

DOI: 10.26693/jmbs03.06.041

УДК 616.36-008:546.48:591.3

Нефьодова О. О., Білишко Д. В.

ЕМБРИОГЕНЕЗ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ЦИТРАТУ КАДМІЮ ПРИ ІЗОЛЬОВАНОМУ ВВЕДЕННІ ТА В КОМБІНАЦІЇ З ЦИТРАТОМ ГЕРМАНІЮ

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

verashatornaya67@gmail.com

Метою експериментального дослідження було дослідження впливу низьких доз цитрату кадмію на загальний хід ембріогенезу щурів при ізольованому введенні в низьких дозах та в комбінації з цитратом германію. Для моделювання впливу і токсичної дії експозиції кадмію протягом всієї вагітності самицям щурів лінії Wistar щодня через зонд вводили цитрат кадмію ізольовано (в дозі – 1,0 мг/кг) або в комбінації з цитратом германію (в дозі – 0,1 мг/кг).

Аналіз морфометричних показників проведеного експерименту показав ембріотоксичну дію цитрату кадмію при ентеральному введенні в низьких дозах, що виражається в зменшенні кількості ембріонів по відношенню до групи контролю на всіх термінах розвитку та підвищення рівня загальної ембріональної смертності.

Зниження показників ембріональної смертності та підвищення кількості ембріонів при комбінованому введенні цитрату кадмію з цитратом германію свідчить про модифікуючий вплив цитрату германію на токсичність кадмію.

Ключові слова: кадмій, германій, ембріотоксичність, ембріогенез, щури, експеримент.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана згідно теми кафедральної наукової роботи кафедри клінічної анатомії, анатомії та оперативної хірургії «Морфофункціональний стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», № держ. реєстрації 0117U003181.

Вступ. Проблема мікроелементозів сьогодні надзвичайно актуальна в усіх країнах світу, її розв'язання, за визначенням ВООЗ, є головним завданням у забезпеченні здоров'я населення Землі в ХХІ ст. [2, 4]. І якщо при гіпомікроелементозах, зумовлених дефіцитом есенціальних мікроелементів, розвиваються хвороби недостатності, то при різноманітних формах контакту організмів з токсичними мікроелементами виникає синдром інтоксикацій – токсикопатій. Мікроелементний дефіцит ніколи не буває ізольованим, він завжди пов'язаний із

мікроелементним дисбалансом і виявляється порушеннями різних видів обміну з відповідними морфологічними проявами [3, 5, 6]. Нині більшість фахівців зазначають, що вирішити проблему мікроелементозів лише за допомогою корекції харчового раціону неможливо, а тому постає надзвичайно актуальне питання безпечного та надійного джерела мікроелементів для організму людини. Проте розроблення нових засобів для корекції та лікування мікроелементного дисбалансу стримується недостатністю знань про особливості обміну мікроелементів в організмі здорових людей та норми добової потреби в них в умовах підвищеного техногенного навантаження, а також даних щодо балансу, форм і видів взаємодії мікроелементів та ультрамікроелементів у разі їх одночасного надходження [1, 8, 9].

В останні роки відбулося розширення сфери використання різних сполук кадмію і значне збільшення антропогенного вкладу до забруднення ними навколишнього середовища, в результаті чого вміст кадмію в атмосферному повітрі, продуктах харчування та об'єктах господарсько-питного водопостачання перевищує допустимі нормативи в ряді регіонів нашої країни і за кордоном. Саме тому увагу науковців привертають дослідження наслідків впливу важких металів в концентраціях, які раніше вважалися безпечними, проте збільшують ризик ураження плода та новонародженого. У ряді експериментальних робіт відмічається комплекс змін в будові і функції паренхіматозних органів ембріону при дії свинцю, кадмію, ртуті [7, 9]. Але питання взаємодії мікроелементів під час вагітності та їх опосередкований вплив на ембріон залишається відкритим як і пошук нових біоантогоністів токсичним речовинам.

Германій – мікроелемент, який у людини підвищує ефективність імунної системи організму, бореться з онкозахворюваннями, зменшує больові відчуття. Добова потреба організму людини – 0,4–1,5 мг, цей елемент добре абсорбується організмом (близько 95%) і відносно рівномірно розподіляється по органах і тканинах (як в позаклітинних,

так і внутрішньоклітинних просторах), виводиться з організму переважно з сечею (90%). В організмі людини органічний германій володіє широким спектром біологічної активності: має антигіпоксичну дію – забезпечує перенесення кисню до тканин організму і, переносячи кисень, попереджає розвиток кисневої недостатності на тканинному рівні, зменшує ризик розвитку так званої кров'яної гіпоксії, що виникає при зменшенні гемоглобіну в еритроцитах; стимулює імунітет, пригнічуючи процеси розмноження мікробних клітин, активуючи макрофаги і специфічні клітини імунітету; має протигрибкові, противірусні та антибактеріальні властивості (стимулює продукування інтерферону для захисту від чужорідних мікроорганізмів); є потужним антиоксидантом – блокує вільних радикалів в організмі. Останні експериментальні дослідження довели, що цей мікроелемент продовжує життя лабораторних тварин на 25–30%. [10, 11, 12]

Все вищевикладене свідчить про необхідність проведення вивчення морфогенетичних змін, що відбуваються в ембріогенезі зародків щура та на ранніх стадіях після народження при впливі сполук кадмію як при ізольованому введенні так і при комбінованому з цитратом германію.

Мета дослідження – експериментально дослідити вплив низьких доз цитрату кадмію на загальний хід ембріогенезу щурів ізольовано та в комбінації з цитратом германію.

Матеріали і методи дослідження. Для моделювання впливу і токсичної дії експозиції кадмію протягом всієї вагітності самицям щурів лінії Wistar щодня рег ос через зонд вводили цитрат кадмію ізольовано (в дозі – 1,0 мг/кг) або в комбінації з цитратом германію (в дозі – 0,1 мг/кг). Нами обрали дози, що наближаються до тих, які можуть надходити в організм із навколишнього середовища. Відповідно до умов і вимог проведення ембріональних експериментів ми забезпечили повноцінний харчовий раціон, воду для пиття і ретельний догляд самицям; введення розчинів металів проводили з першого дня вагітності щоденно в один і той же час доби (з 10 до 12 години).

Для ембріонального дослідження отримували самиць з датованим терміном вагітності, використовуючи метод вагінальних мазків. Перший день вагітності встановлювали на підставі виявлення сперматозоїдів у вагінальному мазку. 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 здат-

ністю підвищувати рівень ембріональної смертності (ембріолетальний ефект) та викликати зовнішні та структурні вади розвитку внутрішніх органів (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 досліджуваних речовин 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 =

$$ПІС = \frac{B - (A + Б)}{B},$$

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

3. Постімплантаційна смертність =

$$ПостІС = \frac{Б}{A + Б},$$

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

4. Кількість плодів на 1 самку.

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. Постімплантаційну смертність визначали за різницею міст імплантації в рогах матки та кількістю ембріонів.

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

Дослідження на тваринах проводили у віварію ДМА відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджуються з Європейською конвенцією про захист експериментальних тварин (Страсбург, 1985). В експериментальних моделях використовували розчин цитрату германію, отриманого за аквананотех-

нологією [Науково-дослідний інститут нанобіотехнологій та ресурсозбереження України, м. Київ].

Результати дослідження та їх обговорення.

Аналіз результатів дослідження показав, що у контрольній групі всі ембріони відповідали стандартним критеріям ембріонального розвитку щура. Зовнішній огляд плодів групи ізольованого введення цитрату кадмію та комбінованого введення кадмію з цитратом германію не виявив формування зовнішніх каліцтв, тобто тератогенного ефекту агенти впливу в зазначеній дозі та способу введення не мають. Обрахування середніх показників ембріогенезу продемонструвало, що в групі ізольованого впливу цитрату кадмію спостерігалось зменшення кількості ембріонів та жовтих тіл вагітності в яєчниках самиць на обох термінах вагітності та збільшення загальної ембріональної смертності (таблиця).

Так, в дослідній групі впливу цитрату кадмію на досліджуваних термінах вагітності кількість живих плодів знижується відносно групи контролю в наступному порядку: 13 доба вагітності на 11,1%, 20 доба вагітності на 13,7%, що супроводжувалось зменшенням вагових показників ембріонів: на 13 добі ембріогенезу (-16,7%) та 20 добі ембріогенезу (-7,3%). В групі експозиції кадмієм показник доімплантаційної смертності перевищував значення контрольної групи ($p < 0,01$), відмічали наявність плаценти за відсутності ембріона в матці – постімплантаційну смертність, що свідчило про ембріотоксичний вплив цитрату кадмію на ембріон після процесу імплантації.

В дослідній групі комбінованого введення кадмію та германію спостерігалась тенденція до збільшення кількості живих плодів на одну самицю (навіть недостовірною перевищення показників

контролю) у порівнянні із групою, яка впродовж вагітності отримувала цитрат кадмію ізольовано (таблиця).

Порівняльний аналіз кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках самиць показав, що в групі тварин, які отримували цитрат кадмію цей показник дорівнював показнику з контрольної групи на 13 добу та на 20 добу гестації зменшувався на 1,35%, що свідчить про гонадотоксичну дію кадмію при довгостроковому впливі. Така ситуація пояснює збільшення як загальної ембріональної смертності більш ніж у 3 рази так і до- та післяімплантаційної смертності ембріонів, тобто цитрат кадмію має виражену ембріотоксичну дію в експерименті на щурах.

В групі комбінованого введення кадмію та германію гонадотоксична та ембріотоксична дія кадмію виразно зменшувалась, що свідчить про модифікуючий вплив цитрату германію на токсичність цитрату кадмію в експерименті на щурах.

Показник загальної ембріональної смертності в групі ізольованого введення цитрату кадмію складав $15,76 \pm 2,70$ на 13-й добі ембріогенезу та $17,10 \pm 1,63$ на двадцятій. Та ж сама доза кадмію при введенні з германієм призводила до зниження загальної ембріональної смертності у щурів до $10,13 \pm 1,76$ на 13-й добі та до $9,41 \pm 1,38$ на 20-й. Різниця отриманих нами в експерименті масометричних показників ($p > 0,05$) розцінювалась нами як адаптаційно-компенсаторне пристосування організму вагітної самиці до забезпечення кращого живлення плодів в умовах впливу шкідливого дестабілізуючого фактору. Такі дані свідчать про зменшення ембріотоксичності кадмію цитратом германію, таким чином цитрат кадмію можна розглядати як новий біоантогоніст кадмію.

Таблиця – Показники ембріонального розвитку щурів в нормі та в експерименті при впливі цитрату кадмію при ізольованому та комбінованому введенні з цитратом германію

Показник	Контроль		Дослідна група ізольованого впливу цитрату кадмію		Дослідна група комбінованого впливу цитрату кадмію+цитрат германію	
	13 доба	20 доба	13 доба	20 доба	13 доба	20 доба
Кількість живих плодів на 1 самицю	9,00±0,53	9,13±0,53	8,00±0,27*	7,88±0,27	8,88±0,80	9,63±0,53
Кількість жовтих тіл вагітності на 1 самицю	9,50±0,40	9,63±0,40	9,50±0,40	9,50±0,40	9,88±0,66	10,63±0,66
Загальна ембріональна смертність, %	5,26±0,31	5,19±0,07	15,76±2,70**	17,10±1,63**	10,13±1,76**	9,41±1,38**
Передімплантаційна смертність, од	–	0,01±0,07	0,07±0,04**	0,08±0,04**	0,01±0,10	0,04±0,08**
Постімплантаційна смертність, од	0,05±0,01	0,04±0,01	0,10±0,03**	0,10±0,03**	0,09±0,03*	0,06±0,01*

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

Висновки. Аналіз морфометричних показників проведеного експерименту наявно показав ембріотоксичну дію цитрату кадмію при ентеральному введенні в низьких дозах, що виражається в зменшенні кількості та маси ембріонів по відношенню до групи контролю на всіх термінах розвитку.

Зниження показників ембріональної смертності на всіх стадіях гестації в експерименті при комбінованому введенні цитрату кадмію з цитратом герма-

нію свідчить про попередження цитратом германію негативного впливу цитрату кадмію.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується проведення гістологічних досліджень паренхіматозних органів ембріонів, що підлягали впливу сполукам кадмію та цитрату германію, що допоможе виявити зміни на тканинному рівні та можливо буде пояснювати рівень ембріональної смертності.

References

1. Biletska EM. Gigiyenichna otsinka mikroelementnogo zabezpechennya naselennya Dnipropetrovskoyi oblasti ta yogo vplyv na reproduktyvne zdorov'ya. *Aktualni pytannya gigiyeny ta ekologichnoyi bezpeky Ukrainy: za tez doi nauk-prakt konf.* K; 2011: 132–3. [Ukrainian]
2. *Globalnaya strategyya VOZ po pytanyyu, fizycheskoy aktyvnosti y zdorov'yu: Rukovodstvo dlya stran po monytoringu y otsenke osushchestvlenyya.* VOZ; 2009. 47 s. [Russian]
3. Dynerman AA. Rol zagryaznyteley okruzhayushchey sredy v narushenyy embryonalnogo razvytyya. M: Medytsyna; 1980. 191 s. [Russian]
4. Skalnyy AV, Zaytseva YP, Tynkov AA. *Mykroelementy y sport. Personalizyrovannaya korrektsyya elementnogo statusa sportsmenov: monografyya.* Ed by AV Skalnyi. M: Sport; 2018. 288 s. [Russian]
5. Pykhiteeva EG, Shafran LM, Bolshoy DV. Systemnyy podkhod k problemam transporta y byologicheskoy roly metallov v zhyvykh organizmakh. *Aktualnye problemy transportnoy medytsyny.* 2016; 4(46): 7-20. [Russian]
6. Paranko NM, Rublevskaya NY, Belytskaya EN, y dr. Rol tyazhelykh metallov v vozniknovenyy reproduktyvnykh narushenyy. *Gygyena y sanytariya.* 2002; 1: 28-30. [Russian]
7. Setko NP, Zakharova EA. Kynetyka metallov v systeme mat-plod-novorozhdenny pry tekhnogennom vozdeystvyy. *Gygyena y sanytariya.* 2008; 6: 65-7. [Russian]
8. Trakhtenberg IM. *Knyga pro otruty ta otruyennyya. Narysy toksykologiyi.* Ternopil: TDMU; 2008. 364 s. [Ukrainian]
9. Shafran LM, Pykhiteeva EG, Bolshoy DV. Toksykologyya metallov v reshenyy zadach okhrany zdorovya naselennyya y okruzhayushchey sredy. *Prychernomorskiy ekologichnyy byulleten.* 2003; 1(7): 935-1000. [Russian]
10. Asai K. *Miracle Cure: Organic Germanium.* New York: Japan Publications; 1980. 139 p.
11. Brutkiewicz RR, Suzuki F. Biological activities and antitumor mechanism of an immunopotentiating organogermanium compound, Ge-132. *In Vivo.* 1987; 1(4): 189–203. PMID: 2979786
12. Mironov VF, Berliner EM, Gar TK. Reactions of trichlorogermane with acrylic acid and its derivatives. *Zhurnal Obshchei Khimii.* 1967; 37: 911–2.

УДК 616.36-008:546.48:591.3

ЭМБРИОГЕНЕЗ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИТРАТА КАДМИЯ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ ВВЕДЕНИИ И В КОМБИНАЦИИ С ЦИТРАТОМ ГЕРМАНИЯ

Нефедова Е. А., Билишко Д. В.

Резюме. Целью экспериментального исследования было исследование влияния низких доз цитрата кадмия на общий ход эмбриогенеза крыс при изолированном введении и в сочетании с цитратом германія. Для моделирования влияния и токсического действия экспозиции кадмия на протяжении всей беременности самкам крыс линии Wistar ежедневно через зонд вводили цитрат кадмия изолированно (в дозе – 1,0 мг / кг) или в комбинации с цитратом германія (в дозе – 0,1 мг / кг) .

Анализ морфометрических показателей проведенного эксперимента показал эмбриотоксическое действие цитрата кадмия при энтеральном введении в низких дозах, что выразилось в уменьшении количества эмбрионов по отношению к группе контроля на всех сроках развития и повышении уровня общей эмбриональной смертности.

Снижение показателей эмбриональной смертности и увеличение количества эмбрионов при комбинированном введении цитрата кадмия с цитратом германія свидетельствует о модифицирующем влиянии цитрата германія на токсичность кадмия.

Ключевые слова: кадмий, германий, эмбриотоксичность, эмбриогенез, крысы, эксперимент.

UDC 616.36-008:546.48:591.3

**Embryogenesis of Rats under the Influence of Cadmium Citrate
in Isolated Introduction and in Combination with Germanium Citrate**

Nefodova O. O., Bilishko D. V.

Abstract. The problem of microelementosis today is extremely relevant in all countries of the world, its solution, as defined by WHO, is the main task of providing the health of the Earth's population in the XXI century. In recent years, there occurred an expansion of using various compounds of cadmium and a significant increase in anthropogenic contribution to pollution of the environment. It resulted in the content of cadmium compounds in the air, food and objects of household and drinking water supply exceeds the permissible standards. It is known that germanium is a trace element that increases the effectiveness of the human body's immune system, fights with cancer, reduces pain, and has a wide range of biological activity. Moreover, it has antihypoxic action providing oxygen transfer to the tissues of the body and, by transferring oxygen, prevents the development of oxygen deficiency on tissue level, reduces the risk of developing the so-called blood hypoxia, stimulates immunity, and is a powerful antioxidant – a blocker of free radicals in the body.

The purpose of the experimental study was to investigate the effect of low doses of cadmium citrate on the overall course of embryogenesis in rats at isolated doses and in combination with germanium citrate. To simulate the effects and toxic effects of exposure to cadmium throughout pregnancy, female Wistar rats received cadmium citrate daily (through a probe) (in a dose of 1.0 mg / kg) or in combination with germanium citrate (at a dose of 0.1 mg / kg).

Results and discussion. The analysis of the morphometric indices of the experiment showed the embryotoxic effect of cadmium citrate upon enteral administration in low doses, which is expressed in the decrease of the number of embryos and their mass in relation to the control group at the studied terms of development and increase of the level of general embryonic mortality. In the group of exposure to cadmium citrate, the number of live embryos was reduced relative to the control group in the following order: 13 days of gestation by 11.1%, 20 days of pregnancy by 13.7%. It was accompanied by a decrease in the weight of embryos: on the 13th day of embryogenesis it was (–16.7%) and on the 20th day of embryogenesis it was (–7.3%). The preimplantation mortality rate was greater than the control group under the exposure to cadmium. We noticed the presence of placenta in the absence of an embryo in the uterus – post-implantation mortality, indicating the embryotoxic effect of cadmium citrate on the embryo after the implantation process.

Conclusions. The decrease in the rates of embryonic mortality and the increase in the number of embryos in combination with the introduction of cadmium citrate with germanium citrate indicates the modifying effect of germanium citrate on cadmium toxicity.

Keywords: cadmium, germanium, embryotoxicity, embryogenesis, rat, 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 03.08.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування