

VPLYV SUBCHRONICKEJ PERORÁLNEJ APLIKÁCIE KADMIA A SELÉNU
NA ŠTRUKTÚRU STEHNOVEJ KOSTI ADULTNÝCH POTKANOV

EFFECTS OF SUBCHRONIC PERORAL ADMINISTRATION OF CADMIUM AND
SELENIUM ON FEMORAL BONE STRUCTURE IN ADULT RATS

Boboňová, I.¹, Chovancová, H.¹, Martiniaková, M.¹, Omelka, R.², Toman, R.³

¹*Department of Zoology and Antropology, ² Department of Botany and genetics, Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher University in Nitra, Nitra, Slovak Republic; ³Department of Veterinary Disciplines, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovak Republic*

ABSTRACT

The aim of this study was to examine effects of subchronic peroral administration to cadmium and selenium on femoral bone structure in adult male rats. 1-month-old male Wistar rats were randomly divided into three groups, each containing 10 males. In the first group (E1) rats were administered to cadmium at the dose of 30 mg of CdCl₂/l in drinking water for 90 days. In the second group, (E2) animals received a drinking water containing 5 mg of Na₂SeO₃/l for the same treatment period. The third group of rats without cadmium and selenium application, served as a control (K). After the experimental period (90 days), body weight, femoral weight, femoral length and histological structure of the bones were compared between experimental and control groups. Our results revealed a significant increase in femoral weight in Cd-exposed rats. On the other hand, body weight and femoral length were significantly decreased in rats with Se intoxication. Also, the qualitative histological characteristics of the compact bone tissue were different in the middle part of compact bone in medial and lateral views between experimental and control groups. In Cd- and Se-treated rats, a smaller number of primary and secondary osteons was identified. Moreover, a few resorption lacunae were observed in rats perorally administered to Cd. The results allow for the conclusion that subchronic exposure to Cd and Se significantly influenced macroscopic and microscopic structure of compact bone tissue in rats.

Key words: bone tissue, histomorphometry, rat, cadmium, selenium

ÚVOD

Kadmium (Cd) ako jeden z predstaviteľov ťažkých kovov je stabilným environmentálnym znečisťovateľom s tendenciou kumulovať sa v biosfére, ale aj v ľudskom organizme (Hijová et al.,

2003). Okrem pľúc, obličiek a pečene sa toxické účinky Cd preukázali i na kostiach a samčích pohlavných orgánoch (Siddiqui et al., 2010). V súvislosti s kostným tkanivom sa Cd považuje za environmentálny rizikový faktor vzniku osteoporózy (Brzóska a Moniuszko-Jakoniuk, 2005). V štúdií Chena et al. (2009) bol zaznamenaný škodlivý účinok Cd na osteoblasty a osteoklasty. Konečným výsledkom narušenia diferenciácie a aktivity uvedených buniek je zvýšenie resorpcie kosti (Regunathan et al., 2003) a zníženie tvorby kostného tkaniva (Long, 1997).

Selén (Se) je v nízkych koncentráciách esenciálnym prvkom nevyhnutným pre rast zvierat i ľudí, ale vo vysokých koncentráciách má toxické vlastnosti. Funkčnou formou uvedeného prvku sú biologicky aktívne selénoproteíny napr. enzým glutationperoxidáza (Mosnáčková et al., 2003). Podľa Eberta a Jakoba (2007) sa niekoľko selenoproteínov nachádza v kostiach, kde zohrávajú dôležitú úlohu v metabolizme kostného tkaniva. Se vo vyšších dávkach spôsobuje abnormálny vývin kostí a chrupiek a je známy ako teratogénny prvok (Greenberg, 2003). Ďalšie výskumy potvrdili, že vysoké koncentrácie Se indukujú apoptózu zreých osteoklastov (Chung et al., 2006).

V našej práci si kladieme za cieľ makroskopicky a mikroskopicky analyzovať stehnové kosti (*femury*) adultných potkanov po perorálnej subchronickej aplikácii Cd a Se, keďže doposiaľ nie sú k dispozícii vedecké publikácie detailne popisujúce kvalitatívne histologické charakteristiky kostného tkaniva potkanov exponovaných uvedenými prvkami.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili 30 samcov laboratórnych potkanov línie Wistar (chovaných vo schválenom pokusnom zariadení na SPU v Nitre) vo veku 1 mesiac, ktoré boli rozdelené do 3 skupín (E1, E2, K) po 10 jedincov. V experimentálnej skupine E1 zvieratá prijímali Cd v dávke 30 mg $\text{CdCl}_2/\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ v pitnej vode počas 90 dní a v druhej experimentálnej skupine (E2) bol potkanom do vody pridávaný Se v dávke 5 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{l}$ počas toho istého obdobia. Na porovnanie výsledkov sme zostavili skupinu 10 samcov, ktoré prijímali pitnú vodu bez akýchkoľvek prídavkov. Po ukončení experimentálneho obdobia boli všetky zvieratá z kontrolnej a experimentálnych skupín odvážené a ich stehnové kosti boli odobrané na makroskopickú a histologickú analýzu. Na stanovenie hodnôt dĺžky a hmotnosti *femurov* sme použili posuvné meradlo a analytické váhy. Získané údaje sme vyjadrili ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka a rozdiely medzi experimentálnymi skupinami a kontrolou sme štatisticky vyhodnotili pomocou nepárového T-testu. Z pravých *femurov* analyzovaných potkanov boli zhotovené histologické preparáty v súlade s metodikou Martiniakovej et al. (2008). Kvalitatívne histologické charakteristiky kompaktného kostného tkaniva laboratórnych potkanov sme určili na základe medzinárodne akceptovaných klasifikácií kostného tkaniva podľa Enlowa a Browna (1956) a Ricqlésa et al. (1991).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky makroskopickej analýzy dokumentujú, že hodnoty priemernej telesnej hmotnosti potkanov, hmotnosti *femurov* a dĺžky *femurov* sú vyššie pri laboratórnych potkanoch z experimentálnej skupiny E1 v porovnaní s kontrolou. Štatisticky významné rozdiely sme však identifikovali iba v prípade hmotnosti *femurov* (tabuľka 1). Uvedená skutočnosť by mohla naznačovať stimulačný účinok Cd na hmotnosť stehnových kostí. V súlade s našimi zisteniami, Gaurav et al. (2010) zaznamenali štatisticky preukazné zvýšenie hmotnosti parenchymatóznych orgánov (pečeň, obličky) u samcov potkanov s chronickou intoxikáciou Cd. Taktiež nesignifikantné rozdiely v telesnej hmotnosti (Brzóska a Moniuszko-Jakoniuk, 2005) a dĺžke stehnových kostí (Brzóska et al., 2007) boli dokumentované i pri adultných potkanoch po perorálnej aplikácii dávkou 5 alebo 50 mg Cd/l v pitnej vode počas 12 mesiacov.

Porovnaním hodnôt priemernej telesnej hmotnosti potkanov, hmotnosti *femurov* a dĺžky *femurov* medzi laboratórnymi potkanmi s perorálnou aplikáciou Se (skupina E2) a kontrolnou skupinou sme zistili, že hodnoty priemernej telesnej hmotnosti potkanov a dĺžky stehnových kostí sú signifikantne nižšie pri jedincoch zo skupiny E2. Naopak, hodnoty priemernej hmotnosti stehnových kostí boli pri potkanoch z experimentálnej skupiny (E2) vyššie, avšak tieto zmeny neboli štatisticky významné (tabuľka 1). Preukázané zníženie rastu u potkanov, ktorým bol podávaný Se v dávke 5 $\mu\text{g Na}_2\text{SeO}_3$ počas 12 týždňov, bolo demonštrované i v práci Ipa (1981).

Tabuľka 1 Priemerná hodnota telesnej hmotnosti, hmotnosti a dĺžky *femurov* analyzovaných skupín laboratórnych potkanov

Skupina potkanov		N	Priemerná telesná hmotnosť (g)	Priemerná hmotnosť <i>femurov</i> (g)	Priemerná dĺžka <i>femurov</i> (cm)
K	(1)	10	405,00±52,65	1,05±0,17	3,94±0,09
E1	(2)	10	422,50±27,20	1,27±0,14	3,99±0,14
E2	(3)	10	352,50±37,14	1,07±0,11	3,74±0,07
T-test			1:3 +	1:2 +	1:3 +

P<0.05 (+)

Diafýzy stehnových kostí laboratórnych potkanov z kontrolnej skupiny disponovali z hľadiska kvalitatívnych histologických charakteristík prakticky rovnakou mikroštruktúrou. Endostálna a periostálna hranica analyzovaných kostí, bola vo všeobecnosti formovaná zónou bezcievnatého kostného tkaniva. V stredovej časti kompakty sme zaznamenali výskyt roztrúsených a izolovaných sekundárnych osteónov, ktoré vytvárali vrstvu nepravidelného Haversového kostného tkaniva. Výsledky z kvalitatívnej histologickej analýzy korešpondujú s výsledkami štúdií viacerých autorov (Enlow a Brown, 1958; Martiniaková et al. 2005; Reim et al., 2008; Martiniaková et al., 2009).

Mikroskopická stavba *femurov* laboratórných potkanov s perorálnou subchronickou aplikáciou Cd a Se bola v mediálnych a laterálnych úsekoch stredovej časti kompakty odlišná. V uvedených oblastiach cievne kanáliky zasahovali až do centrálnej časti kompakty. U potkanov zo skupiny E2 siahali v niektorých prípadoch cievne kanáliky až k periostálnej hranici. Predpokladáme, že u potkanov z oboch experimentálnych skupín viedol výskyt primárneho cievnatého radiálneho kostného tkaniva v stredovej časti kompakty k zníženiu počtu primárnych a sekundárnych osteónov, ktoré sme taktiež zaznamenali. Vymiznutie Haversového systému, ktorý bol nahradený rozsiahlym degenerovaným a nekrotickým tkanivom, bolo demonštrované i v práci Lia et al. (1997) pri potkanoch chronicky exponovaných Cd. Pri králikoch chronicky exponovaných Se (10 mg Na₂SeO₃/kg kŕmnej zmesi) Turan et al. (1997) zistili zníženie počtu osteocytov v dôsledku deštrukcie kostného tkaniva a vzniku nekalcifikovaných oblastí v kostnej hmote. Uvedení autori navyše pozorovali aj zníženie biomechanických vlastností stehnových kostí.

Na základe uvedených zistení sa domnievame, že vytvorenie primárneho cievnatého radiálneho kostného tkaniva v centrálnej časti kompakty u potkanov zo skupín E1 a E2 by mohlo súvisieť s adaptívnou reakciou kostného tkaniva na toxicitu spôsobenú Cd a Se. Tým by sa zabránilo odumretiu kostných buniek a následnej nekróze kostného tkaniva. V blízkosti endostálneho povrchu (hlavne v antero-mediálnych a postero-mediálnych oblastiach) sme pri potkanoch exponovaných Cd navyše pozorovali niekoľko resorpčných dutín, čo by mohlo súvisieť so vznikom ranného štádia osteoporózy. Viaceré experimentálne štúdie potvrdili, že Cd stimuluje diferenciáciu a aktivitu osteoklastov, a naopak, inhibuje formovanie a aktivitu osteoblastov (Coonse et al., 2007; Chen et al., 2009), v dôsledku čoho dochádza k narušeniu rovnováhy medzi resorpciou a tvorbou kosti, úbytku hustoty kostnej hmoty a zvýšenému riziku fraktúr (Bhattacharyya, 2009).

ZÁVER

Subchronická expozícia Cd sa prejavila zvýšenou hmotnosťou *femurov* pri potkanoch, zatiaľ čo subchronická expozícia Se spôsobila zníženie telesnej hmotnosti potkanov a dĺžky ich stehnových kostí. Oba prvky vyvolali zmeny v mikroštruktúre kompaktného kostného tkaniva, prejavujúce sa zníženým počtom primárnych a sekundárnych osteónov a výskytom cievnych kanálikov v stredovej časti kompakty. U jedincov exponovaných Se zasahovali cievne kanáliky v niektorých prípadoch až k periostálnemu povrchu. V prípade subchronickej intoxikácie Cd sme v blízkosti endostálneho povrchu pozorovali niekoľko resorpčných dutín.

Pod'akovanie:

Príspevok bol podporený projektom KEGA 3/7338/09. Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu LAGEZ č.26220120051, na základe podpory Operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. BHATTACHARYYA, M. H. 2009. Cadmium osteotoxicity in experimental animals: Mechanisms and relationship to human exposures. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol.238, 2009, p.258-265.
2. BRZÓSKA, M. M., MONIUSZKO-JAKONIUK, J. 2005. Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol.207, 2005, p.195-211.
3. BRZÓSKA, M. M., ROGALSKA, J., GALAZYN-SIDORCZUK, M., JURCZUK, M., ROSZCZENKO, A., KULIKOWSKA-KARPIŃSKA, E., MONIUSZKO-JAKONIUK, J. 2007. Effect of zinc supplementation on bone metabolism in male rats chronically exposed to cadmium. In *Toxicology*, vol.237, 2007, p.89-103.
4. CHEN, X., ZHU, G., GU, S., JIN, T., SHAO, S. 2009. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts in vitro. In *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol.28, 2009, p.232-236.
5. CHUNG, Y. W., KIM, T. S., LEE, S. Y., LEE, S. H., CHOI, Y., KIM, N., MIN, B.M., JEONG, D.W., KIM, I. Y. 2006. Selenite-induced apoptosis of osteoclasts mediated by the mitochondrial pathway. In *Toxicology Letters*, vol.160, 2006, p. 143-150.
6. COONSE, K. G., COONTS, A. J., MORRISON, E. V., HEGGLAND, S. J. 2007. Cadmium induces apoptosis in the human osteoblast-like cell line Saos-2. In *Journal Toxicology and Environmental Health A*, vol. 70, 2007, p. 575-581.
7. EBERT, R., JAKOB, F. 2007. Selenium deficiency as a putative risk factor for osteoporosis. In *Int. Congr. Ser.*, 2007, p.158-164.
8. ENLOW, D. H., BROWN, S. O. 1956. A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part I. In *Texas Journal of Science*, vol.8, 1956, p.405-412.
9. ENLOW, D. H., BROWN, S. O. 1958. A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part III. In *Texas Journal of Science*, vol.10, 1958, p.187-230.
10. GAURAV, D., PREET, S., DUA, K. K. 2010. Chronic cadmium toxicity in rats: treatment with combined administration of vitamins, amino acids, antioxidants and essential metals. In *Journal of Food and Drug Analysis*, vol.18, 2010, p.464-470.
11. GREENBERG, M. I. 2003. Occupational toxicology: Police and law enforcement personnel. In *Occupational, industrial and environmental toxicology*. (Eds. Greenberg, M. I.,

- Hamilton, R. J., Phillips, S. D., McCluskey, G. J.), Pennsylvania: Mosby, 2003, p.312-325, ISBN 0-323-01340-6
12. HIJOVÁ, E., NIŠTIAR, F., KUČHTA, M., KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M. 2003. Chronická a akútna intoxikácia kadmíom a zmeny antioxidantného stavu. In *Rizikové faktory potravinového reťazca. Nitra: SPU*, 2003, p.35-36.
 13. IP, C. 1981. Prophylaxis of mammary neoplasia by selenium supplementation in the initiation and promotion phases of chemical carcinogenesis. In *Cancer Research*, vol.41, 1981, p.4386-4390.
 14. LI, J. P., AKIBA, T., MARUMO, F. 1997. Long-term, low-dose, cadmium-induced nephropathy with renal osteopathy in ovariectomized rats. In *Texas Journal of Science*, vol.22, 1997, p.185-198.
 15. LONG, G. J. 1997. The effect of cadmium on cytosolic free calcium, protein kinase C, and collagen synthesis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol.143, 1997, p.189-195.
 16. MARTINIAKOVÁ, M., GROSSKOPF, B., VONDRÁKOVÁ, M., OMELKA, R., FABIŠ, M. 2005. Observation of the microstructure of rat cortical bone tissue. In *Scripta medica*, vol.78, 2005, p.45-50.
 17. MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., GROSSKOPF, B., SIROTKIN, A. V., CHRENEK, P. 2008. Sex-related variation in compact bone microstructure of the femoral diaphysis in juvenile rabbits. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol.50, 2008, p.15.
 18. MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., GROSSKOPF, B., MOKOŠOVÁ, Z., TOMAN, R. 2009. Histological analysis of compact bone tissue in adult laboratory rats. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol.42, 2009, p.56-59.
 19. MOSNÁČKOVÁ, J., KOVÁČIKOVÁ, E., PASTOROVÁ, J., KOŠICKÁ, M., VOJTAŠŠÁKOVÁ, A., HOLČÍKOVÁ, K., SIMONOVÁ, E. 2003. Selén v potravinách. In *Odborná príručka*. Bratislava: NOI, 2003, p. 36, ISBN 80-89088-22-8.
 20. REGUNATHAN, A., GLESNE, D. A., WILSON, A. K., SONG, J., NICOLAE, D., FLORES, T., BHATTACHARYYA, M. H. 2003. Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol.191, 2003, p.272-293.
 21. REIM, N. S., BREIG, B., STAHR, K., EBERLE, J., HOEFLICH, A., WOLF, E., ERBEN, R. G. 2008. Cortical bone loss in androgen-deficient aged male rats is mainly caused by increased endocortical bone remodeling. In *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 23, 2008, p. 694-704.

22. RICQLES, A. J., DE-MEUNIER, F. J., CASTANET, J., FRANCILLONVIEILLOT, H. 1991. Comparative microstructure of bone. In *Hall, B. K. (ed.). Bone 3, Bone Matrix and Bone Specific Products, Boca Raton: CRC Press, 1991, p.1-78.*
23. SIDDIQUI, M. F. 2010. Cadmium induced renal toxicity in male rats, *Rattus rattus*. In *Eastern Journal of Medicine*, vol.15, 2010, p. 93-96.
24. TURAN, B., BALCIK, C., AKKAS, N. 1997. Effect of dietary selenium and vitamin E on the biomechanical properties of rabbit bones. In *Clinical Rheumatology*, vol.16, 1997, p.441-449.

Kontaktná adresa

doc. RNDr. Monika Martiniaková, PhD., Katedra zoológie a antropológie, FPV UKF v Nitre;
Nábřežie Mládeže 91, 949 74 Nitra, e-mail: mmartiniakova@ukf.sk