

Теоретична медицина

УДК [611.832:615.065]-616-092.9

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНІВ РУХОВОГО СЕГМЕНТАРНОГО ЦЕНТРУ СІДНИЧОГО НЕРВА ПРИ ВІНКРИСТИН- ТА ЕТОПОЗИД-ІНДУКОВАНІЙ ПЕРИФЕРІЙНІЙ НЕЙРОПАТІЇ

С. Б. Геращенко, О. І. Дельцова

*Івано-Франківський національний медичний університет;
76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2;
e-mail: histology@ifnmu.edu.ua*

В експерименті на 53 білих щурах вивчали вплив вінкристину і на 86 тваринах вплив етопозиду. Встановлено, що зміни в перикаріонах рухових нейронів спинного мозку можна розцінювати як прояв неспецифічної реакції перикаріонів на пошкодження його периферійного відростка (вінкристин). Експериментальна етопозид-індукована периферійна нейропатія є первинною прогресуючою аксонопатією. У численних популяціях нейронів поєднуються процеси альтерації і компенсації. Протягом усього терміну спостереження патоморфологічна картина відзначається значною гетерогенністю і мозаїчністю.

Ключові слова: вінкристин, етопозид, рухові нейрони, спинний мозок, морфологія.

До групи хіміотерапевтичних препаратів, яким притаманна виражена нейротоксичність, входять вінкристин і етопозид. У 10-67% хворих на злоякісні пухлини, які отримують вінкристин, препарат викликає парестезії, невралгічні болі, атаксію, арефлексію, оніміння кінцівок, периферійні нейропатії і полінейропатії з больовим синдромом, випадання глибоких сухожильних рефлексів, звисання стопи, м'язову слабкість [1, 2].

Етопозид – 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.

Зважаючи на труднощі отримання біопсійного і аутопсійного матеріалу, **метою** даного дослідження було вивчення змін перикаріонів нейронів спинного мозку рухового сегментарного центру сідничого нерва в експерименті.

Матеріал і методи дослідження. Об'єктом дослідження слугував руховий сегментарний центр спинного мозку, локалізований в ядрах IX пластини (за Рекседом) сірої речовини попереково-крижового відділу спинного мозку [3] 53 білих рандомбредних щурів. Вінкристин-індуковану нейропатію моделювали за методом К.О. Aley et al. [4]. Дослідним тваринам протягом двох тижнів щоденно (понеділок-п'ятниця) довенно вводили вінкристин (*Vincristinum sulfuricum*, виробництво Гедеон Ріхтер, Угорщина), розчинений в ізотонічному розчині NaCl, у дозі 100,0 мкг/кг маси тіла – усього 10 ін'єкцій. Матеріал забирали на 3-ю, 7-у, 14-у і 21-у доби після останнього введення, 27 контрольним тваринам вводили довенно еквівалентний об'єм розчинника.

Нейротоксичний вплив етопозиду вивчали на експериментальній моделі, запропонованій С.Л. Vregman [5], яка передбачає одноразове довенне введення препарату в дозі 22 мг/кг маси тварини 86 білих нелінійних щурів (*Rattus norvegicus L.*). Нами встановлено, що одноразове довенне введення етопозиду дозі 22 мг/кг маси тіла викликає в експериментальних тварин, починаючи з 7-ї доби досліду, зниження рухової активності, на 15-у добу – парези тазових кінцівок, що відповідає II-III ступеню нейротоксичності (згідно рекомендацій ВООЗ і Міжнародного протиракового союзу для оцінки ступеня побічних проявів хіміотерапії) [6].

Утримання тварин та маніпуляції проводилися у відповідності до положень “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) та вимог Додатку 4 до “Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин (Наказ МОЗ №755, 1977 р.). Тварин виводили з експерименту передозуванням ефірного наркозу.

У роботі використано нейрогістологічні і електронномікроскопічні методики дослідження. Досліджувався стан тіл рухових нейронів, які формують еферентний компонент сідничого 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 L₂-S₁.

Результати досліджень та їх обговорення. При світлооптичному дослідженні препаратів спинного мозку при введенні вінкристину встановлено, що структура переважної більшості перикаріонів нейронів рухового сегментарного центру збережена. Лише на 14-у добу досліду з'являються окремі клітини великих розмірів (б-мотонейрони) із хроматофільною субстанцією дрібногранулярного вигляду. У навколядерній зоні окремих нейронів малого діаметру (г-мотонейрони) визначається

хроматоліз. На 21-у добу кількість перикаріонів з ознаками дезорганізації хроматофільної речовини дещо зростає. При цьому спостерігається порушення структури речовини Ніссля як на периферії клітини, так і в її центральній частині. Ядра мотонейронів овальної або округлої форми, хроматин має однорідний вигляд, інколи визначається його периферійна конденсація, у частини ядер виявляються зони просвітлення каріоплазми.

При електронномікроскопічному дослідженні в цитоплазмі перикаріонів мотонейронів на 3-ю добу виявляється розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, зростання кількості мітохондрій, окремі з яких набувають видовженої або неправильної форми. Численні профілі агранулярної ендоплазматичної сітки розширені, визначається велика кількість лізосом. Диктіосоми комплексу Гольджі звичайної будови. Вільні рибосоми і полісоми рівномірно розподілені в об'ємі цитоплазми. Ядра овальної форми, каріолема формує неглибокі інвагінації. Еухроматин дрібногранулярної будови, середньої електронної щільності. Ядерця розміщені переважно в центральній частині ядра, звичайної структури.

На 7-у добу експерименту в ядрах мотонейронів зростає ступінь гетерохроматизації хроматину, підвищується рухомість каріолеми, навколядерний простір на окремих ділянках розширений. Цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки розширені, деформовані, окремі з них зазнають вакуольної трансформації і дегрануляції. Визначається збільшення просвіту та вакуольна трансформація окремих елементів комплексу Гольджі, які заповнені електроннопрозорим вмістом. Спостерігається велика кількість мітохондрій округлої, овальної, видовженої або неправильної форми. В окремих із них кристи вкорочені і розріджені, виявляється вогнищеве руйнування мембран. У цитоплазмі перикаріонів рухових нейронів простежується велика кількість вільних рибосом і полісом.

14-а доба досліджу характеризується редукцією гранулярної ендоплазматичної сітки. Кількість цистерн зменшується, вони вкорочуються, частина з них орієнтована хаотично. Водночас, в окремих нейронах спостерігається поєднання атрофії гранулярної ендоплазматичної сітки зі зниженням щільності вільних рибосом і полісом та зменшенням осміофільності гіалоплазми. Серед великої кількості мітохондрій переважають органели з явищами розрідження, вкорочення, часткового або повного лізису крист, просвітленням матриксу і розплавленням зовнішньої і внутрішньої мітохондріальних мембран. Як і в попередні терміни досліджу, виявляється значна кількість лізосом. Зростає число диктіосом комплексу Гольджі, яке поєднується з проліферацією і розширенням його елементів. Одночасно велика кількість перикаріонів зберігає звичайну ультраструктурну організацію.

На 21-у добу, поряд із незмінними перикаріонами та нейронами, які зазнають описаних вище змін, наявні поодинокі рухові нейрони з

вираженою атрофією гранулярної ендоплазматичної сітки, що представлена поодинокими профілями. Останні хаотично орієнтовані, укорочені, місцями деформовані, розширені або вакульно трансформовані. На багатьох ділянках спостерігається їхня дегрануляція. Переважна більшість цистерн агранулярної ендоплазматичної сітки розширена, заповнена вмістом низької електронної щільності. Типовою для цього терміну досліду є проліферація, розширення просвіту і вакуольна трансформація пухирців комплексу Гольджі. Зниження кількості вільних рибосом і полісом поєднується з вогнищевим набряком гіалоплазми. Зміни мітохондрій різноманітні – від незначних порушень ультраструктури до повного руйнування. На окремих ділянках визначається зменшення числа і порушення орієнтації мікротрубочок і нейрофіламентів. Привертає увагу велика кількість лізосом та поодинокі мультивезикулярні тільця. Навколяядерний простір місцями дещо розширений, контури каріолеми на окремих ділянках розмиті. Зростає ступінь гетерохроматизації ядра. Ядерце нерідко локалізоване асиметрично, з незначно вираженими ознаками дисоціації його глобулярного і фібрилярного компонентів.

Таким чином, виявлені зміни рухового сегментарного центру сідничого нерва можна розцінювати як прояв поєднаної неспецифічної компенсаторної реакції мотонейронів на порушення структури і транспортних процесів в еферентних нервових волокнах [7].

При введенні етопозиду мотонейрони всіх субпопуляцій, які беруть участь у формуванні еферентного компоненту сідничого нерва, на 3-ю добу експерименту характеризуються незначними змінами. Речовина Ніссля в окремих нейронах має вигляд грубих грудок, розміщених переважно периферійно, або дрібногранулярного вигляду. В окремих клітинах спостерігається периферійний хроматоліз. При електронномікроскопічному дослідженні на 3-ю добу експерименту в цитоплазмі переважної більшості мотонейронів зміни не виражені. Лише в деяких перикаріонах рухових нейронів виявляється помірне розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки та елементів комплексу Гольджі.

На 7-у добу досліду кількість клітин із порушеннями розподілу та характеру забарвлення речовини Ніссля зростає, з'являються мотонейрони з просвітленою каріоплазмою. У цитоплазмі еферентних нейронів цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки помірно розширені. Зростає кількість лізосом. Частина цистерн агранулярної ендоплазматичної сітки мають великий діаметр. Структура мітохондрій, у цілому, збережена. Однак, у деяких із них впорядковане розміщення порушується, кристи руйнуються, при цьому матрикс набуває дрібнозернистого вигляду середньої електронної щільності. Поодинокі мітохондрії мають зруйновану зовнішню і внутрішню мітохондріальні мембрани. Каріолема формує неглибокі інвагінації, кількість пор ядерної оболонки зростає, вони розширені, спостерігається посилений транспорт рибосом.

Через 15 діб після введення етопозиду визначаються поліморфні зміни мотонейронів рухового сегментарного центру сідничого нерва, збільшується число клітин з явищами хроматолізу, гіпохромними ядрами з дрібногранулярним хроматином. В окремих перикаріонах спостерігається підвищення електронної щільності гіалоплазми, втрата впорядкованості і розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, поява великої кількості лізосом. Ядра таких нейронів здебільшого неправильної форми за рахунок утворення глибоких інвагінацій. Каріолема на значному протязі зруйнована. Окремі цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки та структури комплексу Гольджі дещо збільшені в діаметрі, заповнені вмістом середньої або низької електронної щільності.

У деяких мотонейронах визначається редукція гранулярної ендоплазматичної сітки зі збільшенням числа вільних рибосом і полісом. Спостерігається проліферація, розширення і вакуольна трансформація елементів комплексу Гольджі. Мітохондрії переважно набряклі, зовнішня і внутрішня мембрани деяких із них зруйновані. Кристи вкорочені, редуковані, нечисленні. У цитоплазмі з'являються мультивезикулярні тільця, кількість лізосом і електроннощільних включень цитоплазми збільшується.

Нерідко визначаються набряклі мотонейрони з просвітленою гіалоплазмою. Кількість цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки і вільних рибосом та полісом у них зменшене на тлі проліферації і розширення просвіту елементів комплексу Гольджі. Мітохондрії набряклі з порушенням орієнтації крист, їхнім частковим або повним розплавленням, руйнуванням мембран. Часто в цитоплазмі визначаються вакуолі великих розмірів, заповнені електроннопрозорим вмістом. Нерідко в цитоплазмі ідентифікується проліферація мікротрубочок і утворення мієліноподібних фігур.

Структурно-функціональні зміни рухового сегментарного центру сідничого нерва на 3-ю добу введення етопозиду узгоджуються з результатами досліджень, присвячених вивченню механізмів дії препарату на нервові клітини в культурі. Встановлено, що етопозид індукує розрив одинарних і подвійних ниток ДНК унаслідок пригнічення топоізомерази II, що проявляється порушенням ультраструктури білоксинтезувального апарату перикаріонів нейронів [8, 9]. Водночас у наших дослідах у нейронах визначалися неглибокі дистрофічні зміни, на відміну від виявлених деякими авторами в експериментах *in vitro* явищ апоптозу нейронів [10, 11]. Компенсаторні реакції нейронів на пошкодження ДНК окремі дослідники пояснюють активацією антиапоптичних факторів, зокрема теломерази і білка Bcl-X(L) [12, 13]. Тобто при введенні етопозиду переважають компенсаторні зміни перикаріонів нейронів, що ефективно забезпечує збереження структурної і функціональної цілісності еферентних нейронів у ранні терміни досліду. Поряд із цим до 7-ї доби зростає

проникність стінки гемокапілярів рухового сегментарного центра для крупномолекулярних білків, у нашій роботі отримані докази порушення гемато-енцефалічного бар'єру вентральних рогів сірої речовини спинного мозку, що співзвучні з результатами досліджень N. Savaraj et al. [14] і M.K. Spigelman et al. [15], які виявили порушення бар'єрної функції мікрогемосудин головного мозку і порушення структури нейронів під впливом етопозиду.

Висновки

1. При вінкристин-індукованій нейропатії ротягом першого тижня в перикаріонах нейронів рухового сегментарного центру відбувається активація процесів метаболізму. Із 14-ї доби нарастають деструктивні зміни. Прогресування і поглиблення дистрофічних змін до 21-ї доби супроводжується порушенням архітекτονіки мікротрубочок і нейрофіламентів. Зміни в перикаріонах рухових нейронів переднього рогу спинного мозку можна розцінювати як прояв неспецифічної реакції перикаріонів на пошкодження його периферійного відростка.

2. Експериментальна етопозид-індукована периферійна нейропатія є первинною прогресуючою аксонопатією. У морфогенезі захворювання ми пропонуємо виділити наступні стадії – фазу первинної аксональної реакції (3-я доба досліджу), фазу порушення системи мікроциркуляції периферійних нервів та їх сегментарних центрів (7-а доба експерименту), фазу дегенеративних змін (15-а доба спостереження). Прогресування нейропатії супроводжується не стільки докорінною зміною характеру патологічного процесу, скільки появою численних популяцій нейронів, в яких своєрідно поєднуються процеси альтерації і компенсації. Унаслідок цього протягом усього терміну спостереження патоморфологічна картина відзначається значною гетерогенністю і мозаїчністю.

Література

1. Haim N. Muscle cramps associated with vincristine therapy / N. Haim, S.A. Barron, E. Robinson // *Acta Oncol.* – 1991. – Vol.30, №6. – P. 707-711.
2. Olesen L.L. Prevention and management of drug-induced peripheral neuropathy / L.L. Olesen, T.S. Jensen // *Drug safety.* – 1991. – Vol.6, №4. – P. 302-314.
3. Геращенко С.Б. Аксонні та дендритні проєкції сідничого нерва у спинному мозку та спинномозкових гангліях білих щурів / С.Б. Геращенко // *Буковинський медичний вісник.* – 2001. – Т.5, №3-4. – С. 23-24.
4. Aley K.O. Vincristine hyperpalgnesia in the rat: A model of painful vincristine neuropathy in humans / K.O. Aley, D.B. Reichling, J.D. Levine // *Neuroscience.* – 1996. – Vol. 73, №1. – P. 259-265.
5. Etoposide-induced and VMY-40481-induced sensory neuropathy in mice / C.L. Bregman, R.A. Buroker, R.S. Hirth [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 1994. – Vol.22, №5. – P. 528-535.

6. Блохин Н.Н. Химиотерапия опухолевых заболеваний / Н.Н. Блохин, Н.И. Переводчикова. – М.: Медицина, 1984. – 304 с.
7. Pathogenesis of axonal degeneration: parallels between Wallerian degeneration and vincristine neuropathy / M.S. Wang, Y. Wu, D.G. Culver [et al.] // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2000. – Vol.59, №7. – P. 599-606.
8. Holm B. ICRF-187 rescue in etoposide treatment in vivo. A model targeting high-dose topoisomerase II poisons to CNS tumors / B. Holm, P.B. Jensen, M. Sehested // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1996. – Vol.38, №3. – P. 203-209.
9. Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration / T. Nagao, S. Yoshimura., V. Saito [et al.] // Teratog. Carcinog. Mutagen. – 1999. – Vol.19, №3. – P. 233-241.
10. The levels of cdk5 and p35 proteins and tau phosphorylation are reduced during neuronal apoptosis / P. Kerokoski, T. Suuronen, F. Salminen [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol.280, №4. – P. 998-1002.
11. Kuusisto E. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells / E. Kuusisto, T. Suuronen, A. Salminen // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol.280, №1. – P. 223-228.
12. Temporospatial sequence of cellular events associated with etoposide-induced neuronal cell death: role of antiapoptotic protein / J.E. Kim, B.S. Han, W.S. Choi [et al.] // J. Neurosci. Res. – 2001. – Vol.66, №6. – P. 1074-1082.
13. Lu C. Telomerase protects developing neurons against DNA damage-induced cell death / C. Lu, W. Fu, M.P. Mattson // Brain Res. Dev. Brain. Res. – 2001. – Vol.131, №1-2. – P. 167-171.
14. Comparison of CNS penetration, tissue distribution, and pharmacology of VP 16-213 by intracarotid and intravenous administration in dogs / N. Savaraj, K. Lu, L.G. Feun [et al.] // Cancer Invest. – 1987. – Vol.5, №1. – P. 11-16.
15. Etoposide induced blood-brain barrier disruption in rats: duration of opening and histological sequelae/ M.K. Spigelman, R.A. Zappulla, J.A. Strauchen [et al.] // Cancer Res. – 1986. – Vol.46, №3. – P. 1453-1457.

*Стаття надійшла до редакційної колегії 20.12.2013 р.
Рекомендовано до друку д.м.н., професором Зайцем Л.М.,
д.м.н., професором Грицуляком Б.В.*

**MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF NEURONS
OF MOTOR SEGMENTAL CENTRES OF ISCHIATIC NERVE
BY VINCRISTINE- AND ETIOPOSIDE-INDUCED
PERIPHERAL NEUROPATHY**

S. B. Geraschenko, O. H. Deltsova

Ivano-Frankivs'k National Medical University;

76018, Ivano-Frankivs'k, Galytska str., 2; e-mail: histology@ifnmu.edu.ua

Influence of the vincristine (86 white rats) and etoposide (86 white rats) has studied in experiment. By vincristine-induced neuropathy changes of perikarions of motor neurons of the spinal cord thus nonspecific reaction of the nerve cell body were established. Experimental etoposide-induced neuropathy is peripheral progressive axonopathy. The processes of alteration and compensation were combined. By all terms of observation the pathomorphological pictures were heterogeneous and mosaic.

Key words: vincristine, etoposide, motor neurons, spinal cord, morphology.