

## ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

# МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ЦИНКА И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПИТАНИЯ

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF THE GUT MUCOUS MEMBRANES CONDITION IN RATS WITH ZINC DEFICIENCY AND AFTER A REPLETION FEEDING

**З.М. Гаджиева, М. Баяржаргал, С.Н. Зорин, И.В. Гмошинский, В.К. Мазо\***  
**Z.M. Gadzhieva, M. Bajarzhargal, S.N. Zorin, I.V. Gmoshinsky, V.K. Mazo\***

ГУ НИИ питания РАМН, Москва.  
State Research Institute of Nutrition, R.A.M.S., Moscow.

\*Адрес для переписки: Мазо Владимир Кимович; 109240, Москва, Устьинский пр., д. 2/14, ГУ НИИ питания РАМН, лаборатория физиологии и биохимии пищеварения; E-mail: mazo@ion.ru

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** питание, цинк, обеспеченность, пищевые источники, морфология, слизистая оболочка, кишка.

**KEY WORDS:** nutrition, zinc, safety, food sources, morphology, mucous membrane, gut.

**РЕЗЮМЕ:** В работе исследовалось влияние полусинтетического корма с различной обеспеченностью цинком на состояние слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки и толстой кишки у крыс. В работе использовали морфометрические методы: измеряли высоту ворсинок и глубину крипта, высоту эпителиального слоя на срезах ворсинок; проводили подсчет клеток в слое эпителия на продольных срезах ворсинок и крипта и содержание в них бокаловидных клеток и митотически делящихся клеток. Полученные результаты свидетельствуют о роли влияния обеспеченности организма животного цинком на сохранение целостности эпителиального пласта слизистых оболочек кишечника и протекающие в нем репаративные процессы.

**ABSTRACT:** The purpose of the given work was to research an influence of polysynthetic diet with various levels of zinc on a condition of distal small intestine and colon mucous membranes in rats. For the experiment, 29 Wistar rats were divided into 3 groups. All the animals received semisynthetic diet with various contents of zinc. The content of zinc in semisynthetic diet for the 1<sup>st</sup> group was 13.3 mg/kg. Animals of this group received dietary zinc within 28 days as  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . Rats of the 2<sup>nd</sup> group received semisynthetic zinc-deficient diet containing 1.3 mg/kg of zinc within 28 days. Animals of the 3<sup>rd</sup> group received zinc-deficient diet during the first 14 days while for the next 14 days they had the «repletion» diet as basal semisynthetic feed with 12 mg/kg of zinc added as a

complex with enzymatic hydrolyzate of cow milk protein. Thus the total content of zinc in the «repletion» diet was up 13.3 mg/kg. Upon termination of the experiment, animals were sacrificed by decapitation and subjected to postmortem dissection. Mucous membranes of distal small intestine and colon were studied by common morphological and morphometrical methods. The results revealed that zinc supplementation plays an important role in preservation of epithelial layer integrity in mucous membranes of intestine and colon and takes part in gut recovery processes.

## ВВЕДЕНИЕ

Цинк играет важную роль в росте и делении клеток, обновлении эпителиального покрова слизистых оболочек, стабилизации клеточных мембран (Coleman, 1992; Vallee, Ealchyk, 1993; Hambidge, 2000). Биологические функции цинка реализуются за счет реагирования с сульфидрильными группами белков (Virgili et. al., 1999; Davis, Cousins, 2000). Предполагается, что в процессах развития нарушенной целостности слизистых оболочек может участвовать неадекватная обеспеченность организма цинком (Troskot et. al., 1997; Virgili et. al., 1999; Davis, Cousins, 2000). Целью данной работы явилось исследование влияния полусинтетического корма с различной обеспеченностью цинком на состояние слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки и толстой кишки у лабораторных животных (крыс).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 29 крысах-самцах линии Вистар, которые были разделены на 3 группы. Животные на протяжении всего эксперимента получали полусинтетический корм с различным содержанием цинка. Общее содержание цинка в полусинтетическом корме животных 1-й группы составляло 13,3 мг/кг. Животные этой группы получали с кормом цинк в течение 28 дней в форме  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . Крысы 2-й группы содержались также в течение 28 дней на базовом полусинтетическом цинкдефицитном корме, содержание цинка в котором составляло 1,3 мг/кг. Животные 3-й группы на протяжении первых 14 дней получали цинкдефицитный корм, а в последующие 14 дней — «восстанавливющий» корм, представляющий собой базовый полусинтетический корм, дополнительно обогащенный 12 мг/кг цинка в форме комплекса с ферментативным гидролизатом белка коровьего молока (Zn-ФГБКМ), полученного по методике, описанной в работе (Мазо и др., 2003). Общее содержание цинка в «восстанавливающем» корме составляло 13,3 мг/кг корма.

По окончании эксперимента животных умерщвляли путем декапитации и подвергали патологоанатомическому вскрытию. Для гистологического исследования брали кусочки дистального отдела тонкой кишки и толстого кишечника. Гистологический материал фиксировали в жидкости Карнума и заливали в парафин. Срезы толщиной 2—4 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Бокаловидные клетки выявляли с помощью Шифф-реактива по Шабадашу. При изучении полученных

препаратах использовали морфометрические методы: измеряли высоту ворсинок и глубину крипты, высоту эпителиального слоя на срезах ворсинок; проводили подсчет клеток в слое эпителия на продольных срезах ворсинок и крипты и содержание в них бокаловидных клеток и митотически делящихся клеток.

Статистическую обработку результатов измерений проводили с использованием пакета программ SPSS 11.5. Рассчитывали средние величины ( $M$ ) со стандартными ошибками ( $m$ ). Достоверность различия групп проверяли с использованием непараметрического рангового критерия Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены некоторые морфометрические показатели состояния слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки у крыс с различной обеспеченностью корма цинком. У животных, получавших в течение 4 недель цинкдефицитный полусинтетический корм (2-я группа), в структуре слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки обнаружены достаточно глубокие изменения по сравнению с крысами, содержащими в течение того же времени на полусинтетическом корме с содержанием цинка 13,3 мг/кг (1-я группа).

Как видно из представленных в таблице 1 данных, у животных, получавших цинкдефицитный корм, увеличена глубина крипты ( $P < 0,05$ ), уменьшена высота клеток эпителиального слоя на ворсинках ( $P < 0,05$ ) и в криптах ( $P > 0,05$ ). У 7 из 10 крыс

**Таблица 1. Некоторые показатели состояния слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки у крыс с различной обеспеченностью цинком**

№ групп	Добавляемый в корм источник цинка и продолжительность кормления	Количество животных в группе	Высота ворсинок, усл.ед. ( $M \pm m$ )	Глубина крипты, усл.ед. ( $M \pm m$ )	% бокаловидных клеток в эпителии ( $M \pm m$ )		Высота клеток эпителия, усл.ед. ( $M \pm m$ )		% количество митозов ( $M \pm m$ )
					ворсинок	крипты	на ворсинках	на криптах	
1	$ZnSO_4$ 4 недели	9	$52,8 \pm 2,3$	$51,6 \pm 4,0^*$	$16,5 \pm 1,5$	$21,3 \pm 1,8$	$5,4 \pm 0,3^*$	$4,0 \pm 0,4$	$2,8 \pm 1,0^*$
2	без добавки Zn 4 недели	10	$51,5 \pm 1,6$	$63,7 \pm 1,2$	$14,3 \pm 0,7$	$21,1 \pm 1,0$	$4,5 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
3	без добавки Zn 2 недели	10	$52,8 \pm 1,7$	$55,8 \pm 3,1^{**}$	$15,5 \pm 1,2$	$22,1 \pm 1,7$	$5,2 \pm 0,2^{**}$	$3,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$
	Zn-ФГБКМ 2 недели								

Примечание: \* различия между группами 1 и 2 достоверны по непараметрическому ранговому критерию Манна-Уитни; \*\* различия между группами 2 и 3 достоверны по непараметрическому ранговому критерию Манна-Уитни.

этой группы в криптальной зоне наряду с обычными обнаруживались и узкие крипты, выстланые слоем более низких клеток эпителия. В собственной пластине слизистой оболочки клетки были распределены неравномерно. Численность муцинопродуцирующих клеток в слое эпителия ворсинок и крипты в группе животных с дефицитом цинка практически не отличалась от соответствующего показателя для группы животных, обеспеченных цинком, но по форме эти клетки представляли собой мелкие и средние бокалы с небольшим количеством секрета.

Более заметные различия в структуре эпителия выявлены в зоне вершин ворсинок и в криптах. Так, для крыс с дефицитом цинка отмечены гораздо большая частота отслойки эпителия от собственной пластинки, образование микрополипозных выростов в виде складок эпителиального слоя, появление участков низких клеток с пикнозом ядер. В значительно большей степени по сравнению с животными, нормально обеспеченными цинком, выявлялись очаги десквамации с нарушением непрерывности эпителиального пласта. Существенно снижалось число клеток крипты, входящих в митоз ( $P < 0,05$ ).

Введение в полусинтетический корм добавки цинка в форме комплекса Zn-ФГБКМ крысам, получавшим до этого в течение 2 недель цинкдефицитный корм (группа 3), положительно сказывается на состоянии слизистой тонкой кишки. Муцинопродуцирующие клетки большинства животных из этой группы содержали умеренное количество секрета, который выделялся в виде средних бокалов. Глубина крипты восстанавливалась до значений, не отличающихся достоверно от обеспеченных цинком животных ( $P > 0,1$  в сравнении с 1-й группой;  $P < 0,05$  в сравнении со 2-й группой). В структуре эпителиального слоя на вершинах ворсинок и крипты также выявлена тенденция к улучшению. Так, клетки эпителия по высоте восстановились до уровня, который был определен у крыс, обеспеченных цинком. Хотя в эпителиальном слое ворсинок чаще (у 6 из 10 крыс), чем у крыс, обеспеченных цинком, выявлялись очаги отставания эпителия от поверхности собственной пластины, но количество животных с такими нарушениями было меньшим, чем в цинкдефицитной группе, где это отмечено у 9 из 10 крыс. У животных, получавших «восстанавливающий» корм, как и у крыс из цинкдефицитной группы, в слое эпителия вершин ворсинок имелись очаги десквамации клеток в просвет кишки. Количество таких животных составляло 70% и 40% соответственно в группах, потреблявших цинкдефицитный и «восстанавливающий» корм. При этом в цинкдефицитной группе наблюдалась более тяжелая картина со случаями нарушения непрерывности эпителиального слоя в зонах десквамации.

Таким образом, дополнительное введение цинка в количестве 12 мг/кг полусинтетического корма в форме комплекса Zn-ФГБКМ восстановило глубину криптальных отделов, высоту эпителиального слоя в слизистой оболочке дистального отдела тонкой кишки крыс, получавших ранее цинкдефицитный корм, до показателей, характерных для крыс, потреблявших обеспеченный цинком корм.

Состояние ядерного аппарата клетки, число клеток в криптах, вступающих в митоз, позволяет в определенной мере судить об интенсивности протекания reparативных процессов в слизистой оболочке тонкой кишки, что в значительной мере определяет ее барьерающую функцию в отношении антигенов энтеральной среды.

У животных, получавших цинкдефицитный корм, в клетках эпителия выявлялись ядра с «прозрачной» плазмой, во многих из них четко выделялись компактные ядрышки; обнаруживались также ядра с интенсивно окрашенными крупными глыбками хроматина, что не было характерно для животных, потреблявших обеспеченный цинком корм. Несмотря на тенденцию к увеличению количества митотически делящихся клеток у крыс, получавших «восстанавливающий» корм, в структуре ядерного аппарата клеток эпителия, главным образом в криптальных отделах, имелись изменения, характерные для крыс из цинкдефицитной группы. При этом также обнаруживались ядра с интенсивно окрашенными компактными ядрышками, ядра с крупными плотными глыбками хроматина в обычной или неокрашивающейся «прозрачной» кариоплазме.

Исследование слизистой оболочки толстой кишки крыс всех трех групп выявило у них различия в состоянии эпителиального слоя. Некоторые показатели, характеризующие состояние слизистой оболочки толстой кишки крыс из групп с различной обеспеченностью цинком, приведены в таблице 2. У крыс, содержащихся в течение 28 дней на полусинтетическом корме, обеспеченном цинком, слизистая оболочка была складчатой, крипты умеренной ширины и располагались с умеренной плотностью, собственная пластина слизистой богата клетками.

У животных, получавших в течение 28 дней цинкдефицитный корм, в слое эпителия, главным образом нижней половины крипты, выявлялись клетки с увеличенными светлыми ядрами, содержащими ярко окрашенные компактные ядрышки, также обнаруживались ядра увеличенных или обычных размеров с редкими хроматиновыми глыбками. В собственной пластине клетки располагались неравномерно, их содержание как в поверхностной, так и базальной зонах слизистой было несколько увеличено. Наблюдались изменения ширины крипты, во многих случаях в слизистой оболочке обнаруживали крипты, покрытые слоем плоских

**Таблица 2. Некоторые показатели состояния слизистой оболочки в толстой кишке у крыс с различной обеспеченностью цинком**

№ групп	Добавляемый в корм источник цинка и продолжительность кормления	Количество животных в группе	Глубина крипт, усл. ед. ( $M \pm m$ )	Высота эпителия крипт, усл.ед ( $M \pm m$ )	Количество бокаловидных клеток, %	Количество митозов, %	Состояние покровного эпителия		
							Десквамация клеток	Участки низких клеток	Очаги нарушения непрерывности
1	ZnSO <sub>4</sub> 4 недели	9	76,6±2,4	4,0±0,1	35,2±1,9	0,8±0,1	0	0	0
2	без добавки Zn 4 недели	7	72,0±3,0	3,6±0,2	36,0±1,4	0,9±0,1	7	4	3
3	без добавки Zn 2 недели	9	67,5±2,8*	3,54±0,04*	35,6±2,1	0,6±0,1	7	4	0
	Zn-ФГБКМ 2 недели								

Примечание: \* различия с группой 1 достоверны по непараметрическому ранговому критерию Манна-Уитни, Р<0,05.

клеток. У 4 животных из 9 обследованных в просветах некоторых крипт наблюдались небольшие скопления слущенных клеток. У 7 из 9 животных данной группы в слое покровного эпителия наблюдалась десквамация клеток и очаги эрозий с оголением поверхности собственной пластины, чаще наблюдались сегментоядерные клетки. Наблюданная тенденция к увеличению числа митотически делящихся клеток, возможно, является компенсаторной реакцией при неполном восстановлении клеток эпителия в криптах.

По окончании двухнедельного кормления крыс «восстанавливающим» кормом (после предшествующего двухнедельного цинкдефицитного кормления) в слизистой оболочке толстой кишки также прослеживались изменения в состоянии ядер в клетках крипタルного эпителия: встречались клетки с увеличенными светлыми ядрами и ядрами с крупными глыбками хроматина. Содержание митотически делящихся клеток в крипタルном эпителии достоверно не отличалось от показателя, определенного у крыс, обеспеченных цинком.

Статистически значимых количественных различий в содержании муцинопродуцирующих клеток в слое крипタルного отдела слизистой оболочки в толстой кишке не наблюдалось у крыс всех трех групп. Однако у животных, потреблявших цинкдефицитный корм в течение 4 недель и 2 недель (с «восстановлением»), муцинопродуцирующие клетки обнаруживались в форме средних бокалов, в отдельных случаях встречались клетки с разрыхленным пенистым секретом, ра-

стягивающим цитоплазму клетки, чего не отмечалось у крыс обеспеченных цинком в течение 28 дней.

Как видно из приведенных в таблице 2 данных морфометрического определения, введение органической формы цинка в течение 2 недель в корм крысам, получавшим предварительно цинкдефицитный корм в течение 2 недель, не привело к нормализации состояния покровного эпителия в слизистой оболочке толстой кишки. Несмотря на это, следует отметить, что у животных, получавших «восстанавливающий» корм, не обнаруживались очаги нарушения покровного эпителия, в то время как в цинкдефицитной группе имелись крысы с нарушенной непрерывностью эпителиального слоя и обнажением поверхности собственной пластины.

В совокупности результаты исследования слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки и слизистой оболочки в толстой кишке крыс, потреблявших полусинтетический корм с различным содержанием цинка, свидетельствуют о роли влияния обеспеченности организма животного цинком на сохранение целостности эпителиального пласта слизистых оболочек кишечника и протекающие в нем репаративные процессы.

Как известно, слизистая оболочка кишки является одним из основных компонентов барьерной системы, препятствующей поступлению из просвета ЖКТ во внутреннюю среду организма белковых антигенов, токсинов микрофлоры, вирусов и живых микроорганизмов. Целостность эпителиального барьера кишки может быть наруше-

на в результате ряда воздействий, таких, как ишемия/реперфузия (Deitch, 1992; Horton et al., 1992), ионизирующее излучение (Гмошинский и др., 1996), хирургическая травма кишечника (Rhodes, Karnovsky, 1971), воздействие патогенных вирусов, бактерий и гельминтов (Bloch et al., 1979; Reinhardt, 1984), реакция местной и системной анафилаксии (Bloch et al., 1979; Jackson et al., 1981; Reinhardt, 1984; Мурашев и др., 2000). Морфологически на светооптическом уровне нарушение кишечного барьера выражается в изменении соотношения размеров ворсинка/крипта, отеке и отслойке эпителия, нарушении целостности эпителиального пласта, образовании микрополипов на вершинах ворсинок, усиении десквамации клеток и нарушении целостности эпителиального пласта (Гмошинский, 1997; Мурашев и др., 2000). На электронно-микроскопическом уровне это сопровождается нарушением межклеточных плотных контактов, сопровождаемым парацеллюлярным проникновением макромолекуллярных трейсеров (таких, как пероксида зида и коллоидная гидроокись лантана) (Морозов и др., 1982; Rhodes, Karnovsky, 1971).

Выявленные в настоящем исследовании морфологические изменения слизистой оболочки тонкой кишки у крыс с дефицитом цинка во многом аналогичны тем, которые наблюдаются в состояниях, сопровождающихся патологическим увеличением кишечной проницаемости (Rhodes, Karnovsky, 1971; Морозов и др., 1982; Reinhardt, 1984; Гмошинский, 1997; Мурашев и др., 2000). Это позволяет предположить, что дефицит цинка может сопровождаться увеличением проницаемости кишечного барьера для макромолекул.

При оценке возможностей «восстанавливающего» кормления для нормализации защитного кишечного барьера важно еще раз отметить, что у крыс его получавших, так же как и у животных, нормально обеспеченных цинком в течение всех 28 дней, не было отмечено очагов нарушения непрерывности эпителиального пласта как в тонкой, так и толстой кишках. Введение цинка в полусинтетический корм крысам, содержавшимся предварительно в течение 2 недель на цинкдефицитном корме с содержанием этого микроэлемента 1,3 мг/кг, в количестве 12 мг/кг в форме комплекса цинка с ферментативным гидролизатом белков коровьего молока в течение 2 недель, способствовало частичному восстановлению нарушенных вследствие дефицита цинка морфологических показателей эпителиального слоя слизистой оболочки тонкой кишки. Однако при этом сохранялись определенные патологические изменения, в том числе в структуре ядерного аппарата клеток, которые были более выражены в толстой кишке. Это может указывать на недостаточное время восстановления цинкового статуса или на необходимость увеличения дозы цинка в период восстановительного кормления.

## Литература

Гмошинский И.В. Проницаемость кишечного барьера для макромолекул при некоторых патологических состояниях и воздействии различных алиментарных факторов (экспериментально-клиническое исследование). Автореф. дисс. докт. биол. М., 1997. 36 с.

Гмошинский И.В., Радченко С.Н., Зорин С.Н., Мазо В.К. Коррекция диетой проницаемости защитного барьера кишки при гамма-облучении // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1996. Т. 82, № 3. С. 117–124.

Мазо В.К., Зорин С.Н., Гмошинский И.В. и др. Новые пищевые источники эссенциальных микроэлементов. Комплекс цинка с ферментативным гидролизатом сывороточных белков коровьего молока // Вопросы детской диетологии. 2003. Т. 1, № 6. С. 6–8.

Морозов И.А., Хвыля С.И., Лысиков Ю.А. Электронно-микроскопическое изучение проницаемости энтероцитов тонкой кишки для коллоидного лантана в опытах *in vitro* и *in vivo* // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1982. Т. 68, № 9. С. 1261–1268.

Мурашев А.Н., Коршунов В.А., Хохлова О.Н. и др. Количественная характеристика модели системной анафилаксии у крыс линии Спрейг-Доули // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2000. Т. 86, № 2. С. 190–195.

Bloch K.J., Bloch D.B., Stearns M., Walker W.A. Intestinal uptake of macromolecules. VI. Uptake of protein antigen *in vivo* in normal rats and in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or subjected to mild systemic anaphylaxis // Gastroenterology. 1979, 77(5):1039–1044.

Coleman J.E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins // Annu. Rev. Biochem. 1992, 61(8):897–946.

Davis S.R., Cousins R.J. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function // J. Nutr. 2000, 130(5):1085–1088.

Deitch E.A. Multiple organ failure // Ann. Surg. 1992, 216:117–127.

Duff M., Ettarh R.R. Crypt cell production rate in the small intestine of the zinc-supplemented mouse // Cells Tissues Organs. 2002, 172(1):21–28.

Hambidge M. Human zinc deficiency // J. Nutr. 2000, 130(5)Suppl.:1344S–1349S.

Horton J., Walker P., Kaufman T. O<sub>2</sub> free radicals mediate ischemia induced changes in intestinal permeability // Circ. Shock. 1992, 37(1):50.

Jackson P.G., Lessof M.H., Baker R.W.R. et al. Intestinal permeability in patients with eczema and food allergy // Lancet. 1981, 1:1285–1286.

*Reinhardt M.C.* Macromolecular absorption of food antigens in health and disease // Ann. Allergy. 1984, 53(6/2):597—600.

*Rhodes R.S., Karnovsky M.J.* Loss of macromolecular barrier function associated with surgical trauma of the intestine // Lab. Invest. 1971, 25:220—232.

*Troskot B., Simicevic V.N., Dodig M. et al.* The protective effect of zinc sulphate pretreatment

against duodenal ulcers in the rat // BioMetals. 1997, 10(4):325—329.

*Vallee B.L., Ealchyk K.H.* The biochemical basis of zinc physiology // Physiol. Rev. 1993, 73(1):79—118.

*Virgili F., Canali R., Figus E. et al.* Intestinal damage induced by zinc deficiency is associated with enhanced CuZn superoxide dismutase activity in rats: effect of dexamethasone or tyroxine treatment // Free Radical Biol. Med. 1999, 26(9-10):1194—1201.