

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ

УДК 576.35:57.017.6:57.084

DOI: 10.34680/2076-8052.2025.2(140).223-230

Поступила в редакцию / Received 05.04.2025

ГРНТИ 34.19.19+34.03.27+34.05.17

Специальность ВАК: 3.3.2.; 3.3.1.

Принята к публикации / Accepted 28.06.2025

Научная статья

КОРРЕКЦИЯ ПРОЯВЛЕНИЙ СЕНЕСЦЕНЦИИ В ТОНКОЙ И ТОЛСТОЙ КИШКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ИСКУССТВЕННОГО СТАРЕНИЯ

Яковлев А. А.¹, Васильев Ю. Г.¹, Шумихина Г. В.¹, Берестов Д. С.²,
Корепанова Ю. Б.¹, Карбань О. В.²

¹ Ижевская государственная медицинская академия (Ижевск, Россия)

² Ижевская государственная сельскохозяйственная академия (Ижевск, Россия)

Аннотация. Для выявления закономерностей изменений гистологической структуры тонкой и толстой кишки белых мышей, а также коррекции данных состояний сенолитическими препаратами авторами проведено исследование с использованием белых беспородных мышей, отобранных по типу «случай-контроль». Был применен селективный активатор p53 – препарат FOXO4DRI. После введения доксорубина на 14 сутки были получены результаты, позволившие сделать основные выводы о существовании определенных отличий ответов среди особей разного пола, на введение равного количества доксорубина. Было доказано выраженное проапоптотическое действие сенолитического препарата FOXO4DRI, более значимое в лабильных популяциях. Выраженность ответов на введение препарата также имела дозозависимый эффект.

Ключевые слова: тонкая кишка, толстая кишка, доксорубин, апоптоз, клеточные реакции, FOXO4DRI.

Для цитирования: Яковлев А. А., Васильев Ю. Г., Шумихина Г. В., Берестов Д. С., Корепанова Ю. Б., Карбань О. В. Коррекция проявлений сенесценции в тонкой и толстой кишке экспериментальных животных на фоне искусственного старения // Вестник НовГУ. 2025. 2 (140). 223–230. DOI: 10.34680/2076-8052.2025.2(140).223-230

Research Article

MODULATION OF SENESCENCE-RELATED CHANGES IN THE SMALL AND LARGE INTESTINE OF EXPERIMENTAL ANIMALS WITH INDUCED AGING

Yakovlev A. A.¹, Vasil'ev Yu. G.¹, Shumikhina G. V.¹, Berestov D. S.²,
Korepanova Yu. B.¹, Karban' O. V.²

¹ Izhevsk State Medical Academy (Izhevsk, Russia)

² Izhevsk State Agricultural Academy (Izhevsk, Russia)

Abstract. To identify patterns of histological changes in the small and large intestines of white mice, as well as to evaluate the corrective potential of senolytic agents in these conditions, the authors conducted a study using outbred white mice selected based on a case-control design. A selective p53 activator – FOXO4DRI – was used. On day 14 following doxorubicin administration, the results obtained allowed for key conclusions regarding the presence of distinct sex-based differences in response to equivalent doses of doxorubicin. The senolytic agent FOXO4DRI demonstrated a pronounced pro-apoptotic effect, particularly in labile cell populations. Additionally, the intensity of the response to the drug showed a dose-dependent pattern.

Keywords: small intestine, large intestine, doxorubicin, apoptosis, cellular reactions, FOXO4DRI.

For citation: Yakovlev A. A., Vasil'ev Yu. G., Shumikhina G. V., Berestov D. S., Korepanova Yu. B., Karban' O. V. Modulation of senescence-related changes in the small and large intestine of experimental animals with induced aging // Vestnik NovSU. 2025. 2 (140). 223–230. DOI: 10.34680/2076-8052.2025.2(140).223-230

Введение

Искусственное формирование сенесцентного фенотипа (клеток, исчерпавших митотический потенциал естественным или экспериментальным путем) достаточно широко используется в лабораторной практике. В качестве индуктора сенесценции может быть использован препарат группы антрациклиновых антибиотиков – доксорубицин [1–4]. Путем частичного блока митоза, а также активацией оксидативного стресса доксорубицин формирует выраженные проявления клеточного старения в лабильных популяциях [2]. Сенесцентные клетки, формирующие вокруг себя сенесцентный фенотип – блок клеточного деления и снижение функции прилежащих клеток, помимо прочего, не способны делиминироваться путем апоптоза, и их клиренс осуществляется иммунным механизмом. Для коррекции сенесценции и активации не иммунного клиренса данной популяции клеток применяются различные активаторы апоптоза в популяциях, с клетками, исчерпавшими митотический резерв – сенолитики. В данной работе применен селективный активатор p53 – препарат FOXO4DRI. Данный пептидный препарат активирует апоптоз у поврежденных и сенесцентных клеток, тем самым снижает степень проявления клеточного и тканевого старения, не повреждая нормальные клеточные популяции.

Цель работы – выявление закономерностей изменений гистологической структуры тонкой и толстой кишки белых мышей на фоне введения доксорубицина, а также коррекция данных состояний сенолитическими препаратами.

Материалы и методы

Животные для эксперимента случайным образом поделены в группы, с формированием выборки по типу «случай-контроль». В качестве экспериментальных животных были использованы белые беспородные мыши. Минимальная статистическая потребность составила: в контроле – 5 самцов, 5 самок; экспериментальная группа с введением 10 мг/кг доксорубицина – 5 самцов, 5 самок; экспериментальная группа 5 мг/кг доксорубицина – 5 самцов, 5 самок, и такие же по половому и численному составу группы животных с сочетанным применением пептида FOXO4DRI. Доксорубицин предварительно разводили физиологическим раствором до объема, удобного для дозирования (0,1 мл на каждые 10 г живой массы). В качестве исследуемого препарата доксорубицин использовался «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). Контрольные животные получали

физиологический раствор в эквивалентном объеме. Взвешивание экспериментальных животных производилось перед введением препарата.

Выведение животных из эксперимента производилось методом декапитации на 14 сутки эксперимента по общепринятой методике. После этого проводилась макроскопическая оценка внутренних органов. Образцы кишечника, для фиксации, помещали в нейтральный забуференный формалин, сразу после аутопсии.

Материал промывался, обезжизнялся в спиртах различной концентрации, заливка производилась в парафиновую среду «Histomix». Срезы выполнялись на ротационном микротоме (толщиной 5–7 мкм) с дальнейшей окраской гематоксилином и эозином, заключением в акриловую монтирующую маловязкую среду «Витрогель» и микроскопическим анализом. Полученные препараты описывались и документировались с помощью окуляр-видеокамеры.

Исследования выполнены, руководствуясь [5] и [6]. Экспериментальная часть работы на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми [7] и [8].

Результаты и их обсуждение

У экспериментальных животных, получавших доксорубицин, 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. Структура тонкой и толстой кишки типичная. Эпителий ворсинок с единичными мононуклеарами в базальной части эпителиальной пластинки. Каемка столбчатых эпителиоцитов хорошо выражена. Содержание слизи на поверхности эпителия незначительно в виде локальных участков толщиной до 1–3 мкм, преимущественно в толстой кишке. Зоны апоптотической активности в основном в типичных зонах замещения эпителия. Апоптотические фигуры по площади эпителия крипт и основания ворсинок выявляются как случайные находки. Митотическая активность выявляется в крипах как тонкой, так и толстой кишки в виде единичных митозов. В собственной пластинке слизистой оболочки содержание мононуклеаров и полинуклеаров незначительно. Проявлений воспалительных реакций во внешних оболочках не выявляется. Гладкие миоциты мышечной пластинки слизистой и мышечной оболочек, нейроны интрамуральных нервных узлов ареактивны.

Контроль, самки. Общая организация кишки самок морфологически идентичная с таковой у самцов.

У самцов на 14 сутки после введения доксорубицина, в количестве 5 мг/кг, проявления ответов по сравнению с контролем носят умеренный или слабо выраженный характер. Как и в контроле, имеются незначительные проявления кариопикнозов и кариорексисов в апикальной зоне микроворсинок. Как случайные

находки обнаруживаются апоптотические тельца по ходу крипт и поверхности ворсинок тонкой кишки, крипт толстой кишки. Однако, выявляется несколько повышенное содержание бокаловидных экзокриноцитов в эпителии тонкого кишечника. В криптах тонкой и толстой кишки выявляется существенное снижение пролиферативной активности и митозы выявляются как единичные находки в совокупности нескольких срезов препаратов. Слизистая собственной пластинки обнаруживает незначительное повышение содержания как мононуклеаров, так и полинуклеаров. Как единичные находки выявляются отдельные апоптотические тельца в соединительнотканых структурах стенки кишок в целом. Единичные лимфоидные узелки не проявляют признаков реактивности, но в них также видны единичные клетки с проявлениями кариопикнозов. Гладкие миоциты как мышечной оболочки, так и подслизистой основы в целом малореактивны, но в продольном слое обнаруживаются единичные гладкие миоциты с проявлениями кариопикноза. В ганглиях ауэрбаховского сплетения выявляются нейроны с признаками гипертрофии и ядрышек ядер, с расширением перинуклеарных цистерн, незначительной вакуолизацией цитоплазмы (до 10–15% от общей популяции). Отмечается слабо выраженная периваскулярная лимфомоноцитарная инфильтрация субсерозных структур.

У самок на 14 сутки после введения 5 мг/кг доксорубина проявления апоптотической активности в зоне апикальной части ворсинок тонкой кишки и на внешней поверхности эпителия толстой кишки усиливаются в виде учащенного выявления групп клеток с проявлениями кариопикнозов и кариорексисов. Нередко обнаруживаются клетки с признаками гиперхромности ядер и цитоплазмы на поверхности крипт и ворсинок. Это сочетается с расширением межклеточных канальцев в базальной зоне между столбчатыми энтероцитами. Проллиферативная активность в этой зоне близка к предыдущей описанной группе.

В собственной пластинке слизистой и подслизистой основе общие проявления реактивного ответа близки к аналогичной группе самцов. Митотическая активность не определяется. Динамика изменений гладких миоцитов и нейронов ауэрбаховского сплетения также близка к описанной ранее аналогичной группе самцов.

У самцов и самок на 14 сутки после введения пептида FOXO4DRI не отмечалось каких-либо значимых изменений в общей гистологической организации стенки кишки к описанным ранее в контрольной группе и не имелось каких-либо видимых гендерных различий. Это проявлялось в качественном и количественном составе эпителия, его особенностях в толстой и тонкой кишке. Имелись типичные проявления пролиферативной активности и характерная зональная организация проявлений апоптотической активности эпителия. Динамики в клеточных популяциях соединительнотканых структур, гладких миоцитов и тел нейронов также не выявляется. Данная тенденция говорит о том, что клеточные популяции кишки молодых животных не подвержены выраженному клеточному старению.

У самцов на 14 сутки после введения 10 мг/кг доксорубина тонкая и толстая кишка проявляет умеренно-выраженную динамику. Эпителий в целом по площади рассматриваемых зон кишки сохранен по всей поверхности. Высота и число ворсинок в тонкой кишке близко к контрольным животным. Однако в эпителии ворсинок выявляется расширение межклеточных канальцев между столбчатыми эпителиоцитами. Обнаруживается незначительное повышение проявлений кариопикноза и кариорексиса в эпителии основания ворсинок и криптах. Аналогичные изменения в криптах выявляются и в эпителии толстой кишки. Митотическая активность умеренно снижена, преимущественно в тонкой кишке. При анализе состава популяции эпителиоцитов выявляется незначительное повышение числа бокаловидных экзокриноцитов, как в тонкой, так и толстой кишке в сочетании с увеличением образования слизи. Имеются локальные участки расширения просвета крипт в толстой кишке, вероятно, спровоцированные усиленным экзоцитозом слизи. Реактивные изменения в собственной пластике слизистой оболочки проявляются в умеренной или слабо выраженной очаговой лимфоидно-моноцитарной инфильтрации в стенке. Менее выражены лейкоцитарные ответы в подслизистой основе и мышечной оболочке. Во всех оболочках обнаруживаются незначительные лейкоцитарные (преимущественно мононуклеарами) периваскулярные инфильтраты. Инфильтрация захватывает до половины толщины оболочек, явления некроза не определяются. В гладких миоцитах выявляются единичные проявления кариопикноза. Часть нейронов ганглиев ауэрбоховского сплетения с проявлениями набухания ядер и незначительной вакуолизации цитоплазмы.

У самцов на 14 сутки после введения 10 мг/кг доксорубина с сочетанным применением FOXO4DRI тонкая и толстая кишка имеет более выраженные изменения. В частности, расширяется зона эпителия на вершине ворсинок с видимыми проявлениями кариопикноза и кариорексиса, с признаками локальных участков отделения от слизистой оболочки. Диффузно распределены апоптотические тельца по всей поверхности эпителия крипт и ворсинок при их содержании до 0,2–0,5% от общей популяции эпителиоцитов. До 10–12% каемчатых энтероцитов проявляет признаки гиперхромности ядер и цитоплазмы. Определяется смещение клеточного состава в сторону бокаловидных клеток, как в тонкой, так и толстой кишке, с достоверным их увеличением в поле зрения. Это сочетается с повышенным содержанием слизи на поверхности стенок кишечника. Признаки расширения полостей крипт выявляются относительно регулярно. Незначительная инфильтрация мононуклеарами в эпителии ворсинок. Митотическая активность в криптах как тонкой, так и толстой кишки незначительно повышена в сравнении с контролем, преимущественно в тонкой кишке.

Умеренно или слабо выраженная инфильтрация лейкоцитами диффузного характера охватывает до 2/3 толщины оболочек, занимая более половины поверхности как тонкой, так и толстой кишки. Наиболее выраженная лимфоидно-

моноцитарная инфильтрация обнаруживается на уровне подслизистой и мышечной оболочек. Выявляется повышение содержания нейтрофилов и эозинофилов. Имеются признаки слабо или умеренно выраженной периваскулярной инфильтрации во всех оболочках с незначительными проявлениями периваскулярного отека. Кровеносные сосуды собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы с проявлениями умеренно выраженного полнокровия, незначительным набуханием ядер эндотелиоцитов. Имеются единичные апоптотические тела в соединительной ткани, преимущественно на вершинах крипт и ворсинок.

Гладкие миоциты мышечной оболочки выявляют набухание ядер с расширением перинуклеарных цистерн (до 8–10% популяции в тонкой, и 10–12% – в толстой кишке). Проявления кариопикноза обнаруживаются соответственно у 3–4% и 3–6% гладких миоцитов. Нейроны межмышечного нервного сплетения во всех случаях выявляют признаки значительной реактивности, как в виде набухания, так и сморщивания и гиперхромности ядер и цитоплазмы.

У самок на 14 день после введения 10 мг/кг доксорубицина проявления цитопатического действия на эпителий кишки более выражены по сравнению с самцами. В эпителии по поверхности основания и центральных участков ворсинок значительно чаще выявляются проявления кариопикноза и кариорексиса. Имеются отдельные участки на вершине ворсинок тонкой кишки с проявлениями дезэпителизации. Аналогичные реакции в виде появления апоптотических телец видны и в соединительных тканях стенки как тонкой, так и толстой кишки. В мышечной оболочке толстой кишки выявляется диффузная инфильтрация периваскулярных зон и подслизистой основы мононуклеарами.

У самок на 14 день сочетанного введения 10 мг/кг доксорубицина и FOXO4DRI проявления кариопикноза и кариорексиса в эпителии распространены по всем отделам как в толстой, так и тонкой кишке. Апоптотические тельца располагаются единично по всей поверхности эпителия крипт и ворсинок при их содержании до 0,3–0,8% от общей популяции эпителиоцитов. Апикальные поверхности части ворсинок тонкой кишки могут быть дезэпителизованы, содержат группы до 10 и более эпителиоцитов с проявлениями пикноза ядер. Содержание бокаловидных экзокриноцитов и повышение их секреторной активности близко к наблюдаемому у самцов. Степень инфильтрации мононуклеарами эпителия также близка.

Более выраженные морфологические реакции с активацией апоптозов видны и в соединительных тканях стенки как тонкой, так и толстой кишки. Апоптотические тельца выявляются как в собственной пластике слизистой, так и в подслизистой основе. Это сочетается с диффузной инфильтрацией периваскулярных зон и соединительнотканых структур мононуклеарами и немногочисленными полинуклеарами, сосудистыми реакциями, аналогично описанной у самцов идентичной группы. Ответы гладких миоцитов и нейронов также близки к указанной группе.

Заключение

Таким образом, введение доксорубина в разной дозировке (5мг/кг, 10 мг/кг) ведет к усилению проявлений апоптозов в стенке кишки, в виде пикнотизации ядер и кариорексиса, увеличения степени хроматофильности цитоплазмы, формирований апоптотических телец; явлений с выраженными неспецифическими реакциями, в виде лейкоцитарной инфильтрации. При этом не выявлено усиленной пролиферативной активности клеток как в эпителии, так и в соединительнотканых структурах тонкой и толстой кишки. Проявление апоптозов и иных клеточных реакций имеет выраженный дозозависимый эффект. Также имеются незначительные отличия в клеточном ответе между самцами и самками, что проявляется в менее значимой степени инфильтрации и относительно сохранной, митотической активности в стенке кишки самцов.

Применение сенолитического препарата активирует механизмы не иммунного клиренса, что проявляется выраженным проапоптотическим эффектом как на пролиферативно активные, так и стабильные популяции клеток стенки тонкой и толстой кишки.

Список литературы

1. Harrington K. L., Lewanski C. R., Stewart S. W. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: Clinical development // *Journal of clinical oncology*. 2000. 12 (1). 16–24. DOI: 10.1053/clon.2000.9105
2. Olson R. D., Mushlin P. S., Breuner D. E., Fleischner S., Cusack B. J., Chang B. K., Boncek R. J. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1988. 85 (10). 3585–3589. DOI: 10.1073/pnas.85.10.3585
3. 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
4. Green P. S., Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2002. 1588 (1). 94–101. DOI: 10.1016/s0925-4439(02)00144-8
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Москва: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. Правила лабораторной практики: Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 N 708Н. URL: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=165691> (Дата обращения: 12.12.2024).
7. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: Приложение // О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 (изменения и дополнения от 27.07.1978 г.). URL: <https://base.garant.ru/71623476/53f89421bbdaf741eb2d1ecc4ddb4c33/> (Дата обращения: 12.12.2024).
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/COETSER/1986/1.html> (Accessed: 12.12.2024).

References

1. Harrington K. L., Lewanski C. R., Stewart S. W. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part.2: Clinical development // Journal of clinical oncology. 2000. 12 (1). 16–24. DOI: 10.1053/clon.2000.9105
2. Olson R. D., Mushlin P. S., Breuner D. E., Fleischner S., Cusack B. J., Chang B. K., Boncek R. J. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1988. 85 (10). 3585–3589. DOI: 10.1073/pnas.85.10.3585
3. Bazikov I. A., Beyer E. V., Lukinova V. V., Maltsev A. N. Comparative evaluation of acute toxicity doxorubicin and its in niosomes // Medical news of North Caucasus. 2015. 10 (4). 403–406. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098 (In Russian).
4. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part 1. Moscow: Grif and K, 2012. 944 p. (In Russian).
5. Green P. S., Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. 2002. 1588 (1). 94–101. DOI: 10.1016/s0925-4439(02)00144-8
6. Rules of laboratory practice: Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 23.08.2010 N 708N. URL: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=165691> (Accessed: 12.12.2024).
7. Rules for carrying out work using experimental animals: Appendix // On measures to further improve organizational forms of work using experimental animals: Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 dated 12.08.1977 (amendments and additions, 27.07.1978). URL: <https://base.garant.ru/71623476/53f89421bbdaf741eb2d1ecc4ddb4c33/> (Accessed: 12.12.2024).
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/COETSER/1986/1.html> (Accessed: 12.12.2024).

Информация об авторах

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

Васильев Юрий Геннадьевич – доктор медицинских наук, профессор, Ижевская государственная медицинская академия (Ижевск, Россия), ORCID: 0000-0002-3417-728, devugen@mail.ru

Шумихина Галина Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, Ижевская государственная медицинская академия (Ижевск, Россия), ORCID: 0009-0006-6330-0432, histolog@igma.udm.ru

Берестов Дмитрий Сергеевич – кандидат биологических наук, доцент, Ижевская государственная сельскохозяйственная академия (Ижевск, Россия), ORCID: 0009-0000-6907-6546, berestovds@rambler.ru

Корепанова Юлия Борисовна – кандидат медицинских наук, доцент, Ижевская государственная медицинская академия (Ижевск, Россия), ORCID: 0000-0003-4167-4784, histolog@igma.udm.ru

Карбань Оксана Владиславовна – доктор физико-математических наук, доцент, Ижевская государственная сельскохозяйственная академия (Ижевск, Россия), ORCID: 0000-0001-7210-8860, ocsa123@yahoo.com