

В.В. Гончарук

Вінницький національний медичний
університет ім. М.І. Пирогова,
Вінниця, Україна

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.04.287>

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СТІНКИ СЕЧОВОГО МІХУРА ЯК НАСЛІДОК ДІЇ ЕПІРУБІЦИНУ

Ключові слова: сечовий міхур,
слизова оболонка, підслизова
основа, рак сечового міхура,
хіміотерапія.

*Внутрішньоміхурове введення засобів хіміотерапії широко застосовується у клінічній практиці та в експериментальних дослідженнях. Проте, дані щодо морфологічних змін слизової оболонки сечового міхура внаслідок дії таких препаратів практично відсутні. **Мета:** встановлення закономірностей морфологічних змін шарів стінки сечового міхура при внутрішньоміхуровому введенні епірубіцину. **Об'єкт і методи:** в дослідженнях використані білі безпородні щури (самки, вага 200–250 г), яким внутрішньоміхурово вводили епірубіцин. Морфологічні зміни шарів стінки сечового міхура оцінювали методом світлооптичної мікроскопії фіксованих препаратів (з подальшим забарвленням гематоксиліном та еозином) через 2 год, 3 доби, 7 та 21 добу після введення препарату. Отримані результати піддавали аналізу методом варіаційної статистики. **Результати:** упродовж всього терміну спостереження виявлені морфологічні зміни, які свідчили про порушення кровообігу у судинах гемомікроциркуляторного русла власної пластинки слизової оболонки сечового міхура та підслизовій основі, що супроводжувалося значною неспецифічною запальною інфільтрацією та у кінцевий термін дослідження — фіброзом підслизової основи. **Висновки:** отримані морфологічні та морфометричні дані свідчать про значні порушення шарів стінки сечового міхура внаслідок внутрішньоміхурового введення епірубіцину.*

Рак сечового міхура (PCM) відносять до найбільш поширених злоякісних новоутворень у світі. В загальній структурі онкологічної патології він займає 6-те місце серед захворювань у чоловіків та 17-те місце — у жінок. На PCM припадає в середньому 3% від загального числа онкопатології (чоловіків — 4,6%, жінок — 1,0%), при цьому захворюваність продовжує постійно зростати. [1].

При лікуванні пацієнтів з PCM та при проведенні експериментальних досліджень широко застосовується внутрішньоміхурове введення засобів хіміотерапії. Проте, дані щодо морфологічних змін внаслідок дії таких засобів на слизову оболонку сечового міхура практично відсутні та носять суперечливий характер. Хоча внутрішньоміхурове введення ліків було запропоноване більше 100 років тому, даний метод залишився актуальним і на сьогоднішній день. Існує більше 40 найменувань хіміотерапевтичних засобів, які вводили в порожнину сечового міхура, але ні дослідники-експериментатори, ні клініцисти не надають перевагу жодному із них [2–6]. Без розуміння закономірностей морфологічних змін у слизовій оболонці сечового міхура при застосуванні внутрішньоміхурової хіміотерапії встановити ступінь впливу введенного препарату не можливо. Кращому розумінню процесу перебігу захворювання у людей сприяють спостереження за розвитком PCM у експериментальних тварин, зокрема у щурів. Порівняльні дослідження щодо

морфології сечового міхура вказують на схожість будови його стінки у людини та хребетних; при гістологічному дослідженні доведено, що епітеліоцити людини та щурів не мають принципових відмінностей [7–11].

Саме тому темою нашого дослідження стало встановлення закономірностей морфологічних змін шарів стінки сечового міхура за умови внутрішньоміхурового введення епірубіцину.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на безпородних білих щурах (самки, вага 200–250 г). Вибір щодо їх використання в експерименті обумовлений тим, що щури мають широкий діапазон умов існування, характеризуються високою стійкістю до інфекцій.

Щурів утримували в умовах карантину протягом двох тижнів у віварії науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Тварини знаходилися на стандартному раціоні (збалансований комбікорм відповідно до встановлених норм) з вільним доступом до води при 12 годинному світловому дні з температурним режимом на рівні 24–25°C, вологістю повітря у межах 60%. Всі маніпуляції з тваринами та їх утримання проводили відповідно до “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), дотримувалися рекомендацій “Європейської конвенції про

захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей”. Дотримання правил гуманного відношення до експериментальних тварин підтверджено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М. І. Пирогова (протокол № 4 від 28.03.2019 року).

Для виявлення пошкоджуючої дії хіміопрепарату на стінку сечового міхура щурів ми внутрішньоміхурово вводили розчин епірубіцину (антибіотик групи антрациклінів з цитотоксичною активністю). Експериментальних тварин, яким в порожнину сечового міхура (СМ) вводили епірубіцин ($n = 20$), розділяли на 4 групи (по 5 тварин в кожній) відповідно строку їх виведення із експерименту: через 2 години; 3, 7 та 21 добу. Контрольну групу склали щури, яким ніяких препаратів не вводили.

Загальну анестезію проводили кетаміном з розрахунку 0,2 мл на 100 г маси тіла — 0,5 мл. Через анатомічні особливості будови уретри щурів, ретроградна катетеризація СМ була не можлива і було вирішено вводити препарат безпосередньо в порожнину СМ за допомогою інсулінового шприца. Розчин хімотерапевтичного препарату (епірубіцин) в порожнину СМ вводили в об’ємі 0,3–0,4 мл на 2 год. Після введення препарату щурів виводили із експерименту шляхом дислокації шийних хребців під кетаміновим наркозом у встановлені у строки відповідно до плану експерименту.

Для гістологічного дослідження використовували 5 фрагментів: із задньої, правої та лівої стінки, з верхівки та шийки СМ. Фрагменти тканини маркували, фіксували у нейтральному формаліні 10% протягом 48 год, промивали, зневоднювали та готували парафінові блоки. Зрізи стінок СМ товщиною 5–7 мкм готували на ротаційному мікротомі (НМ 340Е, США) та фіксували на склі. Для вивчення морфocитоархітектоніки зрізи стінки СМ забарвлювали гематоксилін-еозином, для встановлення змін питомої ваги сполучної ткани-

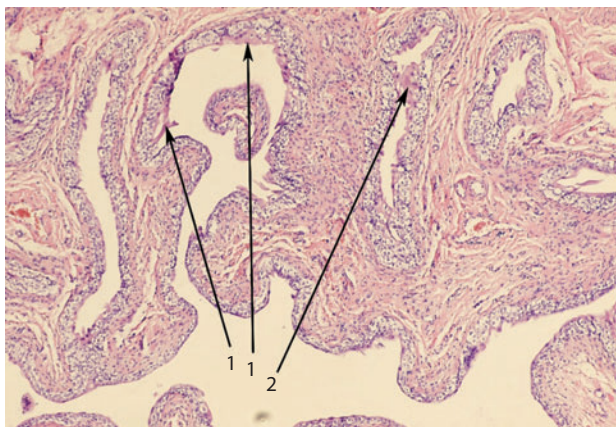


Рис. 1. Стінка сечового міхура щура (36. $\times 200$) через 2 год після введення епірубіцину: 1 — пошкоджені епітеліоцити; 2 — еозінофілія епітеліоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином

ни — за Ван-Гізеном. Гістологічне дослідження стінки сечового міхура здійснювали за допомогою мікроскопа Laborlux S (Leitz) при збільшеннях у 40, 100, 200 і 400 разів. Для мікроскопічного вивчення препаратів та фотофіксації морфологічної картини застосовували цитофотометричний комплекс “Olimpus BX-41” (Японія).

Статистичний аналіз результатів проведення у пакеті “STATISTICA 5.5” (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № АХХР 910А374605FA) з використанням параметричних методів оцінки даних. Достовірність різниці середніх величин визначали на основі t -критерію Ст’юдента. Увагу приділяли показникам з достовірною ($p < 0,05$) різницею.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Через 2 год після введення епірубіцину основні морфологічні зміни шарів стінки сечового міхура стосувалися судин підслизової основи. Товщина підслизової основи у щурів, яким вводили препарат була більшою порівняно з показником контрольних тварин (відповідно $60,1 \pm 3,3$ проти $40,0 \pm 2,1$ мкм). Товщина м’язового шару не відрізнялася від такої у контрольній групі щурів. Найбільш виражені морфологічні зміни були відмічені зі сторони слизової оболонки сечового міхура — клітини поверхневого шару уротелію, особливо в зоні інвагінацій та в основі складок мали інтенсивну еозінофілію або амфотропно забарвлену гомогенізовану цитоплазму. Клітини уроепітелію мали збільшений об’єм, подекуди втрачали контакти з шаром підслизової основи та злушувалися у просвіт сечового міхура, у деяких випадках — до некробіозу (рис. 1). Ядра цих клітин частіше були овальні, подекуди — круглі, часто були розміщені в центральній частині клітин і містили еухроматин. Питома вага пошкоджених епітеліоцитів складала $12,0 \pm 0,6\%$.

Щільність судин підслизової основи зменшилася з $84,0 \pm 4,1$ до $68,3 \pm 3,2$ на 1 мм^2 за рахунок спазму артеріального ланцюга гемомікроциркуляторного русла, а індекс Керногана склав $0,57 \pm 0,02$ для артерій та $0,19 \pm 0,01$ для венул. У всіх випадках мало місце повноокров’я судин підслизової основи та м’язової оболонки, що супроводжувалося діapedезними крововиливами (рис. 2). Спостерігали балонну дистрофію епітеліоцитів слизової оболонки СМ. При чому, саме у цих ділянках ми спостерігали розширення судин з явищами еритропедезу.

Через 3 доби після введення епірубіцину найсуттєвіші зміни відмічали у слизовій оболонці та підслизовому шарі СМ. Епітелій слизової оболонки був нерівномірно витончений (до 1–2 рядів на складках). Епітеліоцити слизової оболонки були пошкоджені, виявляли балоноподібну дистрофію. Траплялись епітеліоцити з конденсованим ядерним хроматином, набряклою просвітленою або, навпаки, ушільненою базотропною цитоплазмою.

Питома вага пошкоджених епітеліоцитів сягала $28,0 \pm 1,4$ клітин (рис. 3).

На цей термін спостереження товщина підслизового шару стала більшою майже вдвічі (до $0,72 \pm 0,03$ мм), з ознаками набряку, нерівномірної вогнищевої запальної клітинної інфільтрації (рис. 4).

Кровонаповнення судин підслизової основи було вкрай нерівномірним. Поряд із вираженим розширенням, повнокров'ям судин і діаплезними вогнищевими крововиливами ми спостерігали ділянки з оптично порожніми судинами. Щільність судин підслизової основи була значно меншою, по відношенню до показників не тільки контрольної групи, але й попереднього строку спостереження і складала — $39,61 \pm 1,98$ на мм^2 . Індекс Кернога-на для артеріол складав $0,25 \pm 0,01$, для венул — $0,24 \pm 0,01$, що ми розцінили, як загальний спазм судин гемомікроциркуляторного русла (рис. 5). Склад запальної інфільтрації був неоднорідним — найбільша кількість була сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, лімфоцитарних елементів.

Отже через 3 доби після використання епірубіцину зміни показника щільності судин підслизової основи вказали, що саме на цей строк ми спостерігали сильний пошкоджуючий вплив хіміопрепарату, у першу чергу, на судини гемомікроциркуляторного русла. Значні зміни торкнулися і функціонально активних клітин.

Через 7 діб найсуттєвіші зміни виявляли у слизовій оболонці та підслизовому шарі оболонки СМ, хоча ці зміни були менш вираженими, ніж у попередній термін. Зберігалися явища балоноподібної дистрофії. Ми спостерігали злушення епітеліоцитів поверхневого шару слизової оболонки. Питома вага пошкоджених епітеліоцитів була високою ($14,0 \pm 0,7\%$). Епітелій слизової оболонки СМ був витончений. У підслизовій основі ми спостерігали явища незначного набряку, її товщина недостовірно наблизилася до показників контролю (рис. 6).

Щільність судин у підслизовій основі виявилась більшою, ніж у попередній термін ($72,3 \pm 3,5$ на мм^2), але все ще не досягала контрольних значень. Індекс Керногана для артеріол набув значень контрольних тварин, для венул — був недостовірно меншим. У базальній пластинці слизової оболонки сечового міхура та в підслизовій основі ми спостерігали вогнищеві явища фіброзу, зокрема у ділянках де слизова оболонка складалася з 1 шару клітин.

Отже, через 7 діб після використання епірубіцину, морфологічні зміни у всіх шарах стінки сечового міхура значно зменшилися. Найбільший ступінь дистрофічних змін, порушення кровообігу спостерігали у слизовій оболонці та підслизовій основі сечового міхура.

На 21 добу після введення препарату ми ще спостерігали злушення епітеліоцитів поверхневого

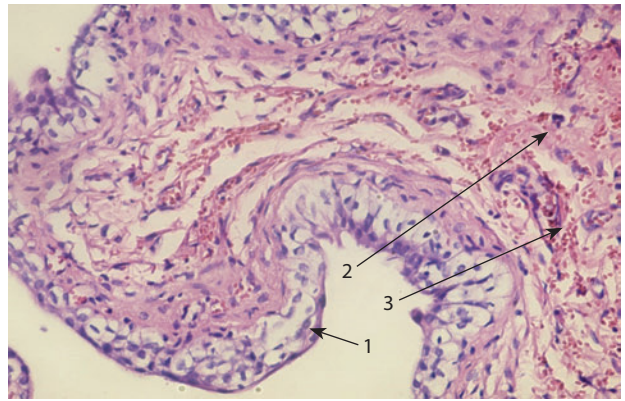


Рис. 2. Стінка сечового міхура щура (3б. $\times 400$) через 2 години після введення епірубіцину: 1 — балоноподібна дистрофія епітеліоцитів; 2 — діапедезні крововиливи, 3 — набряк підслизової основи. Забарвлення гематоксилін-еозином

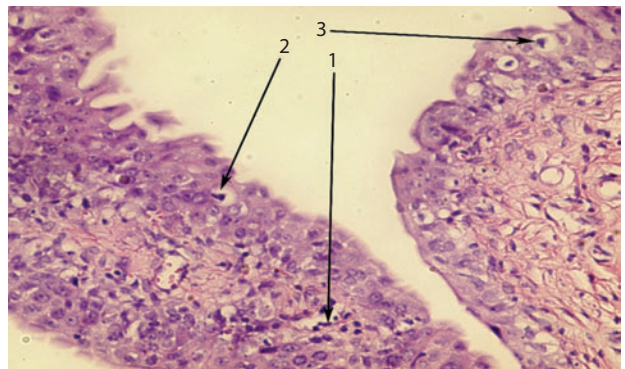


Рис. 3. Фрагмент стінки сечового міхура щура (3б. $\times 400$) через 3 доби після введення епірубіцину: 1 — еозинофільна інфільтрація підслизового шару; 2 — просвітлена цитоплазма епітеліоцитів, 3 — конденсований ядерний хроматин. Забарвлення гематоксилін-еозином

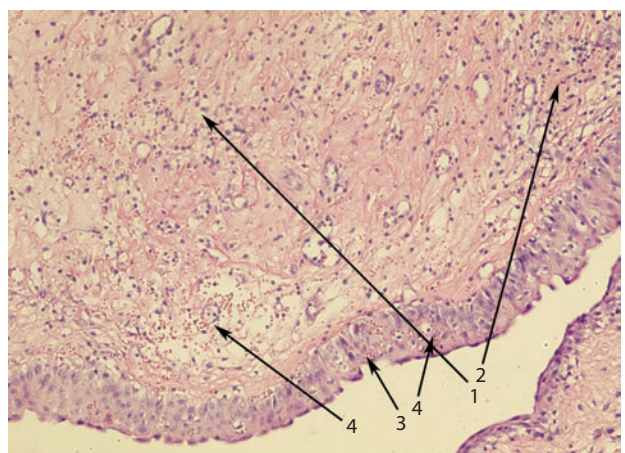


Рис. 4. Фрагмент стінки сечового міхура щура (3б. $\times 200$) через 3 доби після введення епірубіцину: 1 — ознаки набряку підслизової основи; 2 — нейтрофільна інфільтрація підслизової основи, 3 — злушення уроцитів, 4 — балоноподібна дистрофія епітеліоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином

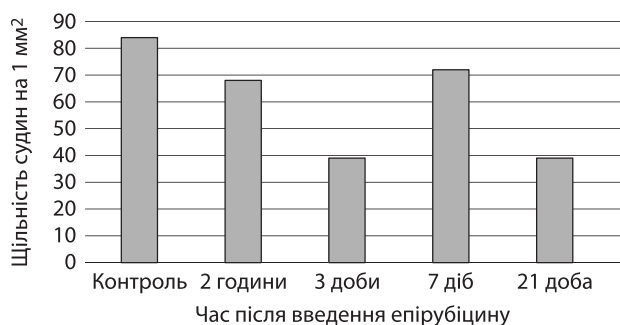


Рис. 5. Зміна щільності судин підслизової основи СМ шурів у різні терміни після застосування епірубіцину

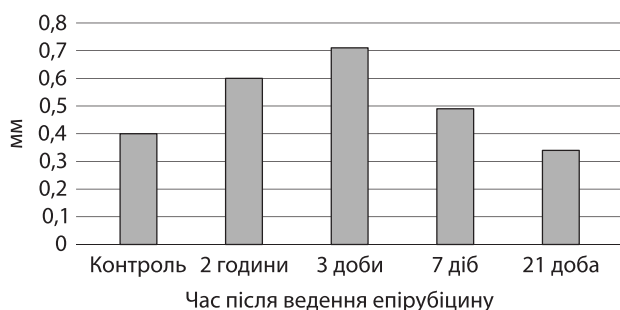


Рис. 6. Товщина підслизової основи СМ шурів в різні терміни після використання епірубіцину мм

шару слизової оболонки СМ. Епітелій слизової оболонки був нерівномірно витончений (до 1–2 рядів на складках), епітеліальні клітини розташовані на вогнищево фіброзованій підслизовій основі та м'язовій оболонці. Епітеліоцити слизової оболонки були пошкоджені, питома вага таких клітин була меншою, ніж на попередній термін і складала $12,0 \pm 0,6\%$.

Товщина підслизової основи була недостовірно меншою, ніж в попередній термін, спостерігали-

ся явища фіброзу (рис. 7). У ділянках фіброзу ми відмічали незначну розсіяну лімфо-гістіоцитарну інфільтрацію з домішкою еозинофільних лейкоцитів. Судини мали нерівномірне кровонаповнення. Стінка деяких судин була нерівномірно потовщена за рахунок плазматичного просичення та гіаліноза. У базальній пластинці слизової оболонки судини мали облітерований просвіт. Щільність судин підслизової основи складала $49,1 \pm 2,5$ на мм² та була достовірно меншою за відповідні значення як контрольних шурів, так і попереднього терміну обстеження.

Спостерігали нерівномірне кровонаповнення судин, у деяких стінка була нерівномірно потовщена за рахунок плазматичного просичення та гіалінозу. Деякі судини мали облітерований просвіт. У ділянках фіброзу ми спостерігали незначну розсіяну лімфо-гістіоцитарну інфільтрацію з домішкою еозинофільних лейкоцитів (рис. 8). Індекс Керногана для артеріол набув контрольних значень, для венул — був незначно вищий за контрольні значення.

Тобто, на 21 добу після використання епірубіцину морфологічні зміни виявляли атрофічно-склеротичний характер із явищами незначної неспецифічної запальної інфільтрації.

Отже результати, отримані в процесі дослідження показали, що внутрішньоміхурове введення епірубіцину призводить до незворотних атрофічно-склеротичних змін слизової оболонки СМ, злушення епітеліоцитів, значного фіброзу підслизового шару із явищами незначної залишкової неспецифічної запальної інфільтрації. За отриманими даними закономірності морфологічних змін стінки СМ при експериментальному застосуванні епірубіцину стосуються стану перехідного епітелію слизової оболонки — ушкодження клітин варіює від 28 до 14% протягом першого тижня та не пов-

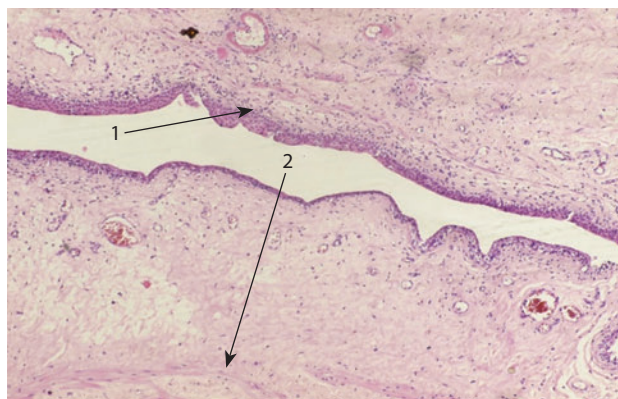


Рис. 7. Фрагмент стінки сечового міхура шура (36. $\times 200$) через 21 добу після введення епірубіцину: 1 — пошкоджені епітеліоцити, 2 — гістіоцитарна інфільтрація, явища фіброзу підслизової основи СМ та м'язової оболонки. Забарвлення гематоксилін-еозином

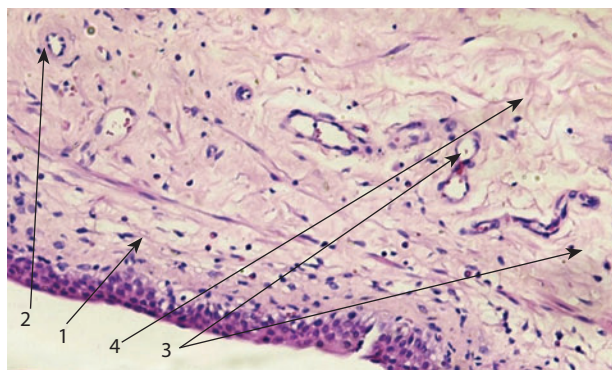


Рис. 8. Фрагмент стінки сечового міхура шура (36. $\times 400$) через 21 добу після введення епірубіцину: 1 — балоноподібні епітеліоцити, 2 — гістіоцитарна інфільтрація у ділянках фіброзу, 3 — облітеровані та зіяючі судини підслизової основи, 4 — явища фіброзу підслизової основи. Забарвлення гематоксилін-еозином

ністю відновлюється до 21 доби після введення препарату. Такі закономірності є чинними для товщини підслизового шару СМ, щільності судин, змін індексу Керногана для артерій і венул, ступеня фіброзування базальної пластинки слизової оболонки СМ та підслизового прошарку. М'язова оболонка майже не зазнавала ушкодження при внутрішньоміхуровому впливі епірубіцину в експерименті.

Отримані експериментальні дані можуть слугувати підґрунтям для подальшого пошуку шляхів захисту слизової оболонки СМ, дозволяють поглибити уявлення про закономірності змін слизової оболонки СМ під впливом хімічних речовин, у тому числі — змін морфологічної структури складових лімфатичної системи.

ВИСНОВКИ

1. При дослідженні на світлооптичному рівні фрагментів стінки СМ щурів, яким внутрішньоміхурово вводили епірубіцин, морфологічні зміни виявляли явища порушення кровообігу у судинах гемомікроциркуляторного русла власної пластинки слизової оболонки, в підслизовій основі, що супроводжувалося значною неспецифічною запальною інфільтрацією, вогнищевим фіброзом.

2. Найбільш суттєвими морфологічні зміни були упродовж перших 7 діб експерименту.

3. На 21 добу після застосування епірубіцину спостерігали витончення та атрофічні зміни уроепітелію, значний вогнищевий фіброз власної пластинки слизової оболонки СМ, підслизового шару з проникненням у м'язову оболонку та явищами неспецифічної запальної інфільтрації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, *et al.* Epidemiology of bladder cancer. Med Sci (Basel) 2020; **8** (1): 15. doi: 10.3390/medsci8010015.
2. Mangsbo SM, Ninalga C, Essand M, *et al.* CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity. J Immunother 2008; **31** (1): 34–42. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181587d29.
3. Zaharoff DA, Hoffman BS, Hooper HB, *et al.* Intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer with chitosan/interleukin-12. Cancer Res 2009; **69** (15): 6192–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1114.
4. Halachmi S, Moskovitz B, Maffezzini M, *et al.* Intravesical mitomycin C combined with hyperthermia for patients with T1G3 transitional cell carcinoma of the bladder. Urol Oncol 2011; **29** (3): 259–64. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.02.012.
5. Pasichnyk SM. Application of local chemotherapy in the treatment of superficial forms of bladder cancer. ACTA. Lviv Medical Journal 2012; **18** (2): 65–8. (in Ukrainian).
6. Kostyuk OG, Hnatiuk MS. Morphometric assessment of features of the regeneration of the mucous membrane of the urinary bladder after its removal. Vinnytsia state university 2008; **12** (1): 21–4. (in Ukrainian).
7. Kostyuk OG, Kavka MP, Bezkorovainy JE. A new method of treating superficial bladder cancer. Clinic anatomy and operative surgery 2008; (1): 85–6. (in Ukrainian).
8. Kostyuk OG. Ways to improve the pharmacokinetics of antitumor chemopreparations in the treatment of superficial bladder cancer. Clinic anatomy and operative surgery 2011; (1): 75–8. (in Ukrainian).
9. Dumanskyi YuY, Kostyuk OG, Kostyuk GY. A new approach to the treatment of superficial bladder cancer. Problems, achievements and prospects for the development of medical and biological scientists 2010; **146** (2): 59–61. (in Ukrainian).
10. Kostyuk FI, Bondar OV, Chystiakov RS, Lysenko VV. Impact of adjuvant intrabladder therapy on quality of life in patients, suffering musculo–noninvasive cancer of the bladder. Klinichna khirurhiia 2020; **87** (7–8): 47–52. doi: 10.26779/2522-1396.2020.7-8.47.
11. Kostyuk OG. Morphological changes in the tissues of the urinary bladder in the long term after submucosal administration of doxorubicin solution. Herald of morphology 2009; **15** (1): 24–6. (in Ukrainian).

MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE BLADDER WALL AS A RESULT OF THE ACTION OF EPIRUBICIN

V.V. Goncharuk

Vinnytsya National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

Summary. Intravesical administration of chemopreparations is widely used in clinical practice and in experiments. However, there are practically no data on morphological changes during the action of chemotherapy drugs on the mucous membrane of the urinary bladder. **Aim:** to establish the patterns of morphological changes in the layers of the bladder wall during intravesical administration of epirubicin. **Object and methods:** the studies use white outbred rats (females, weight 200–250 g). Epirubicin was administered intravesically. Morphological changes of the bladder wall were assessed by light microscopy of fixed preparations of cells stained with hematoxylin and eosin after 2 hours; 3, 7 and 21 days after administration of the epirubicin. The obtained results were analyzed by the

method of variational statistics. **Results:** the obtained data indicate significant disorders on the side of the bladder wall, namely atrophic changes and fibrosis of the submucosal base. Morphological changes indicated circulatory disorders in the vessels of the bladdermucous membrane and the submucosal base, which was accompanied by a significant nonspecific inflammatory reaction. **Conclusions:** obtained morphological and morphometric data indicate significant changes in the bladder wall of rats under the action of the chemotherapy drug epirubicin.

Keywords: bladder, mucous membrane, submucosa, bladder cancer, chemotherapy.

Адреса для листування:

Гончарук В.В.
21018, Вінниця, вул. Пирогова, 56
Вінницький національний медичний
університет ім. М.І. Пирогова
E-mail: vd.goncharuk@gmail.com

Одержано: 13.12.2023