

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ЕМБРІОГЕНЕЗ У ЩУРІВ
 Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (м. Дніпро)

verashatornaya67@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи кафедри медичної біології, фармакогнозії та ботаніки ДЗ «ДМА» «Біологічні основи морфогенезу органів та тварин під впливом мікроелементів та ультрамікроелементів в експерименті» (№ державної реєстрації 0118U006635).

Вступ. Господарська діяльність людини часто призводить до забруднення довкілля, особливу небезпеку становить забруднення важкими металами, адже значна їх частина є надзвичайно токсичною навіть у мінімальних кількостях. Важкі метали не піддаються процесам розкладання, а здатні лише перерозподілятися між природними середовищами. Вони мають властивість концентруватися в живих організмах, викликаючи при цьому різні патології. В живих організмах важкі метали відіграють подвійну роль: в малих концентраціях вони входять до складу біологічно активних речовин, які регулюють нормальний перебіг процесів життєдіяльності, а при зростанні концентрацій призводять до негативних і навіть катастрофічних наслідків для живих організмів [1,2,3]. Результати моніторингу безпеки харчових продуктів по Україні за останні роки показали, що від 0,80 до 3,82% вивчених проб харчових продуктів перевищували гігієнічні регламенти по свинцю; 0,60 – 4,68% – по ртуті; 1,09 – 1,75% – по кадмію. До 10% проб харчових продуктів містять солі важких металів і половина з них – у дозах, що перевищують гранично допустимі концентрації (ГДК). Частота та важкість екологічно залежних захворювань, що виникають у результаті антропогенного забруднення біосфери, свідчить про актуальність даної проблеми [1,4]. Солі кадмію та свинцю характеризуються мутагенними та канцерогенними властивостями і становлять потенційну генетичну небезпеку. Кадмій блокує роботу ряду важливих для життєдіяльності організму ферментів. Крім того, він вражає печінку, нирки, підшлункову залозу та ін., а шкідливість сполук кадмію підсилюється його кумулятивністю. За порівняно короткий історичний період вміст свинцю як потенційно токсичної хімічної речовини у навколишньому середовищі збільшився в десятки і навіть сотні разів, а головне, придбав глобальний характер. Внаслідок здатності цих важких металів та їх сполук до кумуляції, навіть вплив на рівні низьких концентрацій приводить до значного порушення роботи організму [5,6,7]. Вплив важких металів відбувається і на морфологічних структурах ембріона, провокуючи ряд захворювань [8,9]. Результати впливу важких металів на ембріогенез у дослідних тварин експериментальним шляхом досить суперечливі і залежать від дози, способу введення та терміну впливу, тому порівняння їх досить ускладнене [10].

Таким чином, дослідження біоефектів різних токсичних мікроелементів та ультрамікроелементів в

організмі вагітної самки і ембріона – тема важлива і вимагає активного наукового дослідження.

Мета дослідження: провести порівняльний аналіз показників ембріотоксичності низьких доз ацетату свинцю та хлориду кадмію при внутрішньошлунковому введенні в експерименті на щурах при ізольованому введенні та за умов компенсаторної дії цитрату селену.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження впливу солей кадмію та свинцю проведено на білих щурах-самицях лінії «Вістар». Для проведення досліджень обрано низькі дози металів, які відображають реальне їх співвідношення в добових раціонах людини промислового регіону. Досліджувані речовини у вигляді розчинів вводили самицям щоденно впродовж всієї вагітності вшлунково.

Для пошуку можливих біантогоністів важким металом досить перспективними є біотехнологічні препарати, до складу яких включають мікроелементи, що за результатами сучасних досліджень вчених, виконують низку життєво важливих функцій в організмі, є екологічно безпечними та не справляють негативного впливу на здоров'я і морфо-функціональний статус та продуктивність тварини. Доведено, що в організмі органічні сполуки (цитрати) беруть участь у транспортуванні кисню до тканин, попереджуючи розвиток гіпоксії на тканинному рівні, зокрема, результати досліджень вказують на стимулюючий вплив цитратів церію, селену та германію, отриманих методом нанотехнології, на імунобіологічну реактивність організму самиць щурів та їх репродуктивну і детоксикаційну функцію. Тому нами використано цитрат селену, що отримано з використанням нанотехнологій. Всі щури були розділені на 5 груп: 1 група – контрольна, 2 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мкг/кг.; 3 група – тварини, яким вводили розчин хлорид кадмію у дозі – 1,0 мкг/кг.; 4 група – комбінованого введення ацетату свинцю у дозі 0,05 мкг/кг та цитрату селену у дозі 0,1 мкг/кг.; 5 група – комбінованого введення хлориду кадмію у дозі – 1,0 мкг/кг та цитрату селену у дозі 0,1 мкг/кг. Тварин виводили з експерименту на 20-ту добу вагітності шляхом передозування тіопенталового наркозу та вилучали ембріони з матки для подальшого дослідження. Для обчислення ембріональної смертності також вилучали яєчники самиць, в яких підраховували кількість жовтих тіл вагітності.

Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками:

Кількість плодів на 1 самку

Загальна ембріональна смертність (ЗСЕ)

$$ЗСЕ = \frac{B-A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість жовтих тіл вагітності

Передімплантаційна смертність (ПІС)

$$ПІС = \frac{B-(A+B)}{B} (\text{ок.}) \quad (2)$$

де А – кількість живих плодів
 Б – кількість загиблих (резорбованих) плодів
 В – кількість жовтих тіл вагітності
Післяімплантаційна смертність(ПостІС)

$$\text{ПостІС} = \frac{Б}{А+Б} (\text{од.}) \quad (3)$$

де А – кількість живих плодів
 Б – кількість загиблих (резорбованих) плодів

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики. Оцінку вірогідності статистичних досліджень проводили за допомогою t-критерію Ст'юдента.

Дослідження на тваринах проводили у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджуються з Європейською конвенцією про захист експериментальних тварин (Страсбург, 1985).

Результати дослідження та їх обговорення. При впливі екзогенних чи ендогенних чинників на репродуктивну систему безумовно вагомим показником є аналіз стану яєчників, що корелює з кількістю ембріонів, їх імплантацією та перебігом вагітності. В кожній експериментальній групі у самиць видалялись яєчники, зважувались та підраховувалась кількість жовтих тіл вагітності і кількість ембріонів в кожному розі матки окремо. Це дало змогу визначити шляхом обрахування доімплантаційну, післяімплантаційну та загальну ембріональну смертність під дією ацетату свинцю чи хлориду кадмію. Ембріонів вилучали з матки разом з плацентою, не порушуючи пупкового канатика, визначали можливі зміни або вади розвитку, колір покривів та відповідність стадії нормального розвитку згідно загальноприйнятих критеріїв: формування повік, вушних раковин, закладки вібрис, розвитку кінцівок та ін., знімали масометричні показники.

Всі самиці в дослідженні вижили, тератогенного ефекту у ембріонів в експерименті не визначалось. У групі ембріонів свинцевої інтоксикації спостерігались гіперваскуляризація шкірних покривів, що свідчило про хронічний гіпоксичний стан ембріону, а судини ембріону та плаценти були розширені та наповнені кров'ю. В групі впливу хлоридом кадмію гіперваскуляризація ембріонів не зустрічалась.

Проведене обчислення виявило ембріотоксичність ацетату свинцю та хлориду кадмію в зазначених дозах на ембріогенез щурів. Порівняння результатів ембріотропної дії низьких доз свинцю з показниками контрольної групи продемонструвало, що при практично однаковій кількості жовтих тіл вагітності з показниками контрольної групи спостерігається достовірне ($p < 0,05$) зниження кількості живих плодів на 17% – $7,5 \pm 0,53$ ($9,0 \pm 0,4$ контрольна група). Показник загальної ембріональної смертності збільшувався у 2,16 разів ($p < 0,01$) за рахунок переважної їх смертності в доімплантаційний період ($p = 0,07$). Зменшення середнього показника кількості плодів (на 1 самицю) супроводжувалось зменшенням їх маси та розмірів, хоча без достовірної різниці з контролем для даних масометричних показників. В групі тварин, що отримували хлорид кадмію теж виявлено високі показники ембріоток-

сичності: зниження кількості ембріонів, підвищення показників загальної ембріональної смертності як за рахунок підвищення доімплантаційної так і післяімплантаційної ембріональної смертності. Показник середніх значень кількості ембріонів на 1 самицю в даній експериментальній групі дорівнював такому в групі впливу ацетатом свинцю $7,50 \pm 0,53$, хоча показники загальної ембріональної смертності були дещо нижчими від групи свинцевого впливу і становили $22,8 \pm 2,3$ (рис. 1).

Таким чином, загальна ембріональна смертність в обох групах інтоксикації достовірно ($p < 0,01$) збільшувалась в порівнянні до контрольних значень, що призводило до зниження показників кількості ембріонів і свідчило про ембріотоксичний вплив ацетату свинцю та хлориду кадмію в зазначених дозах при ентэральному введенні в експерименті на щурах.

В групах комбінованого введення важких металів з цитратом селену визначається зменшення показника загальної ембріональної смертності більше ніж у 2 рази (в порівнянні до груп ізольованого введен-

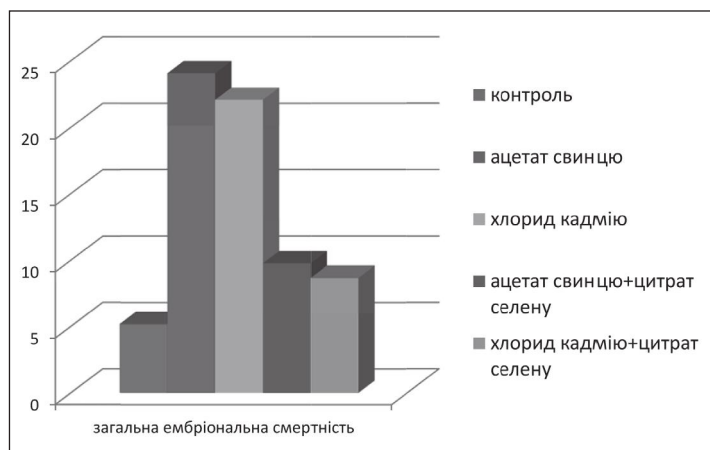


Рисунок 1 – Показники загальної ембріональної смертності в контрольній та експериментальних групах на 20-й добі ембріогенезу щура.

ня важких металів), що свідчить про модифікуючий вплив цитрату селену на токсичність свинцю та кадмію (рис. 1).

Показники загальної ембріональної смертності пропорційно залежать від показників доімплантаційної та післяімплантаційної ембріональних смертностей. Імплантація ембріона в стінку матки самиці щура відбувається на 4-5 день вагітності і вплив дестабілізуючого фактору призводить до загибелі зиготи без затрат енергії самиці на процес імплантації і наступного розвитку ембріону. Доімплантаційна ембріональна смертність є відповіддю з боку організму самиці на вплив шкідливого чинника як зовнішнього так і можливого внутрішнього. Показники доімплантаційної смертності розраховувались нами по різниці між кількістю жовтих тіл вагітності в правому та лівому яєчниках самиці і кількістю ембріонів у відповідних рогах матки. В нормі у багатоплідних тварин також існує доімплантаційна смертність ембріонів. В контрольній групі даний показник був найнижчим і дорівнював $0,01 \pm 0,07$, а в експериментальних групах впливу зростав в декілька разів: в групі впливу ацетатом свинцю дорівнював $0,09 \pm 0,05$, а в групі впливу хлоридом кадмію був найбільшим – $0,21 \pm 0,08$,

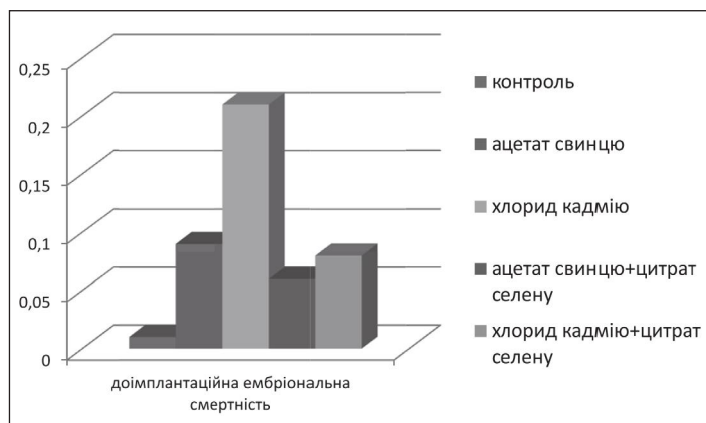


Рисунок 2 – Показники доімплантаційної ембріональної смертності в контрольній та експериментальних групах на 20-й добі ембріогенезу щура.

що свідчить про більш виражений токсичний вплив цього мікроелемента на хід імплантації та плацентарної дослідних тварин. При комбінованому введенні солей важких металів з цитратом селену показники доімплантаційної смертності достовірно знижувались (**рис. 2**). Доведено, що одним з механізмів негативного впливу сполук свинцю та кадмію на стан організму є формування гіпоксичного стану тканин, а в нашому випадку і опосередковану гіпоксію ембріонів. Цитратні форми солей есенціальних мікроелементів приймають участь в функціонуванні циклу Кребса та знижують гіпоксичний стан тканин.

В групах ізольованого впливу солями важких металів збільшувались також і показники післяімплантаційної ембріональної смертності. Якщо в контрольній групі даний показник сягав $0,05 \pm 0,01$, то введення ацетату свинцю призводило до подво-

ення летальності ембріонів після імплантації ($0,10 \pm 0,02$), а хлорид кадмію мав ще більш виражений ембріолетельний ефект – $0,12 \pm 0,02$. При комбінованому введенні даний показник ембріотоксичності також зменшувався: ацетат свинцю+ цитрат селену – $0,8 \pm 0,02$; хлорид кадмію+цитрат селену – $0,9 \pm 0,02$, тобто цитрат селену зменшує токсичну дію важких металів при комбінованому введенні в зазначених дозах в експерименті на щурах. Пропорційне збільшення смертності ембріонів від терміну введення негативного агента логічна: збільшення терміну інтоксикації самиці і ембріонів призводить до вираженого ембріолетального ефекту.

Висновки. Отримані експериментальні дані дають підставу стверджувати, що введення розчинів низьких доз хлориду кадмію, або ацетату свинцю впродовж всього періоду вагітності у щурів внутрішньошлунково має ембріотоксичний ефект, який проявляється в зниженні показників кількості живих ембріонів і підвищенні показників загальної ембріональної смертності за рахунок збільшення як доімплантаційної, так і післяімплантаційної смерті ембріонів. Комбіноване введення цитрату селену з солями важких металів призводить до зниження ембріотоксичного впливу свинцю та кадмію як в доімплантаційний так і в післяімплантаційний період.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним напрямком подальших експериментальних досліджень є експериментальний пошук нових біоантогоністів токсичним важким металам серед мікроелементів.

Література

- Kravtsiv RY, Butsyak HA. Sumisnyy vplyv vazhkykh metaliv na orhanizm tvaryn. Naukovyy visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhyts'koho. 2008;10.2(37):50-6. [in Ukrainian].
- Lohachova LO, Tarasova TO, Kolesnyk KO. Vetrynarno-hihiyenichnyy moshtorinh vazhkykh metaliv u systemi hrunt – kormy – voda – molochna produktsiya v skotars'kykh pidpryemstvakh kharkivs'koyi oblasti za riznykh ekolohichnykh umov. Naukovyy visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhyts'koho. 2010;12.2(44):223-7. [in Ukrainian].
- Shkumbatyuk OY, Shkumbatyuk RS, Lozovyt's'ka TM, Zubyy SV. Ekotoksychnyy tryvalyy vplyv kadmiiu na hematolohichni pokaznyky u shchuriv. Naukovyy visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhyts'koho 2010;12.3(45):201-5. [in Ukrainian].
- Hrebnyak MP, Hrebnyak VP, Yermachenko OB, Pavlovych LV. Zabrudnennya gruntu khimichnyimi elementamy: faktory ryzyku, nehatyvnyy vplyv na zdorovya. Dovkillya ta zdorovya. 2007;3:27. [in Ukrainian].
- Karchauskas VYu, Kotyuzhynskaya SH. O nefrotoksycheskykh éffektakh razlychnykh doz khlorida kadmiiu. Aktual'ni problemy transportnoyi medytsyny. 2006;2:47-9. [in Russian].
- Oberly D, Skal'nyy AV, Skal'naya MH. Patofyziolohyya mykroélementozov. Patohenez. 2016;14(2):20-7. [in Russian].
- Trakhtenberh YM. Tyazhelye metally kak khymycheskye zahryaznytely proyzvodstvennoy y okruzhayushchey sredy. Dovkillya ta zdorov'ya. 1997;2:48-51. [in Russian].
- Trakhtenberh IM. Svyntseva nebezpeka v Ukrayini. Naukovyy zhurnal MOZ Ukrayiny. 2013;3:50-60. [in Russian].
- Serdyuk AM, Belytskaya ÉN, Paran'ko NM, Shmatkov NH. Tyazhelye metally vneshney sredy y ykh vlyyanye na reproduktivnyuyu funktsyyu zhenshchyn. Dnepropetrovsk: ART-PRESS; 2004. 148 s. [in Russian].
- Shatorna VF. Eksperymental'ne doslidzhennya embriotoksychnosti atsetatu svyntsyu ta nanozolota. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2013;2(2):154-9. [in Ukrainian].

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ЕМБРІОГЕНЕЗ У ЩУРІВ

Шаторна В. Ф., Гарець В. І., Кононова І. І., Слесаренко О. Г.

Резюме. Метою дослідження було проведення порівняльного аналізу ембріотоксичності ацетату свинцю та хлориду кадмію при внутрішньошлунковому введенні в експерименті на щурах при ізольованому введенні та за умов компенсаторної дії цитрату селену.

При введенні низьких доз ацетату свинцю або хлориду кадмію впродовж всього періоду вагітності щурів обраховували показники кількості ембріонів на 1 самицю, доімплантаційну, постімплантаційну та загальну ембріональну смертність. Для вирішення поставленої задачі отримували самиць з датованим терміном вагітності, з першого дня розпочинали вплив солями важких металів в низьких дозах і на 20-й добі ембріогенезу проводили оперативний забій. В обох дослідних групах визначався ембріотоксичний ефект, що проявлявся в зниженні показників кількості живих ембріонів і підвищенні показників ембріональної смертності.

Комбіноване введення цитрату селену з солями важких металів призводить до зниження ембріотоксичного впливу свинцю та кадмію як в доімплантаційний так і в післяімплантаційний період.

Ключові слова: важкі метали, ацетат свинцю, хлорид кадмію, цитрат селену, ембріогенез, ембріотоксичність.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ У КРЫС

Шаторная В. Ф., Гарец В. И., Кононова И. И., Слесаренко Е. Г.

Резюме. Целью исследования было проведение сравнительного анализа эмбриотоксичности ацетата свинца и хлорида кадмия при внутрижелудочном введении в эксперименте на крысах при изолированном введении и при комбинации с цитратом селена.

При введении низких доз ацетата свинца или хлорида кадмия в течение всего периода беременности крыс рассчитывали показатели количества эмбрионов на 1 самку, доимплантационную, постимплантационную и общую эмбриональную смертность. Для решения поставленной задачи получали самок с датированным сроком беременности и с первого дня проводили влияние солями тяжелых металлов в низких дозах, на 20-е сутки эмбриогенеза проводили оперативный забой. В обеих опытных группах определялся эмбриотоксический эффект, который проявлялся в снижении показателей количества живых эмбрионов и повышении показателей эмбриональной смертности.

Комбинированное введение цитрата селена с солями тяжелых металлов приводит к снижению эмбриотоксического воздействия свинца и кадмия как в доимплантационный так и в постимплантационный период.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ацетат свинца, хлорид кадмия, цитрат селена, эмбриогенез, эмбриотоксичность.

DETERMINATION OF THE IMPACT OF HEAVY METALS ON EMBRYOGENESIS IN RATS

Shatorna V. F., Garets V. I., Kononova I. I., Slesarenko O. G.

Abstract. Lead and cadmium as polluting the environment and classical toxicants continue to remain the focus of not only ecologists, toxicologists and hygienists, but also pathologists, morphologists and clinicians. This is due to the fact that in the relatively short historical period the content of these potentially toxic chemical compounds in the environment has increased in dozens or even hundreds of times, and most importantly, it has acquired a global character.

Due to the ability of these heavy metals and their compounds to cumulation in the body, even the effect at low concentrations leads to significant disruption of the body. The influence of heavy metals occurs on the morphological structures of the embryo, provoking a number of diseases. The experimental effects of heavy metals on the embryogenesis in the experimental animals are quite controversial and depend on the dose, method of administration and duration of exposure, so comparisons are rather complicated.

Thus, the study of bioeffects of the influence of various toxic elements on the body of pregnant females and on the embryo – the topic is important and requires an active scientific research.

Purpose of the study. To conduct a comparative analysis of the embryotoxicity of lead acetate and cadmium chloride in intragastric administration in an experiment on rats.

Object and methods. Investigation of the effects of cadmium and lead compounds on white rats of the "Wistar" line. For researches, low doses of metals were chosen that reflect the actual ratio of these in the daily human rations of the industrial region.

The test substances were administered to the females throughout the pregnancy in a hemorrhagic state, the first day of pregnancy was determined using the method of vaginal stroke. All rats were divided into 5 groups: 1 group – control, 2 group – animals, which were injected with lead acetate solution at a dose of 0.05 mg/kg; Group 3 – animals that were administered a solution of cadmium chloride was injected at a dose of 1.0 mg/kg; Group 4 – combined administration of lead acetate at a dose of 0.05 mg/kg and selenium citrate at a dose of 0.1 mg/kg; Group 5 – combined administration of cadmium chloride at a dose of 1.0 mg/kg and selenium citrate at a dose of 0.1 mg/kg. Animals were taken from an experiment on the 20th day of pregnancy by overdose of etheric anesthesia and extracted embryos from the uterus for further study. The probable negative effect of the test substance on embryonic development was judged by the ability to increase the level of embryonic mortality (embryoal effect) and cause external and structural defects in the development of internal organs (teratogenic effect); the overall development of embryos was evaluated by the number of embryos, the number of yellow fetuses in the ovaries of females, the body mass of the embryo, and its compliance with the developmental stage according to generally accepted criteria for embryonic development of rats.

The overall embryonic mortality was determined and the preimplantation and post-implantation mortality rates were calculated, which made it possible to determine the embryotoxicity of the substances studied. The analysis of the experiment showed that the total embryonic mortality in both groups of intoxication was significantly ($p < 0.01$) increased compared to control values, which led to a decrease in the number of embryos and indicated the embryotoxic effects of lead acetate and cadmium chloride at the indicated doses for enteral administration in an experiment on rats. There was no teratogenic effect in experimental groups.

The conducted experimental study suggests that the introduction of solutions of low doses of cadmium chloride or lead acetate throughout the entire gestational period to the female rats causes an embryotoxic effect, which manifests itself in lowering the numbers of live embryos and increasing the rates of embryonic mortality. A comparison of the results of the experimental study suggests that the effect of lead acetate leads to a higher level of total embryonic mortality of rats under experimental conditions.

The combined administration of selenium citrate with heavy metal salts leads to a decrease in the embryotoxic effect of lead and cadmium both in the preimplantation and postimplantation period.

Key words: heavy metals, lead acetate, cadmium chloride, selenium citrate, embryogenesis, embryotoxicity.

Рецензент – проф. Проніна О. М.

Стаття надійшла 02.10.2019 року