УДК: 619:611.8:616-091:615:636.4.5:576.31:599.23

Коцюмбас Г.І., д.вет.н., професор
Данкович Р.С., к.вет.н., доцент ©
Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Ґжицького

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В ПЕЧІНЦІ ТА НИРКАХ СВИНЕЙ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО Т-2 ТОКСИКОЗУ

У статті описані макроскопічні, гістологічні, гістохімічні та ультраструктурні зміни, які розвиваються в печінці та нирках свиней за експериментального Т-2 токсикозу. Встановлено, що Т-2 токсин спричиняє пошкодження білоксинтезуючого апарату клітин (гранулярної ендоплазматичної сітки та рибосом), спричиняє порушення обміну нуклеїнових кислот, білків та вуглеводів. Також виявлено руйнування цитоплазматичних мембран, що супроводжується активацією процесів перекисного окислення ліпідів, розвитком дистрофічних (зернистої, вакуольної та жирової дистрофії) та некротичних змін гепатоцитів і нефроцитів

Ключові слова: *Т-2 токсин, печінка, нирки, дистрофія, некроз, гранулярна ендоплазматична сітка, рибосоми*

Однією з найбільш складних проблем сучасного аграрного виробництва є забруднення кормів токсичними речовинами, чільне місце серед яких належить мікотоксинам – вторинним метаболітам плісеневих грибів. На сьогодні відомо близько 200 видів токсиноутворюювальних грибів, які виділяють понад 400 різних мікотоксинів, що суттєво відмінні за хімічною будовою та біологічними властивостями [3; 8; 12]. Слід зазначити, що проблема впливу на організм мікотоксинів знаходится в центрі уваги таких авторитетних міжнародних структур як Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (ФАО), Програми ООН з навколишнього середовища (ЮНЕП), Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), Міжнародної агенції з дослідження раку (МАДР) [2; 10; 13].

Основні групи мікотоксинів, які спричиняють токсикоз у сільськогосподарських тварин і птиці, включають афлатоксини, охратоксини, трихотоцени, фумонізини, стахіботріо- та дендродохіотоксини, зеараленон, ерготамінові алкалоїди тощо [1; 5; 9]. Поміж трихотоценових токсинів у природних умовах найчастіше виявляють ураження кормів Т-2 токсином, ніваленолом, дезоксініваленолом і діацетоксіснівaленолом [3; 6; 8].

Біологічна дія Т-2 токсину на організм характеризується широким спектром токсичного впливу, що виражається дермонекротичною, лімфопенічною, імуносупресивною, нейротоксичною дією, а також цілий рядом віддалених ефектів [4; 6-7; 9]. Більшість дослідників, зосереджуючи свої дослідження на стані органів нервової та імунної систем за Т-2 токсикозу,

© Коцюмбас Г.І., Данкович Р.С., 2013

нерідко оминають увагою зміни, що розвиваються в органах травлення та сечовиділення, які відіграють визначальну роль у всмоктуванні, метаболізмі та виведенні Т-2 токсину та його похідних. У зв'язку з цим, вивчення морфологічних змін, які розвиваються в органах травлення та сечовиділення, за Т-2 токсикозу є актуальним питанням сучасної ветеринарної медицини.

Матеріал та методи. Для експериментального дослідження використовували 2,5-місячних поросят великої білої породи, масою тіла 18−20 кг (n=8). Експерименти на тваринах проводили відповідно до правил Європейської конвенції гуманного ставлення до лабораторних тварин. Поросятам протягом 20 діб згодовуванням комбікорм, який був контамінований Т-2 токсином (0,2 мг/кг маси тіла – 1/20 $ЛД_{50}$) та випоювали воду. Для контролю використовували клінічно здорових тварин, яким згодовували комбікорм не уражений мікотоксинами та випоювали воду (n=6).

Поросят забивали, за умов легкого хлороформового наркозу на 10 та 20 день досліду, проводили патолого-анатомічний розтин. У процесі аутопсії відбирали матеріал для гістологічних, гістохімічних та електронно-мікроскопічних досліджень. Відібраний матеріал фіксували у 10 %-ному нейтральному формаліні та рідині Карнуа. Гістозрізи виготовляли на санному та заморожуючому мікротомах. Препарати фарбували гематоксиліном та еозином, суданом чорним, метиленовим зеленим та піроніном за Браше, PAS-реакцію проводили за Мак-Манусом. Виконання всіх гістохімічних методів супроводжувалося необхідним контролем для підтвердження їх специфічності. Світлову мікроскопію і мікрофотографування гістопрепаратів здійснювали за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 та фотокамери OLYMPUS C-5050.

Електронно мікроскопічні дослідження проводили за методами, описаними у посібнику з мікроскопічної техніки [11]. Зразки переглядали і фотографували в електронно-трансмісійному мікроскопі Tesla BS-500.

Результати досліджень. Макроскопічні зміни у печінці поросят, яким згодовували Т-2 токсин були вираженіші на 20 добу дослідження. Зокрема, печінка була дещо збільшена, нерівномірно забарвлена: коричнево-вишневого кольору, з жовто-бурою строкатістю, часточкова структура згладжена, а консистенція органу подекуди в'яла. Жовчний міхур переповнений в'язкою жовчю зелено-жовтого кольору. Слизова оболонка жовчного міхура шершава.

За гістологічного дослідження печінки поросят (на 10 добу) встановлено розвиток зернистої дистрофії гепатоцитів та початкові етапи розвитку жирової дистрофії. Гепатоцити були набухлі, їх цитоплазма за фарбування гематоксиліном та еозином неоднорідно ацидофільна, містила дрібні еозинофільні зернятка, подекуди нерівномірно просвітлена. За фарбування гістозрізів, виготовлених за допомогою заморожуючого мікротома та пофарбованих суданом чорним, у гепатоцитах виявляли збільшення кількості нейтральних жирів, які у вигляді дрібних гранул чорного кольору (пиловидна жирова дистрофія) нагромаджувались в цитоплазмі. Концентрація глікогену у цитоплазмі гепатоцитів та вміст РНК були дещо зменшені.

На 20 добу у цитоплазмі переважної більшості гепатоцитів візуалізувались чітко сформовані вакуолі, які заповнені просвітленою цитоплазматичною рідиною. Слід зазначити, що за фарбуванням суданом чорним лише в окремих гепатоцитах вдалось виявити округлі дрібні краплі нейтральних жирів (дрібнокрапельна жирова дистрофія). Отже, на 20 добу досліду розвивалась як вакуольна білкова дистрофія, а в деяких гепатоцитах дрібнокрапельна жирова дистрофія (рис. 1). Виявлялись гепатоцити, які зазнавали некротичних змін: їх ядра були зменшені в об'ємі (пікнотичні), гомогенно та інтенсивно забарвлені гематоксиліном, цитоплазма розріджена, в окремих гепатоцитах ядра лізовані. Окрім вираженого зменшення концентрації глікогену у цитоплазмі гепатоцитів на 20 добу досліду, також встановили зниження піронінофілії (у порівнянні з контролем), що вказувало про зниження вмісту РНК у цитоплазматичному матриксі за Т-2 токсикозу.

Подекуди виявляли переповнення синусоїдів та центральних вен кров'ю, інфільтрацію міжчасточкової сполучної тканини лімфоцитами, еозинофілами, а подекуди збільшення кількості зірчастих ретикулоендотеліоцитів (клітин Купфера). У слизовій оболонці жовчного міхура та у жовчних ходах відзначали десквамація епітелію, набряк власної пластинки слизової оболонки, лімфоцитарну інфільтрацію її сполучнотканинної основи. На окремих ділянках іноді відзначалась проліферація епітелію жовчних ходів.

За ультраструктурного дослідження печінки виявляли розширення канальців гладкої ендоплазматичної сітки та цистерн гранулярного ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів (рис. 2), які були переповнені

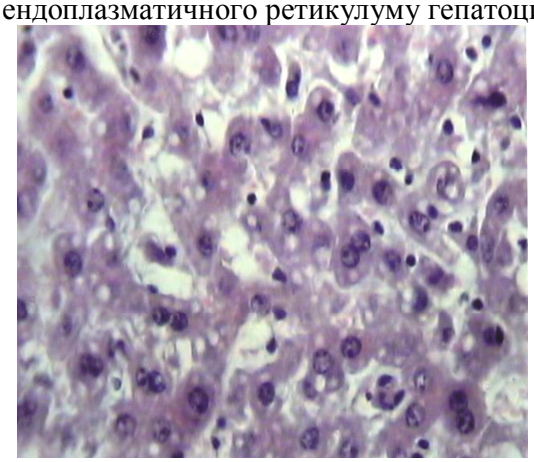

Рис. 1. Вакуольна та жирова (дрібнокрапельна) дистрофія гепатоцитів. 20 доба досліду. Гематоксилін та еозин х 500

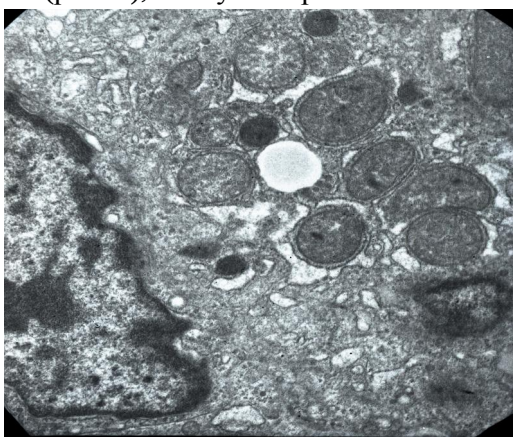

Рис. 2. Розширення канальців гладкої ендоплазматичної сітки. Каріопікноз одного з ядер гепатоцита. 20 доба досліду. Електронограма х 4000

електронно світлим вмістом, з поодинокими осміофільними включеннями. Кількість рибосом на поверхні гранулярної ендоплазматичної сітки, а також на зовнішній ядерній мембрані була зменшена. Подекуди виявляли руйнування мембран гранулярної ендоплазматичної сітки. Комплекс Гольджі був

представлений нерівномірно розширеними цистернами, що обмежені мембранними структурами, поруч із якими розташовувались дещо деформовані міхурці та вакуолі. В окремих ділянках клітини розширенні цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки оточували мітохондрії, більшість з яких набухали, кристи їх були вкороченими або зруйнованими, подекуди спостерігалось просвітлення матриксу мітохондрій. Кількість гранул глікогену, які розміщувались між зігнутими та незначно розширеними канальцями гладкого ендоплазматичного ретикулуму, на 10 добу досліду була зменшена, а на 20 добу глікоген у зазначених ділянках майже не візуалізувався. У окремих гепатоцитах (на 20 добу досліду) розвивались некротичні процеси: ядро зменшувалось в об'ємі (рис. 2), майже повністю заповнювалось гетерохроматином, ущільнювалось, органели зазнавали деструктивних змін, у гіалоплазмі збільшувалась кількість лізосом.

У гепатоцитах, з вираженими ознаками вакуольної дистрофії виявляли різке розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, руйнування мембранних структур останньої, з появою у гіалоплазмі об'ємних вакуолей, що заповнені електронно світлим вмістом, нерідко з домішками дрібних осміофільних пластівців. За умов розвитку жирової дистрофії, у цитоплазматичному матриксі розміщувались об'ємні жирові вакуолі, більшість з яких мали характерну слабоосміофільну посмугованість.

Нирки у дослідних свиней, як на 10 так і на 20 добу досліду були незначно збільшені, волокниста капсула знімалась легко, межа між кірковою та мозковою речовинами чітка. Кіркова речовина подекуди нерівномірно зафарбована: коричнево-червоного кольору, зовнішня зона мозкової речовини дещо світліше забарвлена у червоно-коричневий колір, з сіруватим відтінком, ниркові сосочки світло-сіро-рожевого кольору.

Гістологічно, на 10 добу досліду в окремих ниркових тільцях спостерігали підвищення проникності гломерулярної базальної мембрани і нагромадження у сечовому просторі білкової маси. Цитоплазма проксимальних звивистих канальців була набухла, на окремих ділянках просвітлена, щіточкова облямівка розріджена, місцями зруйнована. В окремих епітеліоцитах проксимальних звивистих канальців реєструвались некротичні зміни. У просвіті канальців нагромаджувалась білкова маса. Дугові та міжчасточкові артерії та вени були розширеними, переповнені кров'ю. Також спостерігали помірне розширення капілярів перитубулярної капілярної сітки, переповнення їх еритроцитами.

На 20 добу досліду гістологічні зміни в нирках свиней були ще більш вираженими. Подекуди траплялись різко зменшені в об'ємі ниркові тільця, капіляри яких були здавлені, їх просвіт був звуженим, мезангіальний матрикс дещо розширеним. Інші ниркові тільця компенсаторно гіпертрофовані, їх капіляри розширені, наповнені еритроцитами. У деяких епітеліоцитах проксимальних звивистих канальців розвивались некротичні зміни: ядро їх зменшене в об'ємі, інтенсивно та однорідно забарвлене гематоксиліном у фіолетовий колір, цитоплазма клітин дещо просвітлена. Деякі проксимальні

канальці були розширеними, подекуди спостерігалась десквамація нефротелію у просвіт канальця, у якому знаходилась надмірна кількість білкової маси, нефроцити при цьому були зменшені в об'ємі, ущільнені.

Окрім цього в епітеліоцитах проксимальних, дистальних звивистих канальців, а також епітелії збірних ниркових канальців розвивалась вакуольна дистрофія. Уражені клітини при цьому набухлі, у їх цитоплазмі з'являлись вакуолі, щіточкова облямівка подекуди руйнувалась, ядро здебільшого відтискалось на периферію клітини. Нейтральних жирів у зазначених вакуолях виявити не вдалося. Навколоклубочкова та міжканальцева строма були інфільтровані лімфоцитами, в окремих ділянках збільшувалась кількість макрофагів, судинна реакція дещо менш виражена, ніж на 10 добу досліду. Проте дугові та міжчасточкові артерії були також дещо розширені, переповнені еритроцитами. Окрім цього, спостерігали розширення та переповнення еритроцитами прямих артеріол мозкової речовини нирок. Також реєструвались некротичні зміни епітелію ниркових сосочків, інфільтрація сполучнотканинної строми мозкової речовини лімфоцитами та макрофагами.

За гістохімічного дослідження нирок спостерігалось зменшення кількості глікогену в апікальній частині проксимальних звивистих канальців, особливо у ділянці руйнування щіточкової облямівки. Окрім цього, піронінофілія цитоплазми проксимальних канальців була меншою, у порівнянні з контролем.

За ультраструктурного дослідження нирок на 10 добу досліду виявляли вогнищеве руйнування мікроворсинок щіточкової облямівки проксимальних звивистих канальців, розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки та зменшення на її поверхні кількості рибосом. Мітохондрії, які локалізуються в компартментах, що утворені складками базальної плазмолеми (у проксимальних та дистальних звивистих канальцях), зберігали свою базально-апікальну орієнтацію. В окремих мітохондріях спостерігали вкорочення та руйнування крист, просвітлення матриксу.

Ультраструктурно, у нефроцитах, у яких реєструвались некротичні зміни спостерігалось руйнування каріолеми, різке зменшення в об'ємі ядра, яке було майже суцільно заповнено інтенсивно конденсованими грудочками гетерохроматину. Більшість органел були зруйновані. У просвітленому цитоплазматичному матриксі розташовувалась значна кількість лізосом різного розміру.

У клітинах проксимальних звивистих канальців, у яких розвивалась вакуольна дистрофія, спостерігалось різке розширення канальців базального лабіринту. Кількість рибосом на поверхні гранулярної ендоплазматичної сітки зменшена. Подекуди відзначали розпад вільних рибосом та полісом. Канальці гладкої ендоплазматичної сітки та цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулуму були різко розширеними, переповнювались цитоплазматичною рідиною, їх мембрани подекуди руйнувались, з утворенням об'ємних вакуолей, які заповнені електронно світлим вмістом, з зернистими або пластівцеподібними осміофільними включення. Ядро в зазначених клітинах

дещо набухле, нуклеоплазма його просвітлена. Досить часто спостерігали руйнування та вкорочення складок цитоплазматичної мембрани, збільшення кількості лізосом та появу пероксисом у цитоплазматичному матриксі нефроцитів.

Висновки. У процесі дослідження встановлено, що Т-2 токсин спричиняє виражену деструкцію мембран гранулярного ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів, а також зменшення кількості рибосом та полісом, що вказує на зниження білоксинтезуючої функції. Також розвиваються дистрофічні (зерниста, вакуольна та жирова дистрофії) та некротичні процеси паренхіматозних елементів печінки і нирок. За гістохімічного дослідження у цитоплазмі гепатоцитів та дещо меншій мірі нефроцитів, виявили зменшення кількості РНК та глікогену, що свідчить про порушення обміну нуклеїнових кислот та вуглеводів за Т-2 токсикозу. Виявлена деструкція цитоплазматичних мембран ультраструктур гепатоцитів та нефроцитів супроводжується появою у цитоплазматичному матриксі пероксисом, збільшенням кількості лізосом, що вказує на активацію окислювального стресу та індукцію процесів перекисного окислення ліпідів.

Література

1. Андрійчук А. В. Мікобіота зерна ячменю, біосинтез і біологічна дія охратоксину А: Автореферат дис. кандидата ветеринарних наук: спец. 16.00.03 “Ветеринарна мікробіологія та вірусологія”/Анрійчук А.В. – Одеса. – 2008.– 18 с.

2. Галяутдинова Г.Г., Егоров В.И., Папуниди Э.К. Ветеринарно-санитарная оценка продуктов животноводства при сочетанном воздействии пиретроида и микотоксина // Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии. – 2008. – С. 248.

3. Духницький В.Б. Ветеринарна мікотоксикологія / В.Б. Духницький, Г.О. Хмельницький, Г.В. Бойко, В.Д. Іщенко // Київ, Аграрна освіта. – 2011. – 240 с.

4. Духницький В.Б. Т-2 токсикоз тварин (патогенез, діагностика, лікування та профілактика): Автореферат дис. доктора ветеринарних наук: спец. 16.00.04 – “Ветеринарна фармакологія та токсикологія” Харків, 2006. – 40 с.

5.Иванов А.В. Микотоксины (в пищевой цепочке) / Иванов А.В., Фисинин В.И., Тремасов М.Я., Папуниди К.Х // Москва: Росинформагротех, 2012. - 136 с.

6.Котик А. М., Труфанова В. О., Труфанов О. В. Частота обнаружения Т-2 токсина, НТ-2 токсина, дезоксиниволенола, зеараленона и фумонизинов в различных кормових субстратах // Птахівництво. – 2006. – Вип. 58. – С. 556 562.

7.Коцюмбас Г.І. Морфо-функціональні зміни у головному мозку щурів, поросят і курей за експериментального Т-2 токсикозу та впливу розчинів натрію гіпохлориту: Автореферат дис. доктора ветеринарних наук: спец. 16.00.02 “Патологія, морфологія та онкологія тварин” / Коцюмбас Г.І. – Біла Церква. – 2008. – 40 с.

8.Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины.– М.: Медицина, 1985. – 320 с.

9.Фисинин В.И., Сурай П. Микотоксины и антиоксиданты: непримеримая борьба (Т-2 токсин – метаболизм и токсичность) // Птица и птицепродукты. – 2012. – №3. – С. 38-43.

10. FAO: food control series. FAO: Mycotoxin surveillance. A guideline : prep. in collab. with the United Nations environment programme. Rome. – 1977. – 68 p.

11. Mulish M., Welsh U. Romeis. Mikroscopiche technic. – Heidelberg. – 2010. – P. 127-154.

12. Shephard G.S. Impact of mycotoxin on human in developing countries / Food Additives & Contaminants. – 2008; Vol.25, N 2. – P. 146-151.

13. Wit M.; Waskiewicz A.; Golinski P. Occurrence of fumonisin FB1 in kernels and rachis of maize cobs infected by Fusarium verticillioides / Wit M.; Waskiewicz A.; Golinski P. // Progress in plant protection / Inst. of plant protection. – Poznan. – 2010. - P. 1832-1836.

Summary

Kotsymbas G., Dankovych R.

PATHOMOPHOLOGICAL CHANGES IN LIVER AND KIDNEY OF PIGS FOR EXPERIMENTAL T-2 TOXICOSIS

This article describes the macroscopic, histological, histochemical and ultrastructural changes that develop in the liver and kidney of pigs for experimental T-2 toxicosis. Found that T-2 toxin causes damage to the rough endoplasmic reticulum and ribosomes, and metabolic causes of nucleic acids and carbohydrates. In addition, dystrophic and necrotic parenchymal elements of the liver and kidneys processes that occur at T-2 toxicosis, accompanied by the destruction of the cytoplasmic membrane, activation of lipid peroxidation

Key words: *T-2 toxin, liver, kidney, degeneration, necrosis, rough endoplasmic reticulum, ribosomes.*

Рецензент – д.вет.н., професор Гуфрій Д.Ф.