Keywords: paclitaxel, dorsal root ganglion, spinal cord, peripheral neuropathy.