

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-52-57>

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ И МИКРОСКОПИЧЕСКУЮ КАРТИНУ ОТДЕЛЬНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

И.В. Алексеев*, И.А. Мирошкина, А.В. Сорокина, И.Б. Цорин, Л.Г. Колик

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий»*

125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, 8

Создание валидированной модели «химического мозга» у лабораторных животных представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит оптимизировать поиск новых средств для предупреждения и фармакологической коррекции отставленных последствий химиотерапии на центральную нервную систему. Цель работы — оценка влияния доксорубина при системном курсовом введении на поведенческие реакции и микроскопическую картину коры больших полушарий и гиппокампа у крыс.

Доксорубин вводили самцам крыс внутривенно в дозах 5 и 6 мг/кг, один раз в неделю, в течение 28 дней. Оценивали поведенческие реакции животных, проводили патоморфологические исследования коры больших полушарий головного мозга и гиппокампа.

Доксорубин в дозах 5 и 6 мг/кг вызывает угнетение двигательной активности в тесте «Открытое поле», нарушение непространственной и пространственной памяти в тестах «Распознавание нового объекта» и «У-лабиринт» соответственно. Препарат в указанных дозах увеличивает выраженность полнокровия сосудов и периваскулярного отека в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе. Доксорубин в дозах 5 и 6 мг/кг вызывает нарушение когнитивных функций у крыс в тестах на оценку непространственной и пространственной памяти, а также нарушения микроциркуляции в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе крыс.

Ключевые слова: доксорубин, когнитивные нарушения, кора больших полушарий, гиппокамп, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алексеев И.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Цорин И.Б., Колик Л.Г. Оценка влияния доксорубина на когнитивные нарушения и микроскопическую картину отдельных структур головного мозга у крыс. *Биомедицина*. 2024;20(3):52–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-52-57>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 26.07.2024

Опубликована 10.09.2024

DOXORUBICIN EFFECTS ON COGNITIVE IMPAIRMENT AND THE MICROSCOPIC VIEW OF BRAIN STRUCTURES IN RATS

Ivan V. Alekseev*, Irina A. Miroshkina, Aleksandra V. Sorokina, Iosif B. Tsorin, Larisa G. Kolik

*Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8*

The creation of a validated model of the “chemical brain” in laboratory animals is an urgent task, the solution of which will optimize the search for new drugs for the prevention and pharmacological correction of delayed effects of chemotherapy on the central nervous system. The aim of the work has been to assess the effect of doxorubicin after systemic course administration on behavioral reactions and the microscopic view of the cerebral cortex and hippocampus in rats.

Doxorubicin was administered intraperitoneally to male rats at doses of 5 and 6 mg/kg, once a week, for 28 days. The behavioral reactions of the animals were assessed, and pathomorphological studies of the cerebral cortex and hippocampus were carried out.

Doxorubicin at doses of 5 and 6 mg/kg causes inhibition of motor activity in the “Open Field” test, impairment of non-spatial and spatial memory in the “New Object Recognition” and “Y-Maze” tests, respectively. Doxorubicin at these doses increases the severity of vascular congestion and perivascular edema in the cerebral cortex and hippocampus.

Doxorubicin at doses of 5 and 6 mg/kg causes impairment of cognitive functions in rats in tests assessing non-spatial and spatial memory, as well as microcirculation disorders in the cerebral cortex and hippocampus of rats.

Keywords: doxorubicin, cognitive impairment, cerebral cortex, hippocampus, rats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Alekseev I.V., Miroshkina I.A., Sorokina A.V., Tsorin I.B., Kolik L.G. Doxorubicin Effects on Cognitive Impairment and the Microscopic View of Brain Structures in Rats. *Journal Biomed.* 2024;20(3): 52–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-52-57>

Submitted 15.04.2024

Revised 26.07.2024

Published 10.09.2024

Введение

Разработка новых химиотерапевтических средств и схем лечения онкологических заболеваний привела к значительному снижению риска рецидивов и повышению выживаемости, что способствовало расширению осведомлённости о побочных эффектах химиотерапевтических средств, включая нежелательные эффекты на не раковые клетки, вторичные по отношению к предполагаемой цитотоксичности для раковых клеток. Одним из последствий современной терапии рака является когнитивная дисфункция, связанная с химиотерапией, обычно называемая «химическим мозгом» [2]. По оценкам, от 18 до 78% больных раком молочной железы сообщают о дискогнитивных расстройствах вскоре после начала химиотерапевтического лечения. Эти симптомы являются кратковременными у большинства пациентов, но, как сообщалось, сохраняются в течение нескольких месяцев

или лет у ~35% пациентов в безрецидивной ремиссии.

Доклинические исследования воздействия противоопухолевых препаратов на грызунов выявили несколько распространённых когнитивных нарушений, наблюдаемых у пациентов, включая нарушения памяти, опосредованные гиппокампом, что указывает на то, что экспериментальное моделирование когнитивных нарушений, вызванных химиотерапией, обладает высокой степенью достоверности для оценки последующих изменений поведенческих реакций [1]. Создание валидированной модели «химического мозга» у лабораторных животных представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит оптимизировать поиск новых средств для предупреждения и фармакологической коррекции отставленных последствий химиотерапии на центральную нервную систему. Доксорубин (Dox), антрациклиновое

противоопухолевое средство, обычно используется в схемах комплексной химиотерапии для лечения солидных опухолей и лейкоза.

Цель работы — оценка влияния Дох при системном курсовом введении на поведенческие реакции и микроскопическую картину коры больших полушарий и гиппокампа у крыс.

Материалы и методы

Опыты проводили на конвенциональных белых крысах-самцах (возраст 16–17 недель, начальная масса 200–220 г) из нелинейных популяций, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животные прошли карантин в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Крысы содержались в полипропиленовых клетках Т/4 (габариты 580×375×200 мм) по 8 особей. Крысы получали комбикорм полнорационный для лабораторных животных ПК-120-191, производимый ООО «МЭСТ» (Россия), и фильтрованную водопроводную воду *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях (20–26°C, 30–70%-ная относительная влажность, 12-часовой цикл освещения и 8–10-кратная смена объема воздуха в час). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 г. «Принципы надлежащей лабораторной практики», Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии № 33 от 14.11.2023 г., а также в соответствии с «Правилами работы с животными» ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Дизайн исследования

Крыс разделили на три группы: 1-я группа — контроль (n=10); 2-я груп-

па — Дох (Доксорубицин-ЛЭНС®, ООО «ВЕРОФАРМ», Россия; лиофилизат для приготовления раствора, 2 мг/мл) в дозе 5 мг/кг (n=10); 3-я группа — Дох в дозе 6 мг/кг (n=11). Препарат вводили внутривентриально один раз в неделю в течение 28 дней. Крысы контрольной группы получали физ. р-р по аналогичной схеме.

Оценку поведенческих реакций проводили в тестах «Открытое поле» (29–30-е сут эксперимента), «Распознавание нового объекта» (31–32-е сут эксперимента), «У-лабиринт» (33–34-е сут эксперимента) с последующей регистрацией выживаемости (в %).

Все выжившие животные опытных и контрольных групп на 37-е сут эксперимента были подвергнуты эвтаназии и патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины структур головного мозга. Фрагменты головного мозга (кора больших полушарий и гиппокамп) фиксировали в 96%-ном этаноле. После окончания стандартной гистологической проводки и заливки в парафиновые блоки готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм. Полученные микропрепараты окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей окраской 1%-ным водным р-ром эозина. Микроскопировали в проходящем свете. Документировали изображения фотокамерой «Nikon DS-Fi1c» (Япония) с применением программы визуализации изображений NIS Elements BR для Nikon.

Результаты и их обсуждение

При оценке паттерна поведения крыс-самцов в тесте «Открытое поле» показано, что Дох вызывает угнетение двигательной активности в дозе 6 мг/кг ($p<0,05$), вертикальной двигательной активности в дозе 5 мг/кг ($p<0,05$) и отсутствие исследовательской активности по сравнению с контрольной группой.

В тесте «Распознавание нового объекта» животные контрольной группы уде-

ляли больше времени новому объекту. Животные, получавшие Dox (5 мг/кг), уделяли новому объекту такое же время, что и знакомому, что свидетельствует о нарушении дифференцировки между старым и новым объектами и ослаблении непространственной памяти. Вместе с тем получены парадоксальные данные у животных, получавших Dox (6 мг/кг), которые проявляли большую заинтересованность в новом объекте по сравнению со знакомым ($p<0,05$).

Анализ данных, полученных в тесте «Y-образный лабиринт», позволяющем оценить изменения в пространственной памяти, показал, что через 24 ч после «знакомства» с Y-лабиринтом животные из опытных групп осуществляли меньше заходов в новый рукав С, а в дозе 6 мг/кг отмечалось снижение времени пребывания в новом рукаве ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой, что указывает на нарушение функции долговременной пространственной памяти под действием Dox.

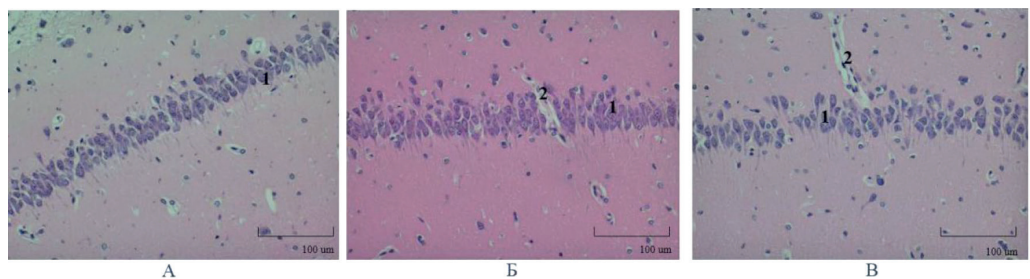


Рис. Микроскопическое исследование фрагментов зоны CA1 гиппокампа крыс (фиксация 10%-ным формалином, окраска галлоцианин-эозином, увеличение $\times 200$). А — контрольная группа, Б — Dox в дозе 5 мг/кг, В — Dox в дозе 6 мг/кг; 1 — округлые перикарионы пирамидных нейронов, 2 — периваскулярный отёк.

Fig. Fragments of the rat hippocampus CA1 zone (fixed with 10% formalin, stained with gallocyanin-eosin, magnification $\times 200$). А — control group, Б — Dox (5 mg/kg), В — Dox (6 mg/kg); 1 — rounded pyramidal neurons, 2 — perivascular edema.

Таблица. Влияние доксорубина на степень выраженности периваскулярного отёка и полнокровия с эритростазом в гиппокампе и в коре больших полушарий у крыс

Table. Effect of doxorubicin on the severity of perivascular edema and congestion with erythrosthias in the hippocampus and cerebral cortex in rats

Показатель, баллы	Интактные, контроль n=5	Группа Доксорубин, 5 мг/кг n=6	Доксорубин 6 мг/кг n=5	Значимость по Краскелу — Уоллису
Периваскулярный отёк в коре больших полушарий	2,00 2,00÷2,00	2,00 2,00÷3,00	3,00 3,00÷3,00 $p<0,05$	$p=0,03$
Полнокровие сосудов с эритростазом в коре больших полушарий	3,00 2,00÷3,00	4,00 3,00÷4,00	4,00 3,00÷4,00 $p<0,05$	$p=0,02$
Периваскулярный отёк в гиппокампе	3,00 2,00÷3,00	3,00 3,00÷4,00	3,00 3,00÷3,00	$p=0,26$
Полнокровие сосудов с эритростазом в гиппокампе	0,00 0,00÷1,00	3,00 1,00÷4,00 $p<0,05$	2,00 2,00÷4,00 $p<0,05$	$p=0,02$

Примечание: * — $p<0,05$ по сравнению с интактными животными согласно непараметрическому аналогу дисперсионного анализа по Краскелу — Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Данные представляли в виде медиан, верхних и нижних квартилей.

Note: * — $p<0.05$ compared with intact animals according to the nonparametric analogue of Kruskal — Wallis analysis of variance with further processing by Dunn's multiple comparison method. Data were presented as medians, upper and lower quartiles.

В ходе эксперимента наблюдалась дозозависимая динамика смертности: на 37-е сут в живых осталось 8 животных из 10 (5 мг/кг) и 6 животных из 11 (6 мг/кг).

Микроскопическое исследование показало, что в коре больших полушарий, а также в гиппокампе у контрольных крыс выявлялось умеренное полнокровие сосудов и единичные случаи периваскулярного отека. У животных, получавших Dоx (5 и 6 мг/кг), полнокровие сосудов и периваскулярный отек в гиппокампе (рис.) и коре больших полушарий визуально были выражены сильнее.

Далее выполнено балльное шкалирование препаратов гиппокампа и коры больших полушарий. Показано, что выраженность периваскулярного отека и полнокровия сосудов с эритростазом у животных, получавших Dоx (5 и 6 мг/кг), была больше ($p < 0,05$), чем у крыс контрольной группы (табл.).

Впервые при микроскопическом исследовании препаратов головного мозга крыс, получавших Dоx (5 и 6 мг/кг), выявлены расстройства микроциркуляции в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе. Полученные данные согласуются с представлениями о подверженности гиппокампа прямым или косвенным повреждениям, возникающим в результате системного применения Dоx.

Выводы

Доксорубицин в дозах 5 и 6 мг/кг при системном курсовом введении вызывает ослабление функций долговременно непространственной и пространственной памяти у крыс, которые сопровождаются нарушениями микроциркуляции в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. John J., Kinra M., Mudgal J., Viswanatha G.L., Nandakumar K. Animal models of chemotherapy-induced cognitive decline in pre-clinical drug development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021;238(11):3025–3053. DOI: 10.1007/s00213-021-05977-7
2. Sekeres M.J., Bradley-Garcia M., Martinez-Canabal A., Winocur G. Chemotherapy-induced cognitive impairment and hippocampal neurogenesis: A review of physiological mechanisms and interventions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(23):12697. DOI: 10.3390/ijms222312697

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Иван Владимирович Алексеев*, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: alekseev_iv@academpharm.ru

Ирина Александровна Мирошкина, к.б.н., ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: iris10.81@mail.ru

Александра Валериановна Сорокина, к.б.н., ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: sorokina_av@academpharm.ru

Ivan V. Alekseev*, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: alekseev_iv@academpharm.ru

Irina A. Miroshkina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: iris10.81@mail.ru

Aleksandra V. Sorokina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: sorokina_av@academpharm.ru

Иосиф Борисович Цорин, д.б.н., ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: tsorinib@yandex.ru

Iosif B. Tsorin, Dr. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;

e-mail: tsorinib@yandex.ru

Лариса Геннадьевна Колик, д.б.н., проф. РАН, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: lgkolik@mail.ru

Larisa G. Kolik, Dr. Sci. (Biol.), Prof. of the RAS, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;

e-mail: lgkolik@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author