

© Морозов В.Н., Лузин В.И., Морозова Е.Н., 2022
УДК: 591.8:599.323.4:661.744.14

В.Н. Морозов¹, В.И. Лузин², Е.Н. Морозова¹
ВЛИЯНИЕ 60-ТИ ДНЕВНОГО ВВЕДЕНИЯ БЕНЗОАТА НАТРИЯ НА УЛЬТРА-
СТРУКТУРУ ХРОМАФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ КРЫС

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, РФ; ²Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки, Луганск, ЛНР, РФ

Цель. Изучить влияние 60-ти дневного введения бензоата натрия на ультраструктуру хромоафинных клеток мозгового вещества надпочечных желез крыс. **Материал и методы.** В эксперименте 18 белых половозрелых крыс-самцов были распределены на три группы – две экспериментальные и одну контрольную. В экспериментальных группах крысы в течение 60 дней ежедневно при помощи желудочного зонда получали 1 мл раствора бензоата натрия из расчета 500 и 1000 мг/кг массы тела соответственно, а животные третьей контрольной группы - эквивалентный объем 0,9% изотонического раствора натрия хлорида. Обработку образцов надпочечных желез проводили согласно стандартного протокола для электронно-микроскопического исследования. **Результаты исследования.** На электроннограммах хромоафинных клеток надпочечных желез крыс группы, получавших бензоат натрия в дозе 500 мг/кг/массы тела выявлены минимальные морфологические изменения: диффузное распределение гетерохроматина в кардиолазме, небольшое количество секреторных гранул, которые, преимущественно, расположены вокруг гранулярной эндоплазматической сети. В группе с использованием дозы 1000 мг/кг/массы тела изменения были более выраженными - диффузное распределение конденсированного хроматина, наличие измененных крист в митохондриях, расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети с фибриллярным содержимым, небольшое количество секреторных гранул, неровные контуры ядра. **Вывод.** 60-ти дневное введение бензоата натрия оказывает влияние на ультраструктуру хромоафинных клеток надпочечных желез половозрелых крыс. Морфологические изменения в вышеуказанных клетках нарастают при увеличении дозы вводимой пищевой добавки и вероятно связаны с влиянием бензоата натрия на генетический материал и биосинтез белка.

Ключевые слова: крыса, надпочечные железы, ультраструктура, бензоат натрия.

Поступила в редакцию 09.10.2022 г. Принята к печати 26.10.2022 г.

Для цитирования: Морозов В.Н., Лузин В.И., Морозова Е.Н. Влияние 60-ти дневного введения бензоата натрия на ультраструктуру хромоафинных клеток надпочечных желез крыс. Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. 2022;4:54-8.

Для корреспонденции: Лузин Владислав Игоревич – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии, Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки (91045, РФ, ЛНР, г. Луганск, кв. 50 лет Обороны Луганска, 1г). ORCID: 0000-0001-8983-2257; тел.: +38 050 682-79-95.
e-mail: vladyslav_luzin@mail.ru

V.N. Morozov¹, V.I. Luzin², E.N. Morozova¹
INFLUENCE OF 60-DAY ADMINISTRATION OF SODIUM BENZOATE ON THE UL-
TRASTRUCTURE OF CHROMAFFIN CELLS OF THE RAT'S ADRENAL GLAND

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation; ²Sent Luke Lugansk State Medical University, Lugansk, LPR, Russian Federation

Aim. To study the effect of a 60-day administration of sodium benzoate on the ultrastructure of the chromaffin cells of the rat's adrenal medulla. **Material and methods.** In the experiment, 18 adult white male rats were divided into three groups - two experimental and one control. In the experimental groups, rats received 1 ml of sodium benzoate solution daily for 60 days using a gastric tube at the dose of 500 and 1000 mg/kg of body weight, respectively, and the animals of the third control group received an equivalent volume of 0.9% saline solution. Adrenal gland samples were processed according to the standard protocol for electron microscopy. **Results.** The electronograms of chromaffin cells of the adrenal glands of rats in the group treated with sodium ben-

zoate at a dose of 500 mg/kg/body weight revealed minimal morphological changes: diffuse distribution of heterochromatin in the karyoplasm, a small amount of secretory granules, which are mainly located around the rough endoplasmic reticulum. In the group using a dose of 1000 mg/kg/body weight, the changes were more pronounced - diffuse distribution of condensed chromatin, the presence of altered cristae in mitochondria, expansion of cisterns of the rough endoplasmic reticulum with fibrillar contents, a small number of secretory granules, uneven contours of the nucleus. **Conclusion.** A 60-day administration of sodium benzoate affects the ultrastructure of the chromaffin cells of the adrenal glands of mature rats. Morphological changes in the above mentioned cells increase with a rise in the dose of the administered food additive and are probably associated with the effect of sodium benzoate on the genetic material and protein biosynthesis..

Key words: rat, adrenal glands, ultrastructure, sodium benzoate.

Received: 09.10.2022. Accepted: 26.10.2022.

For citation: Morozov VN, Luzin VI, Morozova EN. Influence of 60-day administration of sodium benzoate on the ultrastructure of chromaffin cells of the rat's adrenal gland. V.G. Koveshnikov Morphological Almanac. 2022; 4:54-8.

Corresponding author: Vladyslav I. Luzin - MD, PhD, Professor, Head of the Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy SE LPR Saint Luka Lugansk State Medical University (1g, 50-letiya oborony of Lugansk Street, Lugansk, LPR, 91045). ORCID: 0000-0001-8983-2257; tel.: +38 050 682-79-95.
e-mail: vladyslav_luzin@mail.ru

Введение. В процессе жизнедеятельности человек постоянно сталкивается с различными видами стрессоров, в том числе химическими и реакция организма на них, и адаптация имеют важное значение для поддержания его здоровья. Надпочечные железы являются главными продуцентами стресс гормонов и таким образом играют важную роль в быстрой реакции и последующей адаптации к новым физиологическим вызовам [4].

В пищевой промышленности для сохранения безопасности и качества пищевых продуктов используются различные виды консервантов – бензоат натрия, сорбат калия и нитрит натрия. Бензоат натрия из-за своего антифунгального действия применяется для увеличения сроков хранения соков, сладостей, маргарина и др. [11].

Анализ литературы показал неоднозначные результаты в плане влияния бензоата на здоровье человека. Так, установлено, что у некоторых детей он вызывает развитие аллергических реакций, нарушение когнитивных функций; хромосомные аберрации в культивируемых лимфоцитах человека, повышение уровня органоспецифических маркеров печени и почек. С другой стороны, установлена терапевтическая эффективность применения бензоата натрия в комплексной терапии рассеянного склероза, ранней стадии болезни Альцгеймера, пси-

зофрении и болезни Паркинсона [8].

Учитывая недостаточную изученность вопроса безопасности применения бензоата натрия является актуальным его дальнейшее исследование. В частности, на данный момент отсутствуют сведения о влиянии длительного введения бензоата натрия на ультраструктуру хромоафинных клеток мозгового вещества надпочечных желез крыс, что и послужило **целью** настоящего исследования.

Материал и методы. В исследовании участвовало 18 белых половозрелых крыс-самцов массой 200-250 г. Животных распределили на три группы – две экспериментальные и одну контрольную по 6 особей в каждой. В экспериментальных группах крысы в течение 60 дней ежедневно при помощи желудочного зонда получали 1 мл раствора бензоата натрия из расчета 500 и 1000 мг/кг массы тела соответственно (бензоат натрия, производитель EastmanChemical V.V.). Третья контрольная группа получала эквивалентный объем 0,9% изотонического раствора натрия хлорида. Содержание и манипуляции над животными проводились в соответствии с правилами содержания экспериментальных животных, установленной Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза. Протокол исследования одобрен на заседании комиссии по биоэтике ГУ «Луганский

государственный медицинский университет им. Святителя Луки», протокол №2 от 25.03.2022 г. После завершения 60-ти дневного введения бензоата натрия животных выводили из исследования методом декапитации. Выделяли надпочечные железы, измельчали их на мелкие кусочки, фиксировали в 2,5%-м растворе глютаральдегида, с последующей обработкой в 1%-м тетроксиде осмия по G. Palade. После дегидратации в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне материал заливали смесью эпоксидных смол (эпон-аралдит). Полимеризацию проводили в течение 36 часов при 60 °С. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-4 Сумского ПО «Электрон», контрастировали в растворе уранилацетата и цитрата свинца по E. Reynolds и изучали под электронным микроскопом EM-125 с дальнейшим фотографированием [9].

Результаты исследования. В мозговых эндокриноцитах имеется округлой формы ядро, с одним или несколькими ядрышками, глыбки гетерохроматина расположены, преимущественно, под кариолемой. В цитоплазме умеренно развита гранулярная эндоплазматическая сеть, имеются рибосомы, единичные лизосомы и умеренное количество маленьких гранул гомогенных электронно-плотных в центре со светлым ободком. Митохондрии овальной формы расположены поодиночке.

У крыс после воздействия бензоата натрия в дозе 500 мг/кг массы тела на электроннограммах хромафинные клетки имеют ядро овальной формы с ровными границами. В нем выявляются одно или два ядрышка, конденсированный хроматин, диффузно расположенный в кариоплазме. В цитоплазме выявляются круглой или овальной формы митохондрии с везикулярными кристами, единичные лизосомы. Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГЭПС) представляет собой фибриллярные нити, окруженные скоплениями секреторных гранул с гормоном. Встречаются единичные свободные секреторные гранулы.

У животных экспериментальной группы после воздействия бензоата натрия в дозе 1000 мг/кг массы тела на электроннограм-

мах хромафинные клетки имеют ядро овальной или круглой формы с неровными границами. В нем выявляются конденсированный хроматин, диффузно расположенный в кариоплазме. В цитоплазме выявляются круглой или овальной формы митохондрии с везикулярными кристами или в ряде случаев с частично или полностью разрушенными кристами, единичные лизосомы. ГЭПС содержит расширенные цистерны с единичными фибриллярными структурами в просвете. Секреторные гранулы в небольшом количестве визуализируются вблизи ГЭПС (Рисунок 1).

Обсуждение полученных данных. Ультрамикроскопические особенности строения хромафинных клеток мозгового вещества надпочечников контрольной группы крыс коррелируют с аналогичными данными, полученными Vaimai S. и др. (2021) [3].

Согласно исследованиям Watts D. и др. (2021) синтез адреналина и норадреналина связан с синтетическим аппаратом клетки [12].

Анализ литературы показал, что при введении повышенных доз натрия бензоата, по данным Elvan B. и др. (2014), Piper J. D. и др. (2017) и Saatci C. и др. (2016) возникает повреждение хроматина ядер гепатоцитов животных, а также митохондрий клеток и расположенных в них крист [5, 8, 10]. Это объясняет наличие на электронограммах хромафинных клеток мозгового вещества надпочечных желез митохондрий с поврежденными кристами у животных экспериментальной группы после воздействия бензоата натрия в дозе 1000 мг/кг.

Abdul-Hamid M. и др. (2013) и Molinaro C. и др. (2021) в своих работах показывают, что мутации генетического материала могут нарушать синтез белка и замедлять его транспорт из ГЭПС [1, 7]. Согласно данным Kirby T. J. и др. (2018) и Atsushi M. и др. (2022), белки цитоскелета и ядерного скелета могут влиять на форму ядра и расположение хроматина. Так, конденсированный хроматин располагается на периферии кариоплазмы, а деконденсированный хроматин в центре. Расположение генетического материала воздействует на транскрипцию и

еще больше оказывает влияние на биосинтез белка [6, 2]. Вышеизложенный материал помогает объяснить то, что ядро с неровными границами кариолемы, диффузное распределение гетерохроматина в ядре, расширенные каналцы ГЭПС с фибриллярными образованиями в просвете связаны с нарушениями в биосинтезе белка клетки, а, следовательно, и в продукции гормонов мозгового вещества надпочечников экспериментальных животных после воздействия

бензоата натрия в дозе 1000 мг/кг. При этом следует отметить, что в хромафинных клетках надпочечных желез крыс после воздействия бензоата натрия в дозе 500 мг/кг морфологически выявляется только диффузное распределение гетерохроматина в карิโอплазме, небольшое количество секреторных гранул, которые, преимущественно, расположены вокруг ГЭПС, что указывает на дозозависимый эффект пищевой добавки.

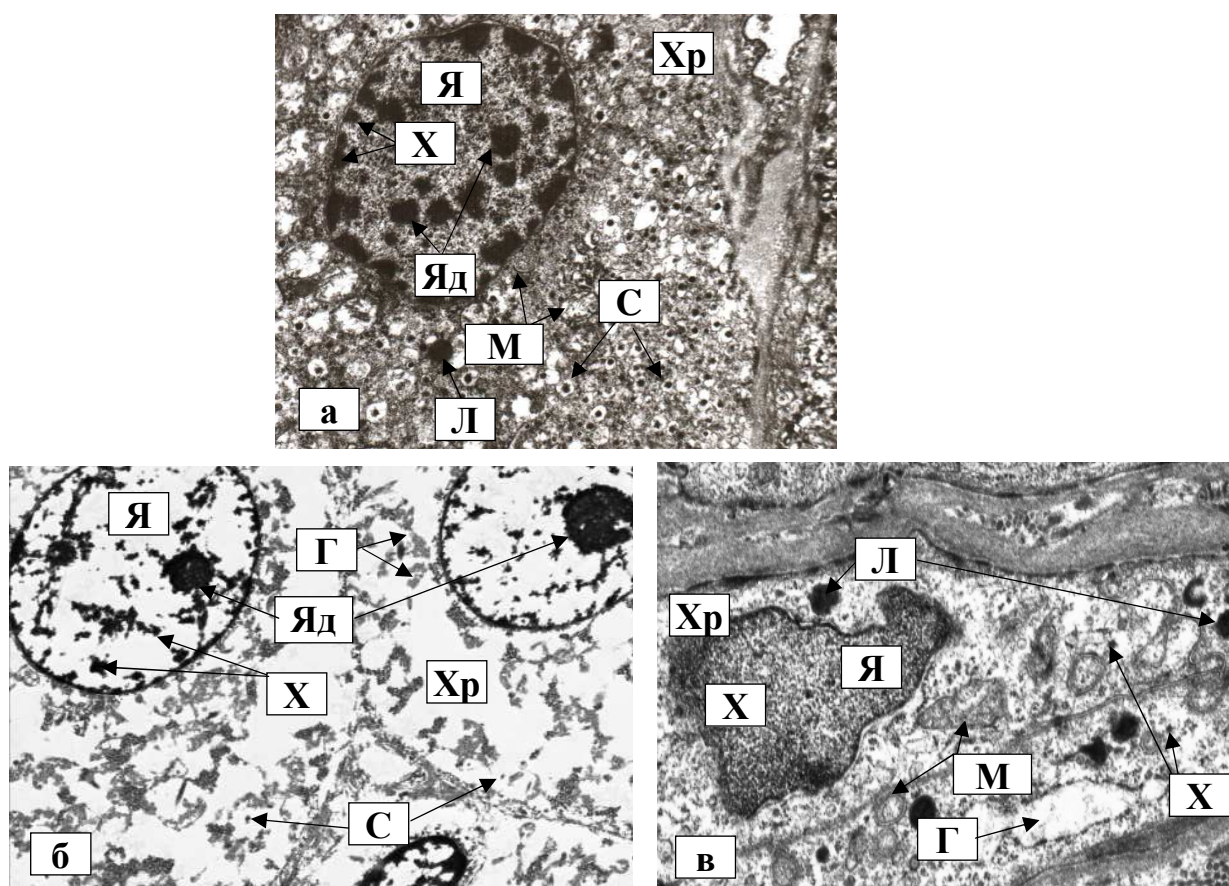


Рисунок 1 - Электронные микрофотографии хромафинных клеток мозгового вещества надпочечных желез половозрелых крыс (а – контрольная группа, б – экспериментальная группа после воздействия бензоата натрия в дозе 500 мг/кг, в – экспериментальная группа после воздействия бензоата натрия в дозе 1000 мг/кг): Хр – хромафинная клетка, Я – ядро, Х – гетерохроматин, Яд – ядрышко, М – митохондрии с измененными кристами, Л – лизосомы, С – секреторные гранулы с адреналином, Г – расширенная цистерна гранулярной эндоплазматической сети с фибриллярным содержимым в просвете. Увеличение $\times 8000$.

Выводы:

1. Особенности строения хромафинных клеток на электроннограммах мозгового вещества надпочечных желез животных после влияния высоких доз бензоата натрия на экспериментальных крыс (в виде диффузного распределения конденсированного хромати-

на, наличие измененных крист в митохондриях, расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети с фибриллярным содержимым, небольшое количество секреторных гранул, неровных контуров ядра) вероятно связаны с влиянием бензоата натрия на генетический материал и биосинтез белка,

что как следствие приводит к снижению синтеза белковых гормонов надпочечными железами.

2. Наличие менее выраженных проявлений (диффузное распределение гетерохроматина в карิโอплазме, небольшое количество секреторных гранул, которые, преимущественно, расположены вокруг гранулярной эндоплазматической сети) при воздействии бензоата натрия в дозе 500 мг/кг массы тела, чем в дозе 1000 мг/кг, свидетельствует о дозозависимом эффекте пищевой добавки.

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: Авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Abdul-Hamid M, Salah M. Lycopene reduces deltamethrin effects induced thyroid toxicity and DNA damage in albino rats. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 2013; 66: 155–63.
2. Atsushi M, Mohammad RKM. On the nuclear pore complex and its emerging role in cellular mechanotransduction. *APL Bioengineering*. 2022; 6: 011504. doi: 10.1063/5.0080480.
3. Baimai S, Bhanichkul P, lanlua P, Niyomchan A, Sricharoenvej S. Modifications of adrenal gland ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic model rats. *Int. J. Morphol.* 2021; 39(1): 109-15.
4. Berger I, Werdermann M, Bornstein SR, Steenblock C. The adrenal gland in stress - Adaptation on a cellular level. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019; 190:198-206. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.006.
5. Elvan B, Tülin A. Effects of Sodium Benzoate and Citric Acid on Serum, Liver and Kidney Tissue Total Sialic Acid Levels: An Ultrastructural Study. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2014; 8(2): 9-15.
6. Kirby TJ, Lammerding J. Emerging views of the nucleus as a cellular Mechanosensor. *Nature Cell Biology*. 2018; 20: 373-81. doi: 10.1038/s41556-018-0038-y
7. Molinaro C, Martoriati A, Cailliau K. Proteins from the DNA Damage Response: Regulation, Dysfunction, and Anticancer Strategies. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(15): 3819. doi:10.3390/cancers13153819.
8. Piper JD, Piper PW. Benzoate and Sorbate Salts: A Systematic Review of the Potential Hazards of These Invaluable Preservatives and the Expanding Spectrum of Clinical Uses for Sodium Benzoate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017; 16(5): 868-80. doi: 10.1111/1541-4337.12284.
9. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of cell biology*. 1963. Vol. 17. P. 208–12.
10. Saatcia C, Erdemb Y, Bayramova R, Akalın H, Taşçıoğlu N, Ozkul Y. Effect of sodium benzoate on DNA breakage, micronucleus formation and mitotic index in peripheral blood of pregnant rats and their newborns // *Biotechnology and biotechnological equipment*. 2016. Vol. 30(6). P. 1179–83. doi:10.1080/13102818.2016.1224979.
11. Stanojević D, Čomić L, Stefanović O, Solujić-Sukdolak S. Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2009; 15: 308-12.
12. Watts D, Bechmann N, Meneses A, Poutakidou IK, Kaden D, Conrad C, Krüger A, Stein J, El-Armouche A, Chavakis T, Eisenhofer G, Peitzsch M, Wielockx B. HIF2 α regulates the synthesis and release of epinephrine in the adrenal medulla. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2021; 99(11): 1655-1666. doi: 10.1007/s00109-021-02121-y.