

Моделювання ПОГЖШ проводилося на 36 шухрах шляхом перев'язки і перетину загальної жовчної протоки. Тварин виводили з експерименту на 3, 7, 14, 21, 28 і 35 добу. Проводили гістологічне та морфометричне дослідження печінки. Патологічні зміни печінки носили наростаючий характер з піком летальності (7 з 11 загиблих тварин) на останні два тижні експерименту і характеризувалися: проліферацією жовчних протоків, проліферацією і гіперплазією гепатоцитів, збільшенням кількості синусоїдальних клітин, фіброзуванням з повною втратою нормальної гістоархітеконики печінки і заміщенням її паренхіми проліферуючими жовчними протоками. Морфологічними ознаками, які передують декомпенсації функції печінки, що супроводжується піком летальності при ПОГЖШ, є максимальні значення об'ємної щільності порталних зон і синусоїдно-гепатацитарного числа, зниження після попереднього максимуму ядерно-цитоплазматичного відношення гепатоцитів, що відповідно відображає максимальну проліферативну активність жовчних протоків і активність синусоїдальних клітин на тлі зниження проліферативної здатності гепатоцитів.

Ключові слова: експериментальний холестаз, повна обструкція жовчних шляхів, морфологія печінки, морфометрія.

Стаття надійшла 17.10.18 р.

летальності. Моделирование ПОВЖШ проводилось на 36 крысах путем перевязки и пересечения общего желчного протока. Животных выводили из эксперимента на 3, 7, 14, 21, 28 и 35 сутки. Проводили гистологическое и морфометрическое исследования печени. Патологические изменения печени носили нарастающий характер с пиком летальности (7 из 11 погибших животных) последние две недели эксперимента и характеризовались: пролиферацией желчных протоков, пролиферацией и гиперплазией гепатоцитов, увеличением количества синусоидальных клеток, фиброзированием с полной потерей нормальной гистоархитектоники печени и замещением ее паренхимы пролиферирующими желчными протоками. Морфологическими признаками, которые предшествуют декомпенсации функции печени, сопровождающейся пиком летальности при ПОВЖШ, являются максимальные значения объемной плотности порталных зон и синусоидально-гепатацитарного числа, снижение после предыдущего максимума ядерно-цитоплазматического отношения гепатоцитов, соответственно отражает максимальную пролиферативную активность желчных протоков и активность синусоидальных клеток на фоне снижения пролиферативной способности гепатоцитов.

Ключевые слова: экспериментальный холестаз, полная обструкция желчных путей, морфология печени, морфометрия.

Рецензент Старченко І.І.

DOI 10.26724/2079-8334-2019-1-67-166

УДК 611.12/13-053.13:616-007.7-092.9:669.018.674

О.О. Нефьодова, *Г.А. Єрошенко, І.П. Залесенець, В.Ф. Шаторна,
О.О. Нефьодов, О.В. Кузнецова
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро,
*Українська медична стоматологічна академія, Полтава

ВПЛИВ НИЗЬКИХ ДОЗ КАДМІЮ ЦИТРАТУ НА КАРДІОГЕНЕЗ ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ

E-mail: elenanefedova1803@gmail.com

Кадмій - це один з небагатьох токсичних важких металів, фізіологічна функція якого в організмі людини на теперішній не встановлена. Cd проявляє свій токсичний вплив при дуже низьких концентраціях і має гострий і хронічний вплив на стан здоров'я. Метою дослідження було експериментальне визначення впливу низьких доз кадмію цитрату на морфометричні показники серця ембріона, передсердно-шлуночкові клапани та коронарні судини при внутрішньошлунковому введенні вагітним самицям щура. Доза цитрату кадмію складала 1,0 мг/кг маси тіла. Експериментально визначено, що вплив цитрату кадмію в зазначеній дозі призводить до зменшення обсягу ендокардіальних подушок передсердно-шлуночкового каналу та зниження кардіофетального індексу у ембріонів щура. В той же час спостерігається збільшення діаметру вінцевих артерій на 11,3%.

Ключові слова: кардіогенез, ембріон щура, ендокардіальні подушки серця, цитрат кадмію.

Робота є фрагментом НДР «Морфофункціональний стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», № державної реєстрації 0117U003181.

Не зважаючи на комплексний підхід у вирішенні питань забруднення навколишнього середовища, зазначена проблема на теперішній момент залишається актуальною. Серед поллютантів біосфери, що представляють найбільшу зацікавленість для різних установ контролю її якості, метали (особливо важкі, тобто такі, що мають атомну вагу більше 40) відносяться до групи найважливіших. Більш за все це пов'язано з біологічною активністю та властивостями багатьох з них. Вплив металів на організм людини і тварин, їх фізіологічна дія є різними і залежить від виду металу, типу з'єднання, в якому він знаходиться в оточуючому середовищі, а також його концентрації. Серед важких металів одні є вкрай необхідними для життя людини і інших живих організмів і належать до так званих біогенних елементів. Інші мають протилежну дію і, при надходженні до живого організму, викликають його отруєння або загибель. Ці метали відносять до класу ксенобіотиків, тобто чужих для живих організмів. Спеціалістами з захисту навколишнього середовища серед металів-токсикантів виділена пріоритетна група. До неї належать кадмій, мідь,

миш'як, нікель, ртуть, свинець, цинк і хром як найбільш небезпечні для здоров'я людини і тварин. Серед них ртуть, свинець і кадмій мають найбільш виражену токсичну дію [2, 3]. Кадмій - це один з небагатьох токсичних важких металів, фізіологічна функція якого в організмі людини на теперішній час не встановлена. Cd проявляє свій токсичний вплив при дуже низьких концентраціях і має гострий і хронічний вплив на стан здоров'я. Найбільш небезпечна властивість Cd полягає в тому, що він може акумулюватись в організмі людини протягом усього життя. Cd властивий довгий біологічний період напіврозпаду в організмі - впродовж 17-30 років [8].

Концентрація кадмію в об'єктах навколишнього середовища (грунт, повітря, вода) постійно збільшується у зв'язку зі зростанням техногенного навантаження. На теперішній час кадмій широко застосовується у промисловому виробництві сплавів, електротехнічній промисловості [4, 12]. Спектр токсичних ефектів кадмію досить широкий та залежить від багатьох факторів, особливо від експозиції. Результатом впливу високих доз сполук кадмію є гострі ураження легень, печінки, нирок, репродуктивних органів. За умов хронічної інтоксикації цей метал демонструє переважно нефротоксичну, імунотоксичну, кардіотоксичну та остеотоксичну дію [5, 7, 9].

Головними шляхами надходження кадмію до внутрішнього середовища організму людини є інгаляційний та пероральний. Засвоєння кадмію при вдиханні забрудненого повітря коливається в межах 10-50% та має залежність від розміру часток. Поглинання через шкіру дуже низьке. Пероральним шляхом абсорбується від 5 до 10%. Кишкова абсорбція кадмію у людини може зростати за умов дефіциту заліза, кальцію або цинку [13]. Тютюновий дим також представляє собою значуще джерело надходження цього металу до організму. Кількість кадмію в крові курців в 2-3 рази вища, ніж у людей, що не палять [6].

Прогрес нанотехнологій призвів до широкого використання особливих форм важких металів, а саме наночастинок. Кадмієвмісні наноматеріали мають широке застосування в багатьох сучасних галузях. Наприклад, в електроніці: при виготовленні фотоелементів, сонячних батарей, фото- і світлодіодів. В медицині – для діагностики («квантові точки»). Фізико-хімічні властивості цих форм важких металів при потрапленні в організм суттєво відрізняються від звичайних солей останніх [10, 11]. В даних літератури зустрічається велика кількість наукових робіт, присвячених дослідженню впливу різних форм кадмію-вмісних сполук в постнатальному періоді [3, 13], в той час як вплив кадмію та його форм на хід ембріогенезу вивчено недостатньо.

Метою роботи було експериментальне визначення впливу низьких доз кадмію цитрату (наноаквахелатна форма кадмію) на морфометричні показники серця ембріона (передсердно-шлуночкові клапани та коронарні судини) при внутрішньошлунковому введенні вагітним самицям щура.

Матеріал та методи дослідження. Експеримент проведено на молодих самицях щурів лінії Wistar (розплідник «Далі 2000», м. Київ). Вибір щурів, як об'єкту дослідження, обумовлений низьким рівнем спонтанних вад розвитку (0,02-0,85%) порівняно з мишами (0,04-15,7%) та кролями (0,74-4,2%) [1]. На підготовчому етапі експерименту досліджували естральний цикл самиць методом піхвових мазків, що дало можливість визначити у кожній самиці тривалість циклу та окремих його фаз, наявність усіх 4 фаз циклу та ритмічність їх чергування. Для подальшого дослідження можливої ембріотоксичної дії самок вагою 170-200 г із стійким ритмом естрального циклу на стадіях проєструс і еструс 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 цитрату кадмію самок щурів піддавали з 1-го по 19-й день вагітності. Для дослідження ембріотоксичного впливу кадмію обрано цитрат кадмію. Оскільки Cd є одним з найпоширеніших токсикантів довкілля промислових регіонів України та впливає на якість гамет та на перебіг вагітності за даними літератури. Для проведення досліджень обрано низьку дозу солі кадмію, яка відображає реальну концентрацію в добових раціонах жінок, в тому числі вагітних промислового регіону. Доза цитрату кадмію складала 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-го 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.

Половину плодів фіксували в 10% розчині формаліну для морфологічних та морфометричних досліджень. Другу половину заморожували для подальшого визначення

вмісту важких металів в ембріонах інверсійно-вольтамперометричним методом. Ембріони щурів, отриманих на 13 день вагітності використовували цілком, а у 20-денних плодів виділяли серце для подальших морфометричних та гістологічних досліджень. Цілі ембріони (13-й день розвитку), та отримані серця ембріонів (20-й день розвитку) заливали у парафінові блоки згідно загальноприйнятих методик. Серійні зрізи товщиною 4-6 мкм після депарафінізації забарвлювали з використанням гематоксилін-еозину та залізного гематоксиліну Гейденгайна.

На забарвлених зрізах 13-тиденних ембріонів досліджували будову атріовентрикулярного каналу, для 20-тиденних плодів проводили також визначення наступних морфометричних параметрів:

- вагові показники ембріона в цілому (волога вага) в нормі та при впливі цитрату кадмію (мг), $M \pm m$;
- вагові показники ізольованого серця ембріона (волога вага) в нормі та при впливі цитрату кадмію (мг), $M \pm m$;
- кардіофетальний індекс (%), $M \pm m$, який розраховувався нами за формулою:

$$KFI = \frac{m}{M} \times 100\%$$

- де КФІ – кардіофетальний індекс; m – маса серця; M – маса ембріона щура.

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики. Оцінку вірогідності відмінностей отриманих морфометричних показників між групою контролю та групою кадмію цитрату проводили за допомогою t-критерію Ст'юдента.

Дослідження виконувались у відповідності до принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000р.), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997р.), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983р.), «Загальним етичним принципам експериментів над тваринами», що затверджені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.) згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» (Страсбург, 18.03.1986р.).

Результати дослідження та їх обговорення. Під час утворення сигмоподібного серця, послідовно починаються процеси септації, яким передують процеси утворення ендокардіальних подушок і ендокардіальних гребенів, пов'язані з накопиченням і редукцією кардіогеля і епітеліально-мезенхімальними перетвореннями, процесами делямінації (розшарування) міокарда шлуночків і розподілу загального атріовентрикулярного каналу. Епітеліально-мезенхімальна трансформація є багатоступеневим процесом, контрольованим багатьма генами різних сигнальних шляхів, під впливом сигналів з мікрооточення або навіть зовнішнього середовища. В кардіогенезі і розвитку ембріона цей процес відіграє ключову роль в етапі формування мезенхіми і підтримки фенотипу мезенхімальних клітин. Формування ендокардіальних подушок відбувається на 13-15 стадії розвитку (за Гамбургером і Гамільтоном) ембріона щура. Спочатку свого утворення ендокардіальні подушки виповнені кардіогелем, потім поступово відбувається заповнення ендокардіальних подушок мезенхімними клітинами, що утворюються завдяки епітеліально-мезенхімальним трансформаціям з ендотелію самих подушок. Послідовне і своєчасне заселення мезенхімними клітинами провізорних атріовентрикулярних клапанів може бути непрямим показником нормального ходу кардіогенезу і формування в подальшому клапанного апарату серця щура.

На 13-й добі ембріогенезу щура (що відповідає 16 стадії розвитку ембріона за Гамбургером та Гамільтоном) ми спостерігали ендокардіальні подушки атріовентрикулярного каналу серця ембріонів, що вже були заповнені мезенхімними клітинами. Заселення мезенхімними клітинами відбувається паралельно редукції кардіогелю в подушках. Ступінь заселення клітинами обсягу подушки також може бути критерієм нормальності перебігу кардіогенезу. Як відомо, виділяється три зони ендокардіальної подушки по ступіню заселення клітинами мезенхіми: субендокардіальна зона – зона утворення мезенхімних клітин, які розташовані досить щільно; середня зона подушки, в якій мезенхімні клітини мають класичну зірчасту форму, рівень щільності клітин незначний; субепікардіальну зону, в якій найдовше зберігаються залишки кардіогелю, кількість клітин мезенхіми найнижча. Саме такий розподіл мезенхімних клітин ми спостерігали в контрольній групі в ендокардіальних подушках атріовентрикулярного каналу (рис.1). В групі впливу цитратом кадмію

морфологія ендокардіальних подушок суттєво відрізнялась: площа подушок була зменшена, а розподіл мезенхімних клітин не відповідав щільності зон подушок в контрольній групі (рис.1).

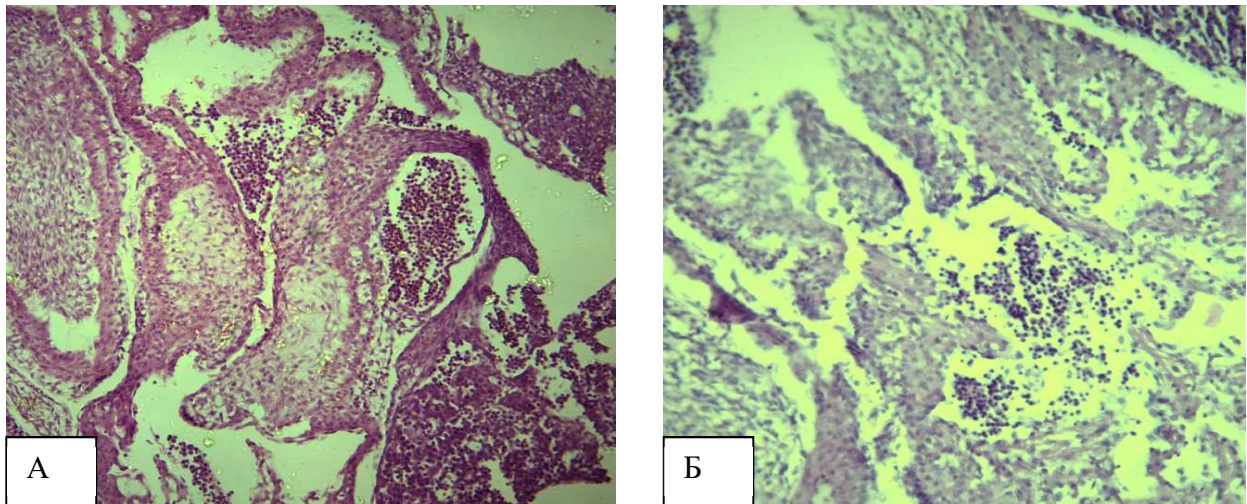


Рис.1. Мікрофотографія атріовентрикулярного каналу ембріонального серця щура 13-ї доби розвитку. А. - Контрольна група. Б - Група впливу цитратом кадмію. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Зб.: x100.

Таким чином, введення цитрату кадмію не змінило сам процес епітеліально-мезенхімних трансформацій в ендокардіальних подушках атріовентрикулярного каналу ембріонального серця, проте прискорило редукцію кардіогелю, що призвело до зменшення обсягу подушок та порушення щільності розташування клітин мезенхіми. У зв'язку з тим, що ендокардіальні подушки атріовентрикулярного каналу є провізорними органами для утворення стулок клапану, зменшення їх обсягу могло призводити до порушень гемодинаміки серця. На цьому етапі ембріогенезу міокард серця ще не містить судин, кровопостачання здійснюється з порожнини серця, тому сформованих судин ми не спостерігали.

При зовнішньому огляді вилучених сердець ембріонів 20-ї доби розвитку (22 стадія розвитку ембріона за стандартами Гамбургера і Гамільтона) нами не виявлено зовнішніх вад розвитку серця. Масометричні показники серця ембріонів групи впливу цитратом кадмію в порівнянні з контрольною групою продемонстрували не тільки зменшення маси самих ембріонів, а й недостовірне зменшення маси серця на 20-й добі ембріогенезу. Аби виключити похибки щодо впливу зниження маси ембріонів та маси сердець на показники кардіотоксичності, нами обраховувався кардіофетальний індекс, що в нормі становив $1,23 \pm 0,02\%$, а в групі впливу цитратом кадмію дорівнював $1,22 \pm 0,06\%$. Таку незначну різницю ми пояснюємо тим, що дослідженню підлягали тільки ембріони, що пережили вплив чинника. Слід зазначити, що кількість живих плодів на 1 самицю у групі контролю становила $9,50 \pm 0,13$, а в групі кадмієвого впливу достовірно знижувалась до $8,75 \pm 0,27$. Важливим, на наш погляд, є і той факт, що ми проводили вплив саме цитратом кадмію, а цитрати металів більш безпечні, ніж інші солі того ж металу, більше того, вони здатні проявляти антиоксидантну дію, позитивно впливаючи на серцево-судинну і імунну системи організму.

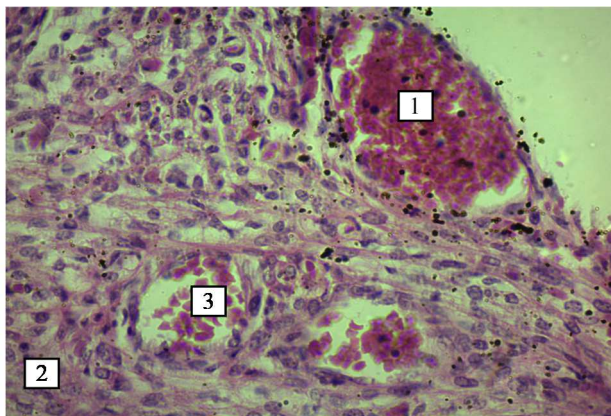


Рис. 2. Мікрофотографія судин серця ембріона щура 20-ї доби розвитку групи впливу цитратом кадмію. Позначення. 1 – вінцева артерія; 2 – міокард; 3 – судини міокарду шлуночка. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Зб.: x100.

На 20-й добі кардіогенезу в міокарді шлуночків спостерігались судини різного калібру, що були найбільш розвиненими в зоні компактного міокарду. Судини субепікардіальної поверхні мали найбільший діаметр, що логічно пояснити фізіологічними потребами міокарда, який вже не має контакту з кров'ю порожнини серця. Вінцеві артерії наприкінці ембріогенезу не є повністю сформованими, їх остаточний розвиток, як і кінцеве формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів, відбувається після народження. В обох групах експериментальних тварин ми спостерігали формування вінцевих артерій в субепікардіальній зоні атріовентрикулярної борозни (рис. 2).

Аналіз отриманих результатів довів, що при впливі кадмію цитрату діаметр вінцевих артерій був більший на 11,3% від контрольної групи, як і їх ступінь кровонаповнення, що може свідчити про опосередковану гіпоксичну дію цитрату кадмію на організм ембріона.

Щаєумон

Вплив цитрату кадмію в зазначеній дозі призводить до зменшення обсягу ендокардіальних подушок передсердно-шлуночкового каналу та зниження кардіофетального індексу у ембріонів щура. В той же час спостерігається збільшення діаметру вінцевих артерій на 11,3%.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним, на наш погляд, є дослідження впливу сполук кадмію на кардіогенез з використанням імуногістохімічних маркерів для визначення зрушень базових гістогенетичних процесів.

Список літератури

1. Avtsyn AP, Zhavoronkov AA, Rish M A. Mikroelementozy cheloveka. M.: Meditsina; 1991:496 s. [in Russian]
2. Budnikov VG. Tyazhelye metally v monitoringe vodnykh ekosistem. Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal. 1998;5:24-9 [in Russian]
3. Trakhtenberg IM, Kolesnikov SV, Lukovenko VP. Tyazhelye metally vo vneshney srede. Sovremennyye gigiyenicheskiye i toksikologicheskiye aspekty. Minsk. 1994. 123 p. [in Russian]
4. Fomenko OZ, Shaulskaya OE, Kot YG, Ushakova GA, Shevtsova AI. Vliyanie raznykh doz kadmiya na aktivnost' matriksnykh metalloproteinaz v serdtse, mozge i syvorotke krovi krysa. Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2016;3:103-7. [in Russian]
5. Åkesson A, Barregard L, Bergdahl IA, Nordberg GF, Nordberg M, Skerfving S. Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure. Environmental Health Perspect. 2014; 122(5):431-8.
6. Batariova A, Spevackova V, Benes B, Cejchanovaa M, Smida J, Cerna M. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. Int. J. Hyg. Environ. Health [Internet]. 2006 [cited 2018 July 17]; 209(4): 359–366.
7. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J. Occupational Med. Toxicol [Internet]. 2006 [cited 2018 July 17]; 1:22-28.
8. Järup L, Åkesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. Toxicol Appl Pharmacol [Internet]. 2009 [cited 2018 July 17];238(3):201-8.
9. Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. Scand. J. Work, Environment & Health. 1998; 24(1):1-52.
10. Kozhevnikova NS, Vorokh AS, Urtskaya AA. Cadmium sulfide nanoparticles prepared by chemical bath deposition. Russian Chemical Reviews. 2015; 84(3): 225-50.
11. Liu L, Sun M, Li Q, Zhang H, Alvarez PJ, Liu H, et al. Genotoxicity and Cytotoxicity of Cadmium Sulfide Nanomaterials to Mice: Comparison Between Nanorods and Nanodots. Environmental Engineering Science. 2014; 31(7): 373-80.
12. Montes S, Juárez-Rebollar D, Nava-Ruiz C, Garcia-Sánchez A, Heras-Romero Y, Rios C et al., "Immunohistochemical Study of Nrf2-Antioxidant Response Element as Indicator of Oxidative Stress Induced by Cadmium in Developing Rats," Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2015 [cited 2018 July 17]; 2015:9.
13. Robin A. Bernhoft. Cadmium Toxicity and Treatment. Scientific World Journal [Internet]. 2013 [cited 2018 July 17]; 2013:7.

Реферати

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ДОЗ КАДМИЯ ЦИТРАТА НА КАРДИОГЕНЕЗ ЭМБРИОНОВ КРЫС **Нефедова Е.А., Ерошенко Г.А., Задесенец И.П., Шаторная В.Ф., Нефедов А.А., Кузнецова Е.В.**

Кадмий - один из немногих токсичных тяжелых металлов, физиологическая функция которого в организме человека в настоящее время не установлена. Cd проявляет свое токсическое воздействие при очень низких концентрациях и имеет острое и хроническое влияние на состояние здоровья. Целью исследования было экспериментальное определение влияния низких доз кадмия цитрата на морфометрические показатели сердца эмбриона, предсердно-желудочковые клапаны и коронарные сосуды при внутрижелудочном введении беременным самкам крыс. Доза по цитрату кадмия составляла 1,0 мг/кг массы тела. Экспериментально установлено, что влияние цитрата кадмия в указанной дозе приводит к уменьшению объема эндокардиальных подушек предсердно-желудочкового канала и снижению кардиофетального индекса у эмбрионов крысы. В то же время наблюдается увеличение диаметра коронарных артерий на 11,3%.

Ключевые слова: кардиогенез, эмбрион крысы, эндокардиальные подушки сердца, цитрат кадмия.

Стаття надійшла 12.09.2018 р.

INFLUENCE OF CADMIUM CITRATE LOW DOSES ON RAT EMBRYO'S CARDIOGENESIS **Nefyodova O.O., Yeroshenko G.A., Zadesenets I.P., Shatorna V.F., Nefyodov O.O., Kuznetsova O.V.**

Cadmium is one of the few toxic heavy metals, which physiological function in the human body is not established so far. Cadmium exhibits its toxic effects at very low concentrations and has acute and chronic effects on the body health. The purpose of the study was to experimentally determine the effect of cadmium citrate low doses on morphometric parameters of the embryonic heart, atrial-ventricular valves and coronary vessels with intragastric administration to pregnant female rats. The dose of cadmium citrate was 1.0 mg/kg of body weight. It has been experimentally determined that the effect of cadmium citrate at a given dose results in the reduced endocardial cushions volume of the atrial-ventricular channel and the reduced cardiometal index in rat embryos. At the same time the growth of the coronary arteries diameter by 11.3% was observed.

Key words: cardiogenesis, rat's embryo, endocardial cushions of the heart, cadmium citrate.

Рецензент Проніна О.М.