

збереження і згасання навички. Внутрішньоочеревне ведення Ангіоліну (50 мг/кг) в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі щурам, які перенесли важке отруєння етанолом, призводило до достовірного підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампу, збільшення вмісту в них РНК і зниження кількості нейронів з ознаками апоптозу. За силою нейропротективної дії Ангіолін при профілактичному і лікувальному режимі введення тваринам, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, достовірно перевершував дію Мілдронату (100 мг / кг), що вводився в аналогічних режимах.

**Ключові слова:** гостре отруєння алкоголем, нейропротекція, орієнтовно-дослідницька активність, нейроапоптоз, Ангіолін, Мілдронат.

Стаття надійшла 23.09.2016 р.

maintaining and fading of the skills. Intraperitoneal Angiolin administration (50 mg/kg) in therapeutic and, especially, in prophylactic regimen to rats which underwent heavy ethanol poisoning resulted in a significant increase of the density of neurons of the hippocampus CA1 zone, increase of RNA content in them and decrease of the number of neurons with apoptotic features. Neuroprotective activity of Angiolin in prophylactic and therapeutic regimen of administration to animals underwent acute heavy ethanol poisoning was significantly higher than the effect of Mildronate (100 mg/kg), administered under the same conditions.

**Key words:** acute alcohol poisoning, neuroprotection, orienting-investigative activity, neuroapoptosis, Angiolin, Mildronate

Рецензент Чайковський Ю.Б.

УДК 611.84+615.281+615.065

Н. З. Довга

ІНІЗ "Івано-Франківський національний медичний університет", м. Івано-Франківськ

### ЕЛЕКТРОННОМІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПАКЛІТАКСЕЛУ НА СІТКІВКУ ОКА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Метою дослідження було вивчення будови сітківки в процесі розвитку паклітаксел-індукованої ретинопатії методом електронної мікроскопії. Білим щурам (30 тварин) вводили внутрішньоочеревинно паклітаксел (Actavis, Румунія) у дозі 2 мг/кг маси тіла через одну добу 4 рази, сумарна доза – 8 мг/кг. Термін дослідження – 1, 7, 14 і 27 діб, 2 і 3 міс. Встановлено, що паклітаксел індукує ретиноксичність, яка проявляється вираженими структурними змінами в сітківці. Найбільш уразливими є фоторецепторні нейрони, в яких спостерігаються деформація, вакуолізація та руйнування зовнішніх сегментів. У клітинах нейронного ланцюга сітківки домінують явища каріопікнозу, набряку гіалоплазми, вакуольної трансформації мітохондрій, дегрануляції ендоплазматичної сітки. Із 2-го міс дослідження характерною є неоваскуляризація шару нервових волокон.

**Ключові слова:** сітківка ока, паклітаксел, фоторецепторні клітини, нейрони.

Препарати групи таксанів (паклітаксел, доцетаксел, тамоксифен та інші) є одними з найбільш ефективних препаратів в якості лікування першої лінії поширених видів раку. Однак вони часто супроводжуються тяжкими периферійними симптомами нейротоксичності і нейропатичного болю. Структурні порушення в спинномозкових гангліях і чутливих нервах викликають втрату чутливості, парестезії, дизестезії та оніміння, які призводять до страждань пацієнта, а також обмежують протипухлинну терапію [8, 9]. Паклітаксел ініціює апоптоз із допомогою декількох механізмів. Водночас мікротрубочки різного статусу, наприклад, цитоскелету і мітотичних веретен мають різну чутливість до паклітакселу, що може відбитися не тільки на перебігу мітозу, але й накласти відбиток на мікротрубочки нормальних клітин. Тобто, виконуючи активну протипухлинну дію, таксани водночас проявляють значні токсичні впливи на здорові тканини [1, 10].

Останнім часом з'явилися повідомлення про такі офтальмотоксичні ускладнення застосування таксанів, як макулопатія з втратою зору [4, 5]. Встановлено, що при лікуванні паклітакселом пошкоджується зоровий нерв, шар нервових волокон сітківки з подальшим звуженням поля зору, про що повідомляють Н. Kashiwagi [3], В. Vakbak et al. [2]. Причиною втрати зору є загибель фоторецепторних клітин, яка відбувається, в основному, за рахунок апоптозу [6].

Таким чином, проблема ретиноксичності препаратів таксанового ряду вимагає глибокого дослідження, оскільки її морфологічна основа до цього часу мало вивчена.

**Метою** роботи було вивчити будову сітківки в процесі розвитку паклітаксел-індукованої ретинопатії методом електронної мікроскопії.

**Матеріал та методи дослідження.** В експерименті білим щурам-самцям масою 150-200 г (30 тварин) вводили внутрішньоочеревинно паклітаксел (Actavis, Румунія) у дозі 2 мг/кг маси тіла через одну добу 4 рази, сумарна доза – 8 мг/кг за методом R.S. Polomano et al. [7]. У контрольній групі (15 тварин) тваринам вводили внутрішньоочеревинно ізотонічний розчин NaCl еквівалентного об'єму. Матеріал для дослідження забирали через 1, 7, 14 і 27 діб, 2 і 3 міс після останнього введення паклітакселу.

Утримання тварин та маніпуляції проводилися у відповідності до положень "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах". На кінець досліду тварин виводили з експерименту передозуванням ефірного наркозу, забирали шматочки сітківки для електронномікроскопічного дослідження, обробляли їх згідно загальноприйнятих методів із наступним вивченням в електронному мікроскопі ПЕМ-125К при прискорюючій напрузі 75 кВ із наступним фотографуванням при збільшенні від 4000 до 16000 разів.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Через 1-7 діб після введення паклітакселу, насамперед, привертають увагу зміни в зовнішніх сегментах паличкових і колбочкових нейронів фоторецепторного шару. Зовнішні сегменти можуть бути некротизованими, деформованими або майже неушкодженими. Перетинчасті диски зовнішнього сегмента паличкового нейрона виявляють нерівномірні розширення і звуження. У сегментах інших паличкових клітин мембрани дисків покручені. Між ними простори неоднакової ширини, які інколи дуже тісно прилягають один до одного, мембрани дисків "злипаються" між собою, в інших випадках нерівномірно розширені. Вогнищево виявляються ділянки руйнування дисків і деструкції плазмалеми, яка оточує сегмент. Місцями зовнішні сегменти локалізуються близько один одного. Між "темними" зовнішніми сегментами з чітко чи нечітко окресленими дисками спостерігаються "світлі" зовнішні сегменти, в яких диски ледь контуруються. Поблизу паличок простежуються відростки пігментоцитів пігментного шару. В їхній цитоплазмі визначаються вакуолі, тонкі мікрофіламенти і поодинокі меланосоми та автофагосоми. У нейронах зовнішнього ядерного шару плазмалема окреслена нечітко. Цитоплазма ущільнена з невеликою кількістю органел: дрібних мітохондрій, цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки. Ядра втрачають округлу форму, мають численні випини та інвагінації, із периферійною конденсацією хроматину. Компоненти ядерця виражені нечітко. Нейропіль між нейронами цього шару практично не містить відростків інших нейронів. У зовнішньому сітчастому шарі ідентифікуються аксо-дендритні синапси між аксонами фоторецепторних клітин і дендритами двополюсних (біполярних) і горизонтальних нейронів – сферули, які містять різну кількість синаптичних пухирців і мають різні розміри. Пресинаптичні полюси синапсів спостерігаються як темні ділянки з пухирцями. У цьому шарі виявляються світлі горизонтальні нейрони округлої форми, у відростках яких визначаються мітохондрії. Внутрішній сітчастий шар тонкий. У нейронах внутрішнього зернистого і гангліонарного шарів ідентифікуються дистрофічні та некробіотичні зміни. Деякі нейрони гангліонарного шару сітківки у стані некрозу. Відростки частини нейронів, які розташовуються в шарі нервових волокон, виявляють некротичні зміни.

На 15-у добу експерименту на поздовжньому перерізі зовнішніх сегментів паличкових нейронів спостерігаються ділянки звуження і розширення. Диски зовнішнього сегмента палички нерівномірно розширені і мають строкату картину. Мембрани перетинчастих дисків окреслені нечітко, спостерігаються ділянки злипання мембран. Порожнини дисків мають різний об'єм, пухирцеподібні розширення у вигляді вакуоль різного діаметру. У деяких ділянках зберегеться лише плазмалема і замість дисків виокремлюється велика вакуоля. Трапляються значно звужені ділянки зовнішнього сегмента, диски в яких не простежуються. В окремих ділянках виявляється деструкція дисків із локальним руйнуванням плазмалеми. У внутрішньому сегменті – вакуольна трансформація мітохондрій, дрібні вакуолі і розмитість плазмалеми. Зв'язувальна війка в стані деструкції. У зовнішньому ядерному шарі контури фоторецепторних нейронів сітківки втрачають округлість форми. Цитоплазма нейронів гомогенно зерниста. Спостерігається каріопікноз і каріорексис, ядра різко осміюфільні, еухроматин в них не ідентифікується. Сферули в зовнішньому сітчастому шарі трапляються рідко. У цитоплазмі нейронів гангліонарного шару спостерігається вакуольна трансформація мітохондрій. Зовнішня мітохондріальна перетинка збережена. У численних мітохондріях гребінці вкорочені. Інші мітохондрії перетворюються на вакуолі. Трапляються мієліноподібні фігури. Комплекс Гольджі має щільно упаковані цистерни і слабо виражений пухирцевий компонент. Гранулярна ендоплазматична сітка складається з плоских мішечків з ознаками дегрануляції. У збережених ядрах невеликі інвагінації ядерної оболонки, еухроматин, незначна периферійна конденсація гетерохроматину. Ядерні перетинки ідентифікуються нечітко. Навколо нейронів виявляються відростки інших нейроцитів, нервові волокна на поперечному зрізі деформовані.

Через 27 діб після введення паклітакселу ядра пігментоцитів округлої форми з м'якими інвагінаціями і помірною периферійною конденсацією хроматину. Пігментоцити вирізняються довгими відростками, які локалізуються поблизу паличок, глибоко проникаючи в фоторецепторний шар сітківки. У складі відростка переважно одна меланосома. У цитоплазмі

пігментоцитів меланосоми з різною кількістю пігмента: одні з них округлі з темним вмістом, інші мають осміофільну і осміофобну частини. Трапляються автофагосоми. Мітохондрії пігментоцитів із розрідженими й укороченими гребінцями та світлим матриксом, цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки поодинокі, спостерігаються рибосоми і полісоми. Відростки пігментоцитів часто з'єднуються між собою та утворюють сітку. Дистрофічні процеси у фоторецепторних нейронах поглиблюються. У паличках диски пошкоджені, їхні мембрани потовщені. Міжмембранні простори розширені. Контури мембран дисків нечіткі. У багатьох із них спостерігається виражена вакуолізація та руйнування. Упродовж сегмента місцями ідентифікуються звуження. Зовні плазмалема має локальні ділянки пошкодження. В окремих нейронах у зовнішньому сегменті – просвітлення великих розмірів із деструкцією дисків. У двополосних і багатополосних гангліонарних нейронах ядра великі й округлі з периферійною конденсацією хроматину, часто у стані пікнозу. У цитоплазмі трапляються великі вакуолі. Мітохондрій та інших органел обмаль. У шарі нервових волокон виявляються набряклі відростки гангліонарних нейронів. Окремі з них містять мітохондрії в різному ступені пошкодження, вакуолі. Їхня аксоплазма насичена пластівцеподібним матеріалом. У цьому шарі з'являються новоутворені капіляри. На люменальній поверхні їхніх ендотеліоцитів спостерігаються парусоподібні відростки. Ядра ендотеліоцитів великі, із вираженою периферійною конденсацією хроматину. Базальна мембрана потовщена і дещо розпушена. В її розщепленнях розміщуються перичити. Капіляри оточені аксонами гангліонарних нейронів різного діаметру. Окремі з них мають набряклу аксоплазму.

У наступний термін експерименту (2 міс) у капілярах власне судинної оболонки ока, які прилягають до пігментного шару сітківки (мембрана Бруха), базальна мембрана потовщена. У цитоплазмі ендотеліоцитів мітохондрії з короткими кристами і світлим матриксом, органел обмаль. У цитоплазмі прилеглих пігментоцитів вихначаються мітохондрії, вакуолі, плоскі дегранульовані цистерни ендоплазматичної сітки, нечисленні меланосоми. Відростки пігментоцитів розташовуються близько до зовнішніх сегментів паличкових нейронів, в яких часто не ідентифікуються диски. В окремих ділянках відростки перетворюються на сітку, у ній локалізуються меланосоми. Поблизу відростків визначаються зруйновані зовнішні сегменти без дисків із великими вакуолями. Двополосні нейрони внутрішнього ядерного шару лежать близько один одного. Вони мають округлі ядра з невеликими випинами і периферійною конденсацією хроматину. Трапляються "світлі" і "темні" нейрони. У перикаріонах "темних" нейронів – численні мітохондрії з короткими кристами, комплекс Гольджі, полірибосоми, у "світлих" – набряк цитоплазми, поодинокі мітохондрії і цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки. У цитоплазмі багатополосних гангліонарних нейронів набряк, цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки плоскі, окремі дегранульовані. Мітохондрії набухлі, із короткими кристами і світлим матриксом, зі проявами вакуольної трансформації. У "темних" нейронах ядро різко осміофільне, пікнотичне, у ньому не ідентифікуються хроматин і ядерце, цитоплазма ущільнена, мітохондрії поодинокі. У шарі нервових волокон виявляються капіляри. Їх стінка тонка. Люменальна поверхня ендотеліоцитів містить численні парусоподібні відростки. Базальна мембрана потовщена і розпушена. Ендотеліоцити можна віднести до "темних": цитоплазма ущільнена, органели ідентифікуються важко.

Через 3 міс після введення паклітакселу в цитоплазмі пігментоцитів спостерігаються меланосоми, мітохондрії, багато м'ялиноподібних фігур. Відростки меланоцитів численні, спрямовані до фотосенсорного шару, об'єднуються й утворюють сітку. Біля сегментів паличкових нейронів у них часто трапляються поодинокі або згруповані меланосоми. У зовнішніх сегментах фотосенсорних клітин диски не ідентифікуються, натомість виявляються вакуолі. Диски в зовнішніх сегментах знаходяться в різному морфо-функціональному стані. Є ділянки, де диски чітко окреслені, розташовані паралельно. У тих же сегментах спостерігаються зони з розмитими контурами дисків і вакуолями, заповненими пластівцеподібним вмістом. Нейрони інших шарів дистрофічно змінені. У шарі нервових волокон типовим явищем стають новоутворені капіляри.

**Висновки**

1. Паклітаксел індукує ретинотоксичність, яка проявляється вираженими морфологічними змінами. Найбільш уразливими є фоторецепторні нейрони, в яких ідентифікуються дистрофічні і некротичні зміни у вигляді деформації, вакуолізації та повного руйнування зовнішніх сегментів. Клітини нейронного ланцюга сітківки (двополюсні і гангліонарні) – з явищами каріопікнозу, набряку гіалоплазми, із вакуольною трансформацією мітохондрій, дегрануляції ендоплазматичної сітки. Характерною ознакою впливу паклітакселу, починаючи з 2-го міс досліджу, є неоваскуляризація шару нервових волокон.
2. Отримані результати можуть бути використані в клініці очних хвороб та онкології для прогнозування морфологічних змін у сітківці та їхньої корекції при використанні антибластозного препарату паклітакселу.

**Список літератури**

1. Abal M. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action / M. Abal, J.M. Andreu, I. Barasoain // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2003. – Vol. 3(3). – P. 193-203.
2. Bakbak B. Assessment of ocular neurotoxicity in patients treated with systemic cancer chemotherapeutics / B. Bakbak, S. Gedik, B.E. Koktekir [et al.] // *Cutan. Ocul. Toxicol.* – 2014. – Vol. 33(1). – P. 7-10.
3. Kashiwagi H. Ocular disorders of anticancer drugs – ocular side effects // *Kan To Kagaku Ryoho*. – 2010. – Vol. 37(9). – P. 1639-1644.
4. Murphy C. G. Cystoid Macular Edema Secondary Tonab-Paclitaxel Therapy / C. G. Murphy, J. B. Walsh, C. A. Hudis [et al.] // *JCO*. – 2010. – Vol. 28(33). – P. 684-687.
5. Modi D. Non-leaking Cystoid Maculopathy Secondary to Systemic Paclitaxel / D. Modi, S. R. Dubovy // *Ophth. Surg. Lasers Imaging Retina*. – 2013. – 44(2). – P. 183-186.
6. Murakami Y. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations / Y. Murakami, S. Notomi, T. Hisatomi T. [et al.] // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2013. – Vol. 37. – P. 114-140.
7. Polomano R. C. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, Paclitaxel / R.C. Polomano, F.J. Mannes, U.S. Clark [et al.] // *Pain*. – 2001. – № 94(3). – P. 293-304.
8. Xiao W. H. Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat / W. H. Xiao, H. Zheng, F.Y. Zheng [et al.] // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 199. – P. 461-469.
9. Yang I. H. Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration / I. H. Yang, R. Siddique, S. Hosmane [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2009. – Vol. 218(1). – P. 124-128.
10. Wang T. H. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together / T. H. Wang, H. S. Wang, Y. K. Soong // *Cancer*. – 2000. – Vol. 88(11). – P. 2619-2628.

**Реферати**

**ЕЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ  
ИССЛЕДОВАНИЕ ВПЛИЯНИЯ ПАКЛИТАКСЕЛА НА  
СЕТЧАТКУ ГЛАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Довга Н.З.**

Целью исследования было изучение строения сетчатки в процессе развития паклітаксел-индуцированной ретинопатии методом электронной микроскопии. Белым крысам (30 животных) вводили внутривенно паклітаксел (Actavis, Румыния) в дозе 2 мг/кг массы тела через одни сутки 4 раза, суммарная доза – 8 мг/кг. Сроки исследования – 1, 7, 14 и 27 суток, 2 и 3 месяца. Установлено, что паклітаксел индуцирует ретинотоксичность, которая проявляется выраженными морфологическими изменениями в сетчатке. Наиболее уязвимыми являются фоторецепторные нейроны, в которых наблюдаются деформация, вакуолизация и разрушение наружных сегментов. В клетках нейронной цепочки сетчатки доминируют явления каріопікноза, отека гіалоплазми, вакуольной трансформации мітохондрій, дегрануляції ендоплазматической сети. Со 2-го мес эксперимента характерным является неоваскуляризація слоя нервных волокон.

**Ключевые слова:** сетчатка глаза, паклітаксел, фоторецепторные клетки, нейроны.

Стаття надійшла 11.10.2016 р.

**THE ELECTRON MICROSCOPIC RESEARCH OF  
PALITAXEL-INDUCED RETINAL CHANGES IN THE  
EXPERIMENT**

**Dovga N.Z.**

The aim of the research was to study the retina structure in the development of Paclitaxel-induced retinopathy with the use of electron microscope. 30 white rats were i.p. injected with Paclitaxel (Actavis, Romania) dosed 2 mg/kg body weight every 2 days 4 times, the total dosage being 8 mg/kg. The terms of the research constituted 1, 7, 14 and 27 days, 2 months, 3 months. We have found out that Paclitaxel does induce retinotoxicity which is presented by electron microscopic changes in the retina. Photoreceptor neurons are the most sensitive to the damage: we observe dystrophy, destruction, deformation, vacuolation, and outer segment damage. The bipolar and ganglion cells of the retinal neuron chain appear to be karyopyknotic, the cytoplasm is swollen, mitochondria vacuolated and endoplasmic reticulum degranulated. Since the 2nd month we observe another characteristic feature of Paclitaxel: it causes the neovascularization of neural tissue layer.

**Key words:** eye retina, Paclitaxel, photoreceptor cells, neurons.

Рецензент Герашенко С.Б.