

АНАТОМИЯ ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.014.46:612.354

DOI: 10.34680/2076-8052.2023.2(131).216-222

ГРНТИ 76.29.34+76.35.45

Специальность ВАК 3.3.1

Научная статья

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ СОЧЕТАННОГО ВВЕДЕНИЯ АДРИБЛАСТИНА И FOXO4-DRI

Яковлев А. А.¹, Васильев Ю. Г.², Шумихина Г. В.¹, Берестов Д. С.²

¹Ижевская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ
(Ижевск, Россия)

²Удмуртский государственный аграрный университет (Ижевск, Россия)

Аннотация Доксорубин активно используется в научной практике не только как химиотерапевтический препарат, но и как индуктор сенесценции за счёт своего механизма действия: а именно блока митоза, развития митохондриальной дисфункции и интеркалирования ДНК, что наиболее ярко проявляется в лабильных клеточных популяциях. Сенесцентный фенотип на данный момент рассматривается как один из возможных вариантов индукции проонкогенов, сбоя процессов репарации, локального воспалительного ответа. Сочетанное применение сенолитиков вместе с химиотерапевтическими препаратами используется уже длительное время (кверцетин и дазатиниб), однако комбинация сенолитиков пептидной природы (FOXO4-DRI) с доксорубином представляется как одна из наиболее перспективных. В данной статье рассмотрено совместное применение FOXO4-DRI и доксорубина у самок и самцов мышей в ранние сроки. В результате при микроскопическом исследовании отмечено умеренное протективное влияние сенолитического пептида на клеточную популяцию печени, снижение степени лейкоцитарной инфильтрации, снижение степени жировой инфильтрации. Отмечена значительная разница в ответах, между животными разного пола.

Ключевые слова: печень, доксорубин, апоптоз, клеточные реакции, FOXO4-DRI

Для цитирования: Яковлев А. А., Васильев Ю. Г., Шумихина Г. В., Берестов Д. С. Морфологические изменения в печени экспериментальных животных на фоне сочетанного введения адрибластина и FOXO4-DRI // Вестник НовГУ. 2023. 2(131). 216-222. DOI: 10.34680/2076-8052.2023.2(131).216-222

Research Article

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER OF EXPERIMENTAL ANIMALS WITH COMBINED INTRODUCTION OF ADRIBASTIN AND FOXO4-DRI

Yakovlev A. A.¹, Vasiliev Yu. G.², Shumikhina G. V.¹, Berestov D. S.²

¹Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (Izhevsk, Russia)

²Udmurt State Agricultural University (Izhevsk, Russia)

Abstract Doxorubicin is actively used in scientific practice not only as a chemotherapeutic drug, but also as a senescence inducer due to its mechanism of action, namely, the blocking of mitosis, the development of mitochondrial dysfunction and DNA intercalation, which is most pronounced in labile cell populations. The senescent phenotype is currently considered as one of the possible options for the induction of prooncogenes, failure of repair processes and local inflammatory response. The combined use of senolytics together with chemotherapy drugs has been used for a long time (quercetin and dasatinib), however, the combination of peptide-based senolytics (FOXO4-DRI) with doxorubicin seems to be one of the most promising. This article discusses the combined use of FOXO4-DRI and doxorubicin in female and male mice in the early stages. As a result, microscopic examination showed a moderate protective effect of the

senolytic peptide on the liver cell population, a decrease in the degree of leukocyte infiltration, and a decrease in the degree of fatty infiltration. There was a significant difference in responses between animals of different sexes.

Keywords: liver, doxorubicin, apoptosis, cellular reactions, FOXO4-DRI

For citation: Yakovlev A. A., Vasiliev Yu. G., Shumikhina G. V., Berestov D. S. Morphological changes in the liver of experimental animals with combined introduction of adriabastin and FOXO4-DRI // Vestnik NovSU. 2023. 2(131). 216-222. DOI: 10.34680/2076-8052.2023.2(131).216-222

Введение

Применение химиотерапевтических препаратов, исходя из их молекулярно-клеточных реакций сопровождается развитием сенесцентного фенотипа в различных, преимущественно активных, клеточных популяциях. Доксорубицин как препарат из группы антрациклиновых антибиотиков, вызывает выраженный сенесцентный фенотип, что связано с его механизмом действия (интеркалирование ДНК, митохондриальное повреждение, блоком факторов транскрипции и митоза (топоизомераза II)) [1]. Данное свойство химиотерапевтических препаратов вызывает необходимость использования различных методик борьбы с сенесцентными клетками, так как сенесцентный фенотип (SASP) обладает различными патогенетическими механизмами, вплоть до выраженного проонкогенного влияния. Одним из возможных сенолитических препаратов может рассматриваться пептид FOXO4-DRI. За счёт конкурентного связывания с ингибитором белка р53 данный пептид позволяет вывести клетку из клеточного цикла, путём активации апоптоза.

В данной работе объектом исследования выбраны клеточные популяции печени белых лабораторных мышей, на фоне индуцированного ареста клеточного цикла и применения сенолитического препарата [11].

Целью данной работы явилась качественная оценка гистологической структуры печени экспериментальных животных на фоне введения доксорубина и сенолитического препарата FOXO4-DRI.

Материалы и методы исследования

Исследование построено по принципу «пар аналогов», где в качестве контроля рассматривались животные, которым был введён доксорубицин, экспериментальная группа представлена животными, с сочетанным введением доксорубина и FOXO4-DRI. Количество животных определено минимальной статистической потребностью – 5 самцов и 5 самок, при введении доксорубина – 10 мг/кг, и 5 самцов и 5 самок при совместном введении доксорубина 10 мг/кг и FOXO4-DRI. Доксорубицин, вводился внутривентрально, с предварительным разведением физиологическим раствором, удобного для дозирования (0,1 мл на каждые 10 г живой массы). Пептид FOXO4-DRI вводился на 10 сутки после введения доксорубина, в дозировке 5 мг/кг внутривентрально, в разведении на

стерильном фосфатном буферном растворе (0,1 мл на 10 г живой массы), трёхкратно через день. В качестве экспериментальных использовались препараты 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), и FOXO4-DRI – препарат «FX4-DRI» (фирмы Chengdu Yongshe Chemical Co., Ltd China – форма выпуска порошок лиофилизированный для приготовления инъекций 10 мг).

Животные выводились из эксперимента по стандартной методике методом декапитации на 14 сутки после введения доксорубина.

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

Подготовка парафиновых блоков, для выполнения гистологических препаратов проводилась по общепринятой методике, с использованием батареи спиртов восходящей крепости, и парафиновой среды «Histomix». Гистологические срезы выполняли на ротационном микротоме (толщиной 5–7 мкм) с дальнейшей окраской гематоксилином и эозином, заключением в акриловую монтирующую маловязкую среду «Витрогель», с последующим 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) [4] и «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010) [6]. Экспериментальная часть работы на животных проводили 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) [8] и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 [7].

Результаты исследования и их обсуждение

У самцов на 14 сутки после введения 10 мг/кг доксорубина структура печени имеет типичный вид. Печёночные балки прослеживаются по всем полям зрения. Жировая инфильтрация гепатоцитов не повсеместна, липидные капли занимают до 10% объема цитоплазмы. Включения мелкие, диаметром до 2-4 мкм. Проявления инфильтрации определяются в периферийных зонах органа, перипортальных зонах печёночных долек. Преимущественно расположение ядер центральное, смещение на периферию не значительное – до 3-7% клеток, гиперхромные ядра встречаются спорадически. До четверти гепатоцитов имеют два

ядра, диаметр их увеличен, определяется гипертрофия ядрышек. Явления лейкоцитарной инфильтрации незначительные, единичные скопления лейкоцитов. На фоне инфильтратов определяются зоны инволюции и апоптоза в виде кариопикноза и кариорексиса. В остальных случаях явления кариопикноза определяются диффузно (до 2-4 в поле зрения на увеличении $\times 400$). Несколько повышено количество резидуальных макрофагально-лимфоцитарных клеточных популяций (печеночные макрофаги и печеночные натуральные киллерные клетки). Выявляется гипертрофия отдельных звездчатых макрофагов в виде увеличения их размеров, гипертрофии ядер. При оценке периваскулярных пространств отмечается их умеренное расширение – нельзя исключить искусственное сморщивание; набухание ядер (до 20-25%) эндотелиоцитов.

У самок на 14 день введения доксорубина определяются выраженные гендерные отличия. Липидная инфильтрация гепатоцитов ярко выражена, до 80% во всех случаях. Обширные липидные включения формируют капли, диаметром до 10 мкм, с оттеснением ядер клеток на периферию. Явления инволюции гепатоцитов в зонах жировой инфильтрации широко представлены, в виде наличия зон кариопикноза и кариорексиса, наличия обширных (до 500 клеток) макрофагально-лимфоцитарных инфильтратов. В остальных случаях лейкоцитарные инфильтрации мелкие. При этом они более многочисленны по сравнению с контролем и с аналогичными изменениями у самцов. Зон гипертрофии ядрышек, а также клеток с удвоенными ядрами не определяется. Существенно усилена диффузная периваскулярная инфильтрация гипертрофированными звездчатыми макрофагами и печёночными натуральными киллерами. Эндотелиоциты центральных вен набухшие, прослеживаются явления кариопикноза, пространства Диссе с выраженной инфильтрацией.

У самцов на 14 сутки при сочетанном введении FOXO4-DRI и доксорубина печень сохраняет общие принципы организации. Клеточный состав не изменён. Признаки жировой дистрофии не определяются, липидные включения мелкие, до 2-4 мкм, по периферии клеток. Определяются единичные зоны диффузной лейкоцитарной инфильтрации. Зоны гипертрофии единичные, с наличием двухъядерных клеток. В целом структура печёночной стромы и паренхимы интактны.

У самок на 14 сутки при сочетанном введении FOXO4-DRI и доксорубина определяется значительная лимфоцитарная инфильтрация до 10-15% от площади срезов, что меньше, чем у контрольной группы. Очаги как мелкие, так и крупные (до 200 клеток). В областях инфильтрации можно определить зоны инволюции гепатоцитов. В одном случае лейкоцитарные очаги более мелкие и не столь многочисленны. Во всех других случаях выражены признаки (от лёгкой до средней) липидной инфильтрации цитоплазмы гепатоцитов. Структура почечных трабекул при этом сохранена, нет признаков развития цирроза.

Заключение

Таким образом, изученные нами морфологические изменения при введении FOXO4-DRI и доксорубина, у самцов и самок имеет умеренное протективное влияние, в виде снижения степени жировой и лейкоцитарной инфильтрации, снижения степени инволюции гепатоцитов, причём значительно более выраженное у самцов. Отмечается отсутствие гиперэргических реакций в виде пролиферативной активности.

Список литературы

1. Harrington K. L., Lewanski C. R., Stewart J. S. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part.2: Clinical development // Clinical oncology. 2000. 12(1). 16-24. DOI: 10.1053/clon.2000.9105
2. Ewer M. S., Benjamin R. S. Cardiotoxicity of chemotherapeutic Drugs // The Chemotherapy source book. Ed. M. C. Perry. New York, 1997. P. 458-468.
3. Olson R. D., Mushlin P. S., Brenner D. E., Fleischer S., Cusack B. J., Chang B. K., Boucek Jr. R. J. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. 85(10). 3585-3589. DOI: 10.1073/pnas.85.10.3585
4. Базиков И. А., Бейер Э. В., Лукинова В. В. Мальцев А. Н. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубина и его ниосомальной формы // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2015. 10(4). 403-406. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под редакцией А. Н. Миронова. Москва, Гриф и К, 2012. 944 с. URL: https://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Zakon_RF/Mironov_Rukovodstvo_po_provedeniju_doklinicheskikh_issledovaniy_lekarstvennykh_sredstv.pdf (Дата обращения: 08.11.2022).
6. Правила лабораторной практики: Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708 н от 23.08.2010 // КонтурНорматив. URL: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId165691> (Дата обращения: 16.12.2022).
7. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977. URL: https://primatologia.ru/images/NII/GLP/3_2_prikaz_minzdrawa_o_meraz_zhiwotnyh.pdf (Дата обращения: 15.12.2022).
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986. URL: <http://www.worldlii.org/int/other/treaties/COETSER/1986/1.html> (Дата обращения: 30.11.2022).
9. Васильев Ю. Г., Шумихина Г. В., Берестов Д. С., Корепанова Ю. Б. Структурные особенности селезенки мышей в различных функциональных состояниях // Труды Ижевской государственной медицинской академии: сборник научных статей. Т. 59. Ижевск, Ижевская государственная медицинская академия, 2021. С. 21-23.
10. 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: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной году науки и технологии в России, Ижевск,

24–26 февраля 2021 года. Ижевск, Ижевская государственная сельскохозяйственная академия, 2021. С. 91-95.

11. Яковлев А. А., Васильев Ю. Г., Шумихина Г. В., Берестов Д. С. Морфологические изменения в печени на введение доксорубина у экспериментальных животных // Вестник НовГУ. 2022. 2(127). 51-54. DOI: 10.34680/2076-8052.2022.2(127).51-54

References

1. Harrington K. L., Lewanski C. R., Stewart J. S. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part.2: Clinical development // Clinical oncology. 2000. 12(1). 16-24. DOI: 10.1053/clon.2000.9105

2. Ewer M. S., Benjamin R. S. Cardiotoxicity of chemotherapeutic Drugs // The Chemotherapy source book. Ed. M. C. Perry. New York, 1997. P. 458-468.

3. Olson R. D., Mushlin P. S., Brenner D. E., Fleischer S., Cusack B. J., Chang B. K., Boucek Jr. R. J. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. 85(10). 3585-3589. DOI: 10.1073/pnas.85.10.3585

4. Bazikov I. A., Beyer E. V., Lukinova V. V., Maltsev A. N. Sravnitel'naya ocenka ostroj toksichnosti doksorubicina i ego niosomal'noj formy [Comparative evaluation of the acute toxicity of doxorubicin and its niosomal form] // Medical News of the North Caucasus. 2015. 10(4). 403-406. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098

5. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Ch. 1 [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1]. Ed. A.N. Mironov. Moscow, Grif i K Publ., 2012. 944 p. Available at: https://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Zakon_RF/Mironov_Rukovodstvo_po_provedeniju_doklinicheskikh_issledovanii_lekarstvennykh_sredstv.pdf (Accessed: 08.11.2022).

6. Pravila laboratornoj praktiki: Prikaz Ministerstva zdravooohraneniya Rossijskoj Federacii № 708 n ot 23.08.2010 [Rules of laboratory practice: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 708 n dated 08/23/2010]. Available at: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=165691> (Accessed: 16.12.2022).

7. Pravila provedeniya rabot s ispol'zovaniem eksperimental'nykh zhivotnykh: Prikaz MZ SSSR № 755 ot 12.08.1977 [Rules for carrying out work using experimental animals: Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 12.08.1977]. Available at: https://primatologia.ru/images/NII/GLP/3_2_prikaz_minzdrawa_o_merah_zhiwotnyh.pdf (Accessed: 15.12.2022).

8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986. Available at: <http://www.worldlii.org/int/other/treaties/COETSER/1986/1.html> (Accessed: 30.11.2022).

9. Vasiliev Yu. G., Shumikhina G. V., Berestov D. S., Korepanov Yu. B. Strukturnyye osobennosti selezenki myshey v razlichnykh funktsional'nykh sostoyaniyakh [Structural features of the spleen of mice in various functional states] // Proceedings of the Izhevsk State Medical Academy: a collection of scientific articles, vol. 59. Izhevsk, Izhevsk State Medical Academy, 2021. P. 21-23.

10. Vasiliev Yu. G., Vasiliev R. O., Berestov D. S. Morfologiya selezenki myshey v kontrole i v hode immunosupressii [Morphology of the spleen of mice in control and during immunosuppression] // Technological trends in sustainable functioning and development of the agro-industrial complex: materials of the International scientific and practical conference dedicated to the year of science and technology in Russia, Izhevsk, February 24–26, 2021. Izhevsk, Izhevsk State Agricultural Academy, 2021. P. 91-95.

11. Yakovlev A. A., Vasiliev Yu. G., Shumikhina G. V., Berestov D. S. Morfologicheskiye izmeneniya v pecheni na vvedeniye doksorubitsina u eksperimental'nykh zhivotnykh [Morphological changes in the liver on the introduction of doxorubicin in experimental animals] // Vestnik NovSU. 2022. 2(127). 51-54. DOI: 10.34680/2076-8052.2022.2(127).51-54

Информация об авторах

Яковлев Алексей Анатольевич – аспирант, и. о. ассистента, Ижевская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ (Ижевск, Россия), ORCID: 0009-0009-1014-5995, al-an.iakowlew@yandex.ru

Васильев Юрий Геннадьевич – доктор медицинских наук, профессор, профессор, Удмуртский государственный аграрный университет (Ижевск, Россия), ORCID: 0000-0002-3417-7280, devugen@mail.ru

Шумихина Галина Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, Ижевская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ (Ижевск, Россия), ORCID: 0009-0006-6330-0432, shum18@rambler.ru

Берестов Дмитрий Сергеевич – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой, Удмуртский государственный аграрный университет (Ижевск, Россия), ORCID: 0009-0000-6907-6546, berestovds@rambler.ru