

УДК: 619:615.9:616.36

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.137

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТОВ С МОРФОМЕТРИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ МИТОХОНДРИЙ ПРИ СМЕШАННОМ МИКОТОКСИКОЗЕ БЕЛЫХ КРЫС НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА

Тарасова Е.Ю. – кандидат биологических наук, зав. лабораторией ветеринарной санитарии, Кашеваров Г.С. – кандидат биологических наук, зав. сектором ультраструктурных исследований, Саитов В.Р. – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Матросова Л.Е. – доктор биологических наук, зав. лабораторией микотоксинов, ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Ключевые слова: микотоксины, профилактика, печень, ультраструктура, гепатоциты, митохондрии, морфометрия.

Keywords: mycotoxins, prevention, liver, ultrastructure, hepatocytes, mitochondria, morphometry.



РЕФЕРАТ

Микотоксины широко изучались многими исследовательскими группами, но необходимы дальнейшие исследования, чтобы лучше понять и прояснить многие вопросы. В этом исследовании продемонстрированы ультраструктурные изменения в печени и морфометрических характеристиках митохондрий крыс при экспериментальном сочетанном воздействии микотоксинов. Первая группа крыс служила биологическим контролем. Второй и четвертой группам с кормом задавали афлатоксин В1, Т-2 токсин, зеараленон. Крысы 4 группы дополнительно к токсичному рациону получали профилактический комплекс в дозе 0,25 % от рациона; третья группа – тот же комплекс дополнительно к основному рациону. В гепатоцитах при смешанном микотоксикозе (вторая группа крыс) наблюдались изменения ультраструктуры ядер: появление ядер нетипичной формы, когда во внешнем контуре некоторых ядер образуются впадины и неровности, но при этом не изменяется структура перинуклеарного пространства. Кроме этого, в ядрах происходит переориентация и в некоторых даже дезинтеграция хроматина, деструкция митохондрий, просветление цитоплазмы. Кристы в митохондриях не просматриваются либо почти не просматриваются, выявляются разрывы мембран с деструкцией органелл, матрикс в основном средней электронной плотности, иногда просветленный. Цитоплазма в большинстве своем электронно-светлая, разного рода включения редки (пероксисомы совершенно не встречаются). Эндоплазматическая сеть представлена фрагментарно. Все изучаемые морфометрические характеристики митохондрий (площадь, периметр, сферичность и калиперометрический диаметр) статистически значимо ($p < 0.05$ в тесте Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга) снижаются в 3,04, 1,57, 1,49 и 1,07 раза в группе токсического контроля относительно группы биологического контроля. Использование профилактического комплекса на фоне смешанного микотоксикоза стабилизирует ультраструктуру различных субклеточных структур гепатоцитов (хроматин конденсированный, перинуклеарное пространство не увеличено, цитоплазма средней элек-

тронной плотности, митохондрии с плотным матриксом). Таким образом, предлагаемый нами профилактический комплекс обладает протективным эффектом в отношении ультраструктуры гепатоцитов и морфометрических показателей митохондрий.

ВВЕДЕНИЕ

Микотоксины являются токсичными соединениями, продуцируемыми грибами. Животные, как и люди, обычно подвергаются воздействию микотоксинов через свой рацион. Результатом является острый, подострый или хронический микотоксикоз [2, 11, 19].

Среди микотоксинов афлатоксин В1 представляет собой чрезвычайно токсичное, мутагенное и канцерогенное соединение [4, 13].

Зеараленон вызывает нарушения в половом цикле и изменения морфологии репродуктивных органов [23, 25].

Механизм токсичности Т-2 токсина заключается в ингибировании синтеза белка с последующим окислительным повреждением клеток, что приводит к неравномерному синтезу нуклеиновых кислот и в дальнейшем к апоптозу или гибели клеток [7, 14].

Тревожной особенностью микотоксинов является их встречаемость часто в сочетании, что приводит к изменению степени их токсичности (аддитивное или синергетическое действие) по сравнению с отдельными эффектами. Систематические экспериментальные исследования ультраструктурных и морфологических изменений, вызванных совместным присутствием в корме афлатоксина В1, Т-2 токсина и зеараленона, в высоких дозах отсутствуют, что обуславливает необходимость настоящего исследования.

Первым органом, в котором проявляются патологические морфологические изменения при микотоксикозах, является печень, что предопределило выбор именно этого органа в качестве объекта исследования. При этом митохондрии представляют собой органеллы, которые подвергаются самым критичным изменениям [20].

Нами для снижения токсикологических эффектов микотоксинов предложен профилактический комплекс, в состав

которого входят нанотрубки галлуазита с подтвержденной *in vitro* высокой адсорбционной активностью к афлатоксину В1, Т-2 токсину, зеараленону и охратоксину А [6, 8, 10]; β-глюканы, способные связывать широкий спектр микотоксинов [16–18]; шрот расторопши богатый витаминами, минералами и антиоксидантными соединениями, стабилизирующими клеточные и субклеточные мембраны, а также метионин, участвующий в детоксикации микотоксинов в печени за счет повышения активности метильных групп [3]. Показано, что печеночный метаболизм играет заметную роль в определении биологического действия микотоксинов. Поэтому предпочтение следует отдавать препаратам с направленным действием на печеночные клетки [1, 9].

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния профилактического комплекса на ультраструктуру печени и морфометрические характеристики митохондрий крыс при одновременном попадании в организм сразу нескольких микотоксинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по определению эффективности профилактического комплекса, в состав которого входят нанотрубки галлуазита, β-глюканы, шрот расторопши и метионин, при смешанном микотоксикозе выполнены на 40 белых крысах массой 150–170 г, полученных из вивария ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и распределенных на 4 группы по 10 крыс в каждой. Первая группа крыс служила биологическим контролем. Второй и четвертой группам с кормом задавали афлатоксин В1, Т-2 токсин, зеараленон. Крысы 4 группы дополнительно к токсичному рациону получали профилактический комплекс в дозе 0,25 % от рациона; третья группа получала тот же комплекс дополнительно к основному рациону.

Микотоксины добавляли в основной рацион путем ступенчатого перемешива-

ния (афлатоксин В1 – 2,5 мг/кг, Т-2 токсин – 5 мг/кг и зеараленон – 2,0 мг/кг корма) на протяжении трех недель. Дозы были выбраны исходя из принципа «наихудшего сценария» возможной контаминации микотоксинами в производственных условиях. В ходе эксперимента изучено влияние профилактического комплекса на ультраструктуру гепатоцитов с оценкой площади, периметра, сферичности и калиперометрического диаметра (диаметра Фере) митохондрий.

Сферичность митохондрий определялась по формуле

$$C=4\pi(S/P^2),$$

где С – коэффициент сферичности;

 S – площадь;

 P – периметр.

Для ультраструктурных исследований печени кусочки ткани размером до 1 мм³ фиксировали в глутаровом альдегиде и обрабатывали по стандартным электронно-микроскопическим методикам [5, 12, 15].

Полутонкие (толщиной до 1,5 мкм) и ультратонкие срезы (толщиной до 80 нм) получали на ультрамикротоме LKB – III 8800. Полутонкие срезы окрашивали 1 % раствором метиленового синего и просматривали в поле зрения светового микроскопа «PZO Biolar» (Польша) на предмет выбора участка для последующей ультратонкой резки. Ультратонкие срезы помещали на медные сеточки для электронной микроскопии без подложки. Контрастирование срезов (сеточек) проводили «методом капли» в растворах уранилацетата (2 часа в термостате при 45 °С) и цитрата свинца (1,5 минуты при 25 °С).

Срезы просматривали на просвечивающем электронном микроскопе «JEM 100 CX-II» («Jeol», Япония) при увеличении до 10 тысяч раз и ускоряющем напряжении 80 кВ.

Морфометрическая обработка микрофотографий производилась с помощью программ Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss) и FIJI / Image J.

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программных средах MS Excel и Statistica 6.0 и включала в

себя вычисление среднего значения показателей (M) и его стандартного отклонения (Sd), а также проведение попарного сравнения групп при помощи теста Манна–Уитни (группу биологического контроля сравнивали с группой токсического контроля; группу биологического контроля сравнивали с опытной группой (основной рацион, контаминированный микотоксинами с добавлением профилактического комплекса); группы контроля безвредности и опытную группу, получавшую контаминированный корм и профилактический комплекс, сравнивали с группами биологического и токсического контроля). Для учёта поправки на влияние множественного сравнения применяли FDR-контроль (контроль частоты ложноположительных результатов), метод Бенджамини–Хохберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты статистического анализа полученных данных представлены в таблице.

Из таблицы видно, что все изучаемые морфометрические характеристики митохондрий статистически значимо снижаются в 3,04, 1,57, 1,49 и 1,07 раза в группе токсического контроля относительно группы биологического контроля в отношении площади, периметра, диаметра и сферичности соответственно. При добавлении в рацион профилактического комплекса мы наблюдаем восстановление этих показателей (статистических отличий от группы биологического контроля обнаружить не удалось). Значения морфометрических показателей при введении в рацион профилактического комплекса значимо отличались от группы, получавшей токсический рацион.

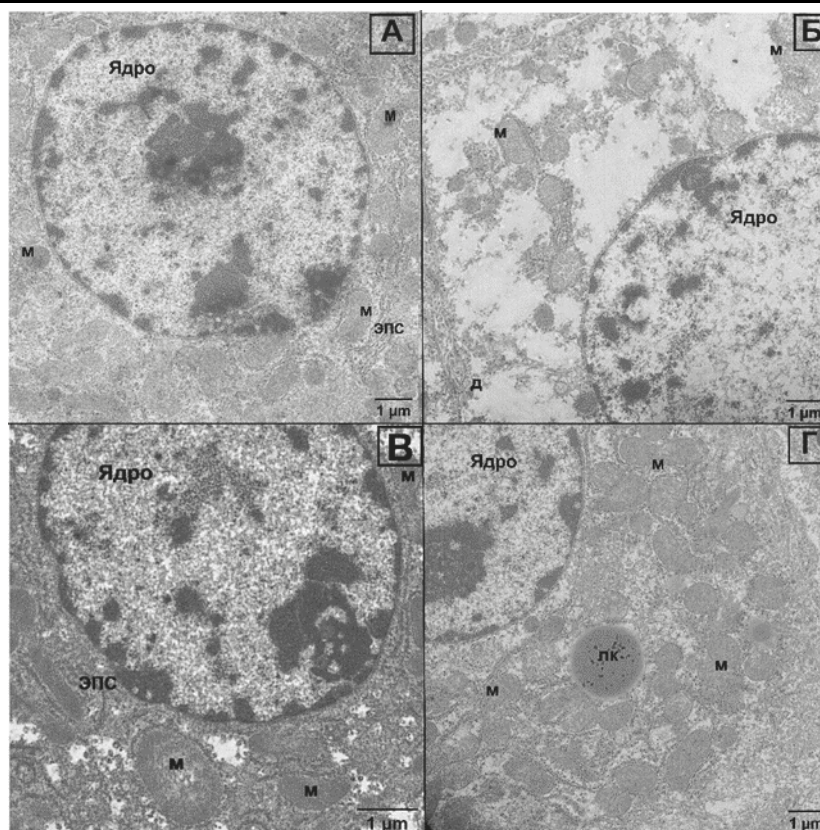
Представляют интерес также изменения, выявленные при изучении морфологии гепатоцитов (рисунок).

В группе биологического контроля ядра гепатоцитов округлой формы, в оболочке отчётливо просматриваются поры, перинуклеарное пространство по всему периметру ядра равномерной ширины, хроматин расположен диффузно. Мито-

Таблица

Морфометрические характеристики ($M(Sd)$) митохондрий гепатоцитов крыс

Группа	Площадь, μm^2	Периметр, μm	Диаметр, μm	Сферичность
Биологический контроль (БК)	0,76(0,51)	3,07(1,13)	1,1(0,43)	0,91(0,08)
Токсический контроль (ТК)	0,25(0,16) ^a	1,95(0,8) ^a	0,74(0,36) ^a	0,85(0,15) ^a
БК+ПК	0,75(0,57) ^b	3,04(1,09) ^b	1,04(0,40) ^b	0,91(0,10) ^b
ТК+ПК	0,72(0,48) ^b	3,08(1,18) ^b	1,14(0,51) ^b	0,9(0,1) ^b
Примечание Верхние индексы показывают статистически значимые отличия с учётом поправки на влияние множественного сравнения: а – отличие от группы биологического контроля, b – отличие от группы токсического контроля.				



Примечания: А – группа биологического контроля, Б – группа токсического контроля, В – группа контроля безвредности профилактического комплекса, Г – опытная группа (токсический рацион+профилактический комплекс), м – митохондрии, ЭПС – эндоплазматическая сеть, д – десмосомы, ядр – ядрышко, лк – липидные капли.

Рис. Фрагменты гепатоцитов белых крыс

хондрии в основном удлинённые с плотным матриксом, в некоторых просматриваются ламеллярные кристы. По всей цитоплазме встречается гликоген, пероксисом нет. Эндоплазматическая сеть хорошо визуализируется по всему периметру снимков, в том числе в околоядерной зоне.

В группе токсического контроля выявляются схожие особенности (как и в случае с морфометрическими характеристиками). Ядерная оболочка у многих гепатоцитов деформирована, контур ядра неровный (отмечаются изломы, впадины). В большей части ядер наблюдается переориентация и дезинтеграция хроматина. Кристы в митохондриях не просматриваются либо почти не просматриваются, выявляются разрывы мембран с деструкцией органелл, матрикс в основном средней электронной плотности, иногда просветленный. Цитоплазма в большинстве своем электронно-светлая, разного рода включения редки (пероксисомы совершенно не встречаются). Эндоплазматическая сеть представлена фрагментарно.

Перинуклеарное пространство в четвертой группе не увеличено, но при этом наблюдается незначительная деформация ядра. Конденсированный хроматин в том или ином количестве присутствует в ядрах гепатоцитов. Митохондрии полиморфны, с плотным матриксом, хорошо просматриваются кристы. Цитоплазма средней электронной плотности, встречаются включения (гранулы гликогена и липидные капли). Эндоплазматическая сеть просматривается.

Таким образом, группа крыс, получавших в дополнении к токсическому рациону профилактический комплекс, показала отличия от группы токсического контроля, приближаясь по своим характеристикам к группе биологического контроля.

Описанные нами ультраструктурные изменения митохондрий под действием микотоксинов согласуются с литературными данными [21, 22]. Изменения в морфологии митохондрий, шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и аппарате

Гольджи под воздействием зеараленона связывают с его влиянием на клеточный метаболизм и секреторные процессы [24]. Установлено, что основные ультраструктурные изменения под действием микотоксинов наблюдаются в эпителии проксимальных канальцев почек и гепатоцитах печени [22]. При внутрижелудочном введении мышам Т-2 токсина в течение 6 месяцев в дозе 0,33 – 0,45 мг/кг выявлены серьезные повреждения структуры гепатоцитов, особенно гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума. Помимо разрушения гепатоцитов, наблюдалось увеличение количества первичных и вторичных лизосом. Регенерирующие очаги были обнаружены у большинства клеток печени. При хроническом Т-2 микотоксикозе существует прямая корреляция между повреждением ультраструктуры гепатоцитов и изменениями в организме [20].

ВЫВОДЫ

При смешанном микотоксикозе в гепатоцитах белых крыс наблюдаются изменения ультраструктуры ядер: появляются ядра нетипичной формы, когда во внешнем контуре некоторых ядер появляются впадины и неровности, но при этом не изменяется структура перинуклеарного пространства. Кроме этого в ядрах происходит переориентация и в некоторых даже дезинтеграция хроматина, деструкция митохондрий, просветление цитоплазмы.

Использование профилактического комплекса на фоне смешанного микотоксикоза стабилизирует ультраструктуру гепатоцитов, хроматин конденсированный, перинуклеарное пространство не увеличено, цитоплазма средней электронной плотности, митохондрии с плотным матриксом.

Также по результатам морфометрического анализа наиболее близкие к биологическому контролю характеристики были свойственны митохондриям животных, получавших дополнительно к токсическому рациону профилактический комплекс.

Таким образом, предлагаемый нами профилактический комплекс обладает протективным эффектом в отношении ультраструктуры гепатоцитов и морфометрических показателей митохондрий крыс.

ULTRASTRUCTURE OF HEPATOCITES

WITH MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF MITOCHONDRIA IN MIXED MYCOTOXICOSIS OF WHITE RATS ON THE BACKGROUND OF THE APPLICATION OF THE PREVENTIVE COMPLEX

Tarasova E.Yu. - Candidate of biological Sciences, head of laboratory of veterinary sanitation, Senior researcher, Kashevarov G.S. - Candidate of biological Sciences, head ultrastructural research sector, Saitov V.R. - Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, Matrosova L.E. - Doctor of Biological Sciences, head of laboratory of mycotoxin, FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

ABSTRACT

Mycotoxins have been extensively studied by many research groups, but further research is needed to better understand and clarify many issues. This study demonstrated ultrastructural changes in the liver and morphometric characteristics of mitochondria in rats under experimental combined exposure to mycotoxins. The first group of rats served as biological control. The second and fourth groups were fed aflatoxin B1, T-2 toxin, zearalenone. Rats of the 4th group, in addition to the toxic diet, received a prophylactic complex at a dose of 0.25% of the diet; the third group - the same complex in addition to the main diet. In hepatocytes with mixed mycotoxicosis (the second group of rats), changes in the ultrastructure of the nuclei were observed: the appearance of nuclei of an atypical shape, when depressions and irregularities form in the outer contour of some nuclei, but the structure of the perinuclear space does not change. In addition, reorientation occurs in the nuclei and in some even disintegration of chromatin, destruction of mitochondria, clarification of the cytoplasm. Cristae in mitochondria are not visible or almost not visible, membrane ruptures with destruction of organelles are detected, the matrix is mainly of medium electron density, sometimes enlightened. The cytoplasm is mostly electron-light, various kinds of inclusions are rare (peroxisomes are not found at all). The endoplasmic reticulum is presented fragmentarily. All studied morphometric characteristics of mitochondria (area, perimeter, sphericity and caliperometric diameter) are statistically significantly ($p < 0.05$ in Mann-Whitney test with Benjamini-Hochberg correction) reduced by 3.04, 1.57, 1.49 and 1.07 times in the toxic control group relative to the biological control group. The use of a prophylactic

complex against the background of mixed mycotoxicosis stabilizes the ultrastructure of various subcellular structures of hepatocytes (chromatin is condensed, perinuclear space is not enlarged, cytoplasm is medium electron density, mitochondria is with a dense matrix). Thus, the prophylactic complex proposed has a protective effect on the ultrastructure of hepatocytes and morphometric parameters of mitochondria.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Барышев, В. А. Повышение эффективности современных сорбентов / В. А. Барышев, О. С. Попова, А. В. Свиридова // Международный вестник ветеринарии. – 2017. – № 2. – С. 13–16.
2. Баскова, Е. Ю. Применение энтеросорбентов на основе нанотехнологий для борьбы с микотоксикозами животных / Е. Ю. Баскова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2008. – Т. 192. – С. 234.
3. Гулюшин, С. Ю. Доноры метильных групп — перспективные средства для профилактики хронических микотоксикозов / С. Ю. Гулюшин, Р. А. Зернов // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 2. – С. 21–31.
4. Изучение сорбционной активности потенциальных средств профилактики микотоксинов в отношении афлатоксинов / Е. Ю. Тарасова, Э. И. Семенов, Л. Е. Матросова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2020. – № 2. – С. 51–58.
5. Методические рекомендации по электронно-микроскопическим исследованиям биологических объектов / А. В. Иванов, А. А. Иванов, А. Н. Чернов [и др.]. – Казань : Росинформгротех, 2011. – 67 с.
6. Нанотрубки галлуазита – новое эффективное средство для борьбы с микотоксикозами / Е. Ю. Тарасова, Э. И. Семенов, Л. Е. Матросова, М. И. Канин // Научная жизнь. – 2020. – Т. 15, № 4 (104). – С. 561–571.
7. Папуниди, Э. К. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса овец при остром и подостром Т-2 микотоксикозе на фоне применения лекарственных средств / Э. К. Папуниди, М. Я. Трemasов, Е. Ю. Тарасова // Ветеринарный врач. – 2010. – № 2. – С. 21–23.
8. Поиск эффективных адсорбентов Т-2 токсина / Е. Ю. Тарасова, Э. И. Семенов, А. Р. Валиев, Л. Е. Матросова // Вестник Марийского государственного университета. Серия: Сель-

- скохозяйственные науки. Экономические науки. – 2019. – Т. 5, № 3 (19). – С. 322–329.
9. Понамарев, В. С. Влияние препарата «Гепатон» в сочетании с фитосорбционным комплексом на уровень эндогенной интоксикации / В. С. Понамарев, О. С. Попова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 3. – С. 124–125.
10. Тарасова, Е. Ю. Изучение сорбционной активности нанотрубок галлуазита по отношению к зеараленону и охратоксину А / Е. Ю. Тарасова // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». – 2021. – Т. 7, № 1. – С. 71–76.
11. Тарасова, Е. Ю. Изыскание средств для лечения животных при Т-2 микотоксикозе : специальность 06.02.03. «Ветеринарная фармакология с токсикологией», 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Тарасова Евгения Юрьевна. – Казань, 2010. – 209 с.
12. Трансмиссионная электронная микроскопия в биологии и медицине / М. М. Сальникова, Л. В. Малюткина, В. Р. Саитов, А. И. Голубев. – Казань : КФУ, 2016. – 125 с.
13. Тремасов, М. Я. Опыт применения пробиотика при микотоксикозах / М. Я. Тремасов, Л. Е. Матросова, Е. Ю. Тарасова // Вестник ветеринарии. – 2009. – № 3 (50). – С. 38–41.
14. Цитотоксическая активность Т-2 токсина к перевиваемым культурам клеток эпителия легкого эмбриона крупного рогатого скота / И. И. Идиятов, Л. Р. Валиуллин, В. В. Бирюля [и др.] // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 41–46.
15. Электронная микроскопия в токсикологических исследованиях: Учебно-методическое пособие / В. Р. Саитов, Л. В. Малюткина, А. И. Голубев [и др.]. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2019. – 34 с.
16. Adsorption of zearalenone by β -d-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall / J. A. Yiannikouris, J. Francois, L. Poughon [et al.] // Food Prot. – 2004. – Vol. 67. – P. 1195–1200.
17. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins with or without yeast cell wall adsorbent on organ weight, serum biochemistry, and immunological parameters of broiler chickens / Z. Li, Z. B. Yang, W. R. Yang [et al.] // Poultry Science. – 2012. – № 91. – P. 2487–2495.
18. Impacts of low level aflatoxin in feed and the use of modified yeast cell wall extract on growth and health of nursery pigs / Y. Sun, I. Park, J. Guo [et al.] // Animal Nutrition. – 2015. – Vol. 1 (3). – P. 177–183.
19. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients – a review of recent patents / Y. Zhu, Y. I. Hassan, C. Watts [et al.] // Anim Feed Sci Technol. – 2016. – Vol. 216. – P. 19–29.
20. Kravchenko, L. V. Hepatocyte ultrastructure in mice with chronic T-2 mycotoxicosis / L. V. Kravchenko, S. I. Khvylya, A. B. Levitskaia // Biulleten eksperimentalnoi biologii i meditsiny. – 1986. – Vol. 102 (10). – P. 482–485.
21. Prabu, P. C. Toxicopathological studies on the effects of aflatoxin B1, ochratoxin A and their interaction in New Zealand white rabbits / P. C. Prabu, P. Dwivedi, A. K. Sharma // Experimental and toxicologic pathology. – 2013. – Vol. 65 (3). – P. 277–286.
22. Stoev, S. Experimental mycotoxic nephropathy in chicks II. Ultrastructural studies / S. Stoev // Bulgarian Medicine. – 1998. – Vol. 6 (7–8). – P. 55–58.
23. Trichothecenes in food and feed: occurrence, impact on human health and their detection and management strategies / D. K. Mahato, S. Pandhi, M. Kamle [et al.] // Toxicon. – 2022. – Vol. 208. – P. 62–77.
24. Ultrastructural changes of ovarian follicle and corpus luteum after experimental zearalenone mycotoxicosis in bitch / M. Gajęcka, B. Przybylska-Gornowicz, K. Obremski [et al.] // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2008. – Vol. 11 (4). – P. 327–337.
25. Zaki, M. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management / M. Zaki // J Toxicol Environ Health Sci. – 2012. – Vol. 4. – P. 13–28.