

DOI: 10.26693/jmbs03.06.036
УДК 616.61:591.3:546.48:612.6

Нефьодова О. О., Азаров О. І.

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА ПОКАЗНИКИ ЕМБРІОГЕНЕЗУ ЩУРІВ ПРИ ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОМУ ВВЕДЕННІ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро, Україна

verashatornaya67@gmail.com

Останнім часом відбулося розширення сфери використання різних сполук кадмію і значне збільшення антропогенного вкладу до забруднення ними навколишнього середовища, що призвело до перевищення гранично допустимої концентрації кадмію в ряді регіонів нашої країни і за кордоном у воді, повітрі та продуктах харчування. В науковій літературі зустрічається значна кількість робіт, присвячених дослідженню впливу на організм даного токсиканта в постнатальному періоді онтогенезу, в той час як вплив кадмію на ембріогенез вивчено недостатньо.

Метою дослідження було експериментальне визначення впливу низьких доз хлориду кадмію на загальний хід ембріогенезу щурів при внутрішньошлунковому введенні впродовж всього періоду вагітності.

Визначення можливого ембріотоксичного впливу хлориду кадмію проводилось обрахуванням стандартних показників ембріонального розвитку: кількість плодів, загальна ембріональна смертність, доімплантаційна ембріональна смертність та післяімплантаційна ембріональна смертність на 13 добу та 20 добу ембріогенезу щура.

Аналіз отриманих результатів показав, що в групі кадмію хлориду впродовж всього ембріогенезу на вагітну самицю спостерігається достовірне зниження (на 14,35%) кількості живих плодів як на 13 добі так і на 20 добі вагітності.

Загальна ембріональна смертність збільшувалась при інтоксикації хлоридом кадмію у 4,1 разів ($p < 0,01$) за рахунок переважної її смертності в доімплантаційний період. Такі дані свідчать про ембріотоксичний вплив надмалих доз хлориду кадмію на експериментальних тварин (щури) при внутрішньошлунковому введенні кадмію протягом всього періоду вагітності.

Ключові слова: ембріогенез, ембріональна смертність, хлорид кадмію, експеримент.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до теми кафедральної наукової роботи «Морфофункціональний стан органів і тканин експерименталь-

них тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», № держ. реєстрації 0117U003181.

Вступ. На сьогодні сполуки кадмію і свинцю є основною часткою важких металів, що формують екологічну кризу планети. Необхідність розробки усестороннього, в тому числі, токсикологічного аналізу конкретної речовини чи сполуки, даних вмісту речовини в об'єктах навколишнього середовища та харчових продуктах, визначення токсичних доз актуальна як для дорослих, так і для організму, що розвивається. Наша держава – це країна з високим рівнем негативних екологічних наслідків виробничої діяльності, у зв'язку з чим проблема охорони навколишнього середовища і піклування про стан здоров'я населення промислових регіонів потребує першочергового вирішення [4, 5, 7, 8, 9]. Народження повноцінного потомства, здатного ефективно адаптуватися до умов навколишнього середовища, багато в чому залежить від становлення органів і систем в процесі внутрішньоутробного розвитку. Досить часто фізіологічний перебіг вагітності виявляється порушеним в результаті впливу хімічних речовин в різні періоди ембріогенезу [10, 11].

В кінці минулого століття у зовнішньому середовищі було зареєстровано понад 4 млн токсичних речовин, і щороку їх кількість зростає на 1–2 тисячі. Звичайно, не можна ігнорувати реально існуючу спільну дію хімічних речовин, але виявити закономірності комбінованої дії їх буде неможливо до тих пір, поки не будуть накопичені достовірні відомості про особливості дії на організм кожного з хімічних компонентів окремо. Останнім часом відбулося розширення сфери використання різних сполук кадмію і значне збільшення антропогенного вкладу до забруднення ними навколишнього середовища, що призвело до перевищення гранично допустимої концентрації кадмію в ряді регіонів нашої країни і за кордоном у воді, повітрі та продуктах харчування. Така ситуація спонукала вчених до експериментальних досліджень з визначення впливу важких металів на розвиток організму в залежності від способу введення та дози [1, 2, 3]. В літературі

зустрічається велика кількість робіт, присвячених дослідженню впливу даного токсиканта в постнатальному періоді онтогенезу [11, 12, 13], в той час як вплив кадмію на ембріогенез вивчено недостатньо. До сих пір залишається відкритим питання проникнення сполук кадмію через плаценту.

Мета дослідження: експериментально визначити вплив низьких доз хлориду кадмію на загальний хід ембріогенезу щурів при внутрішньошлунковому введенні впродовж всього періоду вагітності.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження були проведені на молодих самиць щурів лінії Wistar (розплідник «Далі 2000», м. Київ). Вибір об'єктом дослідження саме цих лабораторних тварин зумовлений низьким рівнем у них спонтанних вад розвитку (0,02-0,85%) порівняно з мишами (0,04-15,7%) та кролями (0,74-4,2%).

На підготовчому етапі перед проведенням експерименту досліджували естральний цикл самиць методом піхвових мазків., що дозволило визначити у кожної самиці тривалість циклу та окремих його фаз, наявність усіх 4 фаз циклу та ритмічність їх чергування. Для подальшого дослідження можливої ембріотоксичної дії самок вагою 160-180 г із стійким ритмом естрального циклу на стадіях проєструсу і еструсу парували з інтактними самцями за схемою 2:1. Перший день вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у піхвових мазках.

Самиць щурів з датованим терміном вагітності розподілили на 2 групи, одна з яких – контрольна, друга – експериментальна. Впливу розчину хлориду кадмію самок щурів піддавали з 1-го по 19-й день вагітності. Для дослідження гаметотоксичного та ембріотоксичного впливу важких металів обрано хлорид кадмію, як один з найпоширеніших токсикантів довкілля промислових регіонів України, який впливає на якість гамет та на перебіг вагітності за даними літератури. Для проведення досліджень обрано низьку дозу солі кадмію, яка може бути співставлена з реальною концентрацією в добових раціонах жінок, в тому числі вагітних промислового регіону. Доза по хлориду кадмію складає 1,0 мг/кг маси тіла.

Згідно загальноприйнятим інструкціям проведення експериментальних робіт, розчин кадмію хлориду вводили самицям ентерально через зонд один раз на добу, в один і той же час, з 1-ого по 19-й день вагітності. Під час введення розчинів реєстрували стан та поведінку самок, динаміку маси тіла, ректальну температуру, тривалість вагітності. На 13-й та 20-й день вагітності проводили оперативний забій. Щурят вилучали з матки, перевіряли на тест «живі-мертві», зважували, фотографували та фіксували у 10%- розчині формаліну для подальшого гістологічного дослідження.

Про можливу негативну дію досліджуваної речовини на ембріональний розвиток судили за здатністю підвищувати рівень ембріональної смертності (ембріолетальний ефект) та викликати зовнішні та структурні вади розвитку внутрішніх органів і кісткової системи (тератогенний ефект); загальний розвиток плодів оцінювали за показниками кількості ембріонів, кількості жовтих тіл вагітності яєчників самиць, маси тіла ембріона, його відповідності стадії розвитку за загальноприйнятими критеріями ембріонального розвитку щурів.

Ембріотоксичну дію хлориду кадмію оцінювали за наступними показниками:

1. Загальна ембріональна смертність =

$$ЗСЕ = \frac{B - A}{B},$$

де А – кількість живих плодів, В – кількість жовтих тіл вагітності.

2. Предімплантаційна смертність =

$$ПІС = \frac{B - (A + B)}{B},$$

де А – кількість живих плодів, Б – кількість загиблих (резорбованих) плодів, В – кількість жовтих тіл вагітності.

3. Постімплантаційна смертність =

$$\text{ПостІС} = \frac{B}{A + B},$$

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

4. Кількість плодів на 1 самку.

5. Маса 1 плода.

Під час оперування підраховували кількість плодів в кожному розі матки та відповідність кількості жовтих тіл в яєчнику з відповідного боку. При цьому визначали доімплантаційну смертність ембріонів: якщо кількість жовтих тіл вагітності в яєчниках самиці була вищою за кількість ембріонів у відповідному розі матки, це свідчило про ембріотоксичний вплив досліджуваного чинника на процес імплантації та наступну загибель ембріона щура – доімплантаційну смертність. Даний показник є одним з ведучих показників ембріотоксичності досліджуваних сполук.

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

Дослідження виконувались у відповідності до принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000 р.), Конвенції Ради Європи у правах людини та біомедицини (1997 р.), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових

товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.), «Загальним етичним принципам експериментів над тваринами», що затверджені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Результати дослідження та їх обговорення.

Результати проведеного експерименту показали, що в групі впливу хлориду кадмію спостерігалось значне зменшення кількості ембріонів на обох термінах вагітності та збільшення ембріональної смертності як до імплантації так і після (таблиця). Такі дані дозволяють зробити висновок про ембріотоксичний вплив хлориду кадмію в зазначеній дозі на ембріон щура при внутрішньо шлунковому введенні самицям впродовж всього процесу ембріогенезу.

Таким чином, як показав аналіз отриманих результатів, середні показники кількості ембріонів на 13 добу ембріогенезу при впливі кадмію хлориду знижуються в порівнянні до контролю на 13,9%, а на 20 добу на 14,8%, що в середньому становить 14,4%. Середній показник кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках самиць не має достовірної різниці, що не суперечить літературним науковим даним. Найбільші зміни спостерігалися нами в показниках загальної ембріональної смертності, які зростали від 4,58% в контрольній групі до 18,81% в групі впливу хлоридом кадмію. При цьому в контрольній групі була відсутня передімплантаційна смертність на 13 добі розвитку, а в групі експерименту вона була найвищою (таблиця).

Порівняння результатів ембріотропної дії низьких доз хлориду кадмію з показниками контрольної групи виявило його ембріотоксичність. Результати

експерименту визначили достовірне ($p < 0,05$) зниження кількості живих плодів в групі кадмієвої інтоксикації, що обумовлено збільшенням у 4,1 разів загальної ембріональної смертності ($p < 0,01$) за рахунок переважної їх смертності в доімплантаційний період. Такі дані підтверджують механізм регуляції чисельності плодів самою на фоні впливу дестабілізуючого фактору, який діє протягом всього періоду вагітності, в тому числі в доімплантаційний період (з 1 по 4-5 день вагітності). Енергетично для самиці щура більш «вигідно» абортувати плоди в початковий період вагітності, ніж в період інтенсивного органогенезу, що знайшло підтвердження і в інших дослідженнях по вивченню ембріотоксичності металів [6, 8, 11]. При цьому зменшується не лише загальна кількість плодів, але і їх маса та розміри порівняно з групою контролю, хоча без достовірної різниці.

Висновки. Аналіз отриманих результатів показав, що в групі впливу хлоридом кадмію при внутрішньошлунковому введенні вагітній самиці в зазначеній дозі (1,0 мг/кг) спостерігається достовірне зниження кількості живих плодів (як на 13 добі так і на 20 добі вагітності) у порівнянні до групи контролю.

Загальна ембріональна смертність збільшується при інтоксикації хлоридом кадмію у 4,1 разів ($p < 0,01$) за рахунок переважної їх смертності в доімплантаційний період. Такі дані свідчать про ембріотоксичний вплив надмалих доз хлориду кадмію на експериментальних тварин (щури) при введенні кадмію протягом всього періоду вагітності.

Перспективи подальших досліджень. Науковий інтерес представляють дослідження внутрішніх органів ембріонів та самиць та можливі гістологічні зміни, що виникають під впливом солей кадмію.

Таблиця – Показники ембріонального розвитку щурів в нормі та в експерименті при впливі хлоридом кадмію на 13 та 20 добі ембріогенезу

Показник	Контроль		Дослідна група	
	13 доба	20 доба	13 доба	20 доба
Кількість живих плодів на 1 самицю	9,00±0,53	9,25±0,53	7,75±0,27*	7,88±0,27*
Кількість жовтих тіл вагітності на 1 самицю	9,50±0,40	9,63±0,40	9,75±0,27	9,50±0,40
Загальна ембріональна смертність, %	5,26±0,31	3,90±0,07	20,51±1,30**	17,11±1,99**
Передімплантаційна смертність, од	–	0,01±0,01	0,15±0,03**	0,12±0,04**
Постімплантаційна смертність, од	0,05±0,01	0,04±0,01	0,06±0,02	0,06±0,01*

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; по відношенню до контролю.

References

1. Shatornaya VF, Lynnyk VA, Kaplunenکو VG, y dr. Morfologicheskoe yssledovanye vlyyanyuya nekotorykh mykroelementov na reproduktivnyuyu systemu y embryogenez. *Mykroelementy v medytsyne*. 2014; 15(3): 34–9. [Russian]
2. Nykolaev VA, Lebedenko YYu. Toksykologyya kadmyua. *Problemy stomatologyy y neyrostomatologyy*. 1999; 1: 48-53. [Russian]
3. Nykula TD. *Toksychni nefropatiji: Klinichna nefrologiya*. Ed by Pyrog LA. K: Zdorov'ya; 2004. p. 379- 84. [Ukrainian]

4. Ostrovskaya SS, Shatorna VF, Kolosova YY. Sochetannoe vozdeystviye svyntsa y kadmyya na organizm. *Visnyk problem biologiyi ta medytsyny*. 2014; 4(115): 121-5. [Russian]
5. Paranko M, Belytskaya EN, Zemlyakova TD, y dr. Rol tyazhelykh metallov v voznyknovenyy reprodoktyvnykh narushenyy. *Gygyena y sanytariya*. 2002; 1: 28-30. [Russian]
6. Savenkova OO. Modelyuyuchy vplyv atsetatu svyntsyu ta yogo kombinatsiyi z nanozalizom na embriogenez eksperymentalnykh tvaryn. *Visnyk problem biologiyi ta medytsyny*. 2013; 3(103): 305-9. [Ukrainian]
7. Skalnyy AV, Rudakov YA. *Byoelementy v medytsyne*. M: Yzdatelskyy dom «ONYKS 21 vek». Myr; 2004. 110 s. [Russian]
8. Skalnyy AV. Vliyanye faktorov okruzhayushchey sredy na reprodoktyvnuyu system devochek y devushek Moskovskogo megapolysa. *Mykroelementy v medytsyne*. 2002; 3(4): 17-25. [Russian]
9. Trakhtenberg YM, Kolesnykov SV, Lukovenko VP. *Tyazhelye metally vo vneshney srede. Sovremennyye gygyeny-cheskiye y toksykologicheskiye aspekty*. Mynsk; 1994. 123 s. [Russian]
10. Fave M. Mykroelementy y beremennost. *Mykroelementy v medytsyne*. 2002; 3(4): 2-6. [Russian]
11. Shatornaya VF, Lynnyk VA, Kaplunenko VG, Savenkova EA, Chekman YS. Morfolozhcheskoye yssledovanye vlyanyaya nekotorykh mykroelementov na reprodoktyvnuyu systemu y embryogenez. *Mykroelementy v medytsyne*. 2014; 15(1): 34-9. [Russian]
12. Pinot F, Kreps SE, Bachelet M, Hainaut P, Bakonyi M, Polla BS. Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev Environ Health*. 2000; 15(3): 299-323. PMID: 11048333. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2000.15.3.299>
13. Jacobo-Estrada T, Santoyo-Sánchez M, Thévenod F, Barbier O. Cadmium Handling, Toxicity and Molecular Targets Involved during Pregnancy: Lessons from Experimental Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(7): 136-55. PMID: 28737682. PMCID: PMC5536077. DOI: 10.3390/ijms18071590

УДК 616.61:591.3:546.48:612.6

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭМБРИОГЕНЕЗА КРЫС ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ

Нефедова Е. А., Азаров А. И.

Резюме. В последнее время произошло расширение сферы использования различных соединений кадмия и значительное увеличение антропогенного вклада в загрязнение ими окружающей среды, что привело к превышению предельно допустимой концентрации кадмия в ряде регионов нашей страны и за рубежом в воде, воздухе и продуктах питания. В научной литературе встречается значительное количество работ, посвященных исследованию влияния данного токсиканта на организм в постнатальном периоде онтогенеза, в то время как влияние кадмия на эмбриогенез изучено недостаточно.

Целью исследования было экспериментальное определение влияния низких доз хлорида кадмия на общий ход эмбриогенеза крыс при внутрижелудочном введении весь период беременности.

Результаты эксперимента оценивали после эвтаназии под наркозом тиопентала натрия самок на 13 и 20 день беременности. О возможном негативном воздействии исследуемого вещества на эмбриональное развитие судили по способности повышать уровень эмбриональной смертности (эмбриолетальный эффект) и вызывать внешние и структурные пороки развития (тератогенный эффект). Общее развитие плодов оценивали по показателям количества эмбрионов, количества желтых тел беременности яичников самок, массы тела эмбриона, его соответствию стадии развития по общепринятым критериям эмбрионального развития крыс.

Анализ полученных результатов показал, что в группе введения беременным самкам кадмия хлорида в течение всего эмбриогенеза наблюдается достоверное снижение (на 14,35%) количества живых плодов как на 13 сутки, так и на 20 сутки беременности.

Общая эмбриональная смертность увеличивалась при интоксикации хлоридом кадмия в 4,1 раз ($p < 0,01$) за счет подавляющей их смертности в доимплантационный период. Такие данные свидетельствуют о эмбриотоксическом влиянии сверхмалых доз хлорида кадмия на экспериментальных животных (крысы) при внутрижелудочном введении кадмия в течение всего периода беременности.

Ключевые слова: эмбриогенез, эмбриональная смертность, хлорид кадмия, эксперимент.

UDC 616.61:591.3:546.48:612.6

Influence of Cadmium Chloride on the Indicators of Rat Embryogenesis in Intragastric Injection **Nefodova O. O., Azarov O. I.**

Abstract. There has been an expansion of using various cadmium compounds recently, which, together with a significant increase in the anthropogenic contribution to environmental contamination, has led to an

excess of the maximum allowable concentration of cadmium in some regions of our country and abroad in water, air and food. In the scientific literature there is a significant number of works dealing with the study of this toxicant influence in the postnatal period of ontogenesis, while the influence of cadmium on embryogenesis has not been studied enough.

The purpose of the study was the experimental determination of the effect of low doses of cadmium chloride on the overall course of embryogenesis in rats with intragastric administration.

Material and methods. A low dose of cadmium salt was chosen for the study, which can be compared with the actual concentration in daily diets of women, including pregnant women, in the industrial region. The dose for cadmium chloride was 1.0 mg / kg body weight.

According to the generally accepted instructions for carrying out the experimental work, a solution of cadmium chloride was administered to female rats enterally through the probe once a day, at the same time, from the first to the 19th day of pregnancy. During the solutions administration, we recorded the condition and behavior of females, the dynamics of body weight, rectal temperature, duration of pregnancy. We performed operative slaughter on the 13th and 20th days of pregnancy. The rats were withdrawn from the uterus, checked for a "live-dead" test, weighed, photographed and fixed in a 10% formalin solution for further histological examination.

Determination of the possible embryotoxic effect of cadmium chloride was carried out by calculating standard indices of embryonic development: number of fetuses, total embryonic mortality, pre-implantation embryonic mortality, and post-implantation embryonic mortality on 13th and 20th days of rat embryogenesis.

Results and discussion. The obtained results showed that in case of application the low doses of cadmium chloride, the average embryo count as compared to the control group on the 13th day of embryogenesis was reduced by 13.9% and on 20th day- by 14.8% (an average of 14.4%). This reduces not only the total number of fetuses, but also their mass and size in comparison with the control group, although without significant difference. The average index of the number of yellow bodies of pregnancy in the ovaries of females did not also have a significant difference, which does not contradict the literary scientific data.

The greatest changes were observed in terms of total embryonic mortality, which grew from 4.58% in the control group to 18.81% in the cadmium chloride group. In the control group, preimplantation mortality was absent on the 13th day of development, and in the experimental group it was the highest. The total embryonic death rate increased with cadmium chloride intoxication by 4.1 times ($p < 0.01$) due to overwhelming mortality in the preimplantation period.

Conclusions. The obtained data indicate the embryotoxic effect of ultrasmall doses of cadmium chloride on experimental animals (rats) with intragastric administration of cadmium throughout the gestation period.

Keywords: embryogenesis, fetal mortality, cadmium chloride, experiment.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 14.08.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування