

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ НА ВВЕДЕНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.А.Яковлев, Ю.Г.Васильев*, Г.В.Шумихина, Д.С.Берестов*

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER ON THE ADMINISTRATION OF DOXORUBICIN IN EXPERIMENTAL ANIMALS

A.A.Yakovlev, Yu.G.Vasiliev*, G.V.Shumikhina, D.S.Berestov*

Ижевская государственная медицинская академия, histolog@igma.udm.ru

*Ижевская государственная сельскохозяйственная академия

Высокая распространенность применения химиотерапевтических препаратов требуют изучения механизмов их действия. В данной статье рассмотрены некоторые механизмы проапоптотического действия доксорубицина на печень экспериментальных животных. Выявлен ряд закономерностей структурных морфологических ответов. В качестве объекта исследования были использованы белые беспородные мыши, сформированные по принципу пар-аналогов, с выделением двух экспериментальных и одной контрольной группы. На 14 сутки животные выводились из эксперимента с последующей визуальной оценкой органов брюшной полости и микроскопической организации печени. В результате при макроскопическом исследовании выявлена выраженная реакция с формированием асептического перитонита и развитием достаточно грубых функциональных изменений непарных органов брюшной полости. При микроскопическом исследовании определены неспецифические виды ответов на введение доксорубицина с формированием лейкоцитарной инфильтрации в различных отделах печени и печеночных долек, накопление жировых включений в цитоплазме гепатоцитов. Существуют выраженные отличия ответов среди особей разного пола на введение равного количества доксорубицина. Выраженность ответов на введение препарата также имела дозозависимый эффект.

Ключевые слова: печень, доксорубин, апоптоз, клеточные реакции

Для цитирования: Яковлев А.А., Васильев Ю.Г., Шумихина Г.В., Берестов Д.С. Морфологические изменения в печени на введение доксорубицина у экспериментальных животных // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. 2022. №2(127). С.51-54. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2\(127\).51-54](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2(127).51-54)

The high prevalence of using chemotherapeutic drugs requires studying the mechanisms of their effect. This article discusses some of the mechanisms of the pro-apoptotic effect of doxorubicin on the liver in experimental animals. A number of patterns of structural morphological responses have been identified. As the object of the study, white outbred mice formed according to the principle of pairs of analogues were used, with the formation of two experimental groups and one control group. On day 14, the animals were withdrawn from the experiment, followed by a visual assessment of the abdominal organs and the microscopic organization of the liver. As a result, a macroscopic examination revealed a pronounced reaction with the formation of aseptic peritonitis and the development of rather gross functional changes in the unpaired abdominal organs of the abdominal cavity. Microscopic examination revealed non-specific types of responses to the administration of doxorubicin with the formation of leukocyte infiltration in various parts of the liver and hepatic lobules, the accumulation of fatty inclusions in the cytoplasm of hepatocytes. Also, there are pronounced differences in responses among individuals of different sexes to the injection of an equal amount of doxorubicin. The severity of responses to the drug administration also had a dose-dependent effect.

Keywords: liver, doxorubicin, apoptosis, cellular reactions

For citation: Yakovlev A.A., Vasiliev Yu.G., Shumikhina G.V., Berestov D.S. Morphological changes in the liver on the administration of doxorubicin in experimental animals // Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences. 2022. №2(127). P.51-54. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2\(127\).51-54](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2(127).51-54)

Доксорубин и его фармацевтические формы на данный момент являются одним из основных химиотерапевтических препаратов, механизм действия которого обусловлен интеркалированием ДНК опухолевой клетки, митохондриальным повреждением, блоком факторов транскрипции и митоза (топоизомераза II) [1]. Препарат может использоваться как индуктор апоптоза [2-5]. Выраженная проапоптотическая активность доксорубицина формирует сенесцентный фенотип (выход из клеточного цикла с изменением микроокружения) у наиболее активно де-

лящихся клеток (López-Otín et al., 2013). В качестве объекта в данном исследовании рассматривались клеточные популяции [6-8].

Целью данной работы явилась качественная оценка гистологической структуры печени экспериментальных животных на фоне введения доксорубицина.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования сформирован по принципу «случай-контроль», где в качестве «случая» рас-

смотрены серии экспериментов с введением доксорубина. Белые беспородные мыши были разделены на следующие группы по 5 самцов и 5 самок в каждой: контрольная; экспериментальная группа с введением доксорубина 10 мг/кг; экспериментальная группа с введением доксорубина 5 мг/кг. Доксорубин предварительно разводили физиологическим раствором до объема, удобного для дозирования (0,1 мл на каждые 10 г живой массы). В качестве экспериментального использовался препарат доксорубина «Адрибластин» фирмы «Pfizer», форма выпуска — порошок лиофилизированный для приготовления инъекций, 10 мг (PHARMACIA & UPJOHN Актавис Италия С.п.А. Пфайзер Италия С.р.Л. Фармация и Апджон С.п.А., страна Италия). Препарат вводился внутривентрально. Контрольные животные получали внутривентрально эквивалентное количество физиологического раствора. Взвешивание экспериментальных животных производилось перед введением препарата.

Выведение животных из эксперимента производилось методом декапитации на 14 сутки по общепринятой методике, после чего проводилась макроскопическая оценка внутренних органов.

Образцы печени для фиксации помещали в нейтральный забуференный формалин сразу после аутопсии.

Далее производили промывку материала, обезживание в батарее спиртов восходящей концентрации, заливку в парафиновую среду «Histomix». Изготовление микроанатомических срезов производили на ротационном микротоме (парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм) с дальнейшей окраской гематоксилином и эозином, заключением в акриловую монтирующую маловязкую среду «Витрогель» и микроскопическим анализом. Полученная картина описывалась и документировалась с помощью окуляр-видеокамеры.

Исследования выполнены исходя из «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012) [9] и «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010) [10]. Экспериментальная часть работы на животных проводилась в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986) [11] и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 [12].

Результаты исследования и их обсуждение

У экспериментальных животных, получавших доксорубин, визуально наблюдалась картина внутрикишечной секвестрации жидкости, сопровождающаяся стазом химуса и окрашиванием стенки кишки в коричневый цвет, что зависело от дозировки препарата. Часть животных имела картину асептического серозного перитонита. Других визуальных изменений не выявлено.

Контроль, самцы. При гистологическом исследовании определялась следующая картина. Печень

обладает типичными особенностями видовой организации. Структура печени имеет слабо выраженное дольчатое строение. Печеночные трабекулы типично сходятся к центральной зоне долек. В 2 случаях выявляется незначительная жировая инфильтрация гепатоцитов. Преобладают одноядерные клетки, с центрально расположенными ядрами. Немногочисленные (не более 15%) гепатоциты имеют 2 ядра. Гипертрофированные ядра и гепатоциты также немногочисленны (не более 1%). У 4 животных выявлена мелкозернистая инфильтрация оксифильными гранулами, что обычно трактуется как циркадное проявление накопления гликогена, типичное для грызунов. Выявляются слабо выраженные лейкоцитарные инфильтрации мононуклеарами в непосредственном окружении междольковых и сегментарных лимфатических протоков. Немногочисленные лейкоцитарные (лимфо-моноцитарные) инфильтраты, стоящие не более нескольких десятков мононуклеаров, обнаруживаются преимущественно на периферии долек. В одном из случаев имеется один лейкоцитарный инфильтрат до 100 клеток. Проявлений значительной апоптотической активности не выявляется. Липидные включения в основном мелкие, немногочисленные. Звездчатые макрофаги, липоциты и ямочные клетки (печеночные натуральные киллерные клетки) немногочисленны и диффузно распределены по ходу синусоидов.

Контроль, самки. Общая организация печени самок морфологически близка к таковой у самцов. Тем не менее, имеются некоторые особенности. В частности лимфоидные и моноцитарноклеточные инфильтрации в печени встречаются относительно реже, преобладают лишь мелкие не более 20–30 клеток лейкоцитарные инфильтраты. Обнаруживается лишь весьма незначительная жировая инфильтрация гепатоцитов. Гепатоциты с гипертрофированными и двойными ядрами единичны в поле зрения.

У самцов на 14 сутки после введения 10 мг/кг доксорубина в печени выявляется общее сохранение микроанатомической организации органа. Сохраняется общая организация печеночных трабекул. Локальные проявления жировой инфильтрации гепатоцитов наблюдаются в четырех случаях, носят слабо или умеренно выраженный характер. Включения мелкие, диаметром до 2–4 мкм. Гепатоциты с проявлениями жировой инфильтрации выявляются в основном на периферии органа либо в центральных участках печеночных долек. Экцентричное расположение и гиперхромность выявляется в 3–7% ядер печеночных клеток. Имеются проявления гипертрофических реакций гепатоцитов (до 15–17%) в виде увеличения диаметра ядер, гипертрофии ядрышек. У 17–29% гепатоцитов выявляется по 2 ядра. Лейкоцитарные инфильтраты в основном немногочисленные и мелкие. В одном из случаев выявляются относительно крупные (более 100–150 клеток) лейкоцитарные инфильтраты с признаками инволюции в них гепатоцитов в виде сморщивания клеток с проявлениями кариопикноза и кариорексиса ядер. В остальных случаях явления кариопикноза определяются диффузно (до 2–4 в поле зрения на увеличении $\times 400$). Незначительно повышено содержание ямочных (печеночных натуральных киллерных клеток)

и купферовских клеток (звездчатых макрофагов). Выявляется гипертрофия отдельных звездчатых макрофагов в виде увеличения их размеров, гипертрофии ядер. Зональные расширения периваскулярных пространств, признаки набухания ядер некоторых (до 20-28%) эндотелиоцитов.

У самок на 14 день введения доксорубина в количестве 10 мг/кг, в отличие от самцов, проявления жировой инфильтрации встречаются практически во всех случаях, достигая от легкой до умеренно выраженной степени. В ряде случаев выявляются признаки крупно- и мелкоочаговой липидной инфильтрации; липидные включения могут вытеснять ядра на периферию клетки. В этом случае повышены проявления инволюции гепатоцитов в зонах инфильтрации, что указывает на развитие дистрофических изменений в органе. В остальных случаях лейкоцитарные инфильтрации мелкие. При этом они более многочисленны по сравнению с контролем и с аналогичными изменениями у самцов. Проявлений усиления гипертрофических реакций гепатоцитов при этом не наблюдается. Существенно усилена диффузная периваскулярная инфильтрация гипертрофированными звездчатыми макрофагами и печеночными натуральными киллерными клетками. Выявлены признаки набухания сосудистого эндотелия. Проявления инфильтрации желчных протоков и трабекулярных вен слабо выражены.

У самцов на 14 сутки после введения доксорубина в количестве 5 мг/кг, наблюдаются проявления диффузной жировой инфильтрации гепатоцитов от легкой до умеренной степени выраженности у всех животных. Они преимущественно локальны. Видны проявления гипертрофических реакций в виде повышенного содержания двухъядерных форм клеток и клеток с гипертрофированным ядром и ядрышко-вым аппаратом. Отмечены два случая с массивными зонами инфильтрации, занимающими до 10-15% площади среза. В основном это клетки моноцитарно-макрофагического и лимфоидного рядов. Но наиболее крупные зоны инфильтрации обнаруживают сегментоядерные формы клеток. Это сопряжено с многочисленными фигурами апоптозов гепатоцитов в этих зонах.

У самок на 14 сутки после введения 5 мг/кг доксорубина проявления от легкой до умеренной жировой инфильтрации цитоплазмы гепатоцитов. Гипертрофические ответы гепатоцитов в виде повышения содержания двухъядерных форм клеток и гигантских гепатоцитов с гипертрофированными ядрышками слабо выражены. Проявления апоптозов гепатоцитов, лейкоцитарные инфильтрации паренхимы также слабо выражены и немногочисленны.

Таким образом, введение доксорубина в разной дозировке (5 мг/кг, 10 мг/кг) ведет к усилению проявлений апоптозов в печени с выраженными неспецифическими реакциями в виде жировой и лейкоцитарной инфильтрации. При этом не выявлено пролиферативной активности клеток. Проявление апоптозов и иных клеточных реакций имеет выраженный дозозависимый эффект. Также присутствуют выраженные отличия в клеточном ответе между самцами

и самками, что проявляется в менее значимом накоплении гепатоцитами жировых включений и меньшей степени лейкоцитарной инфильтрации паренхимы печени у самок.

- Harrington K.L., Lewanski C.R., Stewart S.W. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: Clinical development // Clin Oncol. 2000. Vol.12(1). P.16-24. DOI: <https://doi.org/10.1053/clon.2000.9105>
- Ewer M.S., Benjamin R.S. Cardiotoxicity of chemotherapeutic Drugs // The Chemotherapy source book / Ed. M.C.Perry. 1997. P.649-663.
- Olson R.D., Mushlin P.S., Breuner D.E. et al. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol // Proc Natl Acad Sci USA. 1988. Vol.85. P.3585-3589. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3585>
- Васильев Ю.Г., Васильев Р.О., Берестов Д.С. Морфология селезенки мышей в контроле и в ходе иммуносупрессии // Технологические тренды устойчивого функционирования и развития АПК: Мат. Междунар. науч.-практ. конф. Ижевск, 24–26 февраля 2021 г. Ижевск: ИЖЕГСХА, 2021. С.91-95.
- Васильев Ю.Г., Шумихина Г.В., Берестов Д.С., Корепанова Ю.Б. Структурные особенности селезенки мышей в различных функциональных состояниях // Труды ИГМА: сб. науч. ст. Ижевск: ИГМА, 2021. С.21-23.
- Базиков И.А., Бейер Э.В., Лукинова В.В., Мальцев А.Н. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубина и его нисомальной формы // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2015. Т.10. №4. С.403-406.
- Воронцова Т.С., Исакова Л.С., Васильев Ю.Г., Васильева Н.Н. Влияние техногенного врашающегося электрического поля (ВЭП) на строение печени у крыс // Морфология. 2020. Т.157. №2-3. С.52.
- Берестов Д.С., Шишкин А.В., Трошин Е.И. и др. Микроструктура печени мышей на фоне введения различных доз премикса ActiveMix // Международный вестник ветеринарии. 2018. №4. С.129-134.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н.Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 245 с.
- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 13 октября 2010 г., регистрационный № 18713).
- European convention for protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986. 48 p.
- Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

References

- Harrington K.L., Lewanski C.R., Stewart S.W. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: Clinical development. Clin. Oncol., 2000, vol. 12(1), pp. 16–24. doi: <https://doi.org/10.1053/clon.2000.9105>
- Ewer M.S., Benjamin R.S. Cardiotoxicity of chemotherapeutic Drugs. The Chemotherapy source book. Ed. M.C.Perry. 1997, pp. 649–663.
- Olson R.D., Mushlin P.S., Breuner D.E. et al. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, pp. 3585–3589. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3585>
- Vasiliev Yu.G., Vasiliev R.O., Berestov D.S. Morfologiya selezenki myshey v kontrole i v khode immunosupressii [Morphology of the spleen of mice in control and during immunosuppression]. Tekhnologicheskiye trendy ustoychivogo funktsionirovaniya i razvitiya APK: Mat. Mezhdunar. nauch. - prakt. konf. [Technological Trends of Sustainable Functioning and Development of the Agroindustrial Complex: Mat. Internat. Sci. and Pract. Conf.], Izhevsk, February 24–26, 2021. Izhevsk, IzheGSHA Publ., 2021, pp. 91–95.

5. Vasiliev Yu.G., Shumikhina G.V., Berestov D.S., Korepanova Yu.B. Strukturnyye osobennosti seizenki myshey v razlichnykh funktsional'nykh sostoyaniyakh [Structural features of the spleen of mice in various functional states]. Trudy IGMA: sb. nauch. st. — Proc. of Izhevsk State Medical Academy: Sci. Art. Coll. Izhevsk, ISMA Publ., 2021, pp. 21-23.
6. Bazikov I.A., Beyer E.V., Lukinova V.V., Maltsev A.N. Sravnitel'naya otsenka ostroy toksichnosti doksorubitsina i yego niosomal'noy formy [Comparative assessment of the acute toxicity of doxorubicin and its niosomal form]. Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza — Medical Bulletin of the North Caucasus, 2015, vol. 10, no. 4. pp. 403–406.
7. Vorontsova T.S., Isakova L.S., Vasil'ev Yu.G., Vasil'eva N.N. Vliyaniye tekhnogenogo vrashchayushchegosya elektricheskogo polya (VEP) na stroyeniye pecheni u kryss [Influence of technogenic rotating electric field (REF) on the structure of the liver in rats]. Morfologiya — Morphology, 2020, vol. 157, no. 2–3, p. 52.
8. Berestov D.S., Shishkin A.V., Troshin E.I., et al. Mikrostruktura pecheni myshey na fone vvedeniya razlichnykh doz premiksa ActiveMix [Microstructure of the liver of mice against the background of the introduction of various doses of the ActiveMix premix]. Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii — International Bulletin of Veterinary Medicine, 2018, no. 4, pp. 129–134.
9. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarsvennykh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs]. Ed. A.N.Mironova. Moscow, Grif i K Publ., 2012. 245 p.
10. Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii ot 23.08.2010 № 708n «Ob utverzhdenii Pravil laboratornoy praktiki» [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of August 23, 2010, no. 708n “On Approval of the Rules for Laboratory Practice”] (registered by the Ministry of Justice of the Russian Federation on October 13, 2010, registration no. 18713). (In Russ.)
11. European Convention for Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986. 48 p.
12. Prikaz MZ SSSR № 755 ot 12.08.1977 «Pravila pro-vedeniya rabot s ispol'zovaniyem eksperimental'nykh zhivotnykh» [Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 08/12/1977 "Rules for conducting work using experimental animals"]. (In Russ.)