УДК 616.833+616-091.8+615.277

О.І. Гевка
Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. – проф. С.Б. Геращенко)
ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет"

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ СПИННОМОЗКОВИХ ВУЗЛІВ ЩУРІВ ПРИ ПАКЛІТАКСЕЛ-ІНДУКОВАНІЙ ПЕРИФЕРІЙНІЙ НЕЙРОПАТІЇ

Резюме. У даній роботі на електронномікроскопічному рівні вивчені морфологічні зміни нейронів спинномозкових вузлів L_2-S_1 щурів під впливом паклітакселу. Хіміопрепарат вводили внутрішньоочеревинно в сумарній дозі 8 мг/кг маси тіла 35 білим рандомбредним щурам та досліджували протягом 120 діб експерименту. У динаміці змодельованої периферійної нейропатії виявляються ультрамікроскопічні порушення перикаріонів (вакуольна трансформація мітохондрій з деструкцією крист, розширення цистерн гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки та елементів апарату Гольджі, збільшення числа лізосом) та ядер (деформація каріолеми, мультифокальна сегрегація ядерець) псевдоуніполярних нейронів. Отримані дані свідчать про суттєву роль структурних змін нейронів клітин спинномозкових вузлів у розвитку паклітаксел-індукованої нейропатії.
Ключові слова: паклітаксел, електронна мікроскопія, спинномозковий вузол, периферійна нейропатія.

У сучасній онкології хіміотерапія залишається одним із провідних методів лікування. Серед антибластомних середників широкого спектру дії часто вживаним є препарат групи таксанів – паклітаксел [1]. Клінічні дослідження демонструють його високу ефективність при раках молочної залози, яєчників та інших пухлинах [2]. Поряд із цим побічні дії паклітакселу негативно впливають на загальний стан пацієнтів та відповідно на результати лікування [3, 4]. Нейротоксичність є одним із найбільш небезпечних ускладнень, що проявляється симптомами моторної та сенсорної периферійної нейропатії (оніміння, пекучий біль, парестезії переважно в дистальних відділах кінцівок по типу "рукавичок і шкарпеток") [5, 6]. Вивченню морфогенетичних механізмів розвитку [7] та медикаментозної корекції [8] згаданої патології присвячено ряд дослідницьких праць. Проте в повній мірі деталі виникнення та особливості патоморфологічних змін периферійної нервової системи в динаміці паклітаксел-індукованої нейропатії не з'ясовані.

Мета дослідження: дослідити зміни структур нейронів спинномозкових вузлів у процесі розвитку експериментальної токсичної нейропатії, викликаної паклітакселом, на електронномікроскопічному рівні.

Матеріал і методи. *Експеримент виконано на 35 білих рандомбредних щурах-самцях масою 150-200 г із дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно Європейської конвенції. Препарат Паклітаксел (Actavis, Румунія) (П) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 2 мг/кг маси тіла, через одну добу чотири рази (сумарна доза 8 мг/кг) [9]. В якості контрольної групи слугували 15 тварин, яким вводили внутрішньоочеревинно ізотонічний розчин NaCl еквівалентного об'єму. Забір матеріалу дослідних та контрольних тварин проводили на 1, 7, 15, 27, 60, 90, 120 доби після останнього введення середника. Шматочки спинномозкових вузлів (СМВ) L2-S1 в об'ємі не більше 1 мм3 занурювали у фіксуючу суміш – 1% розчин тетраоксиду осмію на буфері Колфілда на дві години. Після відмивання матеріалу 0,1 М фосфатним буфером та дегідратації в спиртах наростаючої концентрації шматочки контрастували в 2% спиртовому розчині ураніл-ацетату. Потім матеріал пропускали через абсолютний спирт з ацетоном, ацетон, суміш ацетону з епоксидними смолами та чисту смолу. Взірці матеріалу закладали в желатинові капсули, заливаючи епоксидними смолами з додаванням каталізатора з наступним поміщенням їх у термостат (при t +56°C) для поліме-*

© Гевка О.І., 2014

ризації на 24 години. Для орієнтування в досліджуваному об'єкті напівтонкі зрізи товщиною 1,0 мкм забарвлювали толуїдиновим синім. Ультратонкі зрізи, отримані на ультрамікротомі Tesla BS – 490 A, монтували на мідні бленди d=1,0 мм, доконтрастовували розчинами ураніл-ацетату і цитрату свинцю та вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К із наступним фотографуванням при збільшенні від 4800 до 16000 разів.

Результати дослідження та їх обговорення. В усі терміни експерименту ультраструктурна картина СМВ характеризується поєднанням різноманітних ознак ураження чутливих нейронів. На 1-у добу дослідження значна частина перикаріонів псевдоуніполярних нейронів не зазнає змін. Цистерни гранулярної і агранулярної ендоплазматичної сітки (ЕПС), вільні рибосоми та полісоми розміщені рівномірно. Гіалоплазма має середню, місцями низьку електронну щільність. Ядра правильної округлої або овальної форми, хроматин дрібногранулярний, ядерця часто зміщені до периферії. Каріолема чітко контурується. Серед таких нейроцитів подекуди спостерігаються "темні" чутливі нейрони з ознаками деструкції мітохондрій. Останні округлі, мають дрібні або середні розміри, їх кристи розплавлені, а матрикс набуває пластівцеподібного вигляду, частина піддалася вакуольній трансформації.

На 7-у добу після введення П характер морфологічних змін, виявлений у попередній термін, зберігається. Проте, зростає кількість перикаріонів із деформованими обрисами. У них визначаються мітохондрії округлої форми різних розмірів зі збереженими кристами та дрібногранулярним матриксом, в окремих наявні ділянки просвітлення. Розвивається перивазальний набряк сполучнотканинної строми вузла. У кровоносних капілярах СМВ спостерігається підвищенння рухомості люменальної плазмолеми з утворенням пальцеподібних випинань. На окремих ділянках вона виглядає розмитою. Зміни ультраструктури органел більш виражені в "темних" чутливих нейронах, а вогнищевий хроматоліз частіше знаходимо в "світлих". Зростає кількість мантійних гліоцитів, вони витягнутої форми з цитоплазмою підвищеної електронної щільності. Подекуди відзначаються вогнища просвітлення, за рахунок вакуолізації органел. Їхні ядра неправильної конфігурації з нерівномірним розподілом хроматину, більш зосередженого поблизу каріолеми. Серед органел у деяких нейроцитах визначається підвищена кількість лізосом великих розмірів з фагоцитованими частинками всередині. Контури більшості мітохондрій збережені. Вони переважно округлої форми, хоча є і витягнуті паличкоподібно. Цистерни гранулярної ЕПС та вільні рибосоми формують дрібновогнищеві скупчення, між якими контуруються хаотично розміщені елементи цитоскелету. У частини нервових клітин поміж локальними зосередженнями рибосом наявні ділянки просвітлення цитоплазми за рахунок руйнування тілець Ніссля. Цей вогнищевий хроматоліз більш виражений на периферії. Деякі мітохондрії деформовані з ділянками дезорганізації крист та матриксом низької електронної щільності. Нерідко в поле зору попадають двоядерні чутливі нейрони. Їх каріоплазма просвітлена, обмежена чіткою каріолемою. Ядерця не візуалізуються, хроматин представлений розкиданими осміфільними дрібними фокусами гранулярного та фібрилярного компонентів.

На 15-у добу експерименту більшість нейроцитів деформовані внаслідок перицелюлярного набряку. Межі клітин нечіткі, місцями зовсім стерті. Ультраструктура оточуючих гліоцитів теж порушена. Контури внутрішньої мембрани мітохондрій переважно зруйновані, матрикс просвітлений, циліндри ЕПС сильно розширені. У цитоплазмі нейронів підвищена кількість лізосом, вогнищеві скупчення гранулярної ЕПС. У деяких "світлих" чутливих нейронах відзначаються виражені зміни тинкторіальних властивостей органел, зокрема вакуольна трансформація мітохондрій овальної та округлої форми з деструкцією крист та внутрішньої мембрани. Зовнішня мембрана подекуди теж зруйнована. Цистерни гранулярної ЕПС укорочені та розширені, розміщені невеликими скупченнями; місцями атрофовані. Наявні ділянки підвищеної кількості та зосередження лізосом різного ступеня зрілості з фагоцитованими частинками. Каріолема формує численні невисокі випинання та інвагінації. Ядерця, в основному, чітко окреслені, мають овальну, округлу форму, але трапляються і деформовані. Ядерцеві лакуни, як правило, дрібні або середніх розмірів. Крайнім ступенем вираженості змін ядерця у вказаний термін є сегрегація з формуванням вогнищ з ознаками порушення співвідношення фібрилярного і гранулярного компонентів.

На електронних мікрофотографіях СМВ на 27-у добу бачимо, що в цитоплазмі більшості ней-

ронів великого діаметра виражені ознаки вакуолізації органел. Цистерни гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки та елементи апарату Гольджі різко розширені. Окремі цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки частково дегранульовані. Переважаюча кількість мітохондрій вакуольно трансформована. Поодинокі дрібні мітохондрії мають збережену структуру. Обриси ядер хвилясті, каріоплазма дещо просвітлена. Хроматин ядер дрібногранулярного вигляду з рівномірним розподілом. У частини "світлих" нейронів переважають вільні рибосоми і полісоми, що формують вогнищеві скупчення. Спостерігається збільшення кількості лізосом різних розмірів та форми, розподілених у цитоплазмі. Гранулярна ЕПС представлена поодинокими профілями. Лише на окремих ділянках її цистерни орієнтовані і розміщені впорядковано. Більшість мітохондрій набряклі, округлої форми, з ознаками деструкції крист, дисоціації і фокального руйнування зовнішньої мембрани. Ядерна оболонка без видимих порушень огортає каріоплазму середньої електронної щільності. Контури ядерця чітко підкреслені за рахунок периферійної конденсації хроматину. В основному, ядерця мають овальну, округлу форму, деколи дещо деформовані, містять численні лакуни дрібних та середніх розмірів. В окремих ядрах визначається помірно виражена конденсація гранулярного компоненту у вигляді окремих вогнищ, які не мають чітких меж, та вирізняються за електронною щільністю. У цитоплазмі таких нейронів спостерігаються явища хроматолізу. На даному етапі експерименту, порівнюючи з попереднім, зростає кількість чутливих нейронів з ядрами неправильної форми та ознаками мультифокальної сегрегації ядерець. Деформація ядра відбувається за рахунок інвагінацій каріолеми. Ядерце розміщене ексцентрично, осміофільне, із невеликою кількістю дрібних лакун, нерівномірним розподілом гранулярного та фібрилярного компонентів. У таких нейронах просвіти везикул та цистерн комплексу Гольджі розширені, заповнені вмістом низької електронної щільності, мітохондрії вакуолізовані. У прилеглих гліоцитах відзначаються зміни в їхній структурі. Варто відзначити набряк гіалоплазми з цитоплазматичними вакуолями великих розмірів. Ядра гліоцитів неправильної форми з явищами конденсації хроматину у вигляді великих скупчень, що більше зосередженні біля каріолеми.

60-а доба дослідження характеризується зростанням числа чутливих нейронів із порушеною структурою. У "темних" перикаріонах прогресує атрофія цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки. Білоксинтезуючий апарат представлений вільними рибосомами та полісомами, що щільно заповнюють цитоплазму. Більшість мітохондрій вакуолізовані, визначається тотальне руйнування та гомогенізація крист, просвітлення матриксу. Каріолема утворює неглибокі численні випинання, хроматин дрібногранулярний, середньої електронної щільності, рівномірно розподілений. У частині клітин вогнищевий переважає у навколоядерній зоні, в інших – на периферії. Численні профілі агранулярної ЕПС розширені. Виражені зміни спостерігаються в цитоплазмі "світлих" нейронів. Для клітин цього виду характерне розрідження гранулярної ЕПС, яка розміщується острівцями, що складаються з вкорочених, деформованих, невпорядковано розміщених цистерн. Вони розділені прошарками гіалоплазми низької щільності, що заповнена невеликою кількістю вільних рибосом і хаотично орієнтованими мікротрубочками та нейрофіламентами. У перинейрональних гліоцитах спостерігаються переважно однотипні порушення, що проявляються в розширенні профілів ЕПС й елементів апарату Гольджі, вибірковим набуханням мітохондрій із частковим руйнуванням крист та вогнищевим просвітленням матриксу. Ядра великі, округлі,і з чіткими контурами. Каріоплазма середньої електронної щільності з фокальною конденсацією хроматину на периферії. У частини мантійних гліоцитів на тлі відносно збережених органел визначається підвищена кількість лізосом, що подекуди формують мультивезикулярні конгломерати. Подібні скупчення, а також велика кількість первинних, вторинних та третинних лізосом із фагоцитованими частинками, трапляються й у псевдоуніполярних нейронах на цьому етапі досліду.

На 90-у добу прояви вищеописаних порушень структури СМВ зменшуються. Кількість чутливих нейронів із вираженими патологічними змінами органел значно знижується. У таких нейронах спостерігається вакуольна трансформація мітохондрій із деструкцією крист та вогнищево гомогенізованим матриксом, а також розширення цистерни гранулярної ЕПС. Проте в більшості аферентних нейронів відмічаємо мітохондрії лінійно видовжені зі збереженою ультраструктурою. Велика кількість вільних рибосом, які згруповані вогнищево. Ці скупчення розділені широ-

кими прошарками цитоплазми низької електронної щільності, які заповнені мікротрубочками і нейрофіламентами. Подекуди немембранні компоненти цитоплазми оформлені в пучки, на інших ділянках вони лежать невпорядковано. Щільність мікротрубочок і нейрофіламентів неоднорідна. Електронномікроскопічна картина ядер і ядерець суттєвих змін, порівняно з попередніми термінами, не зазнає. Подекуди також виявляються нейрони з множинними лізосомами. Зміни мантійних гліоцитів у СМВ характеризуються набуханням мітохондрій із частковим руйнуванням крист, просвітленням матриксу. Каріоплазма ядер неоднорідна, виражена крайова конденсація хроматину.

На 120-у добу експерименту ультраструктура СМВ дослідних тварин подібна до контрольної. Домінують чутливі нейрони округлої форми з чітко окресленими ядрами. Ядерця дещо зміщені на периферію з рівномірним розподілом фібрилярного та гранулярного компонентів Ядра мають однорідну щільність каріоплазм, а гіалоплазма – середню електронну щільність, лізосоми поодинокі, структура мітохондрій збережена, скупчення рибосом нечисленні.

У даному дослідженні, за допомогою електронномікроскопічного методу ми описуємо порушення будови клітин СМВ під впливом П. Для моделювання периферійної нейропатії ми використали низькодозовий (8 мг/кг) протокол експерименту, запропонований R.C. Polomano et al. [9]. Проведене цими авторами дослідження триває 35 діб й наведені результати фізіологічних реакцій підтверджують розвиток периферійної нейропатії. Однак учені зазначають відсутність мікроскопічних змін у структурі сідничого нерва, СМВ L4-L5, вентральних та дорсальних корінців та сегментів L4-L5 спинного мозку. На противагу цьому отримані нами дані ультрамікроскопічного аналізу демонструють морфологічні зміни СМВ L2-S1 протягом 120 діб досліду. J.M. Jimenez-Andrade et al. [10] досліджували нервові вузли трійчастого нерва, грудні та поперекові аферентні вузли впродовж 10 днів після довенного введення П з метою виявлення популяцій уражених клітин. Для цього оцінювали експресію ATF3 (маркера пошкодження клітин), визначали гіпертрофію гліоцитів за присутністю проміжного філаменту (GFAP) та активацію макрофагів (лізомальний протеїн CD68). Найбільш виражені зміни згаданих факторів спостерігались у поперекових СМВ. Це наштовхнуло авторів на думку, що в ділянці найбільшого ризику пошкодження П знаходяться великі тіла чутливих нейронів із найдовшими аксонами. Такі твердження співпадають з отриманими нами результатами щодо патологічних змін псевдоуніполярних нейронів у динаміці розвитку модельованої нейропатії. У наступних працях J.M. Jimenez-Andrade et al. [11] наводять часткові пояснення частішого виникнення сенсорної нейропатії, ніж моторної. Досліджуючи СМВ L4, відповідні дорсальний та вентральний корінці, фрагменти сідничого нерва, вони описують дуже високу щільність розміщення гемокапілярів саме в ділянці клітинного скупчення в СМВ порівняно з іншими вищезазначеними структурами. Така специфіка розміщення гемокапілярів, а також особливості будови гемомікроциркуляторного русла СМВ частково пояснює зосередження хіміопрепарату в ділянці перикаріонів чутливих нейронів із подальшим на них токсичним впливом. Отримані нами в результаті даної експериментальної роботи електронномікроскопічні зміни сенсорних нейронів, такі як вакуольна трансформація мітохондрій із деструкцією крист та контурів, розширення цистерн гранулярної, агранулярної ЕПС та елементів апарату Гольджі, збільшення числа лізосом, деформація каріолеми, мультифокальна сегрегація ядерець та інші, підтверджують, що пошкодження нейронів СМВ можуть відігравати суттєву роль у патоморфогенезі П-індукованій периферійної нейропатії. T. Kiya et al. [12] стверджують, що важливим компонентом розвитку досліджуваної патології є пошкодження мантійних гліоцитів, оскільки імуногістохімічне дослідження показало, що під впливом П відбувається зниження концентрації L-серину не в клітинах спинного мозку, не в сідничому нерві, а саме в гліоцитах СМВ. На підтвердження цьому в нашому дослідженні також спостерігаються субмікроскопічні порушення структурних елементів мантійних гліоцитів.

Висновок. Пошкодження нейроцитів та мантійних гліоцитів СМВ відіграють суттєву роль у патоморфогенелі П-індукованої периферійної нейропатії. Протягом двох місяців після припинення введення препарату визначається поглиблення змін ядер, білоксинтезуючого та енергетичного апарату цитоплазми чутливих нейронів, дезорганізація цитоскелету. Зростає вираженість процесів автофагії. Зміни в нейронах корелюють з ураженнями мантійних гліоцитів. Період з 90-ї до 120-ї доби характеризується посиленням про-

цесів внутрішньоклітинної регенерації в нейронах та гліоцитах, яке завершується практично повним відновленням ультраструктури перикаріонів чутливих нейронів та мантійних клітин.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані можуть стати підгрунтям для вивчення речовин, які можна було б застосовувати в якості нейропротекторів, та розробки схем лікування ятрогенних токсичних П-індукованих нейропатій у клініці.

Список використаної літератури

1. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии / Д.Б. Корман. – М.: Практическая медицина, 2006. – С. 209-219. 2. Таксаны в адьювантном и неоадьювантном лечении рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, А.А .Божок [и др.] / Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 243-249. 3. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевих препаратов (патогенез, клиника, профілактика, лечение) / А.И. Семенова // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 168-176. 4. Дослідження порівняльної нейротоксичності за умов застосування різних протипухлинних препаратів / О.В. Кузнецова, В.В. Стенула, Б. Нікель [та ін.] // Одеський мед. ж. – 2005. – № 3(89). – С. 21-25. 5. Peripheral neuropathy due to paclitaxel: study of the temporal relationships between the therapeutic schedule and the clinical quantitative score (QST) and comparison with neurophysiological findings / C. Augusto, M. Pietro, M. Cinzia [et al.] // J. Neurooncol. – 2008. – Vol. 86(1). – P. 89-99. 6. Residual neurotoxicity in ovarian cancer patients in clinical remission after first-line chemotherapy with carboplatin and paclitaxel: The Multicenter Italian Trial in Ovarian cancer (MITO-4) retrospective study / S. Pignata, S. De Placido, R. Biamonte [et al.] // BMC Cancer. – 2006. – № 6. – P. 5. 7. RAT in vivo models of taxanes' peripheral neurotoxicity following chronic intravenous administration / A. Canta, F. Lanzani, S. Galbiati [et al.] // J. Periph. Nervous System. – 2004. – Vol. 9, № 2. – P. 101-104. 8. Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment / M. Mo, I. Erdelyi, K. Szigeti-Buck [et. al.] // FASEB J. – 2012. – № 26(11). – P. 4696-4709. 9. 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. – V. 94(3). – P. 293-304. 10. Sensory neurons and their supporting cells located in the trigeminal, thoracic and lumbar ganglia differentially express markers of injury following intravenous administration of paclitaxel in the rat / J.M. Jimenez-Andrade, C.M. Peters, N.A. Mejia [et al.] // Neurosci. Lett. – 2006. – V. 405(1-2). – P. 62-67. 11. J.M. Jimenez-Andrade, M.B. Herrera, J.R .Ghilardi [et al.] // Mol. Pain. – 2008 – № 4. – P. 5-10. 12. Role of satellite cell-derived L-serine in the dorsal root ganglion in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy / T. Kiya, T. Kawamata, A. Namiki [et al.] // Neuroscience. – 2011. – № 174. – P. 190-199.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПИННОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ КРЫС ПРИ ПАКЛИТАКСЕЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

Резюме. В данной работе на электронномикроскопическом уровне изучены морфологические изменения нейронов спинномозговых узлов L2-S1 крыс под влиянием Паклитаксела. Химиопрепарат вводили внутрибрюшинно в суммарной дозе 8 мг/кг массы тела 35 белым рандомбредним крысам и исследовали в течение 120 суток эксперимента. В динамике экспериментальной периферической нейропатии обнаруживаются ультрамикроскопические нарушения перикарионов (вакуольная трансформация митохондрий с деструкцией крист, расширение цистерн гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети и элементов аппарата Гольджи, увеличение числа лизосом) и ядер (деформация кариолеммы, мультифокальная сегрегация ядрышек) псевдоуниполярных нейронов. Полученные данные свидетельствуют о существенной роли структурных изменений нервных клеток спинальных ганглиев в развитии паклитаксел-индуцированной нейропатии.

Ключевые слова: паклитаксел, электронная микроскопия, спинномозговой узел, периферическая нейропатия.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF SPINAL ROOT GANGLIA IN RATS WITH PACLITAXEL -INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY

Abstract. This paper presents the experimental work designed on electron microscopic level to study pathomorphological changes in L2-S1 spinal root ganglia under the influence of Paclitaxel. This antitumor chemical drug was administered intraperitoneally with the total dose of 8 mg/kg of body weight to 35 random bred rats and investigated within 120 days of the experiment. The dynamics of experimental peripheral neuropathy found ultramicroscopic disorders of perikaryons (vacuolated transformation of mitochondria with destruction of cristae and contours, expansion of rough and smooth endoplasmic reticulum cisterns and elements of the Golgi apparatus, increased number of lysosomes) and nuclei (deformation of nuclear envelope, multifocal nucleolar segregation) of pseudounipolar neurons. These data are indicative of a significant role of structural changes in neurons of the spinal ganglia during the development of paclitaxel - induced neuropathy.

Key words: paclitaxel, electron microscopy, spinal ganglion, peripheral neuropathy.

Ivano-Frankivsk National Medical University (Ivano-Frankivsk)

Надійшла 05.02.2014 р.
Рецензент – д.мед.н. Олійник І.Ю. (Чернівці)