

УДК: 619:615.9:579:577.3

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.144

## ИЗМЕНЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ГИСТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ СМЕСИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СМЕШАННОГО МИКОТОКСИКОЗА

Тарасова Е.Ю. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Танасева С.А. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Матросова Л.Е. – доктор биологических наук, зав. лабораторией микотоксинов, Губеева Е.Г. – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник  
ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

**Ключевые слова:** микотоксины, биохимия, гистопатология, печень, профилактика, аминотрансферазы.

**Keywords:** mycotoxins, biochemistry, histopathology, liver, prevention, aminotransferases.



### РЕФЕРАТ

При нарушении технологии заготовки и хранения кормов формируются условия, благоприятствующие развитию грибов рода *Aspergillus*, *Fusarium* и т.д., образующих часто многообразный уровень опасных микотоксинов, что приводит к увеличению числа случаев возникновения микотоксикозов животных. Попадание микотоксинов в организм часто вызывает ряд метаболических, физиологических и иммунологических нарушений. В рамках данной работы оценивалась эффективность профилактической смеси, сочетающей в себе компоненты, воздействующие на разнообразные патологические процессы в условиях сочетанного воздействия микотоксинов. Для эксперимента использовали белых крыс, разделенных на 4 группы. На протяжении 21 сут крысы с кормом получали смесь микотоксинов (афлатоксин В1 – 2,5 мг/кг, Т-2 токсин – 5 мг/кг и зеараленон – 2,0 мг/кг). Отрицательный эффект от сочетанного воздействия продемонстрирован угнетением основных параметров обмена веществ: снижением концентрации общего белка (32,8 %), альбумина (26,5 %), глобулина (42,2 %), глюкозы (23,5 %), повышением содержания мочевины в сыворотке крови (19,4 %), активности печеночных аминотрансфераз: АСТ (32,5 %) и АЛТ (29,6 %), тогда как в группе крыс, получавших токсичный корм с добавлением профилактической смеси, изменения относительно группы биологического контроля составили 9,8, 9,1, 10,9, 9,5, 5,6, 11,3 и 8,33 % соответственно, что свидетельствует о защитном эффекте. Анализ биохимических показателей проведен на анализаторе АРД-200. Протективное действие предлагаемой нами смеси также подтверждено данными гистологических исследований печени как основного органа метаболизма микотоксинов. Таким образом, добавление профилактической смеси на основе нанoadсорбента, органических компонентов, метионина и шрота расторопши в количестве 0,25 % от рациона показало защитный эффект, что выражалось в корреляции обменных процессов и менее выраженных изменениях в печени.

## ВВЕДЕНИЕ

Микотоксины являются природными загрязнителями, которые вырабатываются микроскопическими грибами в любом растительном кормовом сырье [2, 5, 18]. В зависимости от факторов окружающей среды в процессе хранения их количество варьирует и повышается вероятность множественного загрязнения микотоксинами [13-15].

Описано множество последствий для здоровья человека и животных, связанных с воздействием афлатоксина В1, таких как гепатотоксичность, иммунотоксичность, генотоксичность, изменения микробной популяции кишечника и репродуктивные повреждения [7, 9, 11].

Т-2 токсин является наиболее цитотоксичным из трихотеценов типа А и оказывает неблагоприятное воздействие на клеточный метаболизм [4, 6].

Зеараленон классифицируется как ксеноэстроген, так как он имитирует активность эстрогенов путем связывания с рецепторами эстрогена млекопитающих. Это приводит к нарушению эндокринной функции, и, как следствие, репродуктивной системы [16, 17, 20].

После поедания зараженных микотоксинами кормов патологические эффекты варьируют от острого явного заболевания с высокой гибелью до хронического снижения устойчивости к патогенам и продуктивности животных. Потенцирование эффекта зависит от химической структуры микотоксинов, дозы, времени воздействия, биологических факторов (пола и возраста животного), факторов питания и окружающей среды [21-22].

С 1960 года проведено множество исследований, опубликованы данные о токсичности отдельных микотоксинов на клеточном уровне. Однако в последнее время основная проблема, связанная с кормом для животных, загрязненным микотоксинами – это одновременное попадание в организм нескольких микотоксинов, вызывающих метаболические изменения, сопровождающиеся патологическими нарушениями в организме животных.

В целях предотвращения пагубного

воздействия микотоксинов разработан ряд стратегий борьбы, в основном профилактических.

Особое место занимают исследования по созданию эффективных препаратов комплексного действия, которые способны подавлять или уменьшать абсорбцию, стимулировать выведение микотоксинов или изменять механизм их действия [19, 22].

Нами предложена профилактическая смесь, в состав которой входят нанотрубки галлуазита с подтвержденной *in vitro* высокой адсорбционной активностью к афлатоксину В1, Т-2 токсину, зеараленону и охратоксину А [8-10]; β-глюканы, способные связывать широкий спектр микотоксинов [20]; 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].

Целью настоящего исследования явилась оценка потенциальной возможности применения профилактической смеси (ПС), в состав которой входит галлуазит, метионин, β-глюканы, шрот расторопши в условиях сочетанного одновременного воздействия микотоксинов (Т-2 токсина, афлатоксина В1, зеараленона) на белых крыс, с учетом комплекса биохимических показателей, характеризующих процессы обмена веществ, и изменений структурной организации печени.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки влияния корма, загрязненного микотоксинами, и возможную эффективность разработанной профилактической смеси на биохимические маркеры обмена веществ и гистопатологию печени проведен опыт на половозрелых белых крысах массой тела 180-200 г, содержащихся в условиях вивария. Мико-

токсины добавляли в основной рацион путем ступенчатого перемешивания (афлатоксин В1 – 2,5 мг/кг, Т-2 токсин – 5 мг/кг и зеараленон – 2,0 мг/кг корма). Дозы были выбраны, учитывая более высокие уровни естественных контаминаций микотоксинов. Состав профилактической смеси включает в себя компоненты, влияющие на различные патологические процессы. С целью изучения влияния профилактической смеси при смешанном микотоксикозе ее включали из расчета 0,25 % от рациона. Крыс распределили на 4 экспериментальные группы: 1 группа – биологический контроль (основной рацион без каких-либо добавок); 2 – токсический контроль (основной рацион + микотоксины); 3 – контроль безвредности (основной рацион + профилактическая смесь); 4 – опытная (основной рацион + микотоксины + профилактическая смесь).

В конце эксперимента на 21 сут после взятия образцов крови у умерщвленных животных провели изъятие печени у крыс из каждой группы. Кровь собирали в пробирки без антикоагулянта и оставляли для свертывания в термостате в течение 2 ч при температуре 37 °С, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин и отделяли сыворотку. Сыворотку из каждой группы анализировали на содержание общего белка, альбумина, глобулина, мочевины, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и глюкозы. Биохимические показатели определяли на анализаторе АРД-200 (ООО «ВИТАКО», Россия) с использованием специальных наборов реагентов («Chronolab Systems S.L.», Испания). Для расчета концентрации глобулина использовалась формула общий белок минус альбумины.

Для гистопатологического исследования образцы органов фиксировали в 10 % забуференном нейтральном формалине размером не более 10x10x0,5мм, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты

изучали в светооптическом микроскопе Leica DM 1000 с цифровой камерой Leica DFC 320 (Германия).

Обработку цифрового материала проводили методом вариационной статистики с применением критерия достоверности по Стьюденту. Вычисляли следующие величины: среднеарифметическую (М), среднеквадратическую ошибку ( $\pm m$ ) и показатель существенной разницы (р).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные эффекты от воздействия микотоксинов на белковый статус на фоне применения ПС представлены на рисунке 1.

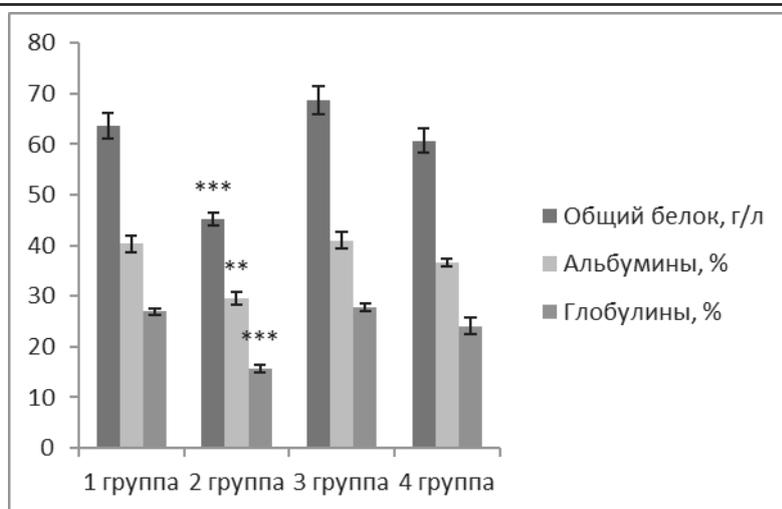
Результаты биохимического анализа сыворотки крови показали, что воздействие микотоксинов (токсический контроль) привело к достоверному снижению содержания общего белка на 32,8 % ( $p < 0,001$ ) относительно группы биологического контроля, тогда как в опытной группе снижение было менее значительным составило 9,7 %.

Крысы, получавшие микотоксины с кормом, показали значительное снижение уровней альбумина и глобулинов по сравнению с контрольной и другими экспериментальными группами. Так, содержание альбуминов и глобулинов достоверно снизилось на 26,6 % ( $p < 0,01$ ) и 42,2 % ( $p < 0,001$ ), соответственно по сравнению с группой биологического контроля. В опытной группе снижение этих показателей составило 9,8 % и 9,11 %.

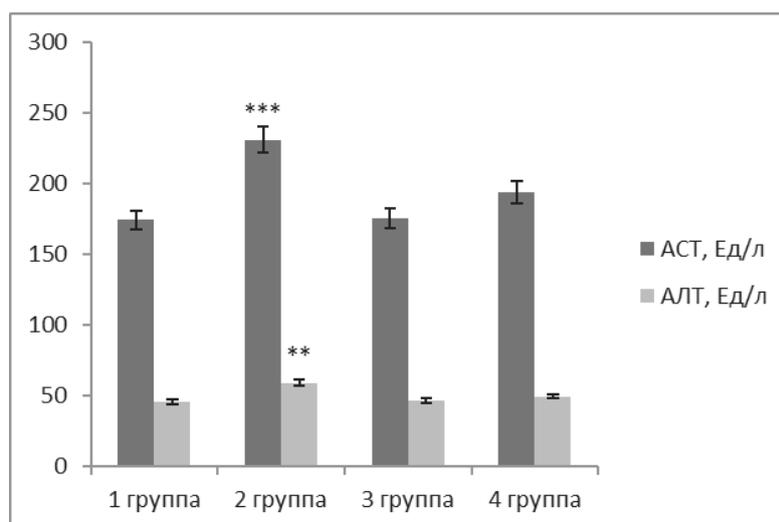
Концентрация мочевины у крыс группы токсического контроля достоверно превышала значения группы биологического контроля на 19,4 % ( $p < 0,05$ ), тогда как в опытной группе повышение составило 5,6 %.

Показатель углеводного обмена (глюкоза) в сыворотке крови у крыс токсического контроля был достоверно снижен на 23,48 % ( $p < 0,05$ ) относительно группы биологического контроля. Понижение этого показателя в опытной группе не имело достоверных отличий от группы биологического контроля.

Введение микотоксинов вызвало за-



**Рис. 1. Белковый статус при смешанном микотоксикозе на фоне применения профилактической смеси.**



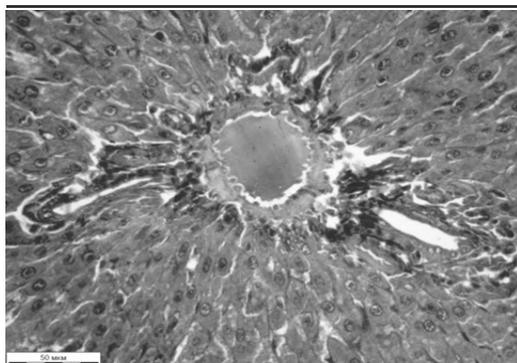
**Рис. 2. Корреляция содержания печеночных ферментов при смешанном микотоксикозе на фоне применения профилактической смеси.**

метное и статистически достоверное повышение уровня сывороточных ферментов печени (рисунок 2).

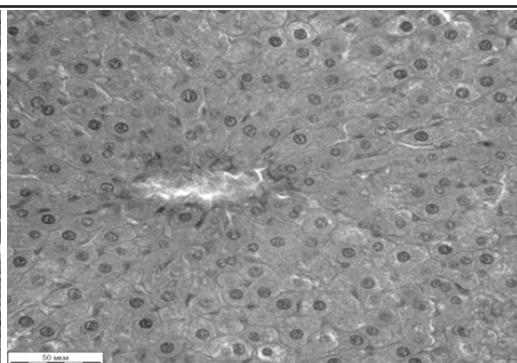
Так, уровни АСТ и АЛТ по сравнению с биологической группой были выше на 32,5 % ( $p < 0,001$ ) и 29,6 % ( $p < 0,01$ ). Тогда как повышение уровня этих ферментов при введении профилактической смеси вместе с микотоксинами было недо-

статочным (11,3% и 8,3 % соответственно).

При гистологическом исследовании печени 2 группы крыс отмечались признаки полиморфной дистрофии, некрозы единичных гепатоцитов, плазматическое пропитывание стенок сосудов. В печени сосуды артериального типа расширены, заполнены эритроmassами, гомогенными



*Рис. 3. Гистологическая структура печени белых крыс при смешанном микотоксикозе (окраска гематоксилином Эрлиха, эозином водным, объектив X40).*



*Рис. 4. Гистологическая структура печени белых крыс при смешанном микотоксикозе на фоне применения профилактической смеси (окраска гематоксилином Эрлиха, эозином водным, объектив X40).*

эозинофильными массами, вены в портальных трактах на поперечном сечении имели овальную форму, пустые просветы. Стенки артерий были утолщены, гомогенизированные, структура нечеткая, эндотелий выбухал в просвет. Венозные сосуды также были утолщены, местами структура стенок нечеткая. Просвет желчного протока пустой. Гепатоциты неравномерно окрашенные, в некоторых по периферии клеток определялись мелкие пустотки круглой формы, цитоплазма гепатоцитов от зернистой до гомогенной интенсивно окрашенной. Единичные гепатоциты безъядерные. Синусоиды сдавленные, неравномерно заполнены эритроцитами. Купферовские клетки интенсивно окрашенные, деформированные (рисунок 3).

В печени артерии расширены, просветы их заполнены эритромами, стенки артерий резко утолщены, структура сосудов четкая. Синусоиды не сдавлены, Купферовские клетки без особенностей. Цитоплазма гепатоцитов неравномерно окрашенная, в базальных отделах единичных гепатоцитов определяются пустоты (рисунок 4).

Микотоксины, попадая в организм, оказывают негативное действие на клетки, органы и ткани, что сопровождается характерными изменениями клинических, гематологических и некоторых биохими-

ческих показателей крови. Все микотоксины после абсорбции сразу поступают в кровью в печень, где метаболизм микотоксинов генерирует токсические метаболиты, вызывая повреждение органа, кульминацией которого является нарушение синтеза, метаболизма, хранения и перераспределения углеводов, белков и т.д. Для некоторых микотоксинов, особенно афлатоксина В1, описано множество нарушений биохимических показателей, изменений гистологической и гистохимической картины печени. Воздействие Т-2 вызывает значительное снижение общего белка в сыворотке и заметное повышение активности трансаминаз

(аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза). Зеараленон, согласно имеющимся данным, также вызывает повышение уровней креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы, аспартаттрансаминазы, аланинтрансаминазы [12, 14, 19]

Наши данные согласуются с результатами вышеуказанных исследований и подтверждают, что афлатоксин В1, Т-2 токсин и зеараленон могут взаимодействовать, вызывая синергетическую токсичность. Последствия такого взаимодействия представлены отдельными биохимическими показателями метаболизма и гистологическими изменениями в печени.

## ВЫВОДЫ

Присутствие в рационе микотоксинов в комбинации (афлатоксин В1 + Т-2 токсин + зеараленон) привело к изменениям отдельных биохимических показателей крови. Возросла активность аминотрансфераз, наблюдалась гипопроотеинемия и гипогликемия.

Согласно результатам исследования добавление профилактической смеси смягчило эффекты, вызванные микотоксинами, возвращая оценки повреждения (стабилизация биохимических показателей и уменьшение серьезности гистопатологических изменений в органах) к значениям, которые незначительно отличались от биологического контроля. Таким образом, предлагаемая нами профилактическая смесь, может стать многообещающим выбором при профилактике смешанных микотоксикозов. Однако необходимы дальнейшие исследования для определения эффективности профилактической смеси у продуктивных животных в самых разных условиях.

## CHANGES IN INDIVIDUAL BIOCHEMICAL PARAMETERS AND HISTOLOGY OF THE LIVER OF WHITE RATS IN THE BACKGROUND OF THE APPLICATION OF A PREVENTIVE MIXTURE UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL MIXED MYCOTOXICOSIS

Tarasova E.Yu. - Candidate of biological Sciences, Senior researcher, Tanaseva S.A. - Candidate of biological Sciences, Leading Researcher, Matrosova L.E. - Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Mycotoxins, Gubeeva E.G. - Candidate of Medical Sciences, Leading researcher, FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

## ABSTRACT

In case of violation of the technology of preparation and storage of feed, conditions are formed for development of fungi of the genus *Aspergillus*, *Fusarium*, etc., which often produce a diverse level of dangerous mycotoxins, leading to an increase in the number of cases of animal mycotoxicosis. The ingestion of mycotoxins into the body often causes a number of metabolic, physiological and immunological disorders. In the framework of this work,

the effectiveness of a prophylactic mixture that combines components that affect a variety of pathological processes under conditions of combined exposure to mycotoxins was evaluated. White rats divided into 4 groups were used for the experiment. For 21 days, rats were fed with a mixture of mycotoxins (aflatoxin B1 - 2.5 mg/kg, T-2 toxin - 5 mg/kg, and zearalenone - 2.0 mg/kg). The negative effect of the combined act was demonstrated by the inhibition of the main metabolic parameters: a decrease in the concentration of total protein (32.8%), albumin (26.5%), globulin (42.2%), glucose (23.5%), an increase in the content of urea in blood serum (19.4%), the activity of hepatic aminotransferases: AST (32.5%) and ALT (29.6%), while in the group of rats that received toxic food with the addition of a prophylactic mixture, changes relative to the biological control group were 9.8, 9.1, 10.9, 9.5, 5.6, 11.3 and 8.33%, respectively, indicating a protective effect. The analysis of biochemical parameters was carried out on the ARD-200 analyzer. The protective effect of the mixture offered is also confirmed by the data of histological studies of the liver, as the main organ of mycotoxin metabolism. Thus, the addition of a prophylactic mixture based on nanoadsorbent, organic components, methionine and milk thistle meal (in an amount of 0.25% of the diet) showed a protective effect, which was expressed in the correlation of metabolic processes and less pronounced changes in the liver.

## 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. Идиятов, И. И. 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.
- 5.Макаева, А. Р. Мониторинг питательной ценности и химической безопасности основных кормов республики татарстан по результатам исследований, выполненных в 2019 году / А. Р. Макаева, О. В. Шлямина, И. М. Фицев // Буглеровские сообщения. – 2020. – Т. 62, № 4. – С. 123–128.
- 6.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.
- 7.Танасева, С. А. Эффективность адсорбентов при сочетанном микотоксикозе цыплят-бройлеров / С. А. Танасева, Е. Ю. Тарасова, Л. Е. Матросова [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2020. – № 4. – С. 50–56.
- 8.Тарасова, Е. Ю. Изучение сорбционной активности нанотрубок галлуазита по отношению к зеараленону и ократоксину А / Е. Ю. Тарасова // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». – 2021. – Т. 7, № 1. – С. 71–76.
- 9.Тарасова, Е. Ю. 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.
- 10.Тарасова, Е. Ю. Поиск эффективных адсорбентов Т-2 токсина / Е. Ю. Тарасова, Э. И. Семенов, А. Р. Валиев [и др.] // Вестник Марийского государственного университета. Серия: Сельскохозяйственные науки. Экономические науки. – 2019. – Т. 5, № 3 (19). – С. 322–329.
- 11.Трemasов, М. Я. Опыт применения пробиотика при микотоксикозах / М. Я. Трemasов, Л. Е. Матросова, Е. Ю. Тарасова // Вестник ветеринарии. – 2009. – № 3 (50). – С. 38–41.
- 12.Dellafiora, L. Forthcoming challenges in mycotoxins toxicology research for safer food - a need for multi-omics approach / L. Dellafiora, C. Dall'Asta // Toxins. – 2017. – Vol. 9. – P.18.
- 13.Mannaa, M. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage / M. Mannaa, K. Kim // Mycobiology. – 2017 – Vol. 45. – P. 240–254.
- 14.Marin S. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment Food Chem / S. Marin, A.J. Ramos, G. Cano-Sancho [et al.] // Toxicol. – 2013. – Vol. 60. – P. 218–237.
- 15.Potekhina, R. M. Biodiversity of mycelial fungi in freshwater in the territory of the park "Mari Chodra" of the Russian Federation / R. M. Potekhina, E. Yu. Tarasova, S. A. Tanaseva [et al.] // Systematic Reviews in Pharmacy. – 2020. – Vol. 11, № 12. – P. 1464–1472.
- 16.Matrosova, L. E. Enterosorbent efficiency mineral attenuation during pig mycotoxicosis / L. E. Matrosova, N. N. Mishina, S. A. Tanaseva [et al.] // International Journal of Mechanical and Production Engineering Research and Development. – 2020. – Vol. 10. – P. 1851.
- 17.Matrosova, L. E. Zeolite, hepatoprotector and probiotic for aflatoxicosis in pigs international / L. E. Matrosova, S. A. Tanaseva, E. Y. Tarasova [et al.] // International Journal of Mechanical and Production Engineering Research and Development. – 2020. – Vol. 10. – P. 7053.
- 18.Rodrigues, I. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed / I. Rodrigues, K. Naehrer // Toxins. – 2012 – Vol. 4. – P.663–675.
- 19.Tarasova, E. Yu. Protective effect of adsorbent complex on morphofunctional state of liver during chicken polymycotoxicosis / E. Yu. Tarasova, L. E. Matrosova, S. A. Tanaseva [et al.] // Systematic Reviews in Pharmacy. – 2020. – Vol. 11, № 11. – P. 264–268.
- 20.Yiannikouris, J. A. Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -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.
- 21.Zaki, M. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management / M. Zaki // J Toxicol Environ Health Sci. – 2012. – Vol. 4. – P. 13–28.
- 22.Zhu, Y. 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.