УДК 612.33+612.42:615.277.3

Н. И. СИДЕНКО
И. Н. ПУТАЛОВА

Омская государственная
медицинская академия

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА БОРТЕЗОМИБА НА СТРУКТУРУ СТЕНКИ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ И ЕЕ ЛИМФАТИЧЕСКОГО РЕГИОНА ИНТАКТНОГО ОРГАНИЗМА

Внутрибрюшинное введение противоопухолевого препарата бортезомиба вызывает структурные изменения стенки тонкой кишки и ее регионарных лимфоидных структур. Выявленные преобразования различаются сроком возникновения, степенью выраженности, продолжительностью. Несмотря на то, что они свидетельствуют о повышении антигенной нагрузки на лимфатический регион кишки, эти изменения носят обратимый характер.

Ключевые слова: лимфатический регион тонкой кишки, бортезомиб.

Химиотерапия рака — важное достижение в эволюции медицины. В многочисленных исследованиях показано, что комбинация химиотерапевтических препаратов оказывается более эффективной по сравнению с применением одного антибиотика [1]. Бортезомиб — это новый, первый в своем классе ингибитор активности протеосомы, который специально разработан для подавления активности протеосомы 26S клеток млекопитающих [2]. Поскольку активность протеосомы влияет на множество процессов, исследования структурных изменений тканей организма при воздействии химиопрепарата бортезомиба продолжаются [3].

Несмотря на большое значение лимфатической системы и лимфоидных органов в поддержании гомеостаза, изменения в них после различных методов химиотерапии практически не изучены. Однако известно, что одни химиотерапевтические препараты вызывают иммуносупрессию, а другие способствуют иммуностимуляции [4]. При химиотерапии рака для достижения эффекта необходимо соблюдать баланс между противоопухолевым действием препаратов и их иммуносупрессивным эффектом [5]. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что химиотерапевтические препараты оказывают на лимфоидные органы в основном иммуносупрессивный эффект. При этом полихимиотерапия часто вызывает поражение тканей тонкой и толстой кишки [6]. Причинами этого большинство авторов считают развитие нейтропении и снижение иммунитета в целом. Действие противоопухолевого препарата не является избирательным, повреждаются все делящиеся клетки, в том числе и клетки, вступившие в иммунный ответ. С этим связан ряд побочных эффектов химиотерапии, таких как нарушение процессов обновления тканей, опустошение лимфоидных органов, снижение всех форм иммунного ответа [7]. Необходим поиск методов сохранения и восстановления нарушенных функций лимфоидных органов без снижения противоопухолевого действия химиопрепаратов. Это обстоятельство и послужило основанием для настоящего исследования.

Цель исследования — в эксперименте выявить особенности структурных преобразований стенки подвздошной кишки и ее лимфатического региона в разные сроки после одного курса введения противоопухолевого препарата бортезомиба для оценки влияния его на интактный организм.

Материал и методы исследования. В качестве подопытных животных использовали белых крыс-самцов породы Wistar 5 – 6 мес. Животным внутрибрюшинно вводили в терапевтической дозе противоопухолевый препарат бортезомиб на 1, 4, 8 и 11 сутки (так проводится первый курс химиотерапии). Материал для морфологического исследования (брыжеечные лимфатические узлы, стенка подвздошной кишки с пейеровой бляшкой) забирали на 12-е сутки (по завершении курса), на 21-е сутки (в этот период в клинике проводят второй курс химиотерапии) и на 90-е сутки (в отдаленный период). Интактные крысы служили контролем. Далее экспериментальный материал подвергали классической гистологической обработке: фиксировали в жидкости Теллесницкого, обезвоживали и обезжиривали в серии восходящих спиртов, просветляли в ксилолах, заливали в парафин-воск, на ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ структурных компонентов производили с помощью МБС-10 и стандартной окулярной тестовой системы при увеличении в 32 раза.

Полученные данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики. Вычисляли средние арифметические величины (M) в абсолютных и относительных единицах и среднее квадратичное отклонение. Учитывая, что форма распределения была близкой к нормальной, достоверность отличий при парном сравнении величин определяли по критерию Стьюдента (t). При всех подсчетах достоверными считали различия $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждения. Общая площадь поперечного сечения стенки подвздошной кишки на 12-е сутки эксперимента после внутрибрюшинного введения бортезомиба составила 11,94±0,54 мм^2, что больше показателя животных контрольной группы на 40 %, на 21-е сутки различия с контрольными данными уменьшились до 25 %, а на 90-е сутки площадь стенки тонкой кишки вновь соответствовала контрольным значениям (7,42±0,52 мм^2).

Площадь слизистой оболочки в стенке кишки на 12-е сутки увеличилась на 32 %, на 21-е сутки она уменьшилась (на 15 %) по отношению к предыдущим суткам и составила 6,12±0,13 мм^2, а на 90-е сутки восстановилась и составила 5,09±0,26 мм^2.

Относительная площадь центрального лимфатического сосуда ворсинки на 12-е сутки увеличилась почти в 2,5 раза по сравнению с таковой у интактных крыс, на 21-е сутки она превышала контроль почти в 2 раза, а в отдаленный период доля центрального лимфатического сосуда соответствовала значениям контроля.

Доля кровеносного капилляра в структуре ворсинки на протяжении всего эксперимента существенно не менялась.

Площадь подслизистой основы в стенке кишки на 12-е сутки эксперимента превышала значения контроля (более чем в 2 раза) за счет увеличения площади межклеточных пространств на 65 % (рис. 1). На 21-е сутки площадь подслизистой основы уменьшилась (на 21 %) по сравнению с предыдущими сутками эксперимента за счет снижения площади межклеточных пространств, но осталась больше (на 40 %) контрольных цифр. На 90-е сутки площадь подслизистой основы в стенке кишки восстановилась и составила 1,18±0,15 мм^2.

Площадь мышечной оболочки на 12-е сутки возросла до 2,09±0,13 мм^2 (в контроле 1,04±0,06 мм^2), что составило 17,52±1,23 % от общей площади сечения, это в 2 раза больше контрольных значений. Показатели межклеточных пространств в ней превышали (в 3 раза) соответствующие показатели интактных крыс. На 21-е сутки площадь мышечной оболочки составила 1,50±0,09 мм^2, это значение превышало значение контроля на 31 %. Площадь интерстициальных пространств в ней уменьшилась (на 29 %) по сравнению с 12-е сутками данного эксперимента, но осталась больше (в 2 раза) контроля. В отдаленный период площадь мышечной оболочки снизилась (на 29 %) в сравнении с 21-е сутками и достигла контрольных значений. Площадь межклеточных пространств в этот период в ней также соответствовала контрольным цифрам.

В результате действия химиопрепаратов увеличивается поступление антигенов, связанное с повреждением эпителиальной выстилки органов (в данном случае – эпителий подвздошной кишки). Можно предположить, что в результате невосполняемой естественной гибели эпителиальных клеток в ткани собственной пластинки слизистой оболочки попадает большое количество антигенных и агрессивных веществ. Эти вещества приводят к воспалительной реакции, повреждению тканей, выбросу биологически и вазоактивных веществ и, соответственно, к накоплению тканевой жидкости и расширению межклеточных пространств и лимфатических сосудов. Не исключено, что расширение компонентов регионарного лимфатического русла может быть связано и с дополнительным сопротивлением на уровне лимфатических узлов [8].

Общая площадь среза пейеровой бляшки на 12-е сутки эксперимента после внутрибрюшинного введения бортезомиба равна 3,75±0,17 мм^2, что превышает контрольные значения на 7 %, на 21-е сутки отмечали дальнейшее увеличение ее площади, и разница с контролем составила 21 %, а на 90-е сутки эксперимента общая площадь среза пейеровой бляшки вновь соответствовала значениям контроля (3,52±±0,26 мм^2).

Количество первичных лимфоидных узелков в составе пейеровой бляшки на протяжении всего эксперимента существенно не менялось. Площадь их уменьшилась (на 47 %) только на 21-е сутки, а на 90-е сутки не отличалась от показателей интактных животных (0,21±0,04 мм^2).

Число вторичных лимфоидных узелков после проведенного курса (на 12-е сутки) снизилась (на 11 %), а площадь их, наоборот, увеличилась (на 14 %) по сравнению с контролем, в большей степени за счет увеличения площадей центров размножения (на 19 %), чем мантийной зоны (на 12 %). На 21-е сутки их количество восстановилось до показателей животных контрольной группы, а площадь узелков возросла еще больше (на 20 %) в сравнении с предыдущим сроком эксперимента и в 1,5 раза превысила показатели контроля (рис. 2). На 90-е сутки число их становится меньше (на 17 %) данных контроля. Показатели площадей вторичных лимфоидных узелков в этот период достигают контрольных значений.

Общая площадь среза брыжеечного лимфатического узла на 12-е сутки эксперимента после внутрибрюшинного введения бортезомиба равна 10,27±0,32 мм^2, что превышает контрольные значения на 16 %.

В этот период морфотип брыжеечного лимфатического узла изменяется с промежуточного у интактных животных (к/м индекс – 1,38±0,08), на компактный тип и имеет самое максимальное для эксперимента значение К/М индекса (1,63±0,08). Вследствие

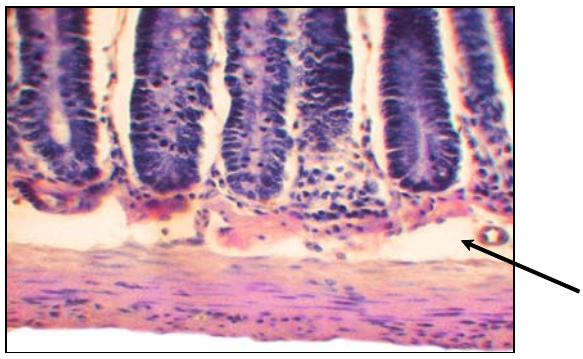

Рис. 1. Стенка тонкой кишки на 12-е сутки после введения бортезомиба. Расширение межклеточных пространств. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, ок. 10

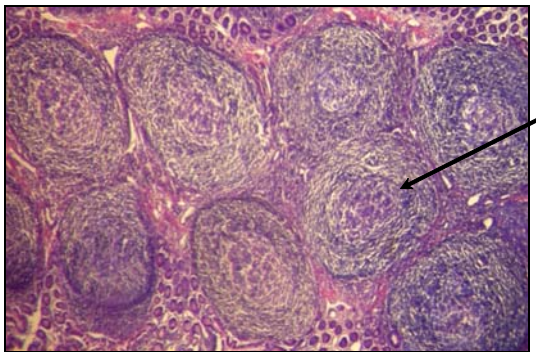

Рис. 2. Преобладание в структуре пейеровой бляшки вторичных лимфоидных узелков на 21-е сутки после введения бортезомиба. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, ок. 10

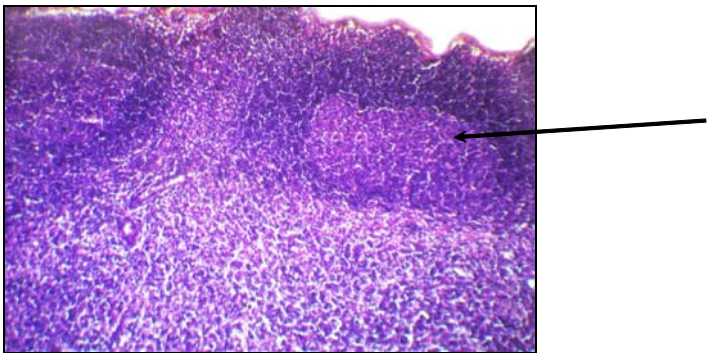

Рис. 3. Вторичные лимфоидные узелки брыжеечного лимфатического узла на 12-е сутки после введения бортезомиба. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, ок. 10

чего можно предположить, что ситуация в регионе требует активации прежде всего детоксикационной функции лимфатического узла.

Площадь коркового вещества увеличивается (на 22 %) по сравнению с таковой у интактных крыс за счет структурных компонентов: площадь паракортикальной зоны увеличилась на 33 %, площадь вторичных лимфоидных узелков возросла в 2 раза, площадь центров размножения в них увеличилась на 25 % (рис. 3). Кроме этого, определяли уменьшение площади первичных лимфоидных узелков почти в 2,5 раза по сравнению с таковой у интактных крыс. Хотя в брыжеечных лимфатических узлах число вторичных лимфоидных узелков увеличивается (на 38 %), а число первичных лимфоидных узелков уменьшается (на 33 %), соотношение между этими показателями остается, как и в контрольной группе животных (число первичных лимфоидных узелков преобладает над соответствующими показателями вторичных лимфоидных узелков более чем в 1,2 раза).

Площадь мозгового вещества на 12-е сутки эксперимента при внутрибрюшинном введении бортезомиба превышает (на 8 %) значения контроля за счет увеличения (на 19 %) площади мозговых синусов.

В этот период в брыжеечных лимфатических узлах В-зависимая зона занимает меньшую часть общей площади среза (26,58±0,68 %), чем Т-зависимая зона (52,65±1,78 %). При сравнении с контрольными данными площади, занимаемые В- и Т-зависимыми зонами, возрастают на 10 и 20 % соответственно.

Общая площадь синусной системы на 12-е сутки равна 1,58±0,11 мм^2, что больше (на 15 %) контрольных значений за счет увеличения главным образом площади мозговых синусов.

На 21-е сутки общая площадь среза брыжеечного лимфатического узла снизилась (на 13 %) по сравнению с 12-ми сутками данного эксперимента и соответствовала значениям контроля.

Значение К/М индекса уменьшается (по сравнению с 12-ми сутками) до 1,45±0,05, но морфотип лимфатического узла в этот период остается компактным, что, по-видимому, связано с потребностью организма в осуществлении в большей степени детоксикационных процессов в регионе лимфосбора.

Площадь коркового вещества уменьшается (на 6 %) по сравнению с предыдущими сутками, но остается больше (на 6 %) значений контроля, что связано с увеличением главным образом площади паракортикальной зоны. Число (6,20±0,86) первичных лимфоидных узелков и их площадь (0,18±0,02 мм^2) меньше показателей контроля в 2 и 3 раза соответственно. Количество и площадь вторичных лимфоидных узелков уменьшаются (на 34 и 51 % соответственно) по сравнению с 12-ми сутками и возвращаются к значениям контроля. Площадь центров размножения вторичных лимфоидных узелков остается на уровне данных предыдущего периода наблюдения и не отличается от показателей интактных животных. Площадь коркового плато в этот период, аналогично 12-м суткам, остается на уровне контрольных значений (0,82±0,06 мм^2).

На 21-е сутки эксперимента площадь мозгового вещества составляет 3,30±0,15 мм^2, что меньше (на 7 %) значений соответствующих показателей на 12-е сутки, но равно контролю. Показатели площадей мозговых синусов соответствуют показателям интактных животных.

Общая площадь синусной системы в брыжеечных лимфатических узлах на 21-е сутки данного эксперимента равна 1,41±0,15 мм^2 и не отличается от контрольных значений (1,35±0,06 мм^2).

Площади Т- и В-зависимых зон уменьшаются в сравнении с 12-ми сутками (на 15 и 13 % соответственно), приходя таким образом к показателям контроля.

На 90-е сутки эксперимента общая площадь среза брыжеечного лимфатического узла равна 8,57± ±0,17 мм^2, что не отличается от показателей интактных животных.

К/М индекс уменьшается (по сравнению с 21-ми сутками) до 1,33±0,08, что равнозначно значениям контроля. По строению лимфатический узел в этот период вновь соответствует промежуточному морфотипу, как и в контроле. Для него, по данным Ю. И. Бородина (1968), характерно оптимальное сочетание транспортной и детоксикационной функций.

Площадь коркового вещества в этот период (4,40± ±0,15 мм^2) снижается (на 8 %) по сравнению со значениями 21-х суток и достигает значений контроля. Количество первичных лимфоидных узелков на 90-е сутки увеличивается почти в 2 раза, а их площадь (0,49±0,04 мм^2) — почти в 3 раза в сравнении с 21-ми сутками, эти показатели возвращаются к контрольным значениям. Показатели вторичных лимфоидных узелков остаются на уровне значений 21-х суток, что также соответствует значениям интактных животных. Площадь паракортикальной зоны уменьшается (на 20 %) по сравнению со значениями на 21-е сутки, возвращаясь к показателям контроля.

На 90-е сутки эксперимента площадь мозгового вещества составляет 3,32±0,15 мм^2, что соответствует значениям в группе контроля. Общая площадь синусной системы в этот период, как и на 21-е сутки, соответствует контрольным значениям.

Площадь Т-зависимой зоны снижается (до 4,21± ±0,13 мм^2), по сравнению с предыдущим сроком, главным образом за счет паракортикальной зоны. Площадь В-зависимой зоны остается на уровне значений 21-х суток. Вследствие чего площади, занимаемые Т- и В-зависимыми зонами, практически равны контрольным.

Химиотерапия приводит к повреждениям эпителиальной выстилки внутренних органов. Через поврежденный эпителий в организм поступает большое количество антигенных веществ, на которые быстро реагируют лимфатические узлы [9]. Таким образом, после внутрибрюшинного введения бортезомиба максимальные изменения в структуре брыжеечного лимфатического узла наблюдали сразу после проведенного курса химиотерапии, на 12-е сутки эксперимента. Морфотип брыжеечного лимфатического узла перестраивается с промежуточного на компактный и имеет самое максимальное значение на 12-е сутки эксперимента. Вследствие чего можно предположить, что ситуация в регионе требует активации детоксикационной функции лимфатического узла. Отмечали преобладание коркового вещества над мозговым почти в 2 раза за счет увеличения преимущественно паракортикальной зоны. Возрастание размеров паракортикальной зоны после введения противоопухолевого препарата может быть связано как с отеком зоны (депонирование большого количества лимфы с высоким содержанием антигенов для длительной обработки), так и с изменением клеточного состава. Увеличение количества и площади лимфоидных узелков с центрами размножения с одновременным уменьшением количества и площади первичных узелков является признаком антигенной стимуляции [10].

Небольшое увеличение площади мозгового вещества, возможно, связано с тем, что в мозговом веществе расположены относительно зрелые клетки, поэтому противоопухолевый препарат оказывает менее выраженное действие на структуры мозгового вещества [10].

Отмечали повышение площади синусной системы за счет увеличения главным образом площади мозговых синусов. Видимо, лимфа депонируется в лимфатических узлах, так как необходимо более длительное время для инактивации токсинов и антигенов, поступивших в лимфатические узлы [10].

Преобладание в структуре узла Т-зависимой зоны свидетельствует об активации клеточного иммунитета, что подтверждает возросшую антигенную нагрузку в регионе лимфосбора и необходимость активации детоксикационной функции лимфатического узла [10].

Выводы

1. После курсового применения противоопухолевого препарата бортезомиба (на 12-е сутки) во всех оболочках подвздошной кишки было обнаружено расширение интерстициальных пространств, в ворсинке — центральных лимфатических сосудов, увеличение площади мозговых синусов в брыжеечных лимфатических узлах, что косвенно свидетельствует об усилении процессов лимфообразования и затруднении оттока лимфы.

2. К началу следующего курса химиотерапии (на 21-е сутки) полного восстановления морфометрических показателей стенки подвздошной кишки и основных звеньев ее лимфатического региона не происходит. В пейеровой бляшке в этот период изменения максимальны, что является морфологическим критерием повышения интенсивности детоксикационных процессов в стенке кишки. Практически полное восстановление показателей регионарного брыжеечного лимфатического узла на 21-е сутки свидетельствует о том, что лимфа, поступающая в него из стенки кишки, является малотоксичной.

3. В отдаленном периоде (на 90-е сутки) все измененные показатели структурных компонентов тонкой кишки и основных звеньев ее лимфатического региона возвращались к значениям контрольной группы.

Библиографический список

1. Macdonald, J. S. Chemotherapy of advanced gastric cancer: present status, future prospects / J. S. Macdonald, J. J. Gohmann // Semin. Oncol. — 1988. — Vol. 15. — № 3. — Suppl. 4. — P. 42—49.

2. Myung, J. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors / J. Myung, K. B. Kim, C. M. Crews // Med Res Rev. 2001 ; 21 (4) : 245.

3. Glickman, M. H. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction / M. H. Glickman, A. Ciechanover // Physiol Rev. 2002 ; 82 (2) : 373.

4. Bodenheimer, H. Jr. Alteration of rat Kupffer cell function following mitomycin-C administration / H. Jr. Bodenheimer, C. Charland, J. Leith // J. Leukoc. Biol. — 1988. — Vol. 43, № 3. — P. 265—270.

5. Sakita, M. Intratumor immunochemotherapy with 5-fluorouracil emulsion and BCG in C3H/HE mice transplanted with MH 134 / M. Sakita, M. Kasuga, T. Yamane // Gann. — 1982. — Vol. 73, № 6. — P. 931—937.

6. Майбородин, И. В. Изменения групповых лимфоидных узелков и брыжеечных лимфатических узлов крыс после введения комплекса химиотерапевтических препаратов: сходство и

различия реакции / И. В. Майбородин, Д. Н. Струкин, В. И. Майбородина // Морфология. — 2007. — Т. 132, № 5. — С. 68—73.

7. Blijlevens, N. M. Drospective avaluation of gut mucosal barrier injury following various myeloablative regimens for haematopoietic stem cell transplant / N. M. Blijlevens, J. P. Donnelly, B. E. Pauw // Bone Marrow Transplant. — 2005. — Vol. 35, № 7. — P. 707—711.

8. Blijlevens, N. M. Measuring mucosal damage induced by cytotoxic therapy / N. M. Blijlevens, B. Van't Land, J. P. Donnelly // Support Care Cancer. — 2004. — Vol. 12, № 4. — P. 227—233.

9. Сходство и различия реакции пейеровых бляшек и брыжеечных лимфатических узлов крыс на полихимиотерапию / И. В. Майбородин [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. — 2005. — Т. 50, № 2—3. — С. 8—13.

10. Майбородина, В. И. Лимфатический регион тонкой и толстой кишки крыс после полихимиотерапии : дис. ... канд. мед. наук / В. И. Майбородина. — Новосибирск, 2003. — 224 с.

СИДЕНКО Надежда Ивановна, аспирантка кафедры анатомии человека.

ПУТАЛОВА Ирина Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека.

Адрес для переписки: 644043, г. Омск, ул. Партизанская, 20.

Статья поступила в редакцию 18.08.2010 г.

© Н. И. Сиденко, И. Н. Путалова

УДК 612.111+543.544.3:547.42+599

И. П. СТЕПАНОВА
А. Г. ПАТЮКОВ
Т. В. ПОСТНОВА
Т. П. МИЦУЛЯ

Омская государственная медицинская академия

Экспертно-криминалистический центр Омской области

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗШИХ СПИРТОВ, АЦЕТАЛЬДЕГИДА, АЦЕТОНА И ДРУГИХ ЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ В КРОВИ МОНО- И ПОЛИГАСТРИЧНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Разработана газохроматографическая методика совместного определения этанола, ацетальдегида и других летучих компонентов в крови млекопитающих. Проведено сравнение содержания этанола и ацетальдегида в крови моно- и полигастричных млекопитающих. Показано, что в организме последних процессы гликолиза сопряжены с процессами спиртового брожения в преджелудках. Предложена математическая модель косвенного определения этанола на основе стандартных биохимических показателей (молочная кислота, глюкоза, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, триацилглицерины).

Ключевые слова: газовая хроматография, этанол, ацетальдегид, кровь.

На сегодняшний день имеется потребность в разработке методики совместного определения содержания этанола и ацетальдегида в тканях млекопитающих, так как отсутствие единого мнения о содержании этих соединений не позволяет в полной мере установить их физиологическую роль и биологическое значение. Доказано, что этанол обладает, прежде всего, метаболической (регулятор проницаемости клеточных мембран, способствует тканевому дыханию, участвует в регуляции обмена нейромедиаторов и гормонов) и энергетической функциями [1]. Данных по ацетальдегиду еще меньше. Именно ему, а не этанолу, приписывается роль одного из основных регуляторов работы дыхательной цепи клетки, причем считается, что свое регуляторное действие он проявляет посредством изменения структурно-функционального состояния убихинона [2]. Нет данных о содержании этанола и ацетальдегида в крови полигастричных млекопитающих.

Этанол и ацетальдегид в основном определяют ферментативной фотоколориметрической методикой, которая является точной, воспроизводимой, достаточно простой в исполнении, однако не позволяет получать данные об уровне ацетальдегида, находящегося в связанном виде.

Более точные значения этих веществ можно получить с помощью газохроматографических методов. Однако используемый алкилнитритный метод