

О.О.Шевчук

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України»

Ключові слова: тонкий кишечник, мелфалан, вуглецевий ентеросорбент, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор.

Надійшла: 10.08.2015
Прийнята: 02.09.2015

УДК 616.341-091.8-02[615.277.3+615.246.2:546.26]-092.9

МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ПРОТЕКТОРНОГО ВПЛИВУ ВУГЛЕЦЕВОГО ЕНТЕРОСОРБЕНТА І ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНІЄСТИМУЛЮЮЧОГО ФАКТОРА НА СТРУКТУРУ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ МЕЛФАЛАНУ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Розробка та оптимізація технології захисту кісткового мозку від цитостатичної мієлодепресії на основі комплексного застосування мас-фрактальних вуглецевих ентеросорбентів та гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору» загальноакадемічного конкурсу науково-технічних проєктів та розпорядження Президії НАН України від 27.02.2013 №133.

Реферат. Мета – вивчити морфологічні характеристики тонкого кишечника здорових щурів при застосуванні цитостатика мелфалану, вуглецевого ентеросорбента та гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора. Мелфалан викликає дистрофічні зміни структурних компонентів слизової оболонки з розвитком лімфо-гістіоцитарної інфільтрації стромы та компенсаторних захисних реакцій. Застосування комбінації вищевказаних чинників сприяє максимальному відновленню морфологічних характеристик. Отже, поєднання ентеросорбції та гемостимулюючого цитокіну є перспективним напрямом ослаблення негативного впливу цитостатичної терапії.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 117-121.

© О.О.Шевчук, 2015

✉ shevchukoo@tdmu.edu.ua

Shevchuk O.O. Morphological aspects of protective influence of carbonic enterosorbent and granulocyte colony stimulating factor on small intestine in case of Melphalan administration.

ABSTRACT. Background. High toxicity of anti-cancer drugs limits the efficacy of the treatment of malignant tumors. The most frequent side effects are the injury of highly proliferative cell and tissues: hematologic and gastrointestinal toxicity. Our previous study showed high myeloprotective activity of combination of carbonic enterosorbent and granulocyte colony stimulating factor. The **objective** of this investigation is to study the morphologic characteristic of small intestine in case of melphalan injection and pharmacocorrection with carbonic granulated enterosorbent C2 and filgrastim. **Methods.** Histologic structure of jejunum of healthy male inbred rats, after the melphalan injection (4 mg/kg) and its correction with enterosorption and filgrastim apart, and in combination was investigated. **Results.** Cytostatic melphalan caused the dilation of microcirculatory vessels and expressed perivascular edema leading to enlargement of intestinal villi. It was revealed a large amount of lymphocytes and histiocytes in stroma and signs of increasing secretory activity of glandular cells. Dystrophic changes of the epithelium were seen. The enteral sorptive therapy showed prominent improvement of morphologic characteristic of jejunum. But signs of increased mucus production were still seen. The granulocyte colony stimulating factor has no effects on small intestine structures. The combination of carbonic enterosorbent and filgrastim improved the histologic picture maximally. **Conclusion.** Combination of enterosorption and granulocyte colony stimulating factor is a prospective approach to diminish the gastrointestinal toxicity of cytostatic therapy.

Key words: small intestine, melphalan, carbonic enterosorbent, granulocyte colony stimulating factor.

Citation:

Shevchuk OO. [Morphological aspects of protective influence of carbonic enterosorbent and granulocyte colony stimulating factor on small intestine in case of Melphalan administration]. *Morphologia*. 2015;9(3):117-21. Ukrainian.

Вступ

Протягом останнього століття злякисні новоутворення за рівнем смертності та захворюваності у світі перемістились з десятого на друге місце, поступаючись лише серцево-судинній патології. За даними ВООЗ до 2030 року кількість

померлих внаслідок розвитку злякисних пухлин зросте на 45,0 % у порівнянні з 2007 роком [1]. Україна за рівнем онкозахворюваності (384,9 на 100 тис. населення) входить в першу десятку країн світу та друга серед країн Європи [2].

Поліхіміотерапія з використанням високих

доз протипухлинних препаратів забезпечила значний прогрес у лікуванні багатьох онкологічних захворювань. Однак висока токсичність антинеопластичних препаратів є одним із лімітуючих факторів ефективного лікування. Частота виникнення різних видів токсичності при проведенні хіміотерапії неоднакова [3, 4, 5]. Серед найбільш частих побічних проявів переважають реакції, обумовлені ураженням клітин з високим темпом проліферації: кровотворних та імунокомпетентних органів, слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, волосяних фолікулів, репродуктивної функції та ін. За даними літератури у 90 % випадків розвивається ураження шлунково-кишкового тракту: нудота та блювання, розвиток мукозитів і, як наслідок, транслокація у системний кровообіг грамнегативних кишкових бактерій та їх ендотоксинів тощо [3, 4]. Це змушує шукати нові методи та засоби, які б пом'якшували цитотоксичний вплив протипухлинної терапії на здорові клітини та тканини.

Попередньо проведені нами дослідження показали виражену мієлопротекторну дію комбінації новітнього вуглецевого гранульованого ентеросорбенту та препарату гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (філграстиму) на тлі застосування алкілюючого цитостатика мелфалану [6].

Мета дослідження – вивчити морфологічні характеристики тонкого кишечника здорових щурів *in vivo* за вищевказаних умов.

Матеріали та методи

Експерименти проводили на білих нелійних щурах-самцях масою 200 ± 20 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Піддослідних тварин було поділено на наступні групи ($n=10$): інтактні щури; тварини, яким вводили мелфалан (L-PAM); щури, які окрім отримували L-PAM та вуглецевий ентеросорбент С2 (L-PAM + С2); група щурів, які отримували L-PAM та філграстим (L-PAM + філграстим); і такі, котрим вводили усі перераховані чинники (L-PAM + С2 + філграстим).

Мелфалан (біфункціональна алкілююча сполука з циклонеспецифічною дією) застосовують для лікування множинної мієломи, меланом, сарком м'яких тканин, для підготовки до трансплантації аутологічного кісткового мозку тощо. Препарат вводили одноразово внутрішньовенно з розрахунку 4 мг/кг. Вуглецевий гранульований ентеросорбент С2, який надано ІЕПОР (прототип гемосорбента ГСГД, насипна вага $0,18 \text{ г/см}^3$, розмір гранул $0,15\text{-}0,25$ мм), вводили внутрішньошлунково у вигляді завису в дистильованій воді за допомогою зонда протягом трьох днів до введення мелфалану та сім днів після цього з розрахунку 5 мл на 1000 г маси щура, що складало 900 мг/кг сухої ваги. Інтактні тварини отримували еквівалентну кількість дистильованої води. Філграстим – офіційний препарат гранулоци-

тарного колонієстимулюючого фактора, вводили підшкірно з розрахунку 50 мкг/кг, починаючи з наступного дня після введення мелфалану впродовж 4 днів один раз на добу.

На 8-у добу після ін'єкції L-PAM, дотримуючись правил біоетики поводження з піддослідними тваринами, за умов евтаназії під кетаміновим знеболенням для дослідження було взято тканини тонкого кишечника для проведення гістологічного дослідження. Усі маніпуляції проводились при дотриманні принципів біоетики відповідно до положення Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах.

Для гістологічного аналізу використовувалися шматочки порожньої кишки, фіксовані у 10 % нейтральному розчині формаліну та фіксаторі Ліллі, з наступною заливкою в парафін [7]. Отримані на санному мікромомі зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Послідовність розвитку патологічного процесу документували за допомогою мікроскопа ЛОМО Біолам та системи виведення зображень гістологічних препаратів. При вивченні морфологічної організації печінки звертали увагу на зміни паренхіми та основних структурних елементів.

Результати та їх обговорення

Як показують проведені нами дослідження, при введенні мелфалану в дозі 4 мг/кг, структурні компоненти слизової оболонки тонкої кишки, у порівнянні з інтактними тваринами (рис. 1), зазнавали ряду змін (рис. 2).

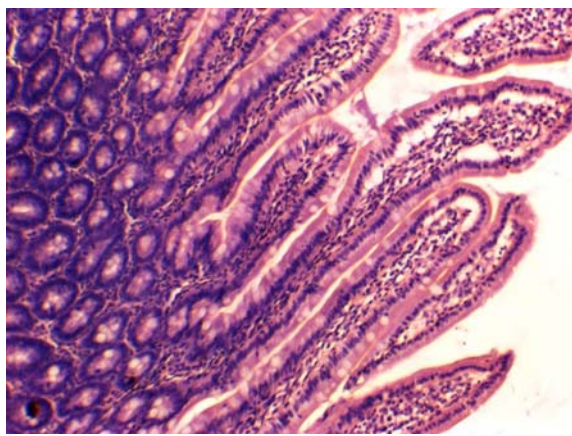


Рис. 1. Структура відділу тонкої кишки інтактної тварини. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$.

Це проявлялося збільшенням розмірів залоз за рахунок підвищеної секреторної активності

залозистого епітелію. Судини мікроциркуляторного русла подекуди розширювались, окремі спричиняли виражений периваскулярний набряк, що призводило до збільшення розмірів ворсин. В стромі спостерігалась поява великої кількості лімфо- та гістіоцитів. Поверхневий епітелій зазнавав виражених дистрофічних змін. Секреторна активність окремих клітин була значною. Судини базальної мембрани візуалізувались помірно, окремі із них розширювались, містили еритроцити. М'язова оболонка зазнала мінімальних змін.

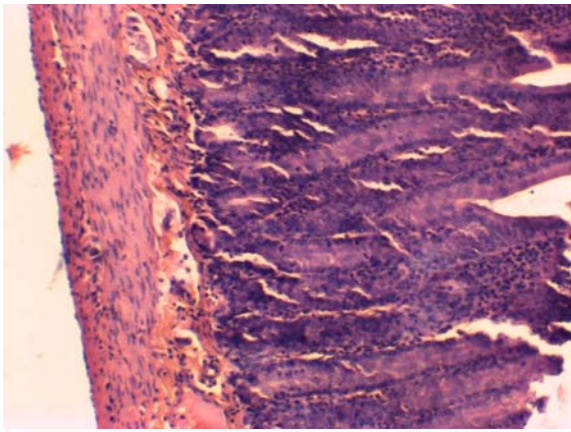


Рис. 2. Структура відділу тонкої кишки дослідної тварини, яка отримала мелфалан у дозі 4 мг/кг. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$.

При застосуванні на тлі введення цитостатика ентеральної сорбційної терапії з використанням вуглецевого гранульованого ентеосорбента С2 (рис. 3), ми спостерігаємо значні позитивні зміни.

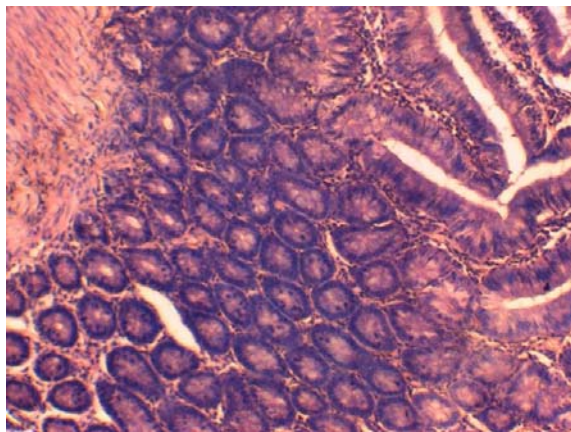


Рис. 3. Структура тонкого кишечника дослідної тварини з групи L-PAM + C2. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$.

Слизова оболонка тонкої кишки зазнає незначних змін по відношенню до норми. Залозистий компонент практично не змінюється. Просві-

ти залоз без змін відносно інтактних тварин, судини мікроциркуляторного русла не візуалізуються. В окремих клітинах поверхневого епітелію спостерігалась підвищена секреторна активність. Товщина ворсин візуально не змінювалась по відношенню до норми. Базальна мембрана не потовщена, її судини візуалізувались мінімально.

На фоні введення тваринам філграстиму зміни були не такі яскраві, як при проведенні ентеральної сорбційної терапії (рис. 4). Слизова оболонка тонкої кишки дещо відновлювала свою структурну організацію, однак залози залишалися збільшеними за рахунок збільшення розмірів залозистого епітелію, просвіти їх мало візуалізувались. Судини мікроциркуляторного русла подекуди розширювались, окремі спричинювали виражений периваскулярний набряк, що призводило до збільшення розмірів ворсин. В стромі мала місце велика кількість лімфо- та гістіоцитів. Поверхневий епітелій зазнавав виражених змін, це проявлялось наявністю переважно дистрофічних змін цитоплазми та зміни розташування ядер. Секреторна активність окремих клітин була помірною. Судини базальної мембрани візуалізувались помірно, окремі із них залишалися розширеними, містили еритроцити. Мав місце слабо виражений периваскулярний набряк. М'язова оболонка практично не змінювалась.

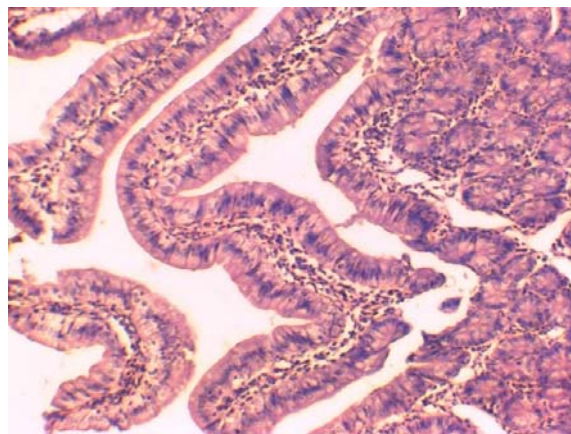


Рис. 4. Структура тонкого кишечника дослідної тварини з групи L-PAM + філграстим. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$.

У групі тварин, які отримували і сорбент С2 і філграстим (рис. 5), слизова оболонка тонкої кишки відновлювала свою структурну організацію. Залози залишалися дещо збільшеними за рахунок збільшення розмірів окремих епітеліоцитів, просвіти їх мало візуалізувались. Судини мікроциркуляторного русла подекуди розширювались, мав місце слабо виражений периваскулярний набряк, який незначно збільшував розміри ворсин. В стромі спостерігалась невелика кількість лімфо- та гістіоцитів. Поверхневий епітелій змінювався мало. Проте в цитоплазмі клітин

спостерігалась велика кількість вакуолей. Ядра епітеліоцитів розташовувались на базальній мембрані і були збереженими у всіх клітин. Судини базальної мембрани візуалізувались помірно, окремі із них залишались розширеними, мали нерівномірне кровонаповнення. М'язова оболонка зазнавала мінімальних змін.

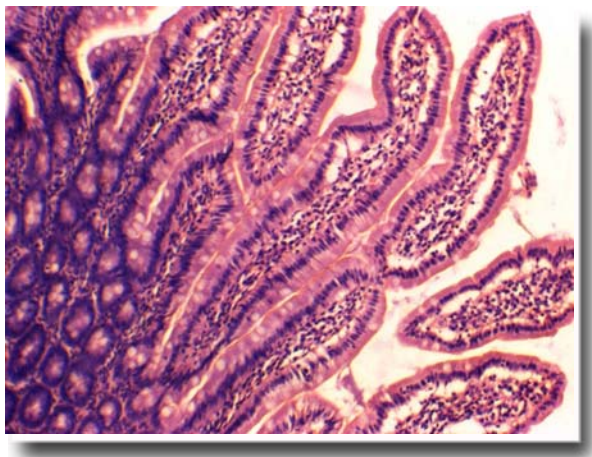


Рис. 5. Структура тонкого кишечника тварини з групи L-RAM + C2 + філграстим. Забарвлення гематоксилином та еозиним. $\times 100$.

Ураження слизових оболонок при проведенні поліхіміотерапії супроводжується розвитком так званих «мукозитів». Цей термін об'єднує запальні (еритематозні та ерозивно-виразкові) ураження слизової ротової порожнини, глотки стравоходу та шлунково-кишкового тракту (ШКТ) в цілому, які розвиваються внаслідок протипухлинної терапії [8]. Мукозит суттєво підвищує вартість лікування, збільшує тривалість госпіталізації хворих, та може навіть призвести до смерті: через розвиток нутрітивної недостатності, або безпосередньо внаслідок розвитку септичних ускладнень через порушення бар'єрної функції слизової оболонки ШКТ. Перебіг мукозитів та їх тривалість значно тяжчі та триваліші на фоні нейтропенії, що теж має значний негативний вплив на загальний стан хворого [9]. Таким чином, застосування ентеральної сорбційної терапії у поєднанні з гемостимулюючим цитокином філграстимом, яке сприяє повному відновленню

структурних компонентів і значно зменшує пошкоджуючий вплив цитостатика, є перспективним підходом для підвищення ефективності лікування злоякісних новоутворів та покращення якості життя таких хворих.

Висновки

1. Введення здоровим щурам цитостатика мелфалан у дозі 4 мг/кг викликає зміни структурних компонентів слизової оболонки тонкої кишки здорових піддослідних щурів з розвитком дистрофічних явищ та лімфо-гістоцитарної інфільтрації стромы. У той же час спостерігаються ознаки активації компенсаторно-приспосувальних реакцій слизової у вигляді посилення слизоутворення.

2. Застосування вуглецевого ентеросорбента C2 на тлі введення сприяє значному покращенню морфологічних характеристик тонкого кишечника. Спостерігаються незначні зміни у порівнянні з інтактними тваринами.

3. Застосування філграстиму на тлі введення мелфалану не має значного позитивного впливу на структурні компоненти тонкого кишечника. Зберігаються дистрофічні зміни епітелію, лімфо-гістоцитарна інфільтрація та ознаки активації захисних механізмів.

4. Максимальний ефект щодо морфологічних характеристик тонкого кишечника ми спостерігаємо при застосуванні комбінації вуглецевого гранульованого ентеросорбента та гранулоцитарного колоніестимулюючого фактора. За цих умов слизова оболонка тонкої кишки практично відновлювала свою структурну організацію.

Перспективи подальших розробок

Враховуючи те, що найбільш часто при проведенні протипухлинної терапії страждає кровотворна функція та пошкоджуються слизові шлунково-кишкового тракту, комбінація ентеральної сорбційної терапії та гемостимулюючих цитокинів є перспективним поєднанням, яке дозволяє зменшити негативний вплив цитостатичної терапії на слизову оболонку тонкого кишечника та може бути рекомендоване для подальшого вивчення та застосування у клінічній практиці лікарів-онкологів.

Літературні джерела References

1. [The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012]. World Health Organization Fact sheet №310. May, 2014.
2. [Cancer in Ukraine, 2013-2014]. Bulletin of national cancer registry of Ukraine. Kyiv, 2015. 104 p. Ukrainian.
3. Stringer AM, Gibson RJ, Bowen JM, Logan

RM, Yeoh AS, Keefe DM. Chemotherapy-induced mucositis: The role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. J Support Oncol. 2007 Jun;5(6):259-67. PMID: 17624050.

4. Stringer AM, Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DM. Chemotherapy-induced modifications to gastrointestinal microflora: evidence and implications

of change. *Current Drug Metabolism*. 2009; 10:79-83. PMID: 19149515.

5. Szwajcer D, Czaykowski P, Turner D. Assessment and management of febrile neutropenia in emergency departments within a regional health authority – a benchmark analysis. *Curr Oncol*. 2011 Dec;18(6):280-4. PMID: 22184489.

6. Shevchuk OO, Posokhova KA, Todor IN, Lukianova NY, Nikolaev VG, Chekhun VF. [Prevention of myelosuppression by combined treatment with enterosorbent and granulocyte colony-stimulating factor]. *Exp Oncol*. 2015 Jun;37(2):135-

8. PMID: 26112942.

7. Lilley R, author. [Pathohistological techniques and practical histochemistry]. Moscow: Mir; 1969. 648 p. Russian.

8. Polevichenko EV. [Alimentary mucositis in oncological patients: the new ways of supportive nutrition]. *Lechashchii vrach*. 2009;(8):91-3. Russian.

9. Bobrov AP, Tkachenko TB. [Changes of mucous membrane of oral cavity in oncological patients on the background of chemotherapy]. *Stomatologiya*. 2006;(6):70-3. Russian.

Шевчук О.О. Морфологические аспекты протекторного влияния углеродного энтеросорбента и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на структуру тонкого кишечника при применении мелфалана.

Цель – изучить морфологические характеристики тонкого кишечника здоровых крыс при введении цитостатика мелфалана, углеродного энтеросорбента и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Мелфалан вызывает дистрофические изменения структурных компонентов слизистой оболочки с развитием лимфо-гистиоцитарной инфильтрации стромы и компенсаторных защитных реакций. Применение комбинации вышеуказанных факторов способствует максимальному восстановлению морфологических характеристик. Таким образом, сочетание энтеросорбции и гемостимулирующего цитокина является перспективным направлением ослабления негативного влияния цитостатической терапии.

Ключевые слова: тонкий кишечник, мелфалан, углеродный энтеросорбент, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.