

УДК 611.341:546.226-092.9
DOI 10.23648/UMBJ.2018.31.17226

МОРФОЛОГИЯ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС-ADOLESCENTS ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ СУЛЬФАТОМ КАДМИЯ

П.А. Елясин, С.В. Залавина, А.Н. Машак, А.П. Надеев, С.В. Айдагулова

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск, Россия

e-mail: elyasin@ngs.ru

Накопление кадмия у детей является серьезной проблемой для жителей мегаполисов. Кадмий обладает канцерогенным, гонадотропным, эмбриотропным, мутагенным, нефротоксическим и генотоксическим действием. Состояние тонкой кишки как естественного биологического барьера отражает способность организма млекопитающего противостоять воздействию такого агрессивного экзотоксиканта, как кадмий.

Цель исследования – выявить морфологические изменения стенки тонкой кишки крыс-adolescents при хронической интоксикации сульфатом кадмия.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 4-недельных крысах-самцах adolescents Wistar, получавших раствор сульфата кадмия в суточной дозе 0,5 мг/кг массы тела в течение 21 сут. Исследовали стенку тонкой кишки. Окраска гематоксилин-эозином и азур-2-эозином. Методы исследования: световая микроскопия и морфометрия. Статистическая обработка проводилась с использованием SPSS® Software version 17.0: применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Результаты. Выявлено снижение толщины всех слоев стенки тонкой кишки. Уменьшилась глубина крипт, увеличилась толщина ворсинки. Увеличились высота и площадь всех клеток эпителиального пласта. Увеличение высоты и площади эпителиоцитов на фоне снижения площади ядра клетки свидетельствует в пользу ингибирования синтеза ДНК и активации цитоплазматических процессов в ответ на цитотоксическое действие ионов кадмия. Увеличение количества бокаловидных клеток можно рассматривать как усиление адаптационно-приспособительных механизмов организма.

Выводы. Хроническое воздействие сульфата кадмия на тонкую кишку крыс-adolescents приводит к снижению биологического барьера между внутренней и внешней средой; уменьшению репаративной возможности эпителия тонкой кишки; активации компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на сохранение целостности поверхности тонкой кишки.

Ключевые слова: тонкая кишка, сульфат кадмия, adolescents, морфометрия.

Введение. Кадмий – один из самых токсичных тяжелых металлов – отнесен ко второму классу опасности [1]. Как и большинство тяжелых металлов, кадмий обладает высокой кумулятивной способностью: период его полувыведения составляет 10–35 лет. Кадмий депонируется в основном в почках (30–60 %) и печени (20–25 %) [2]. Его воздействие связано с синтезом в организме белка металлотионеина, который связывает и транспортирует ионы кадмия [3]. Избыток кадмия нарушает усвоение и обмен ряда микроэлементов: цинка, меди, селена, железа [4, 5]. Кадмий обладает

канцерогенным [1], гонадотропным [6], эмбриотропным [7], мутагенным и нефротоксическим действием [5]. В основе генотоксического действия кадмия лежат изменения интенсивности свободнорадикальных реакций, перекисного окисления липидов с нарушением репликации ДНК [1, 4, 8]. При поступлении через желудочно-кишечный тракт адсорбция кадмия в среднем составляет 5 %, при этом отмечено изменение состава кишечной флоры [9]. Состояние слизистой оболочки кишечника, через которую происходит всасывание компонентов содержимого

кишки, но эпителий которой в свою очередь играет роль естественного биологического барьера, отражает способность организма противостоять воздействию различных экзотоксикантов, в т.ч. кадмия.

Одной из групп риска по накоплению кадмия в организме являются дети [10], в связи с чем изучение действия данного тяжелого металла на неполовозрелых экспериментальных животных крайне актуально.

Цель исследования. Выявить морфологические изменения стенки тонкой кишки крыс-adolescents при хронической интоксикации сульфатом кадмия.

Материалы и методы. Крысам-самцам adolescents Wistar (10 крыс массой 140–150 г), содержащимся в стандартных условиях вивария, в течение 21 сут per os с пищей вводили раствор $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мг/кг живого веса, что приводило к хронической интоксикации кадмием. Контрольная группа (10 крыс) получала корм без сульфата кадмия. Возраст экспериментальных животных (4 нед.), исходя из существующего соотношения продолжительности жизни крыс и человека, соответствует подростковому возрасту онтогенеза человека [11].

Работу с экспериментальными животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [12].

Для гистологических исследований образцы тонкой кишки фиксировали в 10 % нейтральном формалине, проводили их обработку по общепринятой схеме для заливки в парафин. Готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (С. Zeiss) с программным обеспечением BioVisionVersion 4.0.

При морфометрическом исследовании определяли общую толщину стенки и отдельных оболочек тонкой кишки; высоту и толщину ворсинок; глубину и толщину

крипт; высоту, площадь энтероцитов и бокаловидных клеток и их ядер, а также их количество в одной ворсинке. Измерения проводили при увеличении в 100 и 630 раз.

Статистическую обработку полученных цифровых данных осуществляли с использованием статистического пакета SPSS 17.0. Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический метод Манна–Уитни. Также применяли метод вариационной статистики: вычисление средней арифметической (M) и ее ошибки (m). При оценке статистических гипотез принимали уровень значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Количественная морфометрия показала, что в условиях хронического воздействия сульфата кадмия происходит уменьшение толщины всей стенки тонкой кишки за счет истончения ее оболочек. Толщина мышечной оболочки снижается на 37,35 % ($p=0,002$), слизистой оболочки – на 16,58 % ($p=0,023$) и подслизистой основы – на 42,67 % ($p=0,0162$). Основные результаты количественной морфометрии представлены в табл. 1.

Микроанатомические перестройки слизистой оболочки тонкой кишки нашли свое отражение в структурных изменениях ее основных морфофункциональных единиц, в частности в изменении пропорции «ворсинка-крипта». Происходит достоверное увеличение толщины ворсинки на 18,49 % за счет достоверного увеличения высоты бокаловидных клеток на 44,83 % и энтероцитов боковой поверхности ворсинки на 23,99 %.

Поступление кадмия вызывает достоверное уменьшение глубины кишечных крипт на 24,97 %. Исходя из того, что кишечные створчатые клетки находятся в основании кишечных крипт и отвечают за обновление эпителиальной выстилки кишечника для поддержания клеточного гомеостаза [13], можно заключить, что уменьшение глубины крипт является морфологическим признаком снижения регенеративной активности эпителия тонкой кишки.

Цитометрические исследования выявили

увеличение высоты и площади эпителиоцитов на фоне снижения площади их ядер. Эти изменения свидетельствуют в пользу снижения функциональных способностей клеток эпителия тонкой кишки и, в частности, говорят о снижении их

митотической и трансляционной активности, что отражает ингибирующее влияние соли кадмия на основные метаболические процессы клетки в целом.

Таблица 1

Морфометрические показатели структур тонкой кишки у крыс-adolescent Wistar при хронической интоксикации кадмием (M±m)

Показатели	Контроль	Подопытная группа	p
Толщина мышечной оболочки, мкм	145,67±6,92	91,25±3,68	0,002
Толщина подслизистой основы, мкм	49,21±1,63	28,21±1,13	0,0162
Толщина слизистой оболочки, мкм	538,17±17,11	448,89±13,29	0,023
Высота ворсинки, мкм	267,21±9,91	253,36±8,06	0,174
Толщина ворсинки, мкм	71,46±3,08	84,68±3,84	0,005
Глубина крипты, мкм	203,19±6,11	152,44±5,53	0,001
Толщина крипты, мкм	35,97±1,72	35,44±1,23	0,65
Количество энтероцитов в ворсинке	76,5±4,42	68,18±3,48	0,97
Энтероциты апикальной части ворсинки			
Высота, мкм	22,89±0,66	21,43±1,12	0,052
Площадь, мкм ²	133,85±1,96	137,26±5,98	0,067
Площадь ядра, мкм ²	20,9±0,91	23,14±1,37	0,121
Энтероциты боковой поверхности ворсинки			
Высота, мкм	31,17±2,23	38,65±1,07	0,008
Площадь, мкм ²	168,17±8,29	206,85±8,38	0,041
Площадь ядра, мкм ²	33,91±1,08	25,31±1,67	0,01
Бокаловидные эпителиоциты			
Количество в ворсинке	9,1±0,69	13,18±0,81	0,013
Высота, мкм	30,89±1,21	35,52±1,63	0,016
Площадь, мкм ²	184,32±15,36	206,44±12,04	0,364
Площадь ядра, мкм ²	26,33±1,39	19,08±1,07	0,001

Статистически значимое увеличение количества бокаловидных клеток в ворсинке на 44,84 % свидетельствует об активации секреции муцина, являющегося основным компонентом слизи, покрывающей поверхность слизистой оболочки. Как

известно, поддержание клеточного гомеостаза слизистой оболочки кишечника достигается скоординированными процессами пролиферации, дифференциации и замещения отмирающего эпителия с целью разграничения антигенного содержимого

просвета кишки от иммунной системы организма. Нарушения в этом барьере способствуют развитию желудочно-кишечных патологий – от воспалительных заболеваний кишечника до онкологических изменений [14].

Выявленное нами увеличение числа терминально дифференцированных слизьпродуцирующих бокаловидных клеток можно рассматривать как усиление местных адаптационно-приспособительных механизмов, снижающих возможность контакта и поступления в организм сульфата кадмия через слизистую оболочку тонкой кишки.

Заключение. Таким образом, хроническое воздействие сульфата кадмия на тонкую кишку молодых крыс приводит к следующим изменениям: 1) перестраивается стенка тонкой кишки в целом, что находит отражение в изменении толщины всех исследованных оболочек органа; 2) на уровне слизистой оболочки происходит пространственная перестройка морфофункциональной единицы «ворсинка-

крипта», что проявляется в изменении длины и толщины ворсинок, а также глубины крипт; 3) в эпителиальной выстилке изменяются пропорции в соотношении популяций бокаловидных клеток и каемчатых энтероцитов; 4) на субклеточном уровне изменяются показатели ядерно-цитоплазматического соотношения в исследованных субпопуляциях эпителиоцитов. Выявленные гистоморфологические изменения при хроническом поступлении с пищей соли кадмия, по нашему мнению, свидетельствуют о снижении защитных свойств кишечного биологического барьера из-за истончения всех оболочек стенки, что сочетается с уменьшением репаративного резерва эпителиального пласта. В ответ на это активируются компенсаторно-приспособительные реакции, направленные на сохранение целостности эпителия слизистой оболочки тонкой кишки, путем увеличения выработки слизистого компонента кишечного сока.

Литература

1. Дзугоева Ф.С., Можяева И.В., Дзугоев С.Г., Маргиева О.И., Отиев М.А., Тедтоева А.И., Карчаидзе Н.М. Механизмы токсичности тяжелых цветных металлов в эксперименте и клинике. Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. 2015; 10 (4): 117–120.
2. Huo J., Dong A., Yan J., Wang L., Ma C., Lee S. Cadmium toxicokinetics in the freshwater turtle, *Chinemys reevesii*. *Chemosphere*. 2017; 182: 392–398.
3. Hispard F., de Vaufleury A., Martin H., Devaux S., Cosson R.P., Scheifler R., Richert L., Berthelot A., Badot P.M. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008; 70 (3): 490–498.
4. Lynch S.J., Horgan K.A., White B., Walls D. Selenium source impacts protection of porcine jejunal epithelial cells from cadmium-induced DNA damage, with maximum protection exhibited with yeast-derived selenium compounds. *Biol. Trace Elem. Res.* 2017; 176 (2): 311–320.
5. Min K.S., Sano E., Ueda H., Sakazaki F., Yamada K., Takano M., Tanaka K. Dietary deficiency of calcium and/or iron, an age-related risk factor for renal accumulation of cadmium in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2015; 38 (10): 1557–1563.
6. Höfer N., Diel P., Wittsiepe J., Wilhelm M., Kluxen F.M., Degen G.H. Investigations on the estrogenic activity of the metallo-hormone cadmium in the rat intestine. *Arch. Toxicol.* 2010; 84 (7): 541–552.
7. Chan W.H., Shiao N.H. Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008; 29 (2): 259–266.
8. Maciak S., Wlostowski T., Salińska A., Bonda-Ostaszewska E. Tissue cadmium accumulation is associated with basal metabolic rate in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011; 144 (1–3): 944–950.
9. Fazeli M., Hassanzadeh P., Alaei S. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum. Exp. Toxicol.* 2011; 30 (2): 152–159.
10. Залавина С.В., Скальный А.В., Ефимов С.В., Скальная М.Г. Многоэлементный портрет жителей Новосибирска в условиях накопления кадмия. *Микроэлементы в медицине*. 2008; 9 (1–2): 70.
11. Гелашвили О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека

- и крысы. Саратовский научно-медицинский журнал. 2008; 22 (4): 125–126.
12. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944.
 13. Stieler Stewart A., Freund J.M., Blikslager A.T., Gonzalez L.M. Intestinal stem cell isolation and culture in a porcine model of segmental small intestinal ischemia. *J. Vis. Exp.* 2018; 18 (135).
 14. Mentrup H.L., Hartman A., Thames E.L., Basheer W.A., Matesic L.E. The ubiquitin ligase ITC1 coordinates small intestinal epithelial homeostasis by modulating cell proliferation, differentiation, and migration. *Differentiation*. 2018; 99: 51–61.

SMALL INTESTINE MORPHOLOGY OF RATS-ADOLESCENTS WITH CHRONIC CADMIUM SULFATE INTOXICATION

P.A. Elyasin, S.V. Zalavina, A.N. Mashak, A.P. Nadeev, S.V. Aydagulova

Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

e-mail: elyasin@ngs.ru

Cadmium accumulation in children is a serious problem for residents of cosmopolitan cities. Cadmium has carcinogenic, gonadotropic, embryotropic, mutagenic, nephrotoxic and genotoxic effects. Small intestine as a natural biological barrier reflects the ability of the mammals to resist the effects of such an aggressive exotoxin as cadmium.

The aim of the study is to reveal morphological changes in the wall of the small intestine in rats-adolescents with chronic cadmium sulfate intoxication.

Materials and Methods. The experiment was carried out on 4-week Wistar males-adolescents that were administered cadmium sulfate solution 0.5 mg/kg daily for 21 days. Then, the authors examined the wall of the small intestine. It was stained with hematoxylin-eosin and azur-2-eosin. They used such methods of investigation as light microscopy and morphometry. SPSS® software version 17.0 was used for statistical data processing, as well as nonparametric Mann-Whitney U-test.

Results. The authors found out the decrease in thickness of all layers of the small intestine wall. The crypt depth also decreased, while the villus thickness increased. The height and surface of all epithelial layer cells increased. The increase of epitheliocyte height and space, together with the decrease of the nucleus space, proves that DNA synthesis inhibits and cytoplasmic processes become more active in response to the cytotoxic effect of cadmium ions. The increase in the number of goblet cells can be considered as an enhancement of adaptive body mechanisms.

Conclusion. The chronic influence of cadmium sulfate on the small intestine of rats-adolescents results in a decrease in the biological barrier between the internal and external environment; reduction of the small intestine epithelium reparative capacity; activation of compensatory-adaptive reactions aimed at maintaining the integrity of the small intestine.

Keywords: small intestine, cadmium sulfate, adolescents, morphometry.

References

1. Dzugkoeva F.S., Mozhaeva I.V., Dzugkoev S.G., Margieva O.I., Otiev M.A., Tedtoeva A.I., Kar-chaidze N.M. Mekhanizmy toksichnosti tyazhelykh tsvetnykh metallov v eksperimente i klinike [Mechanisms of toxicity of heavy nonferrous metals in experiment and clinic]. *Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya v sovremennom mire*. 2015; 10 (4): 117–120 (in Russian).
2. Huo J., Dong A., Yan J., Wang L., Ma C., Lee S. Cadmium toxicokinetics in the freshwater turtle, *Chinemys reevesii*. *Chemosphere*. 2017; 182: 392–398.
3. Hispard F., de Vaufleury A., Martin H., Devaux S., Cosson R.P., Scheifler R., Richert L., Berthelot A., Badot P.M. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008; 70 (3): 490–498.
4. Lynch S.J., Horgan K.A., White B., Walls D. Selenium source impacts protection of porcine jejunal epithelial cells from cadmium-induced DNA damage, with maximum protection exhibited with yeast-derived selenium compounds. *Biol. Trace Elem. Res.* 2017; 176 (2): 311–320.
5. Min K.S., Sano E., Ueda H., Sakazaki F., Yamada K., Takano M., Tanaka K. Dietary deficiency of

- calcium and/or iron, an age-related risk factor for renal accumulation of cadmium in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2015; 38 (10): 1557–1563.
6. Höfer N., Diel P., Wittsiepe J., Wilhelm M., Kluxen F.M., Degen G.H. Investigations on the estrogenic activity of the metallo-hormone cadmium in the rat intestine. *Arch. Toxicol.* 2010; 84 (7): 541–552.
 7. Chan W.H., Shiao N.H. Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008; 29 (2): 259–266.
 8. Maciak S., Włostowski T., Salińska A., Bonda-Ostaszewska E. Tissue cadmium accumulation is associated with basal metabolic rate in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011; 144 (1–3): 944–950.
 9. Fazeli M., Hassanzadeh P., Alaei S. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum. Exp. Toxicol.* 2011; 30 (2): 152–159.
 10. Zalavina S.V., Skal'nyy A.V., Efimov S.V., Skal'naya M.G. Mnogoelementnyy portret zHITEley Novosibirska v usloviyakh nakopleniya kadmiya [Multi-element status of Novosibirsk inhabitants in response to cadmium accumulation]. *Mikroelementy v meditsine.* 2008; 9 (1–2): 70 (in Russian).
 11. Gelashvili O.A. Variant periodizatsii biologicheskikh skhodnykh stadiy ontogeneza cheloveka i krysy [Periodization of biologically similar stages of human and rat ontogenesis]. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2008; 22 (4): 125–126 (in Russian).
 12. Mironov A.N. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' I* [Guide to preclinical drug research. Part 1]. Moscow: Grif i K; 2012. 944 (in Russian).
 13. Stieler Stewart A., Freund J.M., Blikslager A.T., Gonzalez L.M. Intestinal stem cell isolation and culture in a porcine model of segmental small intestinal ischemia. *J. Vis. Exp.* 2018; 18 (135).
 14. Mentrup H.L., Hartman A., Thames E.L., Basheer W.A., Matesic L.E. The ubiquitin ligase ITC1 coordinates small intestinal epithelial homeostasis by modulating cell proliferation, differentiation, and migration. *Differentiation.* 2018; 99: 51–61.