

УДК: 619:615.9:616.36
DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.127

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПОРАЖЕНИЙ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИИ АФЛАТОКСИНОМ В1

Матросова Л.Е.* – д-р биол. н., зав. лаб. (ORCID 0000-0001-7428-7882), Дом-
бровский В.О. – асп. отделения токсикологии (ORCID 0000-0002-8960-0971), Танасева
С.А. – к. биол. н., вед. науч. сотр. лаб. микотоксинов (ORCID 0000-0003-1295-6184),
Тарасова Е.Ю. – к. биол. н., зав. лаб. (ORCID 0000-0002-9058-5798), Ермолаева О.К. – к.
биол. н., ст. науч. сотр. лаб. микотоксинов (ORCID 0000-0002-9938-6868), Ерохондина
М.А. – мл. науч. сотр. лаб. микотоксинов (ORCID 0000-0001-6971-1618)
ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологиче-
ской безопасности»

Ключевые слова: афлатоксин В1, белые крысы, гематология, биохимия, печень.
Keywords: aflatoxin B1, white rats, hematology, biochemistry, liver.



РЕФЕРАТ

Афлатоксин В1 представляет собой гепатотоксическое и гепатоканцерогенное соединение. Это один из распространенных микотоксинов, вызывающий различные патологические состояния у человека и животных, такие как острые и хронические поражения печени, неврологические расстройства, новообразования, а также нарушения репродуктивной функции.

Настоящая работа была направлена на изучение профилактического действия биологически активной добавки на основе муки из расторопши пятнистой, янтарной кислоты, бентонита, пробиотического штамма *B. subtilis*, витамина А и Е при экспериментальном афлатоксикозе лабораторных животных. Опыты проведены на 24 белых крысах, разделенных по принципу аналогов на 4 группы. Первая группа – биологический контроль, вторая группа – токсический контроль, третьей и четвертой группе на фоне введения микотоксина задавали лечебные препараты. Белым крысам вводили афлатоксин В1 с кормом в дозе 1,5 мг/кг в течение 10 суток. Эффективность лечения оценивали по клиническим признакам подопытных животных, гемато-биохимическому анализу и состоянию печени. Применение биологически активной добавки значительно снижало токсическое действие афлатоксина В1 на организм животных, предотвращало снижение количества гемоглобина, лейкоцитов и эритроцитов, повышение тромбоцитов, активности аминотрансфераз (аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы), щелочной фосфатазы и малонового диальдегида. Патологоанатомических изменений внутренних органов у животных, получавших биологически активную добавку, не регистрировали.

Результаты эксперимента свидетельствуют о высокой терапевтической эффективности использованной биологически активной добавки при афлатоксикозе, вследствие многокомпонентного состава.

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы в ветеринарной медицине приобрела особую актуальность проблема роста патологий гепато-

билиарной системы, которые негативно влияют на физиологический статус животных. Гепатотоксическим действием обладают ряд токсических веществ, среди

которых наиболее опасны тетрахлорметан, хлороформ, бензол и его производные, соединения меди, железа, мышьяка, акриламид, аллиловый спирт, нитрозодиметиламин. Помимо ксенобиотиков печень поражают и природные экотоксиканты – афлатоксины.

Среди различных молекул природных афлатоксинов – афлатоксин В1 является высокотоксичным ($B1 > G1 > B2 > G2$). Он наиболее распространен и представляет серьезную опасность для здоровья птиц, животных и человека, поскольку является гепатотоксичным, мутагенным, канцерогенным, тератогенным и обладает иммуносупрессивным действием [1,2,3]. Афлатоксин В1 продуцируется *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, которые поражают арахис, зерна кукурузы, злаки [4,5].

Как природный загрязнитель, афлатоксин В1 часто присутствует в кормах для животных и птиц. Попад в организм, афлатоксин В1 метаболизируется с образованием различных метаболитов, из которых эпоксид афлатоксина В1 очень реактивный и нестабильный, связывающийся с клеточными макромолекулами, такими как ДНК, РНК, липиды, белки и, приводящий к перекисному окислению липидов и повреждению клеток. Основным аддуктом АFB1-ДНК, образующимся в печени, является афлатоксин В1-N7-гуанин. Этот аддукт нестабилен и подвергается разложению в печени крысы, что приводит к разрушению печеночных клеток [6].

Воздействие афлатоксина включает практически все известные морфологические и клинические варианты поражения печени, от незначительного повышения активности аминотрансфераз до фульминантного гепатита и декомпенсированного цирроза печени [7,8]. Макроскопические поражения включают увеличение печени, гиперемию, пожелтение и рыхлость; петехии или более генерализованные кровоизлияния; отек и экхимозные или петехиальные кровоизлияния в желчном пузыре. Макроскопические данные зависят от дозы и продолжительности

воздействия, но типичны для афлатоксикоза. Фиброз и пролиферация желчных протоков могут быть обширными и обнаруживаться вместе с фиброзной веноокклюзией центральных вен. Из-за вредного воздействия афлатоксина В1 на организм животных и птиц важно разрабатывать эффективные и безопасные гепатопротекторные препараты для снижения его токсичности. Показана эффективность лечения и профилактики афлатоксикоза лекарственными препаратами, снижающими гепатотоксичность с помощью различных механизмов [9,10,11].

Целью настоящего исследования явилось изучение терапевтической эффективности комплексной биологически активной добавки при афлатоксикозе лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на базе отделения токсикологии Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (Казань, Россия). Эксперименты проводили на 24 белых крысах линии Wistar, разделенных по принципу аналогов на 4 группы по 6 особей в каждой. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Для кормления лабораторных животных использовали полнорационный комбикорм. Белые крысы первой группы служили биологическим контролем. Крысам 2, 3 и 4 групп вводили афлатоксин В1 (с содержанием действующего вещества 90-95 %, Sigma-aldrich), в дозе 1,5 мг/кг в течение 10 суток. Для снижения токсического действия микотоксина на печень в качестве препарата-сравнения использовали гепатопротектор флавоноидной природы «Карсил» в дозе 100 мг/кг (группа 3) и комплексную биологически активную добавку из расчета 25 г на кг корма (группа 4). Состав добавки: мука из расщепленной пшеницы (20,00 масс %), янтарная кислота (1,68 масс %), бентонит (76,00 масс %), пробиотический штамм *B.*

subtilis (в титре 106 КОЕ/г, 0,62 масс %), витамин А (0,02 масс %) и Е (1,68 масс %).

Афлатоксин В1 и препараты вводили в корм путем последовательного и ступенчатого тщательного перемешивания.

Продолжительность лечения составила 14 суток.

Контроль лечебного эффекта оценивали по поведению и внешнему состоянию животных, данным гематологического и биохимического анализов крови, макроскопическим изменениям печени.

Наблюдение за клиническим состоянием белых крыс проводили ежедневно. Взвешивание осуществляли на весах BM-520 (Россия). Для гематологических исследований использовали анализатор IDEXX LaserCyte Dx. Биохимические исследования проводились на анализаторе Stat Fax.

О степени интенсивности процесса перекисного окисления липидов судили по накоплению вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА), измеряемого в результате химической реакции с тиобарбитуровой кислотой. Метод основан на реакции между 2-тиобарбитуровой кислотой и промежуточными продуктами ПОЛ, в результате которой образуется окрашенный триметиновый комплекс. Оптическую плотность комплекса оценивали на спектрофотометре Экрос ПЭ-5400УФ (Россия) при длине волны 532 нм [12].

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

Клинические признаки микотоксикоза у животных 2 группы (токсический контроль) проявлялись на 7 сут и включали угнетение, диарею, отказ от корма и одышку. У животных, получавших препараты, отмечали только снижение пищевой возбудимости.

Динамика изменения массы тела и относительная масса печени подопытных и контрольных животных представлены в таблице 1.

Значительных изменений живой массы при введении микотоксина на фоне лечения не отмечали. У животных, получавших только афлатоксин В1, к концу опыта живая масса была снижена на 9,4 %. Токсикоз сопровождался увеличением массы печени, наиболее выраженным в группе токсического контроля (35,9 % ($P<0,001$)). На основании данных гематологического исследования отмечено снижение уровня показателей красной крови во всех группах по сравнению с контролем. Количество эритроцитов и гемоглобина во второй и третьей группе было снижено на 15,9; 19,8 % ($p<0,05$) и 10,1; 10,2 %, соответственно. При добавлении в рацион биологической добавки эти изменения были менее выражены. Кроме того, во 2 группе наблюдалось снижение уровня лейкоцитов на 11,4 % ($p<0,05$) и повышение количества тромбоцитов на 19,4 % ($p<0,05$).

Печеночные ферменты, такие как аланинаминотрансфераза и аспартатаминотрансфераза, высвобождаются из печени в кровоток, и их активность в сыворотке крови является полезным маркером для определения степени повреждения печени, вызванного афлатоксином В1 [13].

Как видно из таблицы, уровни аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови значительно увеличились в группе, получавшей афлатоксин В1, по сравнению с контрольной группой.

Показатели аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы во второй группе повышались в 1,77 и 2,0 раза, соответственно ($p<0,001$). Щелочная фосфатаза была повышена в 3,10 раза ($p<0,001$).

При использовании лекарственных препаратов изменения активности аминотрансфераз были менее значительными. В 3 группе показатель аспартатаминотрансферазы был повышен на 22,4 % ($p<0,05$), аланинаминотрансферазы – на 27,1 % ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 1

Масса тела и печени белых крыс при афлатоксикозе (n=6)

Группа	Средняя масса в начале опыта, г	Средняя масса в конце опыта, г	Относительная масса печени, мг/г
1	148,8±2,15	159,7±3,14	37,0±0,69
2	149,5±1,56	135,4±2,19	50,3±0,80***
3	148,7±1,45	144,0±1,90	44,8±0,56
4	149,1±1,53	152,1±2,35	39,8±0,45

*** $p < 0,001$, при сравнении с группой биологического контроля

Таблица 2

Морфологические и биохимические показатели крови белых крыс на фоне микотоксического поражения печени афлатоксином В₁ (n=6)

Показатель	Группа			
	1	2	3	4
Гемоглобин, г/л	128,2±5,1	107,0±4,9*	115,0±5,5	125,1±6,1
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,9±1,4	5,8±0,9*	6,2±1,2	6,7±0,9
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	402,0±7,5	480,0±9,1*	420,0±15,6	398,0±13,8
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,0±1,1	6,2±0,8*	6,7±0,9*	7,1±0,7
Аспаратаминотрансфераза, ЕД/л	169,1±17,0	300,0±30,4***	207,0±17,9*	167,0±19,0
Аланинаминотрансфераза, ЕД/л	140,0±14,8	282,0±10,0***	178,0±17,0**	134,0±9,9
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	303,0±40,7	940,0±141,1***	357,0±52,0	356,0±34,8
Общий белок, г/л	75,1±3,1	76,7±4,0	74,9±3,0	75,2±2,7
Альбумин, г/л	30,0±1,0	20,0±2,0***	24,0±1,0*	28,0±4,0

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, при сравнении с группой биологического контроля

В четвертой группе статистически достоверных изменений активности печеночных ферментов не регистрировали.

Эти результаты показали, что индуцированный афлатоксином В₁ микотоксикоз, привел к серьезному повреждению печени, что согласуется с литературными данными. При добавлении в рацион препаратов токсическое воздействие микотоксина на функцию печени снижалось.

Альбумин был снижен во всех группах, за исключением группы с добавлением биологически активной добавки. Это при норме общего белка подтверждает тяжелую печеночную недостаточность.

Повреждение клеток и состояние перекисного окисления липидов можно

определить путем измерения содержания малонового диальдегида.

Содержание МДА было значительно ($p < 0,001$) повышено в группе белых крыс, получавших афлатоксин В₁, на 45,9 %. Добавление лекарственных препаратов к токсическому корму предотвращало окислительный стресс в тканях печени. Активность МДА в третьей группе была выше на 19,7 ($p < 0,05$), в четвертой – 7,1 %, соответственно.

При патологоанатомическом исследовании животных группы токсического контроля наблюдали значительные изменения в виде скопления серозной жидкости в грудной и брюшной полости, гиперемии слизистой оболочки желудка и

тонкого отдела кишечника, петехий, выраженной гепато- и спленомегалии. Печень дряблой консистенции с признаками белковой дистрофии и очагами некрозов, у отдельных особей желтого цвета, желчный пузырь с кровоизлияниями, сердечная мышца дряблая, бледная, почки дряблые, капсула легко снимается, граница между корковым и мозговым слоями сглажена. У животных при использовании «Карсила» наблюдали петехиальные изменения в кишечнике и неоднородную консистенцию печени, кроме того, гепатомегалию. В группе, получавшей биологически активную добавку, печень темно-коричневого цвета, не увеличена в размере, в кишечнике и селезенке изменений не наблюдалось.

Выводы. Препараты растительного происхождения, содержащие флавоноиды, широко используются при лечении повреждений печени [14], что обеспечило теоретическую основу для этого эксперимента. В настоящем исследовании отмечено снижение токсического действия афлатоксина B1 на организм лабораторных животных при использовании лекарственных препаратов (предотвращение повышения активности трансаминаз (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы), щелочной фосфатазы, эритро- и лейкопении, снижения гемоглобина и поражения печени).

Наиболее выраженный эффект, вследствие многокомпонентного состава, был отмечен при использовании биологической добавки. Силимарин, содержащийся в плодах расторопши пятнистой, способен стабилизировать мембраны клеток печени при длительном воздействии отравляющих веществ на организм. Бентонит, обладая сорбционными свойствами, снижает количество токсинов поступающих из кишечника. Янтарная кислота, стабилизируя гомеостаз процессов дыхания в митохондриях, снижает оксидативный стресс клеток печени. Пробиотический штамм *B. subtilis* нормализует обменные процессы в кишечнике, что также снижает общую интоксикацию организма. Наличие в составе витаминных ком-

понентов, позволяет нивелировать гиповитаминозы на самых ранних стадиях.

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF WHITE RATS LIVER DAMAGE IN AFLATOXIN B1 POISONING

Matrosova L.E. - Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory, Dombrovsky V.O. - Postgraduate student, Tarasova E.Yu. - PhD in Biology, Senior researcher, Tanaseva S.A. - PhD in Biology, Leading researcher, Ermolaeva O.K. - PhD in Biology, Senior researcher, Erohondina M.A. - Junior Researcher, FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

ABSTRACT

Aflatoxin B1 is a hepatotoxic and hepatocarcinogenic compound. It is one of the common mycotoxins that causes various pathological conditions in humans and animals such as acute and chronic liver damage, neurological disorders, neoplasms and reproductive disorders.

The present work was aimed to study the preventive effect of a dietary supplement based on milk thistle flour, succinic acid, bentonite, probiotic strain *B. subtilis*, vitamins A and E in experimental aflatoxicosis of laboratory animals. The experiments were carried out on 24 white rats, divided according to the principle of analogues into 4 groups. The first group - biological control, the second group - toxic control, the third and fourth groups were given medications against mycotoxin. White rats were injected with aflatoxin B1 with food at a dose of 500 µg/kg for 10 days. The treatments effectiveness was assessed by clinical signs of experimental animals and hemato-biochemical analysis. The level of exposure to aflatoxin B1 was evaluated by the state of the liver. The use of a biologically active additive significantly reduced the toxic effect of aflatoxin B1 on the animal organism, prevented a decrease in the amount of hemoglobin, leukocytes and erythrocytes, an increase in platelets, the activity of aminotransferases (aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase), alkaline phosphatase and malonic daldehyde. There were no pathoana-

tomic changes in the internal organs of animals receiving a biologically active supplement.

The results of the experiment indicate the high therapeutic efficacy of the biologically active additive used in aflatoxicosis, due to the multicomponent composition.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов, Э. И. Фармако-токсикологические аспекты применения энтеросорбентов при сочетанных микотоксикозах. Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук. Казань, 2019. – 342 с.
2. Hussein, S. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals / S. Hussein, J. Brasel // *Toxicol* 2001. – Vol. 167. – P. 101–134.
3. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding potential of *Lactobacilli* / J. Kosztik, M. Mörtl, A. Székács [et al.] // *Toxins*. – 2020. – Vol. 12. – P. 756.
4. 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.
5. Танасева, С. А. Мониторинг афлатоксина В1 в кормах республики Татарстан / С.А. Танасева, О.К. Ермолаева, Л.Е. Матросова, Э.И. Семенов // *Международный вестник ветеринарии*. – 2020. – №2. – С.132–136.
6. Preston, R. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard / R. Preston, G. Williams // *Critic Rev Toxicol*. – 2010. – Vol. 35. – P. 673–683.
7. The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage / G. Eraslan, E. Gökhan, Z. Sarica [et al.] // *Environ Sci Pollut Res*. – 2017. – Vol. 24. – P. 27931–27941.
8. Effect of Kombucha Tea on Aflatoxin B1 Induced Acute Hepatotoxicity in Albino Rats-prophylactic and Curative Studies / R. Jayabalan, S. Baskaran, S. Marimuthu [et al.] // *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. – 2010. – 53(4). – P. 407–416.
9. Танасева, С. А. Эффективность адсор-

бентов при сочетанном микотоксикозе цыплят-бройлеров / С. А. Танасева, Е. Ю. Тарасова, Л. Е. Матросова [и др.] // *Международный вестник ветеринарии*. – 2020. – № 4. – С. 50–56.

10. Ip, S. P. Effect of a lignanenriched extract of *Schisandra chinensis* on aflatoxin B1 and cadmium chloride-induced hepatotoxicity in rats / S. P. Ip, D. H. Mak, Li P.C. [et al.] // *Pharmacol Toxicol* – 1996. – Vol. 78. – P. 413–416.

11. In vitro adsorption-desorption of aflatoxin b1 on pepper's lignins isolated from grassy plants / A. P. Karmanov, A. V. Kanarsky, Z. A. Kanarskaya [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – Vol. 144. – P. 111–117.

12. Кондрахин, И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. М.: КолосС, 2004. – 520 с.

13. Lee Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice / K. C. Choi, W. T. Chung, J. K. Kwon [et al.] // *Food Chem. Toxicol*. – 2010. – Vol. 48. – P. 2747–2753.

14. 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.

REFERENCES

1. Semenov, E. I. Pharmacotoxicological aspects of the use of enterosorbents in combined mycotoxicoses. Dissertation for the degree of Doctor of Veterinary Sciences. Kazan, 2019. – 342 p.
2. Hussein, S. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals / S. Hussein, J. Brasel // *Toxicol* 2001. – Vol. 167. – P. 101–134.
3. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding potential of *Lactobacilli* / J. Kosztik, M. Mörtl, A. Székács [et al.] // *Toxins*. – 2020. – Vol. 12. – P. 756.
4. Baskova, E. Yu. The use of enterosorbents based on nanotechnology to combat animal mycotoxicoses / E. Yu. Baskova // *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named N.E. Bauman*. – 2008. – Vol. 192. – P. 234.

5. Tanaseva, S. A. Monitoring of aflatoxin B1 in the feed of the Republic of Tatarstan / S. A. Tanaseva, O. K. Ermolaeva, L. E. Matrosova, E. I. Semenov // *International Veterinary Bulletin*. – 2020. – № 2. – P. 132–136.
6. Preston, R. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard / R. Preston, G. Williams // *Critic Rev Toxicol*. – 2010. – Vol. 35. – P. 673–683.
7. The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage / G. Eraslan, E. Gökhan, Z. Sarica [et al.] // *Environ Sci Pollut Res*. – 2017. – Vol. 24. – P. 27931–27941.
8. Effect of Kombucha Tea on Aflatoxin B1 Induced Acute Hepatotoxicity in Albino Rats-prophylactic and Curative Studies / R. Jayabalan, S. Baskaran, S. Marimuthu [et al.] // *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. – 2010. – 53(4). – P. 407–416.
9. Tanaseva, S. A. Efficiency of adsorbents in combined mycotoxicosis of broiler chickens / S. A. Tanaseva, E. Yu. Tarasova, L. E. Matrosova [et al.] // *International Veterinary Bulletin*. – 2020. – № 4. – P. 50–56.
10. Ip, S. P. Effect of a lignan-enriched extract of *Schisandra chinensis* on aflatoxin B1 and cadmium chloride-induced hepatotoxicity in rats / S. P. Ip, D. H. Mak, P. C. Li [et al.] // *Pharmacol Toxicol*. – 1996. – Vol. 78. – P. 413–416.
11. In vitro adsorption-desorption of aflatoxin b1 on pepper's lignins isolated from grassy plants / A. P. Karmanov, A. V. Kanarsky, Z. A. Kanarskaya [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – Vol. 144. – P. 111–117.
12. Kondrakhin, I. P. *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics*. M.: KolosS, 2004. – 520 p.
13. Lee Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice / K. C. Choi, W. T. Chung, J. K. Kwon [et al.] // *Food Chem. Toxicol*. – 2010. – Vol. 48. – P. 2747–2753.
14. Ponamarev, V. S. Influence of the drug «Hepaton» in combination with a phytosorption complex on the level of endogenous intoxication / V. S. Ponamarev, O. S. Popova // *Issues of legal regulation in veterinary medicine*. – 2020. – №. 3. – P. 124–125.