

Є.М. Мамотюк,
О.П. Лукашова,
О.К. Кононенко,
С.І. Ревенкова,
В.А. Гусакова

Інститут медичної радіології
ім.С.П. Григор'єва
АМН України,
м. Харків

Гематологічні, морфологічні та ультраструктурні ефекти при поєднаній дії циклофосфану та металоорганічного комплексу на інтактних щурів

Hematological, morphological and ultrastructure effects of simultaneous action of cyclophosphane and metal organic complex on intact rats

Цель работы: Изучение нарушений в системе гемопоэза в слизистой оболочке тонкой кишки, печени, клетках легких при действии высокой дозы циклофосфана, оценка антитоксического влияния на организм комплексного металлоорганического препарата.

Материалы и методы: На 70 крысах массой 160–200 г изучено действие циклофосфана в суммарной дозе 80 мг/кг массы тела и влияние металлоорганического комплекса, вводимого до и после применения цитостатика, в дозе 25 мг/кг. На 3, 7-е и 14-е сутки исследовали гематологические изменения, клеточность костного мозга, морфологию печени, ультраструктуру легких и тонкой кишки.

Результаты: Циклофосфан в токсической дозе угнетает у крыс костномозговое кроветворение, снижает уровень лейкоцитов в крови и вызывает нарушения ультраструктуры клеток легких и тонкого кишечника.

Применение комплексного металлоорганического препарата способствует сохранности ультраструктуры пневмоцитов и энтероцитов, слабо действует на восстановление миелобластов и вызывает появление в печени очагов экстремедуллярного кроветворения. Препарат ускоряет восстановление количества лейкоцитов в крови до исходного уровня и значительно активизирует защитные макрофагальную и лимфоцитарную реакции в тканях организма.

Выводы: У интактных крыс препарат ослабляет токсическое действие циклофосфана на кроветворение, клетки легких, тонкого кишечника и печени и стимулирует макрофаги и лимфоциты.

Ключевые слова: циклофосфан, профилактика токсичности, гематология, ультраструктура, морфология тканей.

Objective: To study the disturbances in the system of hemopoiesis in the mucous membrane of the small intestine as well as liver and lungs at administration of high doses of cyclophosphane and to evaluate antitoxic influence of metal organic drugs.

Material and Methods: Seventy rats weighing 160–200 g were used to study the action of cyclophosphane at a total dose of 80 mg/kg of the body mass and the effect of metal organic complex administered at a dose of 25 mg/kg before and after the cytostatic administration. Hematological changes, bone marrow cells, liver structure, lung and small intestine ultrastructure were studied on the 3rd, 7th and 14th days.

Results: The toxic dose of cyclophosphane inhibited bone marrow hemopoiesis, reduced the level of leukocytes in the blood and caused ultrastructure disturbances in the cells of the lungs and small intestine of the rats.

The use of complex metal organic preparation preserved the ultrastructure of pneumocytes and enterocytes, and produced the foci of extramedullar hemopoiesis in the liver. Its action on restoration of myeloblasts was insignificant. The preparation accelerated restoration of the leukocyte count in the blood up to the initial level and activated protective macrophag and lymphocyte reaction in the tissues of the organism.

Conclusion: In intact rats, the drug reduces the toxic effect of cyclophosphane on hemopoiesis as well as the cells of the lungs, small intestine and liver and stimulates macrophages and lymphocytes.

Key words: cyclophosphane, toxicity prevention, hematology, ultrastructure, tissue morphology.

Застосування хемотерапевтичних препаратів у онкологічній практиці є одним із загальноприйнятих заходів лікування хворих. Водночас відомо, що цитостатики, зокрема циклофосфан, не тільки пригнічують зростання злоякісних клітин, але й мають негативні побічні ефекти на здорові тканини, що спричиняє різні ускладнення в хворих.

Вексперименті та в клініці показано, що циклофосфан у токсичних дозах впливає на гемопоез, має значну гепатотропність, порушує функціональну активність печінкових клітин, впливає на діяльність нирок, знижує функцію щитоподібної залози, викликає атрофічні та дистрофічні зміни слизових оболонок шлунково-кишкового тракту. Відхилення спостерігають і в інших органах. Характерним для токсичної дії циклофосфану є зменшення в крові та органах лімфоїдних елементів, па-

діння фагоцитарної активності лейкоцитів, що призводить до пригнічення імунологічних реакцій організму [1].

При проведенні протипухлинної хемотерапії в клініці враховують негативний вплив цитостатика на кроветворну систему і, в разі виявлення відхилень, застосовують відповідні гемостимулятивні засоби.

Одним із них є препарат, розроблений у Київському інституті фармакології та токсикології АМН України, що являє собою комплекс d-перехідних металів з амінокарбоновою кислотою та добавками вітамінів [2]. В умовах дії радіації цей препарат позитивно впливає на кроветворення [3].

Метою даного експериментального дослідження було вивчення порушень у системі гемопоезу, слизовій оболонці тонкої кишки, печінці та клітинах легень при дії високої дози

циклофосфану, а також оцінка антикоагулянтного впливу на організм комплексного металоорганічного препарату.

Методика дослідження

Дослідження проводили на 70 щурів-самців лінії Вістар з масою тіла 160–200 г, поділених на три групи. Тваринам першої з них внутрішочеревинно вводили циклофосфан (ОАО «Київмедпрепарат») у дозі 40 мг/кг маси тіла дворазово через добу. Щурам другої групи за 3 доби до застосування циклофосфану в зазначеній дозі й далі щоденно протягом 7 діб внутрішлунково вводили металоорганічний комплекс у дозі 25 мг/кг. За контроль правила група інтактних тварин.

Щурів забивали з дотриманням правил евтаназії на 3, 7-му та 14-ту добу після останнього введення циклофосфану. У периферичній крові визначали кількість лейкоцитів, тромбоцитів, еритроцитів та вміст гемоглобіну за допомогою автоматичного аналізатора фірми «Sysmex». Кількість мієлокаріоцитів у кістковому мозку на стегно підраховували в камері Горяєва.

Морфологічний стан печінки вивчали гістологічно після фіксації тканини в 10 %-вому формальдегіді, заключення у парафін з подальшим забарвленням зрізів у гематоксилін-еозині.

Електронно-мікроскопічне вивчення легень та тонкої кишки проводили стандартними методами [4]. Тканини фіксували спочатку в глютаральдегідному фіксаторі за Карновським, потім в осмієвому фіксаторі за Паладе. Після дегідратації у розчинах етанолу зі зростаючою концентрацією та абсолютному ацетоні матеріал заливали в суміш епоксидних смол (епон-аралдит). Ультратонкі зрізи робили на ультратримікромомі УМТП-4 Сумського ВО «Електрон» (Україна), контрастували солями свинцю та урану й переглядали в електронному мікроскопі EM-125 того ж ВО з прискорюючою напругою 75 кВ.

Усі кількісні показники було оброблено статистично на Intel Pentium MMX 200 за допомогою програмного пакета STATISTICA/w (США).

Результати та їх обговорення

При вивченні впливу циклофосфану на систему гемопоезу було встановлено, що на 3-тю добу після його останнього введення у щурів виявляється глибока лейкопенія, причому кількість лейкоцитів становить $10,9 \pm 1,9\%$ порівняно з групою біологічного контролю (див. таблицю). Через 7 та 14 діб вираженість лейкопенії в щурів дещо зменшується, але залишається на вірогідно зниженому рівні ($40,9 \pm 9,7\%$ та $45,3 \pm 11,2\%$ від контролю відповідно).

Застосування металоорганічного препарату запобігає падінню рівня лейкоцитів після одержання циклофосфану. Так, на 3-тю добу вміст лейкоцитів становить $33,8 \pm 7,1\%$ відносно групи біологічного контролю, що значуще відрізняється від показників в щурів, яким вводили тільки циклофосфан, через тиждень — $56,0 \pm 6,3\%$ від контролю, а через два тижні повністю відновлюється, досягаючи значень контрольної групи ($106,6 \pm 11,2\%$).

Після введення циклофосфану значуще падіння рівня тромбоцитів відзначається тільки на 3-тю добу, тоді як на 7-му та, особливо, на 14-ту цей показник не відрізняється від норми. Застосування препарату сприяє дещо меншому зниженню кількості кров'яних пластинок у ранній термін (3-тя доба) та вірогідному зростанню їх рівня на 7-му добу порівняно з групою щурів, які одержували циклофосфан.

Характерним для дії циклофосфану на показники червоної крові є вірогідне зменшення вмісту еритроцитів та гемоглобіну в усі терміни дослідження, яке досягає на 14-ту добу $45,3 \pm 5,8\%$ та $71,6 \pm 5,0\%$ від контрольних значень відповідно. Введення металоорганічного препарату тваринам, які одержували циклофосфан, дещо згладжує процес розвитку в них анемії, про що свідчить значуще підвищення рівня еритроцитів у крові на 7-му та 14-ту доби.

Циклофосфан у токоємній дріз викликає істотне пригнічення кісткового мозкового кровотворення. Так, на 3-тю добу в щурів, яким вводили циклофосфан, розвивається виражена мієлоїдна гіпоплазія, при якій кількість мієлокаріоцитів становить $1,3\%$ від контролю. У подальші терміни кількість цих клітин дещо зростає, залишаючись при цьому на вірогідно зниженому рівні. Введення препарату практично не впливає на процеси кровотворення у кістковому мозку. Спостерігається лише тенденція до збільшення його клітинності, яка в більшості термінів не досягає вірогідних значень.

Одержані дані свідчать про стимулювальну дію металоорганічного препарату на білий ристок кровотворення в щурів, які одержували циклофосфан. Однак це не збігається зі значним зниженням процесів гемопоезу в кістковому мозку цих тварин.

Проте гістологічні дослідження печінки показали, що після застосування препарату серед гепатоцитів з'являються невеликі згрупування округлих інтенсивно базofil'них мієлобластних клітин стимульованого екстрамедулярного кровотворення, що може пояснювати явища поновлення вмісту лейкоцитів на фоні низького рівня мієлокаріоцитів (рис. 1).

Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що введення циклофосфану призводить до помітних змін тонкої будови легень. Спостерігається значний набряк цитоплазми епітеліальних та ендотеліальних клітин, поява товстих пучків колагенових волокон в інтерстиції та окремих капілярах (рис. 2). Із капілярів зникають клітини білої крові. Пневмоцити II типу змінюються мало, тоді як знач-

Термін дослідження, доба	Дослід					
	біологічний контроль		циклофосфан		циклофосфан + препарат	
	n	($\bar{X} \pm S_x$)	n	($\bar{X} \pm S_x$)	n	($\bar{X} \pm S_x$)
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$						
3-тя	13	$8,22 \pm 0,53$	6	$0,90 \pm 0,15^*$	6	$2,78 \pm 0,58^{**}$
7-ма			6	$3,36 \pm 0,80^*$	6	$4,60 \pm 0,52^*$
14 та			6	$3,72 \pm 0,92^*$	6	$8,76 \pm 0,92^{**}$
Тромбоцити, $10^9/\text{л}$						
3-тя	13	$642,7 \pm 39,9$	6	$98,7 \pm 14,4^*$	6	$176,8 \pm 44,2^*$
7-ма			6	$414,0 \pm 96,7$	6	$752,0 \pm 66,9^{**}$
14 та			6	$552,8 \pm 117,9$	6	$579,0 \pm 87,0$
Еритроцити, $10^{12}/\text{л}$						
3-тя	13	$8,04 \pm 0,19$	6	$5,77 \pm 0,22^*$	6	$6,30 \pm 1,00^*$
7-ма			6	$5,13 \pm 0,40^*$	6	$6,68 \pm 0,25^{**}$
14 та			6	$3,64 \pm 0,47^*$	6	$5,35 \pm 0,40^{**}$
Гемоглобін, г/л						
3-тя	13	$145,8 \pm 4,5$	6	$108,6 \pm 3,9$	6	$120,4 \pm 1,8^*$
7-ма			6	$95,3 \pm 9,9^*$	6	$125,3 \pm 7,0$
14 та			6	$104,4 \pm 7,6^*$	6	$117,6 \pm 3,5^*$
Міелокаріоцити, $10^6/\text{стегно}$						
3-тя	13	$143,8 \pm 9,3$	6	$1,9 \pm 0,5^*$	6	$5,8 \pm 1,1^{**}$
7-ма			6	$15,0 \pm 0,1^*$	6	$38,7 \pm 20,1^*$
14 та			6	$36,6 \pm 7,2^*$	6	$56,8 \pm 16,6^*$

Примітка. Вірогідно порівняно: * – з контролем, $p < 0,05$; ** – з циклофосфаном, $p < 0,05$.

но активізуються макрофаги, поверхня яких розростається, цитоплазма заповнюється численними органелами, серед яких переважають первинні та вторинні лізосомий фагосоми, що може свідчити про поглинення матеріалу зруйнованих клітин тканини легень.

Застосування препарату тваринам, які одержували цитостатик, мало впливає на процеси колагенізації в аерогематичному бар'єрі, тоді як притаманний дії циклофосфану набряк цитоплазми епітеліо- та ендотеліоцитів зовсім відсутній. У капілярах знов виявляються нейтрофільні лейкоцити, яких немає при введенні одного циклофосфану, що, можливо, є результатом стимулювального впливу препарату на гемопоєз. Ще більше активізуються макрофаги, в цитоплазмі яких містяться не тільки первинні та вторинні лізосоми, але й окремі фагоцитовані клітини (рис. 3). Не змінюється лише тонка будова альвеолоцитів II типу.

Про негативний вплив хемопрепарату на клітини тонкого кишечника свідчать явища

ураження ентероцитів крипт, в яких з'являються вторинні лізосоми та аутофагосоми, чого немає в інтактних тварин (рис. 4). Майже повністю зникають ентерохромафінні клітини. Характерною для дії циклофосфану є відсутність гранулярних та еозинофільних лейкоцитів у кишковій стромі ворсинок, що може бути результатом дії циклофосфану на кістковий мозок, та поява макрофагів із розвиненою цитоплазмою, яка вміщує великі фагосоми. Останнє може бути пов'язане з деструктивними процесами в тканині кишечника. Спостерігається також значний набряк цитоплазми ендотеліоцитів капілярів.

В умовах дії хемопрепарату та металоорганічного комплексу не відзначається ознак ураження недиференційованих клітин крипт, а сполучно-тканинна строма ворсинок збагачується гранулярними та еозинофільними лейкоцитами, серед яких з'являються нейтрофіли. Виявляються також моноцити та їх активовані форми, що вказує на значну стимуляцію

макрофагальної реакції та сприяє очищенню тканини від зруйнованого матеріалу. Спостерігається інфільтрація стромі лімфоцитами та масовий перехід їх до епітеліального шару (рис. 5). Міжепітеліальні лімфоцити (МЕЛ) є Т-клітинами, які виконують роль Т-супресорів та стимулюють регенерацію ентероцитів [5]. Активація МЕЛ може бути захисною імунологічною реакцією, яку викликає дія металоорганічного препарату. Все це свідчить про те, що введення металоорганічного комплексу щурям, підданим впливу циклофосфану, запобігає ураженню ентероцитів тонкої кишки, стимулює макрофагальну та лімфоцитарну реакцію і призводить до збагачення стромі лейкоцитами.

Проведені дослідження дають підстави вважати, що в умовах токсичного впливу на щурів циклофосфану введення їм випробуваного комплексного металоорганічного препарату сприяє захисту ультраструктур клітин легень та тонкого кишечника, зменшенню ураження печінкової тканини та утворенню в ній осередків екстрамедулярного кровотворення, що забезпечує, очевидно, поновлення альтернативного гемопоезу, не пов'язаного з продукцією кровотворних клітин у кістковому мозку.

Привертає увагу певний збіг в особливостях захисного ефекту комплексного металоорганічного препарату при дії високої дози цитостатика та йонізуючої радіації [3]. Застосований в однаковій дозі препарат має антиоксидантну та протирадіаційну активність, очевидно, внаслідок спільних точок прикладення до єдиних мішеней цих двох різнорізних ушкоджувальних факторів. Дійсно, за даними [1], циклофосфан уражує дві життєво важливі системи клітин – ядерний апарат (ДНК) та їх мембрани, що властиво саме йонізуючому випромінненню. З наших даних випливає, що в інтактних щурів критичними органами для циклофосфану є вельми радіочутливі кістковий мозок та клітини кишечника. Все це вказує на справедливості припущення про спільний вільнорадикальний характер механізму ушкодження клітинних структур при опромінюванні та впливі цитостатика. На користь цього свідчить гіпотеза В.А. Барабоє та ін. [6] про те, що при дії на організм агресивних агентів в найрізноманітнішій природі (хвильове випроміннення, введення токсичних речовин, цитостатиків тощо) виникає «променевиї стрес», який супроводжується активацією перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран. З цієї позиції стає зрозумілим позитивний ефект пре-

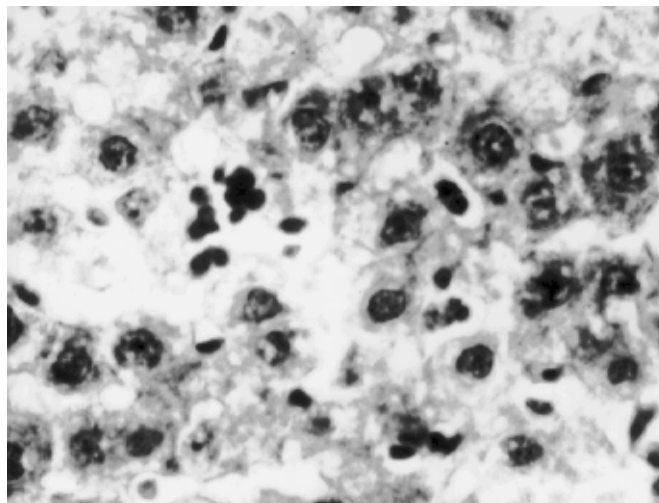


Рис. 1 – Печінка щура на 7-му добу після введення циклофосфану та металоорганічного препарату. Дрібні осередки невеликих інтенсивно базofilічних клітин екстрамедулярного кровотворення серед гепатоцитів. Гематоксилін-еозин, $\times 1000$ (масляна імерсія)

Fig. 1 – The rat liver 7 days after cyclophosphane and metal organic drug administration. Small foci of small intensively basophilic cells of extramedullary hemopoiesis among hepatocytes (hematoxylin-eosin, $\times 1000$, oil immersion)

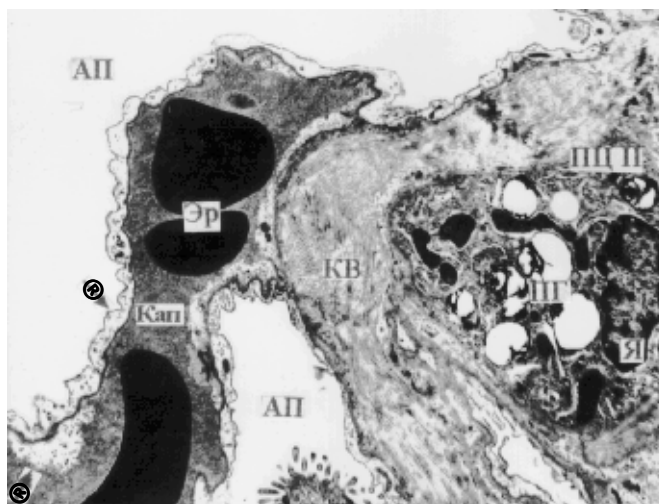


Рис. 2 – Легені щура після введення циклофосфану. Набряк цитоплазми епітеліальних та ендотеліальних клітин. АП – альвеолярний простір; Кап – капіляр; ПЦ-II – пневмоцит II типу; Ер – еритроцит; KB – колагенові волокна; Я – ядро; ПГ – пластинчасті гранули; М – мітохондрії; ⊕ – набряк епітеліальних клітин; ⊙ – набряк ендотеліальних клітин, $\times 8000$

Fig. 2 – The rat lungs of after cyclophosphane administration. Swelling of the cytoplasm of epithelial and endothelial cells: АП – alveolar space; Кап – capillary; ПЦ-II – type II pneumocyte; Ер – erythrocyte; KB – collagen fibers; Я – nucleus; ПГ – plate-lake granules; М – mitochondria; ⊕ – swelling of epithelial cells; ⊙ – swelling of endothelial cells, $\times 8000$

парату на отруєних та опромінених щурів, пов'язаний, певно, з активацією продукування в організмі антиоксидантних і антирадикальних металоферментів типу супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, церулоплазміну тощо та зі збільшенням стійкості клітинних мембран завдяки наявності в препараті широкого комплексу вітамінів.

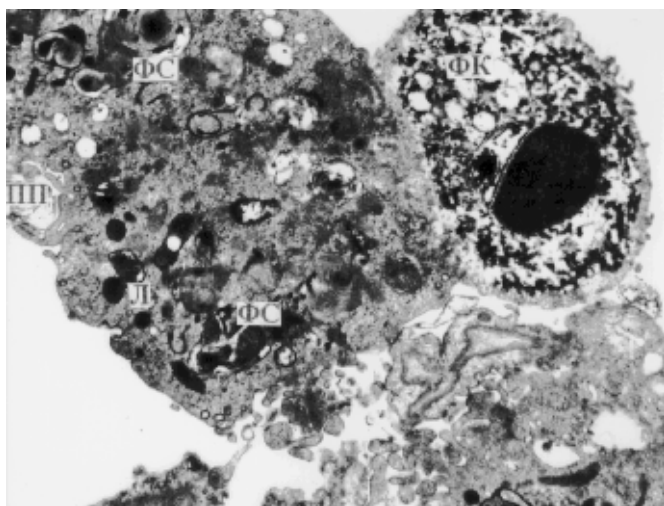


Рис. 3 – Легені щура після введення циклофосфану та металоорганічного препарату. Альвеолярний макрофаг із фагоцитованою клітиною, первинними та вторинними лізосомами у цитоплазмі. ПП – псевдоподії; ФК – фагоцитована клітина; ФС – фагосома; Л – лізома, $\times 12000$

Fig. 3 – The rat lungs after administration of cyclophosphane and metal organic drug. Alveolar macrophag with phagocytosed cells, primary and secondary lysosomes in the cytoplasm. ПП – pseudopodia; ФК – phagocytosed cell; ФС – phagosome; Л – lysosome, $\times 12000$

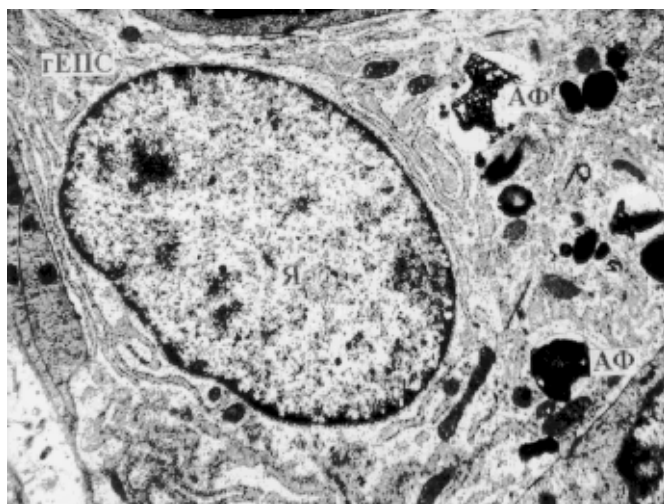


Рис. 4 – Тонка кишка щура після введення циклофосфану. Лізосоми та аутофагосоми в цитоплазмі ентероцита в крипті. Аф – аутофагосома; гЕПС – гранулярна ендоплазматична сітка, $\times 8000$

Fig. 4 – The small intestine of the rat after cyclophosphane administration. Lysosomes and autophages in the cytoplasm of the enterocyte in the crypt. Аф – autophagosome; гЕПС – granular endoplasmic reticulum, $\times 8000$

Досліджуваний препарат, який містить органічний комплекс ряд металів і вітамінів, може знайти застосування для запобігання небажаним реакціям здорових тканин на хемотерапевтичну терапію онкологічних хворих.

Висновки

1. Циклофосфан у дозі 80 мг/кг пригнічує кістково-мозкове кровотворення, знижує рівень

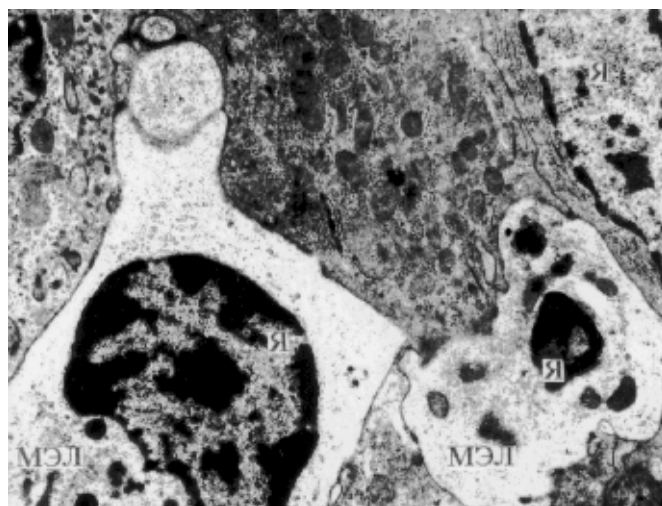


Рис. 5 – Тонка кишка щура після введення циклофосфану та металоорганічного препарату. Міжепітеліальні лімфоцити. МЭЛ – міжепітеліальний лімфоцит, $\times 12000$

Fig. 5 – The small intestine of the rat after administration of cyclophosphane and metal organic drug. Interepithelial lymphocytes. МЭЛ – interepithelial lymphocyte, $\times 12000$

лейкоцитів у крові та викликає порушення ультраструктури клітин легень і тонкого кишечника.

2. Застосування комплексного металоорганічного препарату сприяє збереженню ультраструктури пневмоцитів та ентероцитів, слабо діє на поновлення мієлобластів і викликає появу в печінці осередків екстрамедулярного кровотворення.

3. Препарат прискорює поновлення кількості лейкоцитів у крові до вихідного рівня і значно активізує захисну макрофагальну та лімфоцитарну реакцію в тканинах організму.

Література

1. Олійниченко П.И., Булкина З.П., Синиборова Т.И. Справочник по полихимиотерапии опухолей. – К.: Здоров'я, 2000. – С. 170–176.
2. Григор'єва А.С., Коначович Н.Ф., Зеленцов В.В. // Координ. химия, 1990. – Т. 16, № 5. – С. 646–649.
3. Френкель Л.А., Григор'єва Г.С., Коначович Н.Ф., Мохорт М.А. // УРЖ. – 1999. – Т. VII, вип. 3. – С. 342–343.
4. Г. Гайер. Электронная микроскопия. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
5. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М.: Триада-Х, 1998. – 496 с.
6. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация. – К.: Наук. думка, 1991. – 256 с.

Дата надходження: 24.04.2002.

Адреса для листування:
Лукашова Ольга Петрівна,
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ, вул. Пушкінська, 82,
Харків, 61024, Україна