

DOI:10.26693/jmbs02.03.182

УДК 611.843+616-08-07+611.08

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

## ВПЛИВ 2-ЕТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГІДРОКСИПІРИДИНУ СУКЦИНАТУ НА СІТКІВКУ ОКА ПРИ КОРЕКЦІЇ ПАКЛІТАКСЕЛ-ІНДУКОВАНОЇ РЕТИНОПАТІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Івано-Франківський національний медичний університет

deltsova44@gmail.com

В експерименті 72 білим щурам внутрішньоочеревинно вводили паклітаксел (Actavis, Румунія) у дозі 2 мг/кг маси тіла через одну добу 4 рази, сумарна доза – 8 мг/кг, після чого 48 тваринам вводили внутрішньоочеревинно 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат (армадін) у дозі 10 мг/кг (у контролі 24 щура отримували внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій). Встановлено, що при корекції паклітаксел-індукованої ретинопатії армадіном морфометричні показники (товщина сітківки загалом та її шарів) від 1-ї до 28-ї доби виявляють стабільну тенденцію до нормалізації, що вказує на поліпшення її морфофункціонального стану, відновлення шару паличок і колбочок, наближення товщини інших шарів до показників контролю. Від 60-ї доби починається нівелювання позитивного впливу армадіну на сітківку, що проявляється поступовим зменшенням товщини шару паличок і колбочок, зовнішнього ядерного, сітчастого і гангліонарного шарів. На 120-у добу в зовнішньому та внутрішньому ядерних шарах, шарі нервових волокон виявляються ознаки набряку. Товщина сітківки збільшується.

**Ключові слова:** паклітаксел, ретинопатія, армадін.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** 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», № держ. реєстрації 0117U000672.

**Вступ.** Офтальмопатії як прояв побічної дії хіміопрепаратів групи таксанів, що широко використовуються для лікування онкологічних хворих, привертають усе більшу увагу [5]. Автори повідомляють про порушення зору під час або після отримання курсу паклітакселу [4], яке проявляється таким ускладненням як кістозна макулопатія [7]. В останній час за допомогою методу оптичної когерентної томографії встановлено, що у хворих після припинення системної антибластомної хіміотерапії паклітакселом сітківка значно стоншується і залишається такою протягом 3 місяців [2]. У зв'язку з вищезазначеним, питання запобігання або корекції негативного впливу паклітакселу набуває все більшої актуальності [3]. На думку дослідників, проблему ретиноксичності, викликану хіміотерапією, слід розглядати в загальному контексті нейротоксичності, що сприятиме розробці новітніх нейропротекторних стратегій [6].

**Мета дослідження** – вивчити морфометричні показники сітківки при паклітаксел-індукованій ретинопатії за умов корекції 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинатом.

**Матеріал і методи дослідження.** В експерименті 80 рандомбредним білим щурам масою 150-200 г внутрішньоочеревинно 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], після чого тварин рандомізували на I (48 тварин) і II (32 тварин) дослідні групи. У I дослідній групі тваринам вводили внутрішньоочеревинно 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат (Армадін, виробництво ТОВ Науково-виробнича фірма "Мікрохім", Україна) у дозі 10 мг/кг в 0,5 мл води для ін'єкцій. У контрольній групі тварини отримували внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій еквівалентного

об'єму. 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат – мембранопротектор, антиоксидант, належить до засобів, що впливають на нервову систему. У нормі морфометричні показники визначили на 10 інтактних тваринах.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Матеріал для дослідження (очні яблука) забирали через 1, 7, 14, 21, 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 Tourcam UHCCD5100KPA з програмним забезпеченням TourView виробництва Tourtek 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.

Встановлено, що в інтактних тварин (норма) товщина шару паличок і колбочок становить  $(22,64 \pm 0,19)$  мкм, зовнішнього ядерного –  $(40,98 \pm 0,24)$  мкм, зовнішнього сітчастого –  $(6,08 \pm 0,09)$  мкм, внутрішнього ядерного –  $(18,92 \pm 0,16)$  мкм, внутрішнього сітчастого –  $(28,04 \pm 0,25)$  мкм, гангліонарного –  $(5,33 \pm 0,06)$  мкм, нервових волокон –  $(3,02 \pm 0,08)$  мкм. Загалом товщина сітківки досягає  $(125,01 \pm 0,15)$  мкм. У групі контролю морфометричні показники сітківки в усі терміни спостережень достовірно не відрізнялись від параметрів інтактних тварин.

Через 1 добу після припинення введення армадіну (11 діб після останнього введення паклітакселу) шар паличок і колбочок має рівномірну товщину (рис. 1).

Між зовнішніми сегментами фоторецепторних нейронів трапляються розширення. При морфометричному дослідженні відзначено його потовщення до  $(16,97 \pm 0,24)$  мкм, тоді як у тварин II групи товщина цього шару становила  $(10,15 \pm 0,15)$  мкм,  $p < 0,05$ . Зовнішній ядерний шар містить набряклі ділянки між групами ядер і має товщину  $(30,86 \pm 0,27)$  мкм, тоді як у тварин II групи –  $(32,95 \pm 0,21)$  мкм,  $p > 0,05$ . Зовнішній сітчастий шар потовщав до  $(6,40 \pm 0,13)$  мкм, проти  $(4,06 \pm 0,07)$  мкм у тварин II групи,  $p < 0,05$ . Сюди з

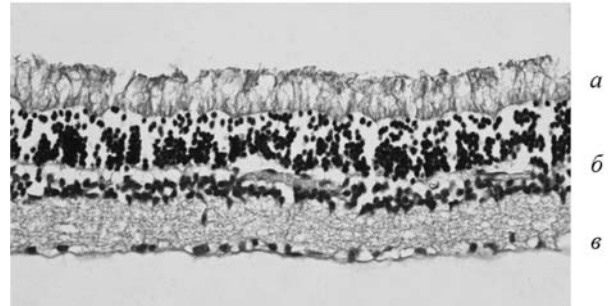


Рис. 1. Рівномірна ширина шару паличок і колбочок (а), переміщення ядер фоторецепторних нейронів у зовнішній сітчастий шар (б), стоншення гангліонарного шару (в) і набряк його нейронів. Термін дослідження – 1 доба після останнього введення армадіну. Мікрофотографія. Заб.: гематоксилін і еозин. Зб.: x288

зовнішнього ядерного шару перемістилися ядра фоторецепторних нейронів. Товщина внутрішнього ядерного шару становила  $(22,79 \pm 0,28)$  мкм, що на 8,8% більше, ніж у тварин без корекції,  $p > 0,05$ . Внутрішній сітчастий шар рівномірно заповнений сітчастими структурами і розширений до  $(38,48 \pm 0,32)$  мкм – на 5,5%, порівняно з тваринами II групи,  $p > 0,05$ . Між відростками нейронів трапляються пухирі невеликих розмірів. Гангліонарний шар став тоншим на 45,1%, проти показника II групи,  $p < 0,05$ . Нейрони в ньому розташовуються нерівномірно групами в один ряд із широкими проміжками між ними. Ядра окремих гангліонарних нейронів втратили округлість, а їхня нейроплазма набрякла. Шар нервових волокон став товстшим на 18,59%,  $p < 0,05$ . Товщина сітківки, загалом, була на 0,9% меншою від показника тварин II групи, складаючи, відповідно  $(121,66 \pm 0,23)$  мкм і  $(122,76 \pm 1,17)$  мкм,  $p > 0,05$ .

Морфометрична картина при 7-денному терміні дослідження показала, що найбільші зміни виявлені в шарі паличок і колбочок. Поверхня, обернена до пігментного шару, рівна. Переміщення ядер із зовнішнього ядерного шару сюди трапляються рідко. Товщина шару паличок і колбочок зросла до  $(20,01 \pm 0,13)$  мкм, проти  $(9,81 \pm 0,09)$  мкм у тварин II групи,  $p < 0,05$ , за рахунок видовження зовнішніх сегментів фоторецепторних клітин. Зовнішній ядерний шар розширився до  $(36,44 \pm 0,15)$  мкм (на 16,32% від 1-ї доби експерименту). У цьому шарі ядра фоторецепторних клітин розміщуються нещільно. Зовнішній сітчастий шар має нечіткі контури через те, що до нього переміщуються нейрони з сусідніх шарів, він став дещо вужчим –  $(6,29 \pm 0,07)$  мкм, порівняно з 1-ю добою –  $(6,40 \pm 0,13)$  мкм,  $p > 0,05$ . Внутрішній ядерний і гангліонарний шари розширилися, порівняно з попереднім терміном дослідження. Нейрони цих шарів містять великі округлі ядра. Внутрішній сітчастий шар звужився до  $(32,72 \pm 0,15)$  мкм, порівняно з попереднім терміном. Товщина сітківки зросла до  $(137,11 \pm 0,69)$  мкм, тоді як у тварин II групи величина

цього показника зменшилася, порівняно з попереднім терміном досліджу.

14-а і 21-а доби виявили в динаміці поступові кроки в напрямку стабілізації і нормалізації морфофункціонального стану сітківки. Особливо це помітно в шарі паличок і колбочок, товщина якого становила, відповідно,  $(21,30 \pm 0,27)$  мкм і  $(24,60 \pm 0,35)$  мкм; у зовнішньому ядерному –  $(39,76 \pm 0,41)$  мкм і  $(40,01 \pm 0,53)$  мкм; у внутрішньому ядерному –  $(20,47 \pm 0,23)$  мкм і  $(20,24 \pm 0,57)$  мкм і гангліонарному –  $(10,11 \pm 0,19)$  мкм і  $(8,16 \pm 0,37)$  мкм шарах сітківки. Товщина сітківки тварин I групи склала, відповідно,  $(136,02 \pm 0,08)$  мкм і  $(136,32 \pm 0,18)$  мкм, проти  $(111,56 \pm 0,78)$  мкм і  $(113,60 \pm 0,54)$  мкм при некоригованій ретинопатії,  $p < 0,05$ .

На 27-у добу односпрямованості змін не спостерігали, хоча показники товщини шарів сітківки незначно відрізнялися від норми (рис. 2). Так, товщина шарів паличок і колбочок, зовнішнього ядерного і сітчастого, внутрішнього сітчастого, нервових волокон зменшувалися, а внутрішнього ядерного і гангліонарного почали зростати. Товщина сітківки зменшилася до  $(131,53 \pm 0,18)$  мкм, у тварин II групи –  $(116,26 \pm 0,92)$ , у нормі –  $(125,01 \pm 0,15)$  мкм.

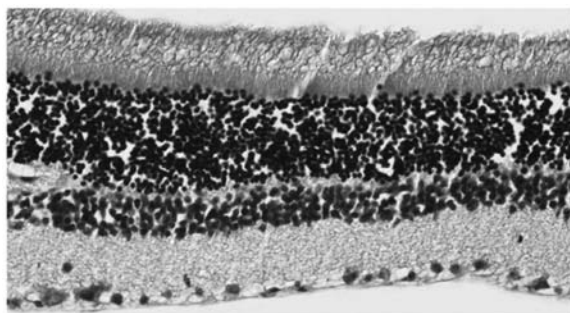
Позитивний вплив армадіну проявлявся у зростанні впорядкованості розташування зовнішніх сегментів паличок і колбочок; зменшення деформації ядер дво- і багатополюсних нейронів; у зовнішньому сітчастому шарі частіше виявлялися горизонтальні нейрони, а у внутрішньому сітчастому – амакринні. У внутрішньому судинному сплетенні сітківки, яке розташовується між гангліонарним шаром і шаром нервових волокон, визначалися капіляри.

Із 60-ї до 90-ї доби експерименту вектор морфометричних змін сітківки тварин II дослідної групи прямує до зменшення показників товщини її шарів, окрім зовнішнього і внутрішнього сітчастого. Товщина шару паличок і колбочок складає, відповідно,  $(21,62 \pm 0,16)$  мкм і  $(20,38 \pm 0,15)$  мкм; зовнішнього ядерного –  $(38,49 \pm 0,19)$  мкм і  $(36,09 \pm 0,14)$  мкм; внутріш-

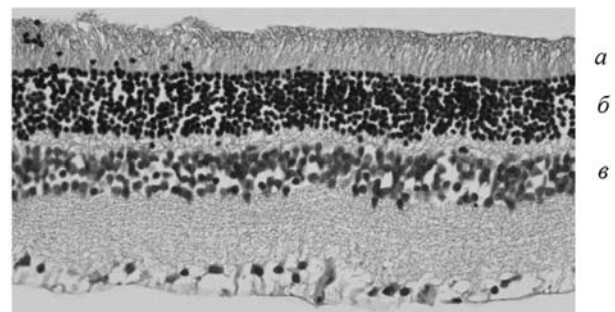
нього ядерного –  $(20,69 \pm 0,14)$  мкм і  $(17,79 \pm 0,19)$  мкм; гангліонарного –  $(9,71 \pm 0,11)$  мкм і  $(8,92 \pm 0,09)$  мкм. Загалом, товщина сітківки зменшилася від  $(125,76 \pm 0,14)$  мкм на 60-у добу до  $(123,89 \pm 0,13)$  мкм на 90-у добу. Водночас, товщина зовнішнього сітчастого зросла від  $(5,97 \pm 0,11)$  мкм на 60-у добу до  $(6,36 \pm 0,07)$  мкм на 90-у добу. У тварин із некоригованою паклітаксел-індукованою ретинопатією товщина зовнішнього ядерного шару, навпаки, зростає від 60-ї до 90-ї доби на 6,37%; зовнішнього сітчастого – на 6,96%; внутрішнього ядерного – на 11,85%; внутрішнього сітчастого – на 11,51%. Натомість, залишаються вірогідно стоншеними шари паличок і колбочок, гангліонарний і нервових волокон. Загалом, товщина сітківки тварин II групи зменшилася від  $(137,02 \pm 1,34)$  мкм на 60-у добу до  $(112,06 \pm 0,64)$  мкм на 90-у добу,  $p < 0,05$ .

На 120-у добу після останнього введення армадіну, порівняно з 90-ю добою, триває зменшення товщини шару паличок і колбочок; зовнішній ядерний змінився незначно; зовнішній і внутрішній сітчасті, гангліонарний стоншилися; внутрішній ядерний і шар нервових волокон – розширились. Товщина сітківки при цьому дещо зросла до  $(128,66 \pm 0,24)$  мкм. Збільшення товщини сітківки відбулося, головним чином, за рахунок набряку внутрішнього ядерного шару (рис. 3).

Виявлені морфологічні прояви позитивного впливу армадіну на сітківку пов'язані, ймовірно, із фармакологічними властивостями препарату, який є інгібітором вільнорадикальних процесів, мембранопротектором, чинить антигіпоксичну дію, покращує мікроциркуляцію та реологічні властивості крові; спричиняє посилення компенсаторної активації аеробного гліколізу та зниження ступеня пригнічення окисних процесів у циклі Кребса в умовах гіпоксії з підвищенням вмісту аденозинтрифосфату (АТФ) і креатинфосфату, активацію енергосинтезувальних функцій мітохондрій, стабілізацію клітинних мембран [8]. Отримані нами результати підтверджують думку



**Рис. 2.** Упорядкованість розташування зовнішніх сегментів паличок і колбочок (а), округлість ядер дво- і багатополюсних нейронів сітківки. Термін досліджу – 27 діб після останнього введення армадіну. Мікрофотографія. Заб.: гематоксилін і еозин. Зб.:  $\times 288$



**Рис. 3.** Зменшення товщини шару паличок і колбочок (а), набряк зовнішнього (б) і внутрішнього (в) ядерних шарів. Термін досліджу – 120 діб після останнього введення армадіну. Мікрофотографія. Заб.: гематоксилін і еозин. Зб.:  $\times 288$

про те, що Армадін (Мексидол) сприяє збереженню гангліонарних клітин сітківки та волокон зорового нерва при прогресуючій нейропатії, наслідками якої є хронічна ішемія і гіпоксія.

Таким чином, застосування армадіну в схемах хіміотерапії з використанням паклітакселу може сприяти збереженню функції сітківки і зорового нерва, що, однак, потребує подальших експериментальних та клінічних досліджень.

#### Висновки

1. Корекція армадіном паклітаксел-індукованої ретинопатії показала, що морфометричні показники (товщина окремих шарів і сітківки загалом) у терміни від 1-ї до 28-ї доби виявляють стабільні показники поліпшення морфо-функціонального стану сітківки – відновлення шару паличок і колбочок, наближення показників товщини інших її шарів до показника норми.

2. Від 60-ї доби починається поступове нівелювання позитивного впливу армадіну на сітківку, що проявляється поступовим зменшенням товщини шару паличок і колбочок, зовнішнього ядерного і сітчастого та гангліонарного шарів.

3. На 120-у добу в зовнішньому та внутрішньому ядерних шарах, шарі нервових волокон виявляються ознаки набряку. Товщина сітківки збільшується.

**Перспективи подальших досліджень.** Застосування армадіну як мембранопротектора і антиоксиданта в якості нейропротектора в експерименті продемонструвало його позитивний вплив на морфо-функціональний стан сітківки ока, що дозволяє прогнозувати доцільність використання препарату з метою запобігання або зниження вираженості паклітаксел-індукованої ретинопатії в клініці.

#### References

1. Polomano RC, Mannes FJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, Paclitaxel. *Pain*. 2001; 94 (3): 293-304.
2. Bakbak B, Gedik S, Koktekir BE, Yavuzer K, Tulek B, Kanat F, Pancar E. Assessment of ocular neurotoxicity in patients treated with systemic cancer chemotherapeutics. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014; 33 (1): 7-10. DOI: 10.3109/15569527.2013.787087.
3. Ishibashi T. Comprehensive strategy for retinal neuroprotection. Challenging the clinical application. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2012; 116 (3): 165-98.
4. Ito S, Okuda M. A case of cystic maculopathy during paclitaxel therapy. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2010; 114 (1): 23-7.
5. Modi D, Dubovy SR. Non-leaking Cystoid Maculopathy Secondary to Systemic Paclitaxel. *Ophthalmic Surg Lasers Imag Retina*. 2013; 44 (2): 183-6. DOI: 10.3928/23258160-20130218-01
6. Park SB, Krishnan AV, Lin CS, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr Med Chem*. 2008; 15 (29): 3081-94.
7. Rahimy E, Sarraf D. Cystoid macular edema secondary to nanoparticle albumin-bound Paclitaxel therapy. *Ophthalmic Surg Lasers Imag Retina*. 2013; 44 (2): 187-9. DOI: 10.3928/23258160-20130212-02.
8. Digital resource: <http://compendium.com.ua/akt/77/523/mexidolum>.

УДК 611.843+616-08-07+611.08

#### ВЛИЯНИЕ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА СЕТЧАТКУ ГЛАЗА ПРИ ПАКЛИТАКСЕЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕТИНОПАТИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

**Резюме.** В эксперименте 72 белым крысам внутрибрюшинно вводили паклитаксел (Actavis, Румыния) в дозе 2 мг/кг массы тела через одни сутки 4 раза, суммарная доза - 8 мг/кг, после чего 48 животным вводили внутрибрюшинно 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат (Армадин) в дозе 10 мг/кг (в контроле 24 крысы получали внутрибрюшинно воду для инъекций). Установлено, что при коррекции армадином паклитаксел-индуцированной ретинопатии морфометрические показатели (толщина слоев и сетчатки в целом) от 1 сут до 28 сут выявляют стабильные показатели улучшения морфо-функционального состояния сетчатки – восстановление слоя палочек и колбочек, приближение показателей других слоев сетчатки к норме. От 60 сут начинается нивелирование положительного влияния армадина на сетчатку, что проявляется постепенным уменьшением толщины слоя палочек и колбочек, наружного ядерного, сетчатого и ганглионарного слоев. На 120 сут в наружном и внутреннем ядерных слоях, слое нервных волокон выявляются признаки отека. Толщина сетчатки увеличивается.

**Ключевые слова:** паклитаксел, ретинопатия, армадин.

UDC 611.843+616-08-07+611.08

### The Effect of 2-Ethyl-6-Methyl-3-Hydrooxypyridine Succinate in Correcting Paclitaxel-Induced Retinopathy

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

**Abstract.** In the run of experiment 72 white rats received intraperitoneal injections of Paclitaxel (Actavis, Romania) dosed 2 mg/kg of body weight, 4 times every 24 hours; the total dosage equaled 8 mg/kg. The following step was to inject 48 animals with 2-ethyl-6-methyl-3-hydrooxypyridine succinate (Armadin) at the dosage of 10 mg/kg of body weight (the control group of animals received intraperitoneal injections of water for injection). We have found out that the Armadin correction of Paclitaxel-induced retinopathy improves the morphometric indexes (the thickness of layers and retina) from the 1<sup>st</sup> to the 28<sup>th</sup> day: the layer of rods and cones is renovated; other layers are close to norm indexes. On the first day after the terminaton of Armadin injections the layer of rods and cones has even thickness and has become thicker up to (16,97±0,24) mkm, while in the control group the layer in question was (10,15±0,15) mkm,  $p < 0,05$  thick.

In 7 days time the layer thickness grew to be (20,01±0,13) mkm versus the thickness in the control group, which was (9,81±0,09) mkm,  $p < 0,05$ . The thickness of retina increased to (137,11±0,69) mkm, while it decreased in the control group.

On the 15<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> days the changes towards stabilizing and normalizing of the morpho-functional state of retina, especially in the layer of rods and cones, whose thickness grew to (21,30±0,27) mkm and (24,60±0,35) mkm. The thickness of the outer nuclear layer was (39,76±0,41) mkm and (40,01±0,53) mkm; the inner nuclear layer became (20,47±0,23) mkm and (20,24±0,57) mkm; ganglionic layer equaled to до (10,11±0,19) mkm and (8,16±0,37) mkm. These indexes were close to norm.

On the 28<sup>th</sup> day the general tendency of changes was not so unanimous as before. The thickness indexes differed consistently from norm. The retina thickness dropped to (131,53±0,18) mkm, while in the control group it was (116,26±0,92), and the norm was (125,01±0,15) mkm. To positive changes we may refer the orderly location of the outer segments of rods and cones; the roundness of nuclei in two- and multipolar neurons; the outer plexiform layer contained horizontal neurons, and the inner plexiform layer contained amacrine cells. We also observed more capillaries in the inner retinal plexus between ganglionic and optic fiber layers.

Starting from Day 60 the positive effect of Armadin decreases, the retina layer morphometric indexes, except for the inner and outer plexiform layers, get thinner both in the experiment and in the control group.

On Day 120 the inner and outer nuclear layers as well as the optic fiber layer reveal the signs of swelling. The retina thickness grows.

The morphological changes discovered may be caused by the pharmacological properties of Armadin, namely, the inhibition of free radical processes, protection of membranes, antihypoxic effect, improvement of blood microcirculation and its rheological properties. The results obtained in the run of the experiment confirm that Armadin (syn. Mexidol) contributes to preserving ganglionic cells of the retina and optic nerve fibers in progressing neuropathy whose results would be chronic ischemia and hypoxia. Applying Armadin in Paclitaxel-containing chemotherapies may help preserve the functions of retina and optic nerve, which requires further research.

**Keywords:** Paclitaxel, retinopathy, Armadin.

Стаття надійшла 21.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування