

# Особенности гистохимических изменений глутаматдегидрогеназы в искусственном мочевом пузыре у динамично (экспериментальное исследование)

Р.В. Савчук<sup>1</sup>, Ф.И. Костев<sup>1</sup>, Б.А. Насибуллин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный медицинский университет

<sup>2</sup>ДУ «Український науково-дослідний інститут медичної реабілітації та курортології Міністерства охорони здоров'я України», м. Одеса

Золотим стандартом лікування м'язово-інвазивного раку сечового міхура з найкращими показниками якості життя пацієнта у післяопераційний період є радикальна цистектомія з ілеоцистопластиком.

**Мета дослідження:** вивчити особливості гистохімічно виявленої активності глутаматдегідрогенази у стінці артіфіційного сечового міхура в експериментальних тварин.

**Матеріали та методи.** Експериментальні дослідження були виконані на 18 самицях mini-pigs віком 4–5 міс і масою 8–10 кг. Моделювання штучного сечового міхура було виконано шляхом цистектомії з наступною ілеоцистопластиком. Контрольні дослідження глутаматдегідрогенази (ГДГ) проводили через 3, 6 і 12 міс після оперативного моделювання.

**Результати.** Гістоензимологічні дослідження стінки здухвинної кишки на різних етапах вивчення після експериментального моделювання артіфіційного сечового міхура не виявили статистично значущих змін активності ГДГ в епітеліальному і підслизовому шарах щодо здорових тварин.

**Заключення.** Активність ГДГ у м'язовому шарі неосциста через 3 міс була статистично вірогідно підвищена, з подальшою тенденцією до збільшення. Можна вважати, що гіпертрофія м'язів змінює транспортні можливості судинної системи артіфіційного сечового міхура, що, з одного боку, зумовлює зсув акценту субстратного забезпечення у бік проміжних метаболітів, а з іншого – недостатнє загальне забезпечення сприяє збереженню процесів життєзабезпечення на порівняно невисокому рівні.

**Ключові слова:** радикальна цистектомія, ілеоцистопластика, глутаматдегідрогеназа.

Рак сечового міхура є дев'ятою за поширеністю злоякісною пухлиною в усьому світі й четвертим найпоширенішим видом раку у чоловіків [1, 2]. У 2018 р. за даними Американського онкологічного товариства очікується виявлення близько 80 тис. нових випадків раку сечового міхура [3].

Золотим стандартом лікування м'язово-інвазивного раку сечового міхура з найкращими показниками якості життя пацієнта у післяопераційний період є радикальна цистектомія з ілеоцистопластиком [4, 5]. Тканини кишечника у реконструктивній хірургії сечового міхура, особливо термінальний відділ здухвинного кишечника, незважаючи на асоційовані злоякісні й системні метаболічні ускладнення, залишаються дотепер найкращим вибором, за відсутності кращої альтернативи [6, 7].

Вивчення впливу сечі на адаптацію слизової оболонки артіфіційного сечового міхура триває протягом останніх 20 років. За даними різних дослідників, результати досить суперечливі. Так, деякі вчені відзначають гіперсекрецію сульфомуцинів, сіаломуцинів, прогресуючу атрофію мікрроворсинок, аденоматозну гіперплазію та дисплазію [8]. Проте

за останнє десятиліття було проведено безліч експериментальних досліджень на тваринних моделях для розроблення нової стратегії для оптимальних реконструктивних рішень. Водночас зміна активності ферментів окисно-відновних реакцій у тканинах артіфіційного сечового міхура залишається поза увагою дослідників, хоча їхня діяльність зумовлює перебіг основних процесів життєдіяльності у тканинах організму.

Системний підхід у фізіології й медицині при вивченні функціональних і патологічних станів людського організму дає можливість оцінювати дані стани за показниками окремих систем і дозволяє використовувати ці системи як біологічні моделі в експериментальній і клінічній діяльності.

**Мета дослідження:** вивчити особливості гистохімічно виявленої активності глутаматдегідрогенази (ГДГ) у стінці артіфіційного сечового міхура в експериментальних тварин.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні дослідження були виконані на 18 самицях mini-pigs віком 4–5 міс і масою 8–10 кг. Моделювання штучного сечового міхура було виконано шляхом цистектомії з наступною ілеоцистопластиком. Вибір експериментального об'єкту зумовлений анатомічними міркуваннями – у самиці сечівник прямий і в 5–7 разів коротший порівняно із самицями.

Методика оперативного втручання була наступною. 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 та підтягують догори. Очеревину розсікають над правим сечоводом разом із навколومیхуровою клітковиною, сечовід відокремлюють від стінки сечового міхура, де перев'язують і відсікають. Аналогічно перев'язують і відсікають лівий сечовід. Перев'язують всі кровоточиві судини з обох сторін. Відділяють передню стінку сечового міхура. Пересікають сечівник, сечовий міхур відділяють від прямої кишки. Міхур видаляють. Гемостаз. Відступаючи 15 см від ілеоцекального клапана, ушивають кінець ізольованого кишкового сегмента безперервними серозно-м'язовими швами вікрил 4-0. Уздовж протибрижового краю розсікають дистальну частину здухвинно-кишкового сегмента на протязі приблизно 10 см. Розсічену частину сегмента U-подібно укладають, суміжні краї обох колін зшивають одним рядом безперервних серозно-м'язових швів вікрил 4-0.

Перед зшиванням вільних країв розсіченого сегмента у приносне коліно здухвинної кишки встановлюють сечовідні катетери № 3Fr, кінці яких виводять через стінку резервуара. У найбільш каудальній частині резервуару роблять отвір, до якого підшивають сечівник 6 швами вікрил 4-0. Шви зав'язують після проведення через сечівник катетера Фолея № 8Fr. Резервуар дрениують цистостомічною трубкою 12Fr, яку виводять разом із сечовідними стентами через стінку ре-

Активність глутаматдегідрогенази у стінці ілеум, ум. од., М±m

Ілеум	Контроль	3 міс	6 міс	12 міс
Епітелій	6,12±0,11	6,09±0,11	6,02±0,11	6,04±0,1
Підслизовий шар	2,02±0,05	2,06±0,09	2,10±0,01	2,05±0,12
М'язовий шар	5,12±0,11	4,10±0,1*	4,09±0,13*	4,0±0,19*

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

зервуара. Резервуар укладають на місце, формують ізоперистальтичне приносне коліно. Здухвинну кишку розсікають на рівні пересічених попередньо сечоводів – на 10 см вище здухвинно-кишкового резервуару. Сечоводи косо зрізають, розсікають уздовж і анастомозують кінець у бік з проксимальною нерозсіченою частиною здухвинно-кишкового сегмента. Стенти, які розташовані всередині сегмента, проводять у сечоводи. Відновлюють безперервність кишки. Стенти виводять через передню черевну стінку, у малий таз встановлюють дренажі через контрапертури. Рану ушивають вікрилом.

Під час проведення ілеоцистопластики вилучали фрагмент стінки здухвинної кишки і стінки сечового міхура. Отриманий матеріал поміщали на суху вуглекислоту (-70 °С) для миттєвого заморожування. З отриманих блоків виготовляли кріостатні зрізи завтовшки 11 мкм, на яких за прописами Лойди проводили гістохімічні реакції з виявлення активності ГДГ. Результати, отримані при дослідженні активності ферменту у стінці здухвинної кишки й сечового міхура, виділені до початку створення моделі сечового міхура, у подальшому використовували як контроль.

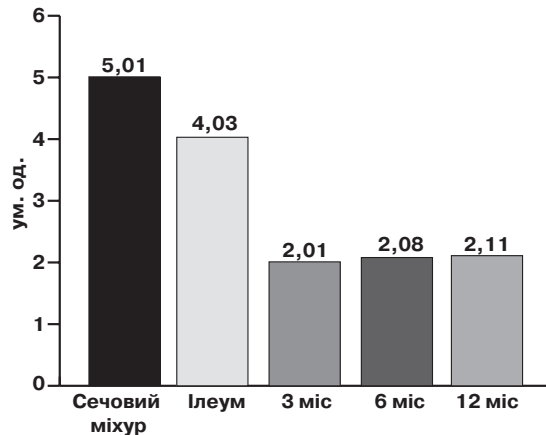
Експериментальних тварин з моделлю сечового міхура групами по 6 тварин виводили з досліду через 3, 6 і 12 міс після оперативного моделювання. Виведення з досліду здійснювалося методом передозування тіопенталу натрію. У тварин вилучали фрагмент стінки здухвинної кишки й штучного сечового міхура. Отриманий матеріал обробляли відповідно до описаного вище алгоритму. На отриманих кріостатних препаратах визначали активність ГДГ.

Глутаматдегідрогеназа (1.4.1.2; 1.4.1.3; 1.4.1.4; ГДГ) – фермент, який здійснює окисне дезамінування глутамату, лейцину й норваліну. Дія ГДГ забезпечує підтримку оптимальної кількості (альфа)-кетоглутарату, тобто ГДГ регулює зв'язок проміжного метаболізму амінокислот і циклу Кребса, а також внутрішньоклітинний фермент останнього етапу гліколізу з відновленням, в анаеробних умовах, пірувату в лактат з вивільненням НАД<sup>+</sup>. Оцінка результатів гістохімічних досліджень здійснювалася напівкількісним методом (Насибуллін, 1992), розробленим нами, що базується на кореляції бальної оцінки активності ферментів і даних цистоспектрофотометрії. Результати досліджень піддавали стандартному статистичному обробленню.

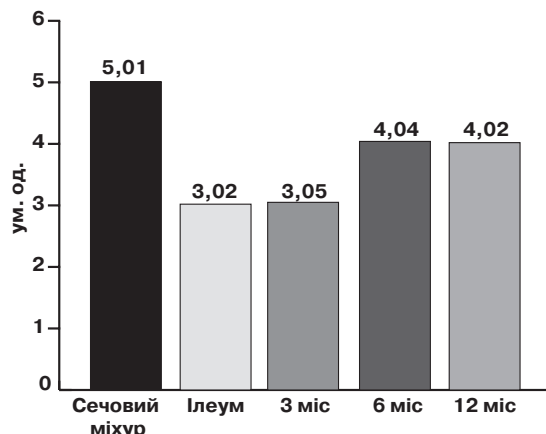
**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Гістоензимологічні дослідження стінки здухвинної кишки на різних етапах вивчення після експериментального моделювання артифіційного сечового міхура не виявили статистично значущих змін активності ГДГ в епітеліальному і підслизовому шарах щодо здорових тварин і представлені у табл. 1. В епітеліальному й м'язовому шарах активність ГДГ висока або близька до неї – 6,12±0,11 і 5,12±0,11 ум.од. відповідно. Необхідно відзначити зниження активності ГДГ на 19,9% – 4,10±0,1 ум. од. (p<0,05) у м'язовому шарі ілеум через 3 міс після оперативного втручання. Дана тенденція зберігається протягом експериментального дослідження.

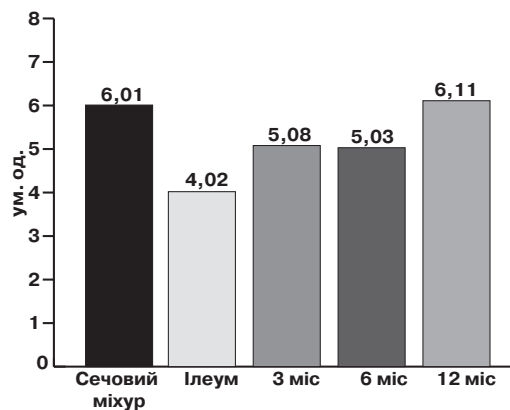
Можна вважати, що завершення післяопераційного періоду повертає функціональну активність структур кишкової стінки у вихідний стан, що спричинює нормалізацію активності ферментів циклу Кребса, а також ферментів циклів субстратного забезпечення основного циклу енергозабезпечення життєдіяльності.



Мал. 1. Активність глутаматдегідрогенази в епітелії сечового міхура, епітеліоцитах ілеум та неоцисті



Мал. 2. Активність глутаматдегідрогенази у підслизовому шарі сечового міхура, ілеум та неоциста



Мал. 3. Активність глутаматдегідрогенази у м'язовому шарі сечового міхура, ілеум та неоциста

Результаты вивчення активності ГДГ у стінці артифіційного сечового міхура після виконання ілеоцистопластики представлені на мал. 1.

Виявлено зниження активності гідрогенази в епітеліальному шарі на 50% –  $(2,01 \pm 0,12)$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) через 3 міс після ілеоцистопластики, порівняно з ілеум –  $4,03 \pm 0,17$  ум. од. і на 59,9% –  $5,01 \pm 0,19$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) порівняно з нативним сечовим міхуром. Дана тенденція зберігається на контрольних етапах експериментального дослідження через 6 і 12 міс. Виконання нових функцій сечового резервуара, постійний контакт із сечею, можливо, позначилися на біохімічній активності епітеліоцитів у формі пригнічення активності ГДГ в епітеліальному шарі неоциста.

Результати, отримані при вивченні активності ГДГ у підслизовому шарі артифіційного сечового міхура, представлені на мал. 2.

Активність ГДГ у підслизовому шарі нативного сечового міхура становить  $5,01 \pm 0,21$  ум. од., що на 39,7% ( $p < 0,05$ ) більше, ніж в ілеум експериментальних тварин –  $3,02 \pm 0,11$  ум. од. Під час контрольних досліджень через 3 міс не спостерігається статистично достовірних змін активності досліджуваної гідрогенази –  $3,05 \pm 0,09$  ум. од. відносно ілеум. Зі свого боку через 6 міс після початку експерименту у підслизовому шарі артифіційного сечового міхура спостерігається збільшення активності ГДГ на 24,5% –  $4,04 \pm 0,27$  ум. од. ( $p < 0,05$ ), з аналогічною тенденцією і через 12 міс –  $(4,02 \pm 0,07)$  ум. од. ( $p < 0,05$ ). Дані зміни свідчать про активізацію синтезу альфа-кетоглутарату.

Зміни активності ГДГ у м'язовому шарі представлені на мал. 3.

Активність ГДГ у м'язовому шарі ілеум на 33% менше –  $4,02 \pm 0,14$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) порівняно з м'язовим шаром нативного сечового міхура –  $6,01 \pm 0,17$  ум. од. ( $p < 0,05$ ), що може пояснюватися більш активною й енерговитратною діяльністю у м'язовому шарі сечового міхура. Зі свого боку через 3 міс після формування артифіційного сечового міхура спостерігається посилення активності ГДГ у м'язовому шарі на 20,1% –  $5,08 \pm 0,13$  ум. од. ( $p < 0,05$ ). Через 6 міс у контрольних дослідженнях активності ГДГ у м'язовому шарі неoblадера не відбувається статистично достовірних змін в активності ГДГ –  $5,03 \pm 0,19$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) порівняно з

даними, отриманими через 3 міс, але зберігається тенденція збільшення активності порівняно з ілеум –  $4,02 \pm 0,14$  ум. од. ( $p < 0,05$ ). Дослідження активності ГДГ у м'язовому шарі неоциста через 12 міс після виконання ілеоцистопластики продемонструвало збільшення активності гідрогенази на 34% –  $6,11 \pm 0,17$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) порівняно з ілеум, її рівень практично зрівнявся з показниками, отриманими для нативного сечового міхура.

## ВИСНОВКИ

Зниження активності ГДГ на 50% в епітеліоцитах неоциста порівняно з ілеум свідчить про токсичний вплив сечі на слизову оболонку неoblадера. Також ця обставина може свідчити про посилення анаеробного гліколізу як джерела аденозинтрифосфату (АТФ) і про посилення використання проміжного метаболіту (альфа)-кетоглутарату як субстрату, що в цілому можливо при зміні системи місцевого капілярного кровопостачання. Можна вважати, що адаптація епітелію кишки до 12-го місяця після операції завершена і система енергозабезпечення переходить на генетично зумовлений рівень активності. Слід зазначити, що субстратне забезпечення циклу Кребса переважно здійснюється за рахунок продуктів анаеробного гліколізу.

У підслизовому шарі активність ГДГ збільшується на 24,5% через 6 міс після проведення ілеоцистопластики, що свідчить про посилення синтезу альфа-кетоглутарату.

Активність ГДГ у м'язовому шарі неоциста через 3 міс була статистично вірогідно підвищена, з подальшою тенденцією до збільшення. 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 з іншого – недостатнє загальне забезпечення сприяє збереженню процесів життєзабезпечення на порівняно невисокому рівні.

Процеси енергозабезпечення артифіційного сечового міхура мають адаптаційно-компенсаторний характер, залежать від умов життєдіяльності з великими можливостями до пристосування й компенсації і потребують подальшого дослідження.

## Особенности гистохимических изменений глутаматдегидрогеназы в искусственном мочевом пузыре в динамике

(Экспериментальное исследование)

Р.В. Савчук, Ф.И. Костев, Б.А. Насибуллин

Золотым стандартом лечения мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря с лучшими показателями качества жизни пациента в послеоперационный период является радикальная цистэктомия с илеоцистопластикой.

**Цель исследования:** изучение особенностей гистохимически выявляемой активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в стенке искусственного мочевого пузыря у экспериментальных животных.

**Материалы и методы.** Экспериментальные исследования были выполнены на 18 самках mini-pigs возрасте 4–5 мес и массой 8–10 кг. Моделирование искусственного мочевого пузыря была выполнена путем цистэктомии с последующей илеоцистопластикой. Контрольные исследования ГДГ проводили через 3, 6 и 12 мес после оперативного моделирования.

**Результаты.** Гистоэнзимологические исследования стенки подвздошной кишки на разных этапах изучения после экспериментального моделирования неoblадера не выявили статистически значимых изменений активности ГДГ в эпителиальном и подслизистом слоях по сравнению со здоровыми животными.

**Заключение.** Активность ГДГ в мышечном слое неоциста через 3 мес была статистически достоверно повышена с последующей тенденцией к увеличению. Можно считать, что гипертрофия миоцитов меняет транспортные возможности сосудистой системы неоциста и, с одной стороны, приводит к смещению акцента субстратного обеспечения в сторону промежуточных метаболитов, а с другой – недостаточное общее обеспечение способствует сохранению процессов жизнеобеспечения на относительно невысоком уровне.

**Ключевые слова:** радикальная цистэктомия, илеоцистопластика, глутаматдегидрогеназа.

## Peculiarities of histochemical glutamatedehydrogenase changes in artificial urinary bladder in dynamics (experimental study)

R.V. Savchuk, F.I. Kostev, B.A. Nasibullin

The gold standard for the treatment of muscle-invasive bladder cancer with the best indicators of the patient's quality of life in the postoperative period is radical cystectomy with ileocystoplasty.

**The objective:** is the investigation of the histochemically revealed activity of glutamate dehydrogenase in the wall of artificial bladder in experimental animals.

**Materials and methods.** Experimental studies were performed on 18 female mini-pigs aged 4–5 months and a mass of 8–10 kg. Modeling of the artificial bladder was performed by cystectomy followed by ileocystoplasty. Control studies of glutamate dehydrogenase were performed at 3, 6 and 12 months after the operational simulation.

**Results.** Hystoenzymological studies of the ileum wall at different stages of the study after the experimental modeling of neobladder did not reveal statistically significant changes in the activity of GDH in the epithelial and submucosa layers compared to healthy animals.

**Conclusion.** The activity of GDG in the muscular layer of the neocyst after 3 months was significantly increased, with a subsequent tendency to increase. The hypertrophy of myocytes changes the transport capabilities of the neocyst system and leads to a shift in the emphasis of substrata provision towards intermediate metabolites. The insufficient general support contributes to the preservation of life-support processes at a relatively low level.

**Key words:** radical cystectomy, ileocystoplasty, glutamate dehydrogenase.

Сведения об авторах

**Савчук Руслан Валерьевич** – Кафедра урологии и нефрологии Одесского национального медицинского университета, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (067) 792-47-63. *E-mail: savrus7@rambler.ru*

**Костев Федор Иванович** – Кафедра урологии и нефрологии Одесского национального медицинского университета, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (067) 482-23-11

**Насибуллин Борис Абдулаевич** – ГУ «Украинский научно-исследовательский институт медицинской реабилитации и курортологии МЗ Украины», 65000, г. Одесса, пер. Лермонтовский, 6

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Wong MC, Fung FD, Leung C, Cheung WW, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep.* 2018 Jan 18;8(1):1129.
2. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017 Jan; 71(1): 96–108.
3. Smith N. D. et al. Bladder cancer mortality in the United States: a geographic and temporal analysis of socioeconomic and environmental factors. *J Urol.* 2016 Feb; 195 (2):290–6.
4. Niyati Lobo, Ramesh Thurairaja, Rajesh Nair, Prokar Dasgupta, Muhammad Shamim Khan. Robot-assisted radical cystectomy with intracorporeal urinary diversion – The new ‘gold standard’? Evidence from a systematic review. *Arab Journal of Urology.* 2018 Sep;16(3):307–13.
5. Wei Shen Tan, Benjamin W. Lamb, John D. Kelly. Complications of Radical Cystectomy and Orthotopic Reconstruction. *Adv Urol.* 2015; 2015: 323157.
6. Leonardo L. Monteiro, Wassim Kasouf. Radical Cystectomy is the best choice for most patients with muscle-invasive bladder cancer? Opinion: Yes. *Int Braz J Urol.* 2017 Mar-Apr; 43(2):184–7.
7. Yong Seong Lee, Ha Bum Jung, Don Kyung Choi, Sung Tae Cho, Ki Kyung-Kim, Young Goo Lee. Functional Assessment of the Hautmann Ileal Neobladder with Chimney Modification Using Uroflowmetry and a Questionnaire. *BioMed Research International Volume* 2016.
8. 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.

*Статья поступила в редакцию 11.10.2018*