

МОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ В СІТКІВЦІ ПІД ВПЛИВОМ ПАКЛІТАКСЕЛУ**Державний вищий навчальний заклад****«Івано-Франківський національний медичний університет» (м. Івано-Франківськ)****deltsova44@gmail.com**

Робота є фрагментом науково-дослідної теми ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» «Морфо-функціональна характеристика уражень центральної і периферійної нервової систем, органів чуття, викликаних хіміопрепаратами, що застосовуються для лікування онкологічних захворювань, та розробка схем нейропротекторної терапії» (№ держреєстрації 0117U000672).

Вступ. Препарати таксанового ряду є високоактивними в лікуванні хворих з онкологічними захворюваннями, їхня протипухлинна активність заснована на стабілізації динаміки мікротрубочок і порушенні клітинного циклу [10,4]. Водночас протипухлинні препарати цього ряду часто викликають пошкодження різних відділів нервової системи [7,9]. У літературі з'являються клінічні повідомлення про паклітаксел-асоційовану ретинопатію – кістоїдний набряк макули сітківки [5,1,6,11] з її потовщенням [3]. Ці явища можуть стати постійними і не зникають після припинення застосування препарату [8].

Нині в клініці встановлено, що при лікуванні паклітакселем виникають токсичні ураження зорового нерва, шару нервових волокон сітківки з подальшим звуженням поля зору, зниженням його гостроти на обидва ока [3,12,13]. Кістозний двобічний набряк макули і вакуольні утворення сітківки часто спостерігаються як рання відповідь на введення паклітакселу. Відносне поліпшення стану очного дна відзначається лише через 3 міс після проведення курсу [2]. Виявлені пошкодження різних відділів ока внаслідок хіміотерапії препаратами таксанового ряду вимагають докладного дослідження в експерименті, оскільки в науковій літературі відсутні дані щодо закономірностей їхнього патоморфогенезу на етапах виникнення, прогресування та реконвалесценції.

Мета дослідження — вивчити будову сітківки в процесі розвитку паклітаксел-індукованої ретинопатії на світлооптичному рівні за допомогою методів комп'ютерного морфометричного аналізу.

Об'єкт і методи дослідження. В експерименті 42 рандомбредним білим щурам масою 150-200 г внутрішньоочередивно вводили 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. [1]. У контрольній групі 21 тварина отримувала внутрішньоочередивно ізотонічний розчин NaCl еквівалентного об'єму. Матеріал для дослідження забирали через 1, 7, 14, 27, 60, 90 і 120 діб після останнього введення препарату.

Шматочки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну і поміщали в парафін за загальноприйнятими методами. Після забарвлення гематоксиліном і еозином зрізи розглядали під мікроскопом і вимірювали товщину сітківки та її окремих шарів. Для вимірювання використовували програмне забезпечення UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 3) в інтерактивному режимі з застосуванням мікроскопа Axioskop та цифрової камери Toupcam UNCCD5100KPA з програмним забезпеченням ToupView виробництва Touptek Photonics Co. Ltd. Аналізатор зображень калібрували за допомогою тестового зразка «МИРА» (ГК 7.216.028-01, виробництво НДІ «Квант»). Для статистичної обробки використовували електронні таблиці Microsoft Excel 2000 та програми Biostat і STATISTICA for Windows.

Результати дослідження та їх обговорення.

Через одну добу після останнього введення паклітакселу спостерігали стоншення шару паличок і колбочок через зменшення довжини зовнішніх сегментів паличкових і колбочкових зорових клітин, а інколи відсутність останніх. Подекуди виявляли переміщення ядер із зовнішнього ядерного шару в шар паличок і колбочок, що може бути зумовлене саме вкороченням їхніх зовнішніх сегментів. Товщина шару паличок і колбочок становила $(10,58 \pm 0,15)$ мкм, у контролі – $(21,52 \pm 0,26)$ мкм, відбулося її зменшення на 50,80% ($p < 0,05$). Зовнішній ядерний шар також стоншувався до $(29,19 \pm 0,20)$ мкм (у контрольних тварин – $(41,76 \pm 0,30)$ мкм, $p < 0,05$), у ньому часто спостерігалися гомогенні дифузні безклітинні зони. Товщина зовнішнього сітчастого шару не змінилася і становила $(5,91 \pm 0,10)$ мкм (у контрольних тварин – $(5,62 \pm 0,11)$ мкм, $p > 0,05$) Внутрішній ядерний шар звужився до $(14,32 \pm 0,11)$ мкм, а внутрішній сітчастий – до $(21,77 \pm 0,23)$ мкм (у контрольних тварин – $(16,80 \pm 0,13)$ мкм і $(25,86 \pm 0,22)$ мкм, відповідно, $p < 0,05$). Гангліонарний і шар нервових волокон, навпаки, розширилися до $(8,62 \pm 0,09)$ мкм, у контрольних тварин – $(5,16 \pm 0,22)$ мкм, $p < 0,05$, і $(4,71 \pm 0,10)$ мкм, у контрольних – $(2,36 \pm 0,10)$, $p < 0,05$. У гангліонарному шарі визначався набряк і зменшення кількості нейронів. У цитоплазмі перикаріонів нейронів містилися великі вакуолі. Загалом, товщина сітківки стала меншою – $(95,10 \pm 0,10)$ мкм, у контрольних – $(118,68)$ мкм, $p < 0,05$, в основному, за рахунок звуження шару паличок і колбочок та зовнішнього ядерного.

Протягом першого тижня (7 діб) товщина шару паличок і колбочок залишалася меншою, порівняно

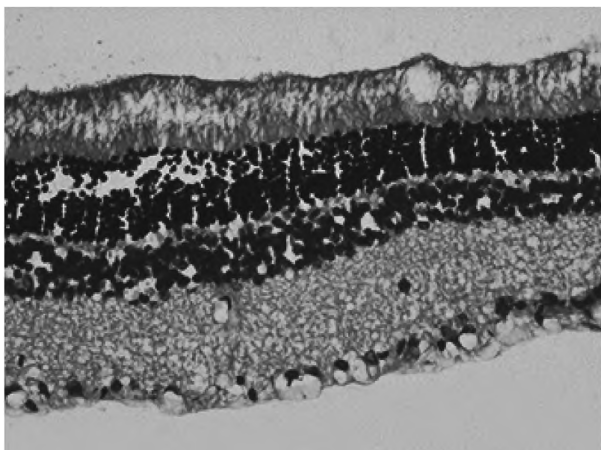


Рис. 1. Потовщення сітківки щура, набряк усіх шарів, вакуолізація гангліонарних нейронів. Термін досліді – 7 діб. Заб. гематоксиліном і еозиним. Зб. х 288.

з контрольними тваринами, величина цих показників суттєво не змінилася, порівняно з 1-ю добою досліді. У цьому шарі розрізняються щільні і світлі ділянки. У щільних ділянках зовнішні сегменти паличок і колбочок локалізуються близько один до одного, а в світлих вони розріджені або відсутні. Спостерігається переміщення ядер із зовнішнього ядерного шару в шар паличок і колбочок. При цьому за рахунок набряку значно розширюються зовнішній і внутрішній ядерні, сітчасті та гангліонарні шари. Внутрішній сітчастий шар має нерівномірну товщину через наявність ділянок звуження і розширення. У нейронах гангліонарного шару ідентифікуються клітини зі зморщеними ядрами і вакуолізованою нейроплазмою (**рис. 1**). Кількість нейронів у гангліонарному шарі стала меншою – ділянки зі звичайною локалізацією і кількістю ядер чергуються з ділянками з відсутністю ядер. Товщина сітківки зростає до $(148,16 \pm 0,16)$ мкм, $p < 0,05$.

Через 15 діб після завершення введення паклітакселу ми виявили подальші зрушення в будові сітківки (**рис. 2**). У шарі паличок і колбочок тривало вкорочення зовнішніх сегментів цих клітин. За-

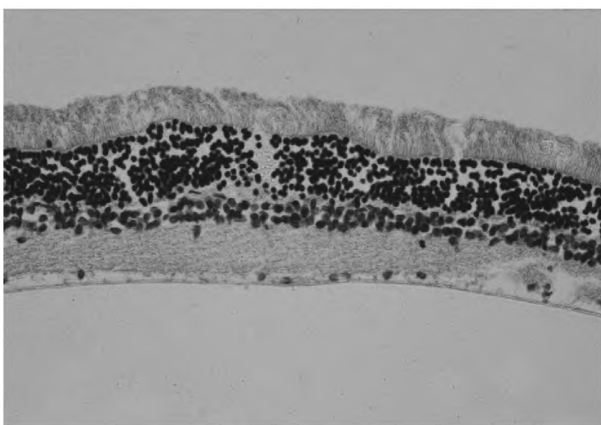


Рис. 2. Деформація зовнішніх сегментів паличок і колбочок, набряк зовнішнього ядерного шару, значне стоншення зовнішнього сітчастого шару сітківки щура на 15-у добу паклітаксел-індукованої ретинопатії. Заб. гематоксиліном і еозиним. Зб. х 288.

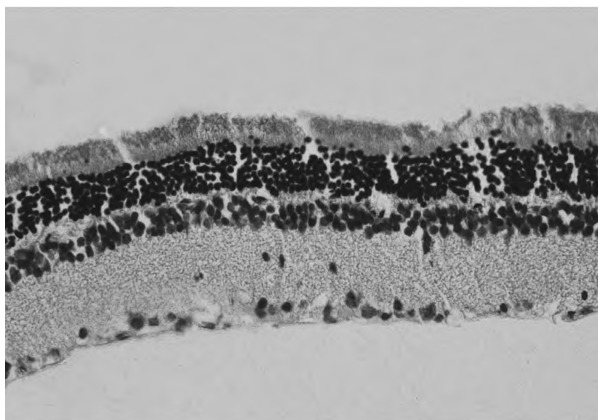


Рис. 3. Розширення внутрішнього ядерного, внутрішнього сітчастого, гангліонарного та шару нервових волокон на 60-у добу після останнього введення паклітакселу. Заб. гематоксиліном і еозиним. Зб. х 288.

галом, шар звузився до $(8,32 \pm 0,10)$ мкм, $p < 0,05$. Товщина зовнішнього ядерного та сітчастого шарів зменшилися, порівняно з показниками контрольних щурів. Внутрішній ядерний шар виявив величину показника, наближену до показників контролю. Місцями спостерігалось наближення зовнішнього і внутрішнього ядерних шарів і зменшення товщини в цих ділянках зовнішнього сітчастого шару. Внутрішній сітчастий шар став тоншим, ніж у контрольних тварин. Гангліонарний шар стоншився, порівняно з 7-ї добою, але не досяг показника контролю. Товщина сітківки, загалом, зменшилася відносно попереднього терміну досліді у показника контрольних тварин до $(97,63 \pm 0,08)$ мкм, $p < 0,05$.

На 27-у добу експерименту сітківка зазнала подальших змін. Встановлено, що товщина шару паличок і колбочок, зовнішнього і внутрішнього ядерного шарів і шару нервових волокон незначно зростає, порівняно з попереднім терміном, водночас залишається меншою, ніж у тварин контрольної групи ($p < 0,05$). Товщина гангліонарного шару зменшилася до $(2,44 \pm 0,04)$ мкм, що значно менше, ніж у попередньому терміні та в контролі ($p < 0,05$). Товщина сітківки при цьому залишилася вірогідно більшою, ніж у контрольних тварин.

Через 60 діб після останнього введення паклітакселу (**рис. 3**) товщина шару паличок і колбочок складала $(11,24 \pm 0,16)$ мкм, зовнішнього ядерного – $(33,74 \pm 0,49)$ мкм, залишаючись меншою, порівняно з контрольними тваринами ($p < 0,05$). Товщина зовнішнього сітчастого не відрізнялася від показника контрольних тварин. Водночас, показники товщини внутрішнього ядерного, гангліонарного та шару нервових волокон перевищували аналогічні значення в контрольних тварин ($p < 0,05$).

Найвиразніші зміни були встановлені через 90 діб після закінчення курсу введення паклітакселу. Товщина фоторецепторного шару залишалася меншою, порівняно з контрольними тваринами – $(13,27 \pm 0,18)$ мкм, $p < 0,05$. Зовнішній ядерний шар потовщений до $(50,47 \pm 1,19)$ мкм, $p < 0,05$; внутрішній ядерний – до $(30,54 \pm 0,67)$ мкм, $p < 0,05$; вну-

трішній сітчастий – до $(48,91 \pm 1,03)$ мкм, $p < 0,05$; гангліонарний – до $(15,73 \pm 0,42)$ мкм, $p < 0,05$. Ці шари набрякли, відстань між клітинами чи відростками збільшена. Загалом за рахунок розширення внутрішніх шарів її товщина збільшилася до $(170,47 \pm 3,18)$ мкм, $p < 0,05$, на тлі попереднього терміну дослідження і порівняно з контрольними тваринами.

У наступний термін (120 діб після останнього введення паклітакселу) ознаки набряку проявлялися в меншому ступені, усі шари сітківки потоншали, порівняно з попереднім терміном експерименту (рис. 4). Морфометричні показники наблизилися до 90-денного терміну, але не повернулися до показників контрольних тварин. Товщина фоторе-

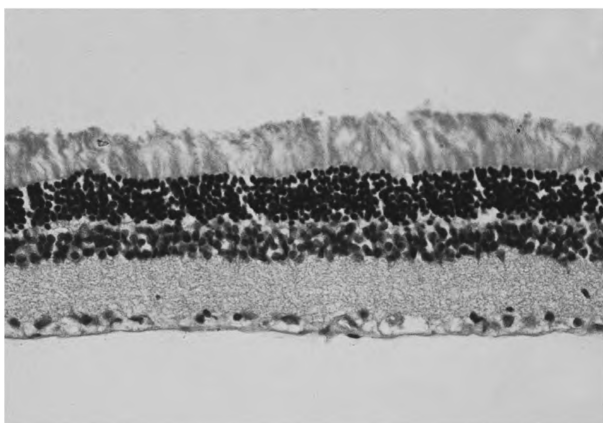


Рис. 4. Наближення товщини сітківки до показника контрольних тварин. Термін дослідження – 120 діб. Заб. гематоксилином і еозином. Зб. $\times 288$.

цепторного шару і зовнішнього ядерного стабільно менша від показника інтактних тварин. На цьому тлі глибокі шари сітківки – від внутрішнього ядерного до шару нервових волокон включно дещо товстіші від контролю, що в сумі наближає товщину сітківки ($121,68 \pm 1,33$) мкм до показника контрольних тварин.

Таким чином, ми встановили, що паклітаксел в експерименті викликає найбільш стійкі зміни в шарі паличок і колбочок, і цим можна пояснити прояви ретиноксичності, яка визначається при застосуванні цього середника в хіміотерапії злоякісних пухлин у клініці [6]. При цьому виникає набряк шарів сітківки, який зберігається протягом усього дослідження. Таким чином, наші експериментальні дані

збігаються з результатами клінічних досліджень, в яких показано поступове зниження зору на обидва ока і наявність глибоких порушень структури сітківки протягом 6 тижнів після завершення курсу хіміотерапії [11,10,12]. Виявлені порушення можуть спостерігатись у хворих протягом 3 місяців [8], що співпадає з нашими даними. Ми поділяємо думку окремих дослідників [2] щодо стоншення ядровмісних шарів, виникнення дистрофічних змін і набряку сітківки, пов'язаного з накопиченням надлишкової рідини в міжклітинному просторі її нейросенсорної частини. Водночас, роль судинного, ішемічного і запального процесів у патоморфогенезі паклітаксел-індукованої ретинопатії потребує, на нашу думку, більш детального вивчення.

Висновки

1. Паклітаксел індукує ретиноксичність, яка проявляється морфологічними і морфометричними змінами в сітківці.

2. Найбільш суттєві зміни визначаються у шарі паличок і колбочок, що проявляється стійким зменшенням його товщини, найбільш вираженим на 15-у добу експерименту. Низький регенераторний потенціал компонентів цього шару підтверджується тим фактом, що виявлені зміни визначаються навіть на 120-у добу дослідження. Метричні характеристики інших шарів змінюються різноспрямовано, ступінь їхньої вираженості відрізняється в динаміці експерименту.

3. У товщині сітківки визначається хвилеподібний характер змін від 1-ї до 27-ї доби: на 1-у добу товщина зменшується, на 7-у добу зростає за рахунок набряку в усіх шарах сітківки, на 15-у добу відбуваються компенсаторні зміни з тенденцією до нормалізації досліджуваного параметру, від 27-ї до 90-ї доби в більшості шарів повторно зростають ознаки набряку і дистрофії нейронів, на 120-у добу набряк залишається у внутрішніх шарах сітківки (від внутрішнього ядерного до шару нервових волокон).

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані можна застосувати в клініці онкології та очних хвороб із метою прогнозу і корекції ретиноксичності, індукованої хіміопрепаратами таксанового ряду.

Література

1. A case of cystoid macular edema associated with Paclitaxel chemotherapy / D.S. Ham, J.E. Lee, H.W. Kim [et al.] // *Int. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 32 (3). – P. 299-304.
2. Angiographically silent cystoid macular oedema secondary to paclitaxel therapy / C.D. Georgakopoulos, O.E. Makri, P. Vasilakis [et al.] // *Clin. Exp. Optom.* – 2012. – Vol. 95 (2). – P. 233-236.
3. 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.
4. de Weger V.A. Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel — a review / V.A. de Weger, J.H. Beijnen, J.H. Schellens // *Anticancer Drugs.* – 2014. – Vol. 25 (5). – P. 488-494.
5. Ito S. A case of cystic maculopathy during paclitaxel therapy / S. Ito, M. Okuda // *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* – 2010. – 114 (1). – P. 23-27.

6. Koo N.K. A case of paclitaxel-induced maculopathy treated with methazolamide / N.K. Koo, Y.C. Kim // Korean J. Ophthalmol. – 2012. – Vol. 26 (5). – P. 394-397.
7. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies / S.B. Park, A.V. Krishnan, C.S. Lin [et al.] // Curr. Med. Chem. – 2008. – Vol. 15 (29). – P. 3081-3094.
8. Modi D. Non-leaking Cystoid Maculopathy Secondary to Systemic Paclitaxel / D. Modi, S.R. Dubovy // Ophthalmol. Surg. Lasers Imag. Retina. – 2013. – Vol. 44 (2). – P. 183-186.
9. Neurotoxicity in ovarian cancer patients on Gynecologic Oncology Group (GOG) protocol 218: Characteristics associated with toxicity and the effect of substitution with docetaxel: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study / D.M. Chase, H. Huang, C.D. Foss [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2014. – Dec 18. pii: S0090-8258(14)01576-1585.
10. Phase II open-label study of bevacizumab combined with neoadjuvant anthracycline and taxane therapy for locally advanced breast cancer / M. Clavarezza, M. Turazza, E. Aitini [et al.] // Breast. – 2013. – Vol. 22 (4). – P. 470-475.
11. Rahimy E. Cystoid macular edema secondary to nanoparticle albumin-bound Paclitaxel therapy / E. Rahimy, D. Sarraf // Ophthalmol. Surg. Lasers Imag. Retina. – 2013. – Vol. 44 (2). – P. 187-189.
12. Teitelbaum B.A. Cystic maculopathy with normal capillary permeability secondary to docetaxel / B.A. Teitelbaum, D.J. Tresley // Optom. Vis. Sci. – 2003. – Vol. 80 (4). – P. 277-279.
13. Telander D.G. Cystoid macular edema with docetaxel chemotherapy and the fluid retention syndrome / D.G. Telander, D. Sarraf // Semin. Ophthalmol. – 2007. – Vol. 22 (3). – P. 151-153.

УДК 611.84+615.281+615.065

МОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ В СІТКІВЦІ ПІД ВПЛИВОМ ПАКЛІТАКСЕЛУ

Довга Н. З., Дельцова О. І., Геращенко С. Б.

Резюме. Досліджено патоморфогенез сітківки ока в динаміці розвитку ретинопатії (120 діб), зумовленої введенням паклітакселу в сумарній дозі 8 мг/кг маси тіла в експерименті на 42 білих рандомбредних щурах. Методи дослідження – світлова мікроскопія з використанням комп'ютерного аналізу морфометричних показників (ширина шарів і товщина сітківки) сітківки ока. Встановлено, що паклітаксел індукує ретиноксичність, яка проявляється морфологічними і морфометричними змінами.

Ключові слова: сітківка ока, паклітаксел, ретинопатія, морфометрія.

УДК 611.84+615.281+615.065

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЕТЧАТКЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПАКЛИТАКСЕЛА

Довга Н. З., Дельцова Е. И., Геращенко С. Б.

Резюме. Исследование посвящено изучению морфологических изменений сетчатки глаза в динамике развития ретинопатии, обусловленной введением паклитаксела в суммарной дозе 8 мг/кг массы тела в эксперименте. Сетчатка глаза белых рандомбредных крыс была объектом эксперимента на протяжении 120 суток и изучалась с помощью световой микроскопии с использованием компьютерного морфометрического анализа. Полученные результаты позволили установить морфометрические критерии морфологических изменений сетчатки на разных этапах развития паклитаксел-индуцированной ретинопатии.

Ключевые слова: сетчатка, паклитаксел, ретиноксичность, морфометрия.

UDC 611.84+615.281+615.065

MORPHOMETRIC CHANGES IN THE RETINA UNDER INFLUENCE OF PACLITAXEL

Dovga N. Z., Deltsova O. I., Geraschenko S. B.

Abstract. Modern schemes of cancer treatment widely apply taxanes as highly effective anticancer medicines. Concurrently, taxanes affect not only cancer cells, but also healthy tissues. Their side effects manifest themselves in the toxicity of various parts of the eye. These effects require more thorough research, as the morphological structure of the parts affected has been little studied. The aim is to study the structure of retina in the development of paclitaxel-induced retinotoxicity at the optical level using computer morphometric analysis.

Object and methods. Within the experimental research 42 randombred rats (mass 150-200 g) were given intraperitoneal injections of Paclitaxel (Actavis, Romania), dosed 2 mg/kg of body mass 1 per 2 days 4 times, which in total equals 8 mg/kg, acc. to the method introduced by R.S. Polomano et al. (2002). Samples for research were taken in 1, 7, 14, 27, 60, 90, and 120 days after the last paclitaxel injection. As a fixative 10% neutral-buffered formalin was used and then the sections were embedded in paraffin according to common rules. The sections were stained in hematoxylin and eosin and measured for the thickness of retina and its layers.

Research outcomes and discussion. In 24 hours after the last paclitaxel injection we could observe the thinning of the photoreceptor layer, caused by the shortening of rod and cone outer segments, and sometimes the absence of the latter. In some cases the shift of nuclei from the outer nuclear layer into photoreceptor layer was observed. The thickness of photoreceptor layer established ($10,58 \pm 0,15$) mkm and in control ($21,52 \pm 0,26$) it was diminished by 50,80% ($p < 0,05$). The outer nuclear layer also diminished: from ($41,76 \pm 0,30$) mkm in control animals to ($29,19 \pm 0,20$) mkm, $p < 0,05$. In this layer also diffuse homogenous areas without cells were noticed. The thickness of the outer plexiform layer has little changed. The inner nuclear layer has thinned to ($14,32 \pm 0,11$) mkm, $p < 0,05$, and the inner plexiform layer has become ($21,77 \pm 0,23$) mkm, $p < 0,05$. The ganglion cell layer and the nerve fiber layer, on the contrary, thickened to ($8,62 \pm 0,09$) mkm, $p < 0,05$, i ($4,71 \pm 0,10$) mkm, $p < 0,05$; with the manifestation of edema and lower amount of neurons. The neurons contained big vacuoles. In general the retina has become thinner.

During the first 7 days the thickness of photoreceptor layer was smaller than in control animals. Also the shift of nuclei from the outer nuclear layer into photoreceptor layer was observed. The edema causes the thickening of

inner and outer nuclear layers, the plexiform layers and the ganglion cell layer. the inner plexiform layer has the uneven thickness. In the neurons of ganglion neuron layer neurons with pyknotic nuclei and vacuolized neuroplasm were identified. There were fewer neurons in the ganglion neuron layer. The retina thickness significantly rises.

After 15 days in the photoreceptor layer the shortening of rod and cone outer segments continued. Generally, the layer thinned to $(8,32 \pm 0,10)$ mkm, $p < 0,05$. The outer nuclear and plexiform layers lost some of their thickness, while the inner nuclear layer did not differ from that of the control animals. The total thickness of retina decreased.

In 27 days after the last injection of paclitaxel the following changes were registered: the photoreceptor, inner and outer nuclear layers and the nerve fiber layer thickened, and the ganglion neuron layer became thinner comparing to the previous term of research. The retina thickness remained larger than in control animals.

In 60 days after the last paclitaxel injection the photoreceptor and outer nuclear layers remained thinned ($11,24 \pm 0,16$) mkm, $p < 0,05$, and $(33,74 \pm 0,49)$ mkm, $p < 0,05$, correspondingly). Meanwhile, we observed the thickening of the inner nuclear ($p < 0,05$), the inner plexiform ($p < 0,05$), the ganglion neuron ($p < 0,05$) and nerve fiber ($p < 0,05$) layers.

On the 90th day the photoreceptor layer remained thinner than in control animals $(13,27 \pm 0,18)$ mkm, $p < 0,05$. The other layers thickened: the outer nuclear – $(50,47 \pm 1,19)$ mkm, $p < 0,05$; the inner nuclear layer – $(30,54 \pm 0,67)$ mkm, $p < 0,05$; the inner plexiform layer – $(48,91 \pm 1,03)$ mkm, $p < 0,05$; the ganglion neuron layer – $(15,73 \pm 0,42)$ mkm, $p < 0,05$. These layers are swollen. The retina thickness reached $(170,47 \pm 3,18)$ mkm, $p < 0,05$.

On the 120th day the retina layers became thinner, the morphometric indexes approached the 90-day term. The photoreceptor and outer nuclear layers are steadily thinner than those in the control animals. The deep retina layers – from the inner nuclear to the nerve fiber one – are still somewhat thicker than in the control animals, and in total the thickness of retina approaches the normal index – $(121,68 \pm 1,33)$ mkm, $p < 0,05$.

Keywords: retina, Paclitaxel, retinotoxicity, morphometry.

Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 02.06.2017 року