

АКТИВНІСТЬ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В АРТИФІЦІЙНОМУ СЕЧОВОМУ МІХУРІ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Р.В. Савчук

Одеський національний медичний університет

Інвазивний рак сечового міхура (СМ) – захворювання, що є причиною найбільшої смертності серед злоякісних новоутворень в урології [1]. Так, в Україні смертність від раку СМ в 2016 р. становила 4,6 випадку на 100 тис. населення [2].

Основним методом лікування інвазивного раку СМ є радикальна цистектомія – оперативне втручання, що полягає у видаленні сечового міхура і пов'язане з великою кількістю ускладнень раннього і пізнього післяопераційного періоду. Крім онкологічних результатів, сьогодні важливим після видалення СМ є вибір типу відведення сечі у різних пацієнтів. Аспекти, розглянуті при сучасній деривації сечі, включали сегмент використовуваного шлунково-кишкового тракту, анатомічне розташування можливої стоми, збереження уретри для ортотопічної деривації, питання про збереження верхніх відділів сечових шляхів і гендерні розбіжності [3].

Найкращим матеріалом для формування ортотопічного СМ, визаним в усьому світі, є сегмент термінального відділу клубової кишки (ілеум) [4–6]. Дев'яностоденна післяопераційна смертність при вивченні результатів проведення радикальної цистектомії в Канаді та Великобританії коливається від 5,1 до 8,1% [7, 8], що є високим показником для операції з намірами зцілення. Також відзначена висока частота післяопераційних ускладнень (28–64%) протягом 90 днів навіть у центрах з великим обсягом і досвідом таких оперативних втручань [9, 10].

Вивчення змін структурно-функціонального характеру в стінці артіфіційного СМ триває протягом останніх двадцяти років. За даними дослідників, результати є досить суперечливими: так, деякі вчені відзначають гіперсекрецію сульфомуцинів, сіаломуцинів, прогресуючу атрофію мікрворсинок, аденоматозну гіперплазію і дисплазію [11, 12].

Припускають, що вплив сечі та виконання нових функцій, не властивих ілеум, спричинюють структурно-функціональні й ферментативні зміни в стінці необладера зі зміною активності ферментів окисно-відновних реакцій у

тканинах артіфіційного СМ, які залишаються поза увагою дослідників, хоча їхня діяльність зумовлює перебіг основних процесів життєдіяльності в тканинах організму.

Мета дослідження: вивчити особливості гістохімічно виявленої активності лактатдегідрогенази в стінці артіфіційного сечового міхура в експериментальних тварин.

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом цього дослідження послужили результати, отримані при дослідженні 18 самиць міні-пігів віком 4–5 міс. і масою 8–10 кг. В експериментальних тварин моделювання артіфіційного сечового міхура виконували шляхом цистектомії з наступною ілеоцистопластикомією.

Вибір експериментального об'єкту зумовлений анатомічними міркуваннями: у самиці уретра є прямою і в 5–7 разів коротшою порівняно з самцями.

Методика оперативного втручання була такою. Під внутрішньовенним наркозом (тіопентал) у положенні на спині свині виконують розріз черевної стінки по середній лінії від лобкового симфізу до пупка. Верхівку сечового міхура захоплюють щипцями, підтягують догори та видаляють. Гемостаз. Відступаючи 15 см від ілеоцекального клапана, ушивають кінець ізольованого кишкового сегмента безперервними серозно-м'язовими швами вікріл 4-0. Уздовж протибрижового краю розсікають дистальну частину клубово-кишкового сегмента довжиною приблизно 10 см. Розсічену частину сегмента

U-подібно укладають, суміжні краї обох колін зшивають одним рядом безперервних серозно-м'язових швів вікріл 4-0. Нижню частину отриманого U-подібного сегмента укладають поперечно догори. Перед зшиванням вільних країв розсіченого сегмента в приносне коліно клубової кишки встановлюють сечовідні катетери № 3Fg, кінці яких виводять через стінку резервуара. У найбільш каудальній частині резервуара роблять отвір, до якого підшивають уретру шістьма швами вікріл 4-0. Шви зав'язують після проведення через уретру катетера

№ 8Fr. Резервуар дрениують цистостомічною трубкою 12Fr, яку виводять разом із сечовідними стентами через стінку резервуара. Резервуар укладають на місце, формують ізоперистальтичне приносне коліно. Клубову кишку розсікають на рівні пересічених попередньо сечоводів – на 10 см вище клубово-кишкового резервуара. Сечоводи косо зрізають, розсікають уздовж і анастомозують кінець у бік з проксимальною нерозсіченою частиною клубово-кишкового сегмента. Стенти, розташовані всередині сегмента, проводять у сечоводи. Відновлюють безперервність кишки. Стенти виводять через передню черевну стінку, в малий таз встановлюють дренажі через контрапертури. Рану ушивають вікрилом.

При проведенні оперативного моделювання сечового міхура вилучали фрагмент стінки клубової кишки і стінки СМ. Отриманий матеріал поміщали на суху вуглекислоту (-70 °С) для миттєвого заморожування. З отриманих блоків виготовляли криостатні зрізи завтовшки 11 мкм, на яких за прописами Ллойда проводили гістоензиматичні реакції з виявлення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ). Результати, отримані при дослідженні активності ферменту в стінці клубової кишки (ілеум) і сечового міхура, виділені до початку створення моделі СМ, надалі використовували як контроль. Експериментальних тварин з моделлю СМ групами по 6 особин виводили з досвіду через 3, 6 і 12 міс. після оперативного моделювання. Виведення з досвіду здійснювалося методом передозування тіопенталу натрію. У тварин вилучали фрагмент стінки клубової кишки (ілеум) і штучного СМ. Отриманий матеріал обробляли відповідно до вищеописаного алгоритму. На отриманих криостатних препаратах визначали активність ЛДГ. Вищезгаданий фермент був обраний для дослідження у зв'язку з тим, що лактатдегідрогеназа (1.1.1.27, ЛДГ) – фермент останнього етапу гліколізу з відновленням, в анаеробних умовах, пірувату в лактат із вивільненням НАД+. Оцінка результатів гістохімічних досліджень здійснювалася напівкількісним методом (Насибуллин, 1992), що розроблений і базується на кореляції бальної оцінки активності ферментів і даних цистоспектрофото-

метрії (вимірюється в умовних одиницях оптичної щільності – ум. од.) Результати досліджень піддавалися стандартній статистичній обробці.

Результати та їх обговорення. Активність ЛДГ в інтактному клубовому кишечнику представлена в табл. 1. У клітинах епітеліоцитів активність ЛДГ висока – (6,03±0,23) ум. од. – або близька до неї, отже, можна говорити про інтенсивне утворення пірувату, що робить можливим оптимальне субстратне забезпечення діяльності циклу Кребса.

Водночас активність ЛДГ у підслизовій пластині – (5,010±0,144) ум. од. – і у м'язовому шарі – (6,020±0,124) ум. од. – помірна, отже, можна вважати, що потреба циклу Кребса в цих структурах забезпечується не лише за рахунок розщеплення глюкози, але й за рахунок окиснення додаткових субстратів.

Визначення активності ЛДГ через 3 міс. після виконання ортотопічної ілеоцистопластики показало її зниження на 38,1% – (3,10±0,09) ум. од. (p<0,05) – у підслизовому шарі, дана тенденція спостерігається і через 12 міс. експерименту. Ці зміни дозволяють вважати, що в клітинних елементах підслизової у субстратному забезпеченні більшу роль починає відігравати надходження субстратів із проміжних метаболітів – альфа-кетоглутарат. Статистично достовірних розбіжностей в епітелії ілеум mini-pigs на різних етапах експерименту ми не виявили. Привертає увагу зниження на 15,6% – (5,08±0,19) ум. од. (p<0,05) – активності ЛДГ у м'язовому шарі ілеум в експериментальних тварин порівняно з первинними показниками.

У нативному СМ mini-pigs відзначена низька активність ЛДГ в епітеліоцитах і підслизовому шарі, що становило (3,00±0,12) і (3,00±0,21) ум. од. відповідно. У м'язовому шарі детрузора визначалася висока активність ЛДГ – (6,00±0,14) ум. од.

Формування артифіційного сечового міхура, виконання нової функції й контакт із сечею позначилися на пригніченні активності ЛДГ у структурних елементах стінки неоциста (рис. 1).

Через 3 міс. після початку експерименту активність ЛДГ в епітеліоцитах необладера зни-

Таблиця 1

Активність лактатдегідрогенази у стінці ілеум, ум. од., M±m

Ілеум	Контроль	3 міс.	6 міс.	12 міс.
Епітелій	6,03±0,23	6,06±0,12	5,54±0,09	6,07±0,13
Підслизовий шар	5,010±0,144	3,10±0,09 *	3,01±0,13 *	3,01±0,20 *
М'язовий шар	6,020±0,124	6,00±0,21	6,02±0,31	5,08±0,19 *

Примітка: * – розбіжності між показниками достовірні (p<0,05).

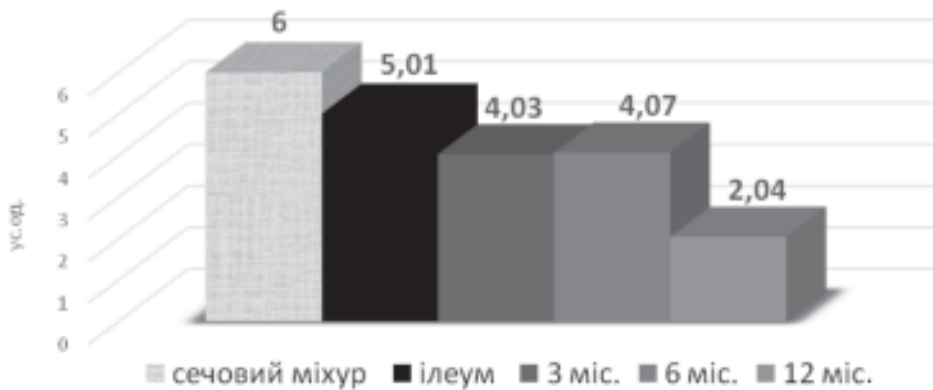


Рис. 1. Активність лактатдегідрогенази в епітеліоцитах ілеум і неоциста

жується на 33% – $4,06 \pm 0,10$ ум. од. ($p < 0,05$) – порівняно з контрольними показниками ілеум, але до 6-го і 12-го місяця експерименту показники приходять у відповідність з нативними даними.

Дані, отримані при вивченні активності ЛДГ у підслизовому шарі, представлені на рис. 2.

При порівнянні активності ЛДГ в інтактному підслизовому шарі сечового міхура – $3,00 \pm 0,21$ ум. од. – та ілеум – $5,010 \pm 0,144$ ум. од. ($p < 0,05$) – привертає увагу підвищена активність у клубовій кишці на 40,12%.

Через 3 міс. після початку експерименту виявлена відсутність достовірних розбіжностей

активності ЛДГ у підслизовому шарі артифіційного сечового міхура – $5,04 \pm 0,2$ ум. од. – від ілеум інтактних тварин. У свою чергу, через 6 міс. відзначено зниження на 19,2% – $4,07 \pm 0,09$ ум. од. ($p < 0,05$), а через 12 міс. зниження на 59,3% – $2,01 \pm 0,09$ ум. од. ($p < 0,05$). Ці зміни дозволяють вважати, що в клітинних елементах підслизової у субстратному забезпеченні значну роль починає відігравати надходження субстратів із проміжних метаболітів – альфа-кетоглутарат.

Дані, отримані при вивченні активності ЛДГ у м'язовому шарі, представлені на рис. 3.

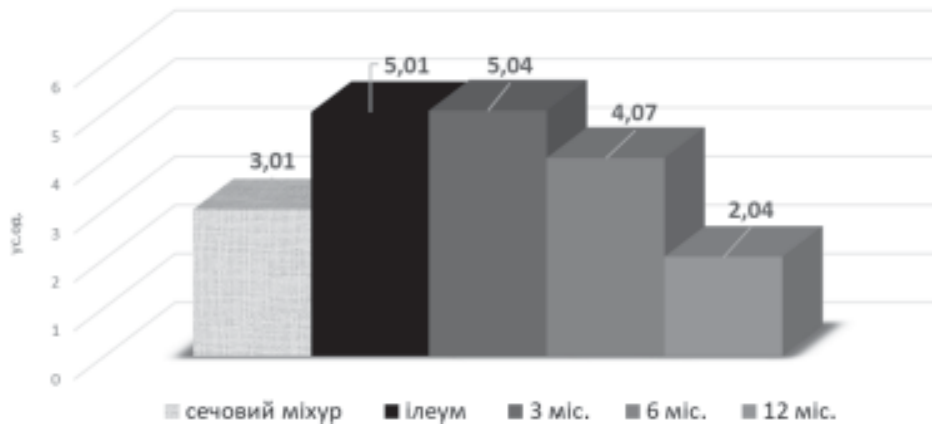


Рис. 2. Активність лактатдегідрогенази у підслизовому шарі ілеум і неоциста

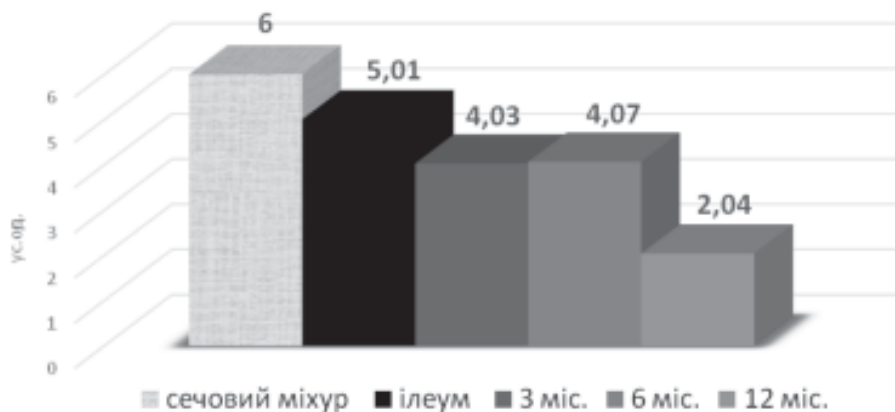


Рис. 3. Активність лактатдегідрогенази у м'язовому шарі ілеум і неоциста

Привертає увагу відсутність достовірних розбіжностей між активністю дегідрогенази в сечовому міхурі – $6,00 \pm 0,14$ ум. од. та ілеум – $6,020 \pm 0,124$ ум. од. При дослідженні активності ЛДГ у м'язовому шарі артифіційного сечового міхура відзначено її зниження на 33% – $4,03 \pm 0,09$ ум. од. ($p < 0,05$) через 3 міс., така тенденція зберігалася до кінця експерименту.

Можна вважати, що гіпертрофія міоцитів змінює транспортні можливості судинної системи артифіційного сечового міхура, що, з одного боку, зумовлює зсув акценту субстратного забезпечення у бік проміжних метаболітів, а недостатнє загальне постачання сприяє збереженню процесів життєзабезпечення на відносно невисокому рівні.

Висновок

Таким чином, за даними нашого дослідження, активність ЛДГ у структурних елементах ілеум і артифіційного сечового міхура зазнає значних змін. У клубовому кишечнику статистично достовірно зниження активності ЛДГ

відзначено лише в підслизовому шарі (на 38,1%) і зберігається до закінчення експерименту. Можна вважати, що завершення післяопераційного періоду повертає функціональну активність структур кишкової стінки у вихідний стан, що зумовлює нормалізацію активності ферментів циклу Кребса, а також ферментів циклів субстратного забезпечення основного циклу енергозабезпечення життєдіяльності.

Формування артифіційного СМ з ділянки ілеум, виконання нової функції й контакт із сечею спричинили зниження активності ЛДГ практично у всіх структурах необладера. Хотілося б відзначити пригнічення активності ЛДГ на 59,3% у підслизовому шарі на 12-му місяці експерименту.

Отримані результати ще раз доводять пригнічення енергетичного обміну на різних стадіях, потенційну гіпоксію в тканині, що зумовлено новими функціональними обов'язками трансплантата, і потребують подальшого вивчення.

Список літератури

1. Antoni S., Ferlay J., Soerjomataram I. *Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends // European urology.* – 2017;71:96–108.
2. *Бюлетень Національного канцер-реєстру № 18 – «Рак в Україні, 2015–2016».*
3. Stenzl A., Sherif H., Kuczyk M. *Radical cystectomy with orthotopic neobladder for invasive bladder cancer: a critical analysis of long term oncological, functional and quality of life results // Int. Braz. J. Urol.* – 2010;36(5).
4. Koga F., Kihara K. *Selective bladder preservation with curative intent for muscle-invasive bladder cancer: A contemporary review // International Journal of Urology.* – 2012;19:388–401.
5. Wu S.Y., Jiang Y.H., Kuo H.C. *Long-term Outcomes of Augmentation Enterocystoplasty in Patients With End-Stage Bladder Diseases: A Single-Institute Experience Involving 102 Patients // Int. Neurourol. J.* – 2017;21(2):133–8.
6. Schwentner C., Sim A., Balbay M.D., Todenhufer T. et al. *Robot-assisted radical cystectomy and intracorporeal neobladder formation: on the way to a standardized procedure // World J. Surg. Oncol.* – 2015.
7. Zakaria A.S., Santos F., Dragomir A., Tanguay S., Kassouf W., Aprikian A.G. *Postoperative mortality and complications after radical cystectomy for bladder cancer in Quebec: a population-based analysis during the years 2000–2009 // Canadian Urological Association Journal.* – 2014;8(7–8):259–67.
8. Hounsoume L.S., Verne J., McGrath J.S., Gillatt D.A. *Trends in operative caseload and mortality rates after radical cystectomy for bladder cancer in England for 1998–2010 // European Urology.* – 2015;67(6):1056–62.
9. Stein J.P., Lieskovsky G., Cote R. et al. *Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients // Journal of Clinical Oncology.* – 2001;19(3):666–75.
10. Shabsigh A., Korets R., Vora K.C. et al. *Defining early morbidity of radical cystectomy for patients with bladder cancer using a standardized reporting methodology // European Urology.* – 2009;55(1):164–76.
11. Parenti A., Aragona F. et al. *Abnormal Patterns of Mucin Secretion in Ileal Neobladder Mucosa: Evidence of Preneoplastic Lesion? // Eur. Urol.* – 1999;35:98–101.
12. Gatti R., Ferretti S., Bucci G. et al. *Histological Adaptation of Orthotopic Ileal Neobladder Mucosa: 4-Year Follow-Up of 30 Patient // Eur. Urol.* – 1999;36:588–594.

Реферат

А К Т И В Н О С Т Ь ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АРТИФИЦИАЛЬНОМ МОЧЕВОМ ПУЗЫРЕ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Р.В. Савчук

Основным лечением инвазивного рака мочевого пузыря является радикальная цистэктомия, оперативное лечение, подразумевающее удаление мочевого пузыря и формирование ортотопического резервуара из терминального отдела илеум. Процесс изучения изменений в стенке искусственного мочевого пузыря структурно-функционального характера продолжается на протяжении последних двадцати лет. Целью нашего исследования было изучение особенностей гистохимически выявляемой активности лактатдегидрогеназы в стенке искусственного мочевого пузыря у экспериментальных животных. Материалом настоящего исследования послужили результаты, полученные при исследовании 18 самок mini-pigs. У экспериментальных животных моделирование искусственного мочевого пузыря выполняли путем цистэктомии и последующей илеоцистопластикой. Формирование искусственного мочевого пузыря из участка илеум, выполнение новой функции и контакт с мочой привели к снижению активности ЛДГ практически во всех структурах неobladders на разных этапах эксперимента. Хотелось бы отметить угнетение активности ЛДГ на 59,3% в подслизистом слое на 12-м месяце эксперимента.

Ключевые слова: радикальная цистэктомия, илеоцистопластика, лактатдегидрогеназа, энергетический обмен.

Адреса для листування

Р.В. Савчук
E-mail: savrus7@rambler.ru

Summary

THE ACTIVITY OF LACTATE DEHYDROGENASE IN THE ARTIFICIAL BLADDER (EXPERIMENTAL STUDY)

R. V. Savchuk

The main treatment for invasive bladder cancer is radical cystectomy, surgical treatment involving the removal of the bladder and the formation of an orthotopic reservoir from the terminal section of the ileum. The process of studying changes of structural and functional character in the wall of artificial bladder has been going on for the last twenty years. The aim was to study the histochemically revealed activity of lactate dehydrogenase in the wall of artificial bladder in experimental animals. The material of the study was the results obtained from the 18-female mini-pigs. The modeling of the artificial bladder in experimental animals was performed by cystectomy and subsequent ileo-cystoplasty. The formation of artificial bladder from the ileum, the implementation of a new function and contact with urine led to a decrease in LDH activity in all structures of the neobladder at different stages of the experiment. It should be noted inhibition of LDH activity by 59.3% in the submucosa at 12 month of experiment.

Key words: radical cystectomy, ileocystoplasty, lactate dehydrogenase, energy metabolism.