



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-39-4-171-179>
УДК 616-006.6-092.9:577.21

Комплексная оценка субхронического низкодозового воздействия доксорубина на модели крыс линии Wistar

М.А. Асанов, А.О. Поддубняк, Р.А. Мухамадияров, А.В. Сеницкая,
М.В. Хуторная, М.Ю. Сеницкий

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ),
650002, Российская Федерация, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, 6

Аннотация

Обоснование. Доксорубин – химиотерапевтический антибиотик из класса антрациклинов, обладающий кумулятивными и дозозависимыми кардиотоксическими эффектами. Кардиотоксические свойства доксорубина проявляются в характерных патологиях сердца. Доксорубин имеет и генотоксические свойства, его часто используют для моделирования острого генотоксического воздействия на моделях мелких лабораторных животных.

Цель исследования: определить роль патологического изменения различных органов и систем организма у крыс линии Wistar в контексте развития кардиотоксических эффектов, вызванных субхроническим кумулятивным воздействием доксорубина, с использованием цитогенетических методов и электронной микроскопии.

Материал и методы. В исследование были включены две группы самцов крыс линии Wistar: экспериментальная группа (10 крыс, еженедельная инъекция доксорубина в хвостовую вену в дозировке 2 мг/кг в течение 4 нед.) и контрольная группа (10 крыс, еженедельная инъекция 0,9% NaCl в хвостовую вену в течение 4 нед.). Для оценки генотоксических эффектов использовали микроядерный тест. Визуализацию структуры миокарда и печени проводили при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно рассеянных электронах с помощью электронного микроскопа.

Результаты. В результате анализа в экспериментальной группе было показано статистически значимое увеличение медианы количества полихроматических эритроцитов с микроядром (3,2% относительно 0,8% в контроле), а также снижение медианы доли полихроматических эритроцитов в общем пуле проанализированных клеток. В экспериментальной группе отмечали выраженную гетерогенность морфологического строения миокарда, а именно неравномерное утолщение кардиомиоцитов и сократительных волокон. Митохондрии были локализованы группами в электронно-прозрачных участках цитоплазмы. При анализе электронных микрофотографий гепатоцитов крыс, получавших доксорубин, были обнаружены дегенеративные изменения структуры печени.

Заключение. Результаты нашего исследования дают представления о подостром влиянии малой дозы доксорубина на сердце, печень и систему кроветворения крыс линии Wistar. Нами были предложены механизмы взаимодействия важных органов и систем организма, подвергшихся воздействию доксорубина, на фоне общего патологического состояния.

Ключевые слова:	кардиотоксичность; гепатотоксичность; генотоксичность; доксорубин; электронная микроскопия; микроядро.
Финансирование:	исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».
Соответствие принципам этики:	исследование проводили в соответствии с принципами Надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 1 от 26.01.2024 г.).
Для цитирования:	Асанов М.А., Поддубняк А.О., Мухамадияров Р.А., Сеницкая А.В., Хуторная М.В., Сеницкий М.Ю. Комплексная оценка субхронического низкодозового воздействия доксорубина на модели крыс линии Wistar. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2024;39(4):171–179. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-39-4-171-179 .

✉ Асанов Максим Айдарович, e-mail: asmaks988@gmail.com.

Comprehensive assessment of subchronic low-dose exposure to doxorubicin in the Wistar rat model

Maxim A. Asanov, Alena O. Poddubnyak, Rinat A. Muhamadiyarov,
Anna V. Sinitskaya, Mariya V. Khutornaya, Maxim Yu. Sinitsky

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
650002, Russian Federation, Kemerovo, Academician Barbarash boulevard, 6

Abstract

Rationale. Doxorubicin is a chemotherapeutic antibiotic from the anthracycline class that has cumulative and dose-dependent cardiotoxic effects. The cardiotoxic properties of doxorubicin are manifested in characteristic pathologies of the heart and its microenvironment. Doxorubicin also exhibits genotoxic properties and is often used to model acute genotoxic effects in small laboratory animal models.

Aim: To evaluate chronic low-dose exposure to doxorubicin in a Wistar rat model using cytogenetic methods and electron microscopy.

Material and Methods. The study included two groups of 10 male Wistar rats: an experimental group (weekly doxorubicin in the tail vein 2 mg/kg for 4 weeks) and a control group (0.9% NaCl). A micronucleus test was used to evaluate genotoxic effects. Visualization of the myocardial structure was carried out using scanning electron microscopy in back-scattered electrons on an electron microscope.

Results. The analysis showed a significant difference between the control (0.8%) and experimental groups (3.2%) in the level of polychrome erythrocytes with a micronucleus. It was found that rats from the experimental group were characterized by a significant decrease in the number of polychromatic red blood cells compared to the control group. In the experimental group, pronounced heterogeneity of the morphological structure of the myocardium was noted. Electron micrographs of hepatocytes from rats treated with doxorubicin showed degenerative changes in the structure of liver cells.

Conclusion. The results of our study provide insight into the subacute effect of a small dose of doxorubicin on the heart, liver and hematopoietic system of normolipidemic Wistar rats. We have proposed mechanisms of interaction between important organs and systems of the body exposed to doxorubicin against the background of a general pathological condition. In the future, the nature of the toxic effects of lower and optimal doses of the mutagen in the context of subchronic cumulative exposure should be determined.

Keywords:	cardiotoxicity; hepatotoxicity; genotoxicity; doxorubicin; electron microscopy; micronucleus.
Funding:	the study was carried out with the support of a comprehensive program of fundamental scientific research of the SB RAS within the framework of the fundamental theme of the Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases No. 0419-2022-0001.
Compliance with ethical principles:	this study was performed in accordance with the principles of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and was approved by the local ethics committee of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Protocol No. 1 of January 26, 2024).
For citation:	Asanov M.A., Poddubnyak A.O., Muhamadiyarov R.A., Sinitskaya A.V., Khutornaya M.V., Sinitsky M.Yu. Comprehensive assessment of subchronic low-dose exposure to doxorubicin in the Wistar rat model. <i>Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2024;39(4):171–179. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-39-4-171-179 .

Введение

Химиотерапевтический антибиотик доксорубин принадлежит к классу антрациклинов и воздействует не только на злокачественные, но и на здоровые клетки, в том числе и в нецелевых органах. Как и многим антрациклиновым препаратам, доксорубину свойственна кумулятивная и дозозависимая кардиотоксичность [1]. Кардиотоксические эффекты доксорубина проявляются в дисфункции левого желудочка, необратимой дегенеративной кардиомиопатии и застойной сердечной недостаточности [2]. Стоит отметить, что результаты эхокардиографии не всегда показывают изменения структуры и микросреды пораженного сердца в результате воздействия доксорубина [3].

Антрациклины, в том числе митомицин С и доксорубин, часто используются в качестве агентов для моделирования сердечно-сосудистых заболеваний у мелких лабораторных животных в исследованиях, посвященных поиску и тестированию новых стратегий терапии [4], а также при изучении влияния генотоксического стресса на организм [5]. К сожалению, большинство научных работ направлено на изучение влияния острого генотоксического и цитотоксического стрессов, вызванных высокими дозами доксорубина [6].

В настоящее время имеются обширные исследования механизмов, обуславливающих кардиотоксичность, гепатотоксичность и ряд других негативных эффектов доксорубина. Источники литературы описывают три главных механизма токсичности доксорубина, приводящих к

гибели клеток, в частности кардиомиоцитов: образование активных форм кислорода, «отравление» топоизомеразы и митохондриальная дисфункция [7]. Однако на настоящий момент крайне мало исследований, описывающих взаимодействие органов и систем организма, подвергшихся воздействию доксорубина, в контексте общего патологического фона. Нарушение функций органов и клеточного метаболизма, угнетение процесса кроветворения, образование хромосомных aberrаций и другие патологические процессы, возможно, также играют важную роль в формировании доксорубин-индуцированной кардиотоксичности.

Цель исследования: определение роли патологического изменения различных органов и систем организма и их взаимосвязь у крыс линии Wistar в контексте развития кардиотоксических эффектов, вызванных субхроническим кумулятивным воздействием доксорубина, с использованием цитогенетических методов и электронной микроскопии.

Материал и методы

Формирование исследуемых групп

В исследование были включены 20 самцов крыс линии Wistar в возрасте 10 нед. с массой тела в среднем 250 г, взятых из вивария отдела экспериментальной медицины НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия). Животные, получавшие инъекции 0,9% раствора NaCl в хвостовую вену раз в неделю на протяжении 4 нед., составляли контрольную группу. Крысы, получавшие инъекции доксорубина (2 мг/кг массы тела, кумулятивная доза 8 мг/кг) в хвостовую вену раз в неделю на протяжении 4 нед., входили в экспериментальную группу. Животных содержали в условиях 12-часовой смены дня и ночи. Еда и вода были доступны на протяжении всего эксперимента.

Раствор доксорубина готовили непосредственно перед использованием (*ex tempore*). Доза доксорубина соответствовала дозировкам, применяемым в клинической практике [8]. Содержание животных и манипуляции над ними проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Протокол (№ 5 от 13.04.2021 г.) исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово).

Пробоподготовка костного мозга

После эвтаназии лабораторным животным в асептических условиях удаляли бедренную кость и очищали ее от мышечной ткани. На проксимальном конце каждой бедренной кости удаляли эпифизы. Затем проводили смыв костного мозга 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) в 1,5 мл пробирку типа Эппендорф. Полученную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин на протяжении 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли и добавляли 500 мкл свежей сыворотки, после чего снова центрифугировали и частично удаляли надосадочную жидкость, оставляя примерно 50–100 мкл в зависимости от количества клеток [9].

Подготовка цитогенетических препаратов

Небольшую каплю клеточной суспензии помещали на край обезжиренного предметного стекла, затем резким движением растягивали каплю по поверхности другим обе-

зжиренным предметным стеклом (под углом в 45°). Стекла с мазками сушили несколько минут на воздухе, далее проводили фиксацию в метаноле не более 5 мин и опять сушили при комнатной температуре 24 ч. Препараты окрашивали 2% раствором красителя Гимза в течение 10 мин, промывали проточной водой и высушивали на воздухе [9].

Цитогенетический анализ

Полихроматические эритроциты (ПХЭ) анализировали при 1000-кратном увеличении с помощью оптического микроскопа (Axiostar Plus, Zeiss, Германия). На каждом препарате подсчитывали не менее 1000 безъядерных ПХЭ, выявляя эритроциты с микроядрами (МЯ) (рис. 1). Также на каждом препарате подсчитывали 200 эритроцитов, определяя количество нормохроматофильных эритроцитов (НХЭ) и ПХЭ, после чего рассчитывали долю ПХЭ. Критерии идентификации ПХЭ, НХЭ и МЯ соответствовали критериям OECD (2014) Test № 474.

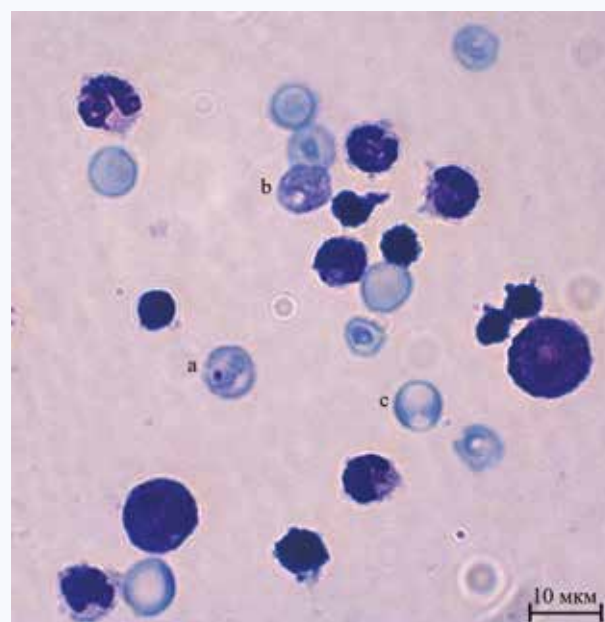


Рис. 1. Препарат смыва костного мозга из бедренной кости крысы (a – полихроматофильный эритроцит с микроядром; b – полихроматофильный эритроцит без аномалий; c – нормохроматофильный эритроцит)
Fig. 1. Bone marrow swab (a – polychromatophilic erythrocyte with micronucleus; b – polychromatophilic erythrocyte without anomalies; c – normachromatophilic erythrocyte)

Исследование ультраструктуры эксплантированных образцов сердца и печени методом сканирующей электронной микроскопии в обратно рассеянных электронах

Морфологические методы оценки ультраструктуры клеток находят широкое применение в экспериментах *in vivo* и позволяют получить объективную информацию о состоянии тканей и органов. Эксплантированные образцы сердца и печени фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде в течение 24 ч, затем постфиксировали 1% четырехокисью осмия в 0,1 М фосфатном буфере в течение 12 ч. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, окрашивали 2%-м уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95%-м этаноле, обезвоживали 99,7%-м изопропанолом

(BioVitrum, Россия) в течение 5 ч и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 ч, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (812) (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1 : 1 (6 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 ч) и проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60 °С. Затем образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США).

Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 мин путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее осуществляли напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия – 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica) [9].

Визуализацию структуры образцов выполняли при помощи сканирующей электронной микроскопии в об-

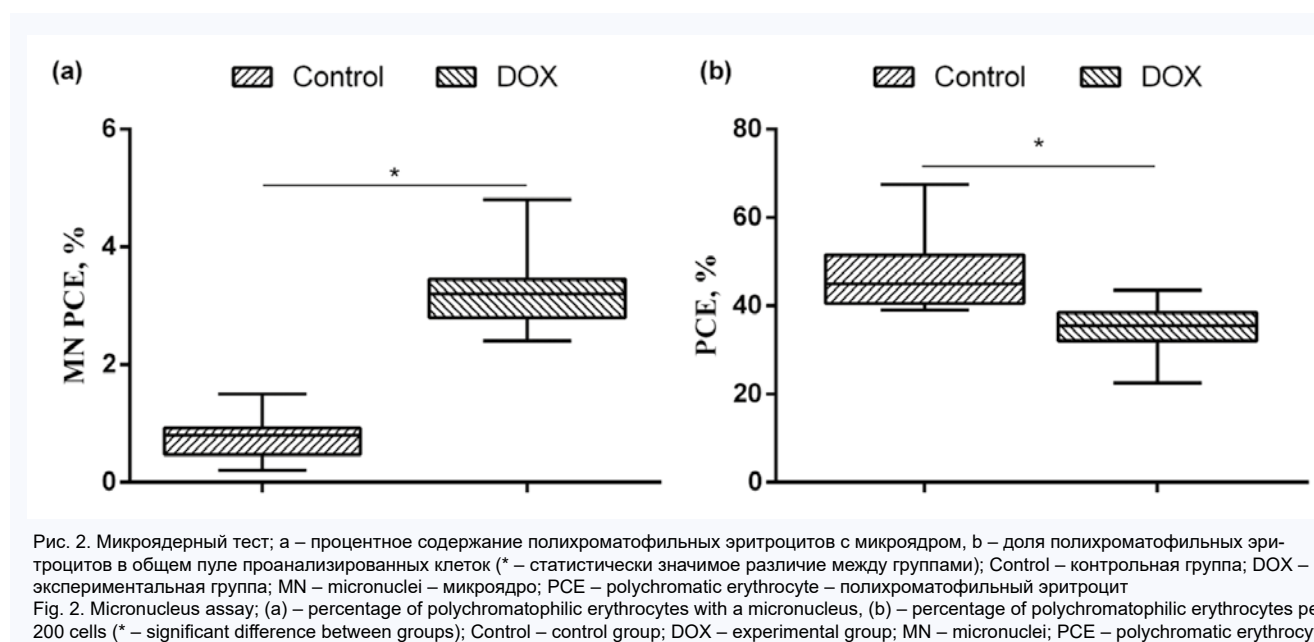
ратно рассеянных электронах в электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакетов прикладных программ StatSoft STATISTICA 10.0, GraphPad Prism 6. Проверяли нормальность распределения количественных показателей с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Так как распределения не были нормальными, при сравнении количественных показателей в двух независимых группах использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости составлял $p = 0,05$.

Результаты

Микроядерный тест

В результате проведенного цитогенетического анализа было показано статистически значимое различие между контрольной и экспериментальной группами по уровню ПХЭ с МЯ ($p < 0,001$, рис. 2а).



Одним из этапов микроядерного теста костного мозга является анализ 200 эритроцитов и подсчет доли ПХЭ для понимания изменения эритропоэза. Согласно ГОСТу № 34660-2020, доля ПХЭ должна стремиться к 50%. Было установлено, что крысы из экспериментальной группы характеризовались значительным снижением количества ПХЭ по сравнению с контрольной группой ($p = 0,001$, см. рис. 2б).

Электронная микроскопия

Электронно-микроскопическое исследование сердца контрольных крыс показало классическую интактную ультраструктуру тканей сердца без явных нарушений во внеклеточных и внутриклеточных пространствах (рис. 3а, с, е, г). Крупные кровеносные сосуды на периферии сердца содержали небольшое количество эритроцитов (см. рис. 3а, с, е). Мышечные волокна локализовались параллельно друг другу, имели равномерную электронную плотность. Митохондрии располагались упорядоченно в виде однослойной цепочки вдоль сократительных волокон, об-

ладали округло-овальной формой. Ядра кардиомиоцитов обычно светлые с одним, реже с двумя или тремя ядрышками (см. рис. 3с, е, г). В крупных и мелких сосудах не выявлялись признаки застоя крови. Лейкоциты в просвете сосудов отсутствовали (см. рис. 3а, с, е).

В экспериментальной группе отмечали выраженную гетерогенность морфологического строения миокарда (рис. 3б, д, ф, h). Крупные и мелкие сосуды содержали большое количество эритроцитов, присутствовали небольшие очаги геморагий (см. рис. 3б, д, ф), что указывает на проявление застоя крови. Регистрировали нарушение упорядоченного расположения кардиомиоцитов, что проявлялось в появлении участков с извилистым расположением кардиомиоцитов и их неравномерном утолщении. Сократительные волокна также имели извилистую структуру (см. рис. 3д). Митохондрии располагались менее упорядоченно, иногда располагались кучно, наслаиваясь друг на друга. В кардиомиоцитах наблюдали признаки дегенерации миофибрилл и вакуолизации цитоплазмы (см. рис. 3h).

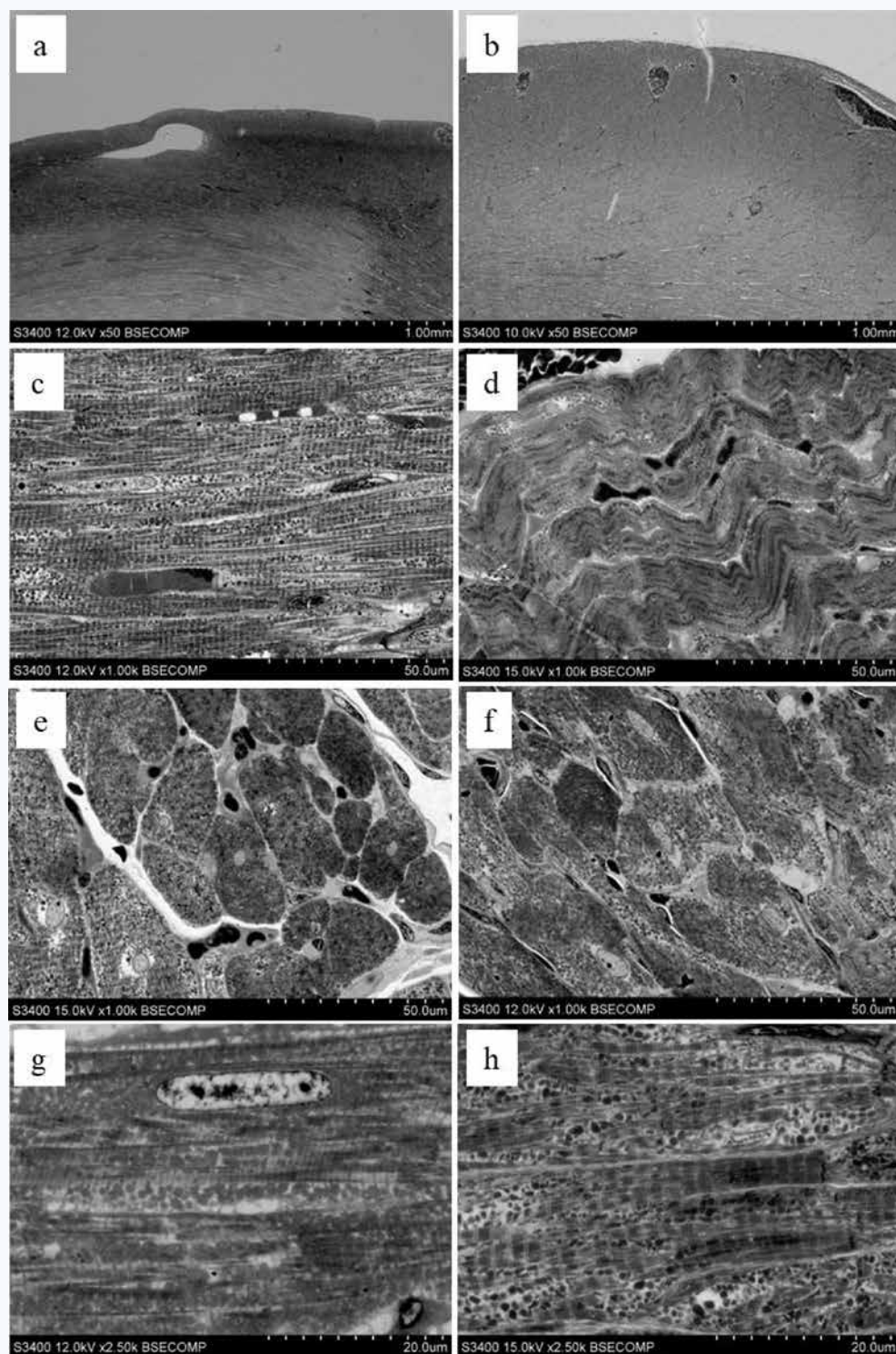


Рис. 3. Ультраструктурное строение сердца крысы: а – контрольная группа, $\times 50$; отсутствие геморрагий периферических сосудов миокарда; б – экспериментальная группа с доxorубицином, $\times 50$; сосуды миокарда полнокровны; в – (продольное сечение), е (поперечное сечение) – контрольная группа, $\times 1000$; упорядоченная локализация кардиомиоцитов, умеренное кровенаполнение капилляров в толще миокарда; д (продольное сечение), ф (поперечное сечение) – экспериментальная группа с доxorубицином, $\times 1000$; извилистость мышечных волокон, избыточное кровенаполнение капилляров; г – контрольная группа, $\times 2500$; митохондрии расположены равномерно в прямом контакте с сократительными волокнами; h – экспериментальная группа с доxorубицином, $\times 2500$; гетерогенность волокон кардиомиоцитов, митохондрии локализованы группами в электронно-прозрачных участках цитоплазмы

Fig. 3. Ultrastructure of the rat heart: a – control group, $\times 50$; absence of hemorrhage of peripheral vessels of the myocardial wall; b – experimental group with doxorubicin, $\times 50$; the vessels of the myocardial wall are excessively filled with blood; c (longitudinal section), e (cross section) – control group, $\times 1000$; ordered localization of cardiomyocytes, moderate blood supply to capillaries in the thickness of the myocardium; d (longitudinal section), f (cross section) – experimental group with doxorubicin, $\times 1000$; tortuosity of muscle fibers, excessive blood filling of capillaries; g – control group, $\times 2500$; mitochondria are evenly distributed in direct contact with contractile fibers; h – experimental group with doxorubicin, $\times 2500$; heterogeneity of cardiomyocyte fibers, mitochondria are localized in groups in electron-transparent areas of the cytoplasm

Выявлены различия в структурной организации печеночных долек между контрольной и экспериментальной группами (рис. 4). В контрольной группе гепатоциты обладали характерной паренхимной формой с типичной цитоплазмой и органеллами (см. рис. 4а, с). Ядра имели округлую или эллиптическую форму, ядерная мембрана чистая, неповрежденная, митохондрии присутствуют в большом количестве. Печеночные дольки были четкими и полными, балки долек прямые (см. рис. 4а). Электронные микрофотографии гепатоцитов крыс, получавших

доксорубин, показали дегенеративные изменения структуры клеток печени. К ним относятся вакуолизация цитоплазмы и набухание митохондрий (см. рис. 4б, d). Наличие значительной вакуолизации цитоплазмы гепатоцитов, протекающей по типу гидропической дистрофии, и периферическая локализация митохондрий были характерными особенностями ультраструктуры гепатоцитов в этой группе. Вероятно, что вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов является следствием набухания эндоплазматической сети.

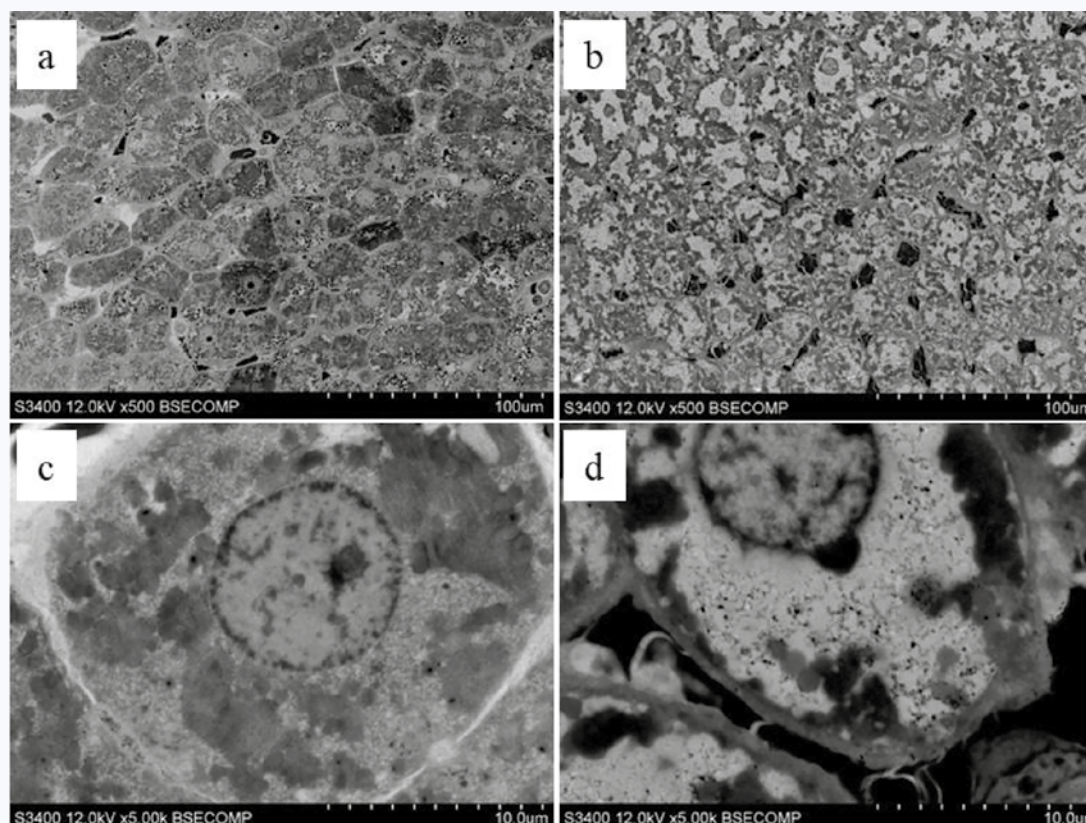


Рис. 4. Ультраструктурное строение печени крысы: а – контрольная группа, $\times 500$; сохранность балочной структуры печени, наличие венозных и желчных капилляров, центральное расположение ядра, отсутствие кровоизлияния; б – экспериментальная группа с доксорубином, $\times 500$, наличие вакуолей преимущественно вблизи ядра, ядро децентрализовано; с – контрольная группа, $\times 5000$, сохранность эндоплазматического ретикула (ЭПР), отсутствие набухания ЭПР, отсутствие вакуолизации, регулярное расположение митохондрий; d – экспериментальная группа с доксорубином, $\times 5000$, пристеночное расположение электронно-плотной цитоплазмы, соединяющей митохондрии
Fig. 4. Ultrastructure of the rat liver: a – control group, $\times 500$; preservation of the membrane structure of the liver, presence of venous and bile capillaries, central location of the nucleus, absence of hemorrhage; b – experimental group with doxorubicin, $\times 500$, the presence of vacuoles mainly near the nucleus, the nucleus is decentralized; c – control group, $\times 5000$, preservation of the endoplasmic reticulum (ER), absence of ER swelling, absence of vacuolization, regular arrangement of mitochondria; d – experimental group with doxorubicin, $\times 5000$, near-wall location of electron-dense cytoplasm connecting mitochondria

Обсуждение

Актуальность изучения влияния доксорубина *in vivo* объясняется важностью роли антрациклиновых препаратов в клинике, поскольку у большинства пациентов кардиотоксические эффекты развиваются спустя некоторое время после первоначального воздействия препарата. Характер воздействия доксорубина может дифференцироваться в зависимости от сроков возникновения негативных эффектов. Так, можно выделить острый (возникает непосредственно во время лечения); ранний (проявляется в течение года после терапии); поздний от-

вет (возникает через несколько лет) [10]. Поэтому важно спрогнозировать тяжесть токсических эффектов антрациклинов, которая, безусловно, будет зависеть от дозировки и времени терапии.

В последние годы прослеживается тенденция к снижению дозировки и длительности времени инфузии доксорубина для предотвращения возникновения его токсических эффектов. Например, Y. Kalender и соавт. изучали гепатотоксические эффекты доксорубина в экспериментальной модели при использовании внутривенных инъекций в дозировке 5 мг/кг в неделю на протяжении 6 нед. [11]. Ученые из Словакии в своем исследовании

кардиотоксических эффектов доксорубина использовали меньшую дозировку: 7 внутривентральных инъекций 2,15 мг/кг доксорубина в течение 3-недельного периода (общая кумулятивная дозировка составляла 15 мг/кг) [12]. В исследовании P.Y. Chen и соавт. была использована группа 4-недельных крыс, получавших доксорубин в дозировке 2,5 мг/кг внутривентрально каждые 3 дня в течение 3 нед. [13]. Они наблюдали снижение массы сердца этих крыс, нарушение расположения кардиомиоцитов, увеличение накопления коллагеновых волокон, усиление фиброза. Однако результат эксперимента на изолированном сердце крысы не показал статистически значимых изменений сердечной функции во время воздействия доксорубина [14]. Стоит отдельно отметить работу российских исследователей. Е.Ю. Подъячева и соавт. исследовали профиль молекулярных маркеров фиброза при введении крысам линии Wistar различных доз доксорубина (кумулятивная доза 5, 10 и 15 мг/кг) [15]. Результаты исследования на основе эхокардиографии и гистохимического метода показали морфологические, в том числе фиброзные, изменения миокарда левого желудочка и развитие диастолической дисфункции у крыс экспериментальных групп.

В настоящем исследовании с помощью сканирующей электронной микроскопии была проанализирована ультраструктура сердца крысы. Нами была отмечена несвойственная нормальной морфологии сердца локализация кардиомиоцитов, структура сократительных волокон, а также нарушение организации цитоплазмы и органелл внутри кардиомиоцитов.

Известно, что доксорубин индуцирует процесс апоптоза посредством различных механизмов. Одним из таких механизмов является окислительный стресс с образованием свободных радикалов кислорода. Благодаря доксорубину, свободные радикалы накапливаются в митохондриях, далее происходит ингибирование белков, противодействующих апоптозу, активация проапоптотических белков. В итоге это приводит к дестабилизации митохондриальной мембраны, высвобождению цитохрома С и к гибели кардиомиоцитов [16]. Помимо вышеуказанного механизма важную роль в клеточном старении кардиомиоцитов, апоптозе и в целом кардиотоксичности играют такие процессы, как перегрузка кардиомиоцитов кальцием, аутофагия и ферроптоз [11].

Патологические процессы в печени и ее дисфункция влияют на физиологические процессы во всем организме в целом и в сердце в частности. В данной работе были продемонстрированы гепатотоксические эффекты субхронического воздействия малой дозы доксорубина. Известно, что депо железа находится в печени. В печени свободные радикалы, продуцируемые доксорубином, реагируют с Fe^{3+} в окислительно-восстановительной реакции. Образуется комплекс, который может восстанавливать кислород до перекиси водорода, генерировать супероксидные анионные и гидроксильные радикалы [11]. В ответ на высвобождение свободных радикалов повышается уровень антиоксидантных ферментов в печени, что указывает на гепатотоксическое действие доксорубина [11]. Естественно, гепатотоксические эффекты сопровождаются снижением функциональной способности печени, что в свою очередь приводит к выпадению значимого гуморального звена сердечно-сосудистой регуляции и гомеостаза [17]. При дисфункции печени увеличивается запас липидов, из-за чего усиливается глюконеогенез.

Далее повышается уровень глюкозы в крови, в итоге возрастает риск развития сердечной недостаточности и кардиомиопатии [17].

Микроядерный тест в ПХЭ млекопитающих обладает высоким потенциалом и специфичностью для быстрого и эффективного скрининга генотоксических эффектов различных мутагенов. Ранее мы использовали микроядерный тест для определения генотоксического потенциала митомицина С (ММС) при хроническом воздействии на мышей, *нокаутных* по гену аполипопротеина Е [18]. В настоящем исследовании мы выявили 4-кратное преобладание ПХЭ с МЯ в группе крыс линии Wistar, экспонированных доксорубином. Уровень МЯ в ретикулоцитах (ПХЭ) отражает количество хромосомных aberrаций, которые возникли в результате ошибок при репликации генетического материала и/или воздействия генотоксических агентов, каким и является доксорубин.

Интересен процесс непосредственного взаимодействия мутагена и ДНК. Согласно литературе, доксорубин является интеркалятором ДНК, предпочитающим участки с высоким содержанием оснований GC. Доксорубин образует водородные связи с гуанином на одной цепи и опосредованно через формальдегид ковалентно связывается также с гуанином на противоположной цепи [19]. Далее образуются кросс-сшивки, приводящие к двойным разрывам ДНК и, как итог, к формированию МЯ [20]. Учитывая тот факт, что кардиомиоциты являются клетками с очень низким пролиферативным потенциалом, генотоксический эффект доксорубина будет иметь накопительный характер. Возможно, накопление хромосомных aberrаций в кардиомиоцитах приводит к запуску механизма апоптоза, так как он является одним из основных путей гибели клеток с генетическими повреждениями [8].

Согласно протоколу микроядерного теста, дополнительно нами были проанализированы 200 клеток, включающие как НХЭ, так и ПХЭ, для определения нарушения эритропоэза, а также подсчитано их соотношение. Контрольная группа характеризовалась нормальным соотношением клеток, а в экспериментальной группе наблюдался явный сдвиг к преобладанию НХЭ. Снижение количества ПХЭ может происходить из-за воздействия доксорубина с последующим ингибированием деления клеток, гибели эритробластов и в конечном итоге удалением поврежденных клеток [8]. Нарушение эритропоэза, заключающееся в снижении количества незрелых эритроцитов, приводит к эритропении, характеризующейся патологическим снижением уровня эритроцитов в кровеносной системе, уменьшением количества кислорода, развитием гипоксии органов, в особенности сердца [21]. Учитывая непосредственную кардиотоксичность доксорубина, гипоксия как дополнительный фактор может увеличить риск развития заболеваний сердца.

Заключение

Таким образом, результаты нашего исследования дают представление о подостром влиянии малой дозы доксорубина на сердце, печень и систему кроветворения крыс линии Wistar. Нами были предложены механизмы взаимодействия важных органов и систем организма, подвергшихся воздействию доксорубина, на фоне общего патологического состояния. В дальнейшем следует определить характер токсических эффектов более низких и оптимальных доз мутагена в контексте субхронического кумулятивного воздействия.

Литература / References

- Argun M., Üzümlü K., Sönmez M.F., Özyurt A., Derya K., Çilenk K.T. et al. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatol. J. Cardiol.* 2016;16(4):234. DOI: 10.5152/akd.2015.6185.
- Guo R., Hua Y., Ren J., Bornfeldt K.E., Nair S. Cardiomyocyte-specific disruption of Cathepsin K protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):692. DOI: 10.1038/s41419-018-0727-2.
- Anghel N., Herman H., Balta C., Rosu M., Stan M.S., Nita D. et al. Acute cardiotoxicity induced by doxorubicin in right ventricle is associated with increase of oxidative stress and apoptosis in rats. *Histol. Histopathol.* 2018;33(4):365. DOI: 10.14670/hh-11-932.
- Yu Q., Li Q., Na R., Li X., Liu B., Meng L. et al. Impact of repeated intravenous bone marrow mesenchymal stem cells infusion on myocardial collagen network remodeling in a rat model of doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Mol. Cell Biochem.* 2014;387(1–2):279–285. DOI: 10.1007/s11010-013-1894-1.
- Hajra S., Patra A.R., Basu A., Bhattacharya S. Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation. *Biomed. Pharmacother.* 2018;101:228–243. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.088.
- Jain A.K., Pandey A.K. *In vivo* micronucleus assay in mouse bone marrow methods. *Mol. Biol.* 2019;2031:135–146. DOI: 10.1007/978-1-4939-9646-9_7.
- Christidi E., Brunham L.R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis.* 2021;12(4):339. DOI: 10.1038/s41419-021-03614-x.
- Boriollo M.F.G., Alves V.E., Silva J.J., Barros G.B.S. Dias C.T.S. et al. Decrease of the DXR-induced genotoxicity and nongenotoxic effects of Theobroma cacao revealed by micronucleus assay. *Braz. J. Biol.* 2021;81(2):268–277. DOI: 10.1590/1519-6984.223687.
- Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A. et al. EMBEDDING and backscattered scanning electron microscopy: a detailed protocol for the whole-specimen, high-resolution analysis of cardiovascular tissues. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:739549. DOI: 10.3389/fcvm.2021.739549.
- Robert J. Long-term and short-term models for studying anthracycline cardiotoxicity and protectors. *Cardiovasc. Toxicol.* 2007;7:135–139. DOI: 10.1007/s12012-007-0022-4.
- Kalender Y., Yel M., Kalender S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology.* 2005;209(1):39–45. DOI: 10.1016/j.tox.2004.12.003.
- Ivanová M., Dvořáková I., Okruhlicová L., Tribulová N., Simončíková P., Barteková M. et al. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2012; 33(4):459–469. DOI: 10.1038/aps.2011.194.
- Chen P.Y., Hou C.W., Shibu M.A., Day C.H., Pai P., Liu Z.R. et al. Protective effect of Co-enzyme Q10 on doxorubicin-induced cardiomyopathy of rat hearts. *Environ. Toxicol.* 2017;32(2):679–689. DOI: 10.1002/tox.22270.
- Henderson K.A., Borders R.B., Ross J.B., Abdulalil A., Gibbs S., Skowronek A.J. et al. Integration of cardiac energetics, function and histology from isolated rat hearts perfused with doxorubicin and doxorubicin-ol; a model for use in drug safety evaluations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2018;94(2):54–63. DOI: 10.1016/j.vascn.2018.08.004.
- Подъячева Е.Ю., Шмакова Т.В., Андреева Д.Д., Торопов Р.И., Чебуркин Ю.В., Данильчук М.С. и др. Профиль молекулярных маркеров фиброза у крыс при воздействии различных доз доксорубина. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2023;59(2):121–130. Podyacheva E.Y., Shmakova T.V., Andreeva D.D., Toropov R.I., Cheburkin Y.V., Danilchuk M.S. et al. Molecular markers profile of fibrosis in rats exposed to different doses of doxorubicin. *Žurnal evolúcionnoj biokhímii i fiziologii.* 2023;59(2):121–130. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0044452923020043.
- Liao H.E., Shibu M.A., Kuo W.W., Pai P.Y., Ho T.J., Kuo C.H. et al. Deep sea minerals prolong life span of streptozotocin-induced diabetic rats by compensatory augmentation of the IGF-I-survival signaling and inhibition of apoptosis. *Environ. Toxicol.* 2016;31(7):769–781. DOI: 10.1002/tox.22086.
- Nakashima M., Nakamura K., Nishihara T., Ichikawa K., Nakayama R., Takaya Y. et al. Association between cardiovascular disease and liver disease, from a clinically pragmatic perspective as a cardiologist. *Nutrients.* 2023;15(3):748. DOI: 10.3390/nu15030748.
- Asanov M.A., Shishkova D.K., Poddubnyak A.O., Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Khutornaya M.V., et al. Dose-response assessment of mitomycin C genotoxic effect on ApoE knockout mice. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023;59(5):1693–1699. DOI: 10.1134/S0022093023050198.
- Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1845:84–89. DOI: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002.
- Ефимов В.А., Федюнин С.В. Кросс-сшитые нуклеиновые кислоты: получение, структура и биологическая роль. Успехи биологической химии. 2010;50:259–302. Efimov V.A., Fediunin S.V. Cross-linked nucleic acids: production, structure and biological role. *Uspekhi biologicheskoi khimii.* 2010;50:259–302. (In Russ.). DOI: 10.1073/pnas.1821022116.
- Rymer J.A., Rao S.V. Anemia and coronary artery disease: pathophysiology, prognosis, and treatment. *Coron. Artery Dis.* 2018;29(2):161–167. DOI: 10.1097/MCA.0000000000000598.

Информация о вкладе авторов

Асанов М.А. – идея работы и планирование эксперимента, написание манускрипта.

Поддубняк А.О. – проведение эксперимента, сбор материала.

Синицкая А.В. – статистическая обработка данных.

Хуторная М.В. – анализ цитогенетических повреждений.

Мухамадияров Р.А. – исследование ультраструктуры explantированных образцов сердца и печени методом сканирующей электронной микроскопии.

Синицкий М.Ю. – редактирование рукописи.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Сведения об авторах

Асанов Максим Айдарович, младший научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, НИИ КПССЗ, Кемерово, <http://orcid.org/0000-0002-0747-2495>.

E-mail: asmaks988@gmail.com.

Поддубняк Алена Олеговна, лаборант-исследователь, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, НИИ КПССЗ, Кемерово, <http://orcid.org/0000-0001-7388-356X>.

E-mail: alyona.poddubnyak@gmail.com.

Information on the author's contribution

Asanov M.A. – idea of the work and planning of the experiment, writing the manuscript.

Poddubnyak A.O. – an experiment conduction, collecting material.

Sinitskaya A.V. – statistical data processing.

Khutornaya M.V. – analysis of cytogenetic damage.

Mukhamadiyarov R.A. – study of the ultrastructure of explanted heart and liver samples using scanning electron microscopy.

Sinitsky M.Yu. – manuscript editing.

Conflict of interest: the authors do not declare a conflict of interest.

Information about the authors

Maxim A. Asanov, Junior Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, <http://orcid.org/0000-0002-0747-2495>.

E-mail: asmaks988@gmail.com.

Alena O. Poddubnyak, Research Assistant, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, <http://orcid.org/0000-0001-7388-356X>.

E-mail: alyona.poddubnyak@gmail.com.

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, НИИ КПССЗ, Кемерово, <http://orcid.org/0000-0002-5558-3229>.
E-mail: rem57@rambler.ru.

Синицкая Анна Викторовна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, НИИ КПССЗ, Кемерово, <http://orcid.org/0000-0002-4467-8732>.
E-mail: cepoav1991@gmail.com.

Хуторная Мария Владимировна, младший научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, НИИ КПССЗ, Кемерово, <http://orcid.org/0000-0002-9714-4080>.
E-mail: masha_hut@mail.ru.

Синицкий Максим Юрьевич, канд. биол. наук, и. о. заведующего лабораторией геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, НИИ КПССЗ, Кемерово, <http://orcid.org/0000-0002-4824-2418>.
E-mail: max-sinitsky@rambler.ru.

 **Асанов Максим Айдарович**, e-mail: asmaks988@gmail.com.

Поступила 20.05.2024;
рецензия получена 26.06.2024;
принята к публикации 14.11.2024..

Rinat A. Mukhamadiyarov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, <http://orcid.org/0000-0002-5558-3229>.
E-mail: rem57@rambler.ru.

Anna V. Sinitskaya, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases Kemerovo, <http://orcid.org/0000-0002-4467-8732>.
E-mail: cepoav1991@gmail.com.

Mariya V. Khutornaya, Junior Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases Kemerovo, <http://orcid.org/0000-0002-9714-4080>.
E-mail: masha_hut@mail.ru.

Maxim Yu. Sinitsky, Cand. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, <http://orcid.org/0000-0002-4824-2418>.
E-mail: max-sinitsky@rambler.ru.

 **Maxim A. Asanov**, e-mail: asmaks988@gmail.com.

Received 20.05.2024;
review received 26.06.2024;
accepted for publication 14.11.2024.