ASSESSMENT OF THE IMMUNE STATUS OF GUINEA PIGS UNDER INFLUENCE OF EXTRACTS OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* L.

Turkina V. A., Yavorska N. Y., Lapovets N. Y., Vorobets N. M, Vishchur O. I.

Abstract. Plants are characterized by organ-specific composition and content of polyphenolic compounds, and they are largely responsible for changes in the immune homeostasis of mammals. At the same time, shoots of *Vaccinium corymbosum* as a by-product of its cultivation have not been studied from the standpoint of their extract possible immunotropicity.

The aim of this study was to conduct a primary immunological screening of extracts of shoots of *Vaccinium corymbosum* L. *in vivo*. Shoots of blueberry *V. corymbosum* of the Elliott variety grown on the experimental plot were used for research. Aqueous-ethanol extract was prepared using 60% aqueous ethanol as extractant by maceration (1:10 / weight: volume / g: ml); aqueous – the extract was prepared by suspending in distilled water under reflux on a low-boiling water bath. The experimental work was performed on 24 outbred male albino guinea pigs, which were kept in vivarium. By the method of «blind ranking» animals were divided into three groups: the 1st group – control, the 2nd group – animals sensitized with water-ethanol extract, the 3rd group – sensitized with water extract. Extracts in a volume of 0.02 ml were injected once intradermally into the outer surface of the ear of experimental animals. After 10 days, additional epicutaneous applications were performed on pre-depilated areas of the lateral surface of the animal's body 5 times a week for 4 weeks. Blood was taken by cardiac puncture to quantify immune homeostasis in anesthetized experimental animals. Changes in peripheral blood parameters (absolute number of leukocytes and leukocyte formula) were determined and hematological indices were calculated. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes was performed by indirect immunofluorescence determination using monoclonal antibodies. Population and subpopulations of lymphocytes were counted using a fluorescence microscope with a phase contrast attachment. Immunoglobulin E in blood serum was determined by immunoassay analysis. Circulating immune complexes were investigated by the method of precipitation spectrophotometrically. Statistical processing of the results was carried out using the Microsoft Excel software package.

In the group of animals affected by water-ethanol extract there was a tendency to decrease the total number of leukocytes, at the same time the effect of aqueous extract caused a tendency to increase this index, but in comparison with the control group there were no significant differences. The redistribution of leukocyte cell pools in both experimental groups was revealed in comparison with the control. It was found that under the influence of water-ethanol extract of *V. corymbosum* shoots in animals, the absolute number of lymphocytes decreases. The detected increase in the number of CD4 cells indicates an increase in the reactivity of lymphocytes and the dominance of T-helpers, an increase in the number of CD8 indicates the activation of the killer link of immunity. In animals of the 2nd and 3rd experimental groups, an increase was found in comparison with the control of the level of Ig E immunoglobulins. The obtained results indicate the development of type 1 hypersensitivity reactions in animals of the experimental groups.

Key words: *Vaccinium corymbosum*, immunity, guineapig.

Рецензент – доц. Луценко Р. В.
Стаття надійшла 01.01.2021 року

DOI 10.29254/2077-4214-2021-1-159-147-150
УДК 599.323.4:591.436:591.3:546.48:616-092.9

Шамелашвілі К. Л., Шаторна В. Ф.

ЕМБРІОТОКСИЧНА ДІЯ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (м. Дніпро)
verashatornaya67@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Експериментальне дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи кафедри медичної біології, фармакогнозії та ботаніки державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Біологічні основи морфогенезу органів тварин під впливом мікроелементів та ультрамікроелементів в експерименті», державний реєстраційний номер 0118U006635.

Вступ. Кадмій це важкий метал, який є токсичним, і потрапляючи в організм людини різними шляхами він наносить шкоду здоров'ю та має здатність до кумуляції. Джерелом надходження кадмію може бути професійна діяльність, дієта, вживання води, в якій є кадмій, вдихання кадмію з димом при палінні. Абсорбований кадмій накопичується в ниркахта печінціу вигляді комплексу з металотіонеїном. Також кадмій зв'язується із сульфгідрильними групами білків, що веде до їх денатурації і до інактивації багатьох ферментів, пригніченняфункції мітохондрій. Сполуки кадмію здатні до ушкодження органів таких якпечінка, нирки, мозок, кістки, легені, можуть призводити до канцерогенезу клітин цих органів [1].

Оскільки вагітність – це дуже специфічний фізіологічний стан, який може впливати і змінювати основні шляхи, які беруть участь в метаболізмі кадмію, пренатальне життя є критичним етапом для впливу цього елемента. Під час вагітності збільшується всмоктування кадмію як при інгаляційному, так і при пероральному прийомі [2]. Цей ефект можна пояснити фізіологічними змінами, що відбуваються на цьому етапі, такими як почастішання дихання, зниження моторики шлунково-кишкового тракту і зменшення спорожнення шлунка. Крім того, надмірна експресія рецепторів і переносників в кишечнику через високу потребу в поживних речовинах

[3] також може сприяти абсорбції Cd. Кадмій накопичується в легенях або кишечнику в залежності від шляху впливу; потім він потрапляє в печінку, нирки, плаценту, молочні залози, матку і плід [4] і може виділятися з молоком [5].

Окрім того, сполуки кадмію здатні впливати на ембріональний розвиток завдяки їх здатності перетинати плаценту, накопичуватися в ній та впливати на її розвиток [6]. Згідно з літературних даних кадмій здатен викликати затримку внутрішньоутробного розвитку або зменшення розміру плоду [7]. Експериментальними дослідженнями доведено, що вплив кадмію гальмує ранній ембріональний розвиток та різко знижує швидкість утворення бластоцисти [8, 9, 10]. При цьому вплив кадмію під час вагітності є більш небезпечним для розвитку плода, ніж для фізіологічного стану матері [11].

Хоча велика кількість робіт присвячена впливу сполук кадмію на живі організми, хронічний вплив кадмію та його форм на загальний хід ембріогенезу та показники ембріональної смертності вивчено не достатньо.

Мета дослідження – експериментально визначити показники ембріотоксичності хлориду кадмію при хронічному внутрішньошлунковому введенні впродовж всього періоду вагітності у щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальні дослідження були проведені на самицях щурів лінії Wistar (розплідник «Далі-2001», м. Київ). Для ембріонального дослідження отримували самиць щурів з датованим терміном вагітності, використовуючи метод вагінальних мазків. На стадії проеструс та еструс підсаджували самців в клітки з самицями з розрахунку 1:3, перший день вагітності встановлювали на підставі виявлення сперматозоїдів у вагінальному мазку. На 13-й та 19-й день вагітності проводили оперативний забій. Щурят вилучали з матки, перевіряли на тест «живі-мертві», зважували, протоколювали, фотографували та фіксували у 10%- розчині формаліну для подальших гістологічних досліджень.

Для моделювання впливу і токсичної дії експозиції хлоридом кадмію ми впродовж всієї вагітності самицям щодня *per os* вводили розчин хлориду кадмію (в дозі – 2,0 мг/кг). Нами обрано дозу, що в 100 разів менша за $ЛД_{50}$ і в два рази більша за таку, яка може надходити в організм із навколишнього середовища при кадмієвому забрудненні довкілля [12]. Окрім контрольної групи (n самиць=20; n ембріонів=235), моделювалась група ізольованого введення хлориду кадмію в дозі 2,0 мг/кг (n самиць=20; n ембріонів=182). Відповідно до умов і вимог проведення ембріональних експериментів ми забезпечили повноцінний харчовий раціон, воду для пиття, а також ретельний догляд самицям; введення розчинів металів (зондуванням) проводили з першого дня вагітності щоденно в один і той же час доби (з 10 до 12 години).

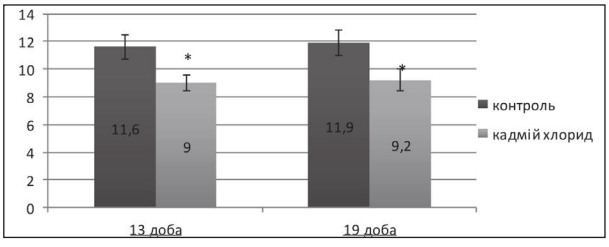

Рисунок 1 – Середні показники кількості живих ембріонів щурів на 13-й та 19-й добі ембріонального розвитку в контрольній та експериментальній групах.
Примітка: * – p<0,05 відносно контрольної групи.

Про можливу негативну дію досліджуваної речовини на ембріональний розвиток ми судили за здатністю підвищувати рівень ембріональної смертності; загальний розвиток плодів оцінювали за показниками кількості ембріонів (середнє значення в групі), кількості жовтих тіл вагітності яєчників самиць, маси тіла ембріона, його відповідності стадії розвитку за стандартними критеріями ембріонального розвитку щурів. Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками:

1. Загальна ембріональна смертність –

$$ЗСЕ=(В-А)/В$$

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

2. Передімплантаційна смертність –

$$ПІС=(В-(А+Б))/В$$

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

3. Постімплантаційна смертність –

$$ПостІС=Б/(А+Б)$$

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

4. Кількість плодів на 1 самку в групі (середнє значення M±m)

Під час оперування підраховували кількість плодів в кожному розі матки та відповідність їх кількості жовтих тіл в яєчнику з відповідного боку. Підрахування жовтих тіл в яєчниках самиць дозволяло визначати доімплантаційну смертність ембріонів: якщо кількість жовтих тіл вагітності в яєчниках 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, а постімплантаційну смертність визначали за різницею міст імплантації (резорбції ембріонів) в рогах матки та кількістю вижившиx ембріонів. Дані показники були базовими показниками для проведення подальшого обрахування показників ембріональної смертності та визначення ембріотоксичності досліджуваних сполук.

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

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

Результати дослідження та їх обговорення. При аналізі отриманих нами даних ми виявили, що сполуки кадмію негативно впливають на ембріональний розвиток та посилюють ембріональну смертність як на 13-ту так і на 19-у добу вагітності у щурів при хронічному щоденному впливі в зазначеній дозі.

Ізольоване введення хлориду кадмію призводить до достовірного зниження (p<0,05) кількості живих ембріонів в порівнянні до контрольної групи. Серед-

ній показник живих ембріонів на одну самицю(M±m) на 13-й добі вагітності під впливом кадмію хлориду зменшився на 22,4%, а на 19-у добу на 22,7% відносно аналогічного показника контрольної групи, що свідчить про високий рівень ембріотоксичності хлориду кадмію при хронічному внутрішньошлунковому введенні в зазначеній нами дозі в експерименті на щурах **(рис.1).**

Важливими критерієм ембріотоксичності є показники загальної, доімплантаційної, а також післяімплантаційної ембріональної смертності. Обрахування показників загальної ембріональної смертності показало, що при ізольованому введенні хлориду кадмію відбувається достовірне збільшення цього показника впродовж всього терміну вагітності. Тобто, на 13-ту добу ембріонального розвитку цей показник збільшився в 4,8 рази (p<0,001), а на 19- у добу в 3,8 (p<0,01) рази порівняно з контролем **(рис.2).** ЗЕС прямо корелює з кількістю вижившиx ембріонів в групах, логічно пояснює зменшення середніх значень кількості ембріонів в посліді.

Ізольоване введення хлориду кадмію призводить до підвищення показника доімплантаційної та постімплантаційної смертності. Імплантація ембріону у щурів відбувається на 4-5 добу вагітності і при впливі негативних чинників екзогенного або ендогенного походження, цей термін вагітності є критичним. На 13-ту добу ембріогенезу в групі впливу хлориду кадмію ми виявили збільшення доімплантаційної смертності в 3,3 рази (p<0,05) в порівнянні з контролем, а на 19-ту добу цей показник збільшується в 3,75 рази (p<0,01) **(рис.3)**. Зростання досліджуваного показника пояснюється продовженням впливу негативного чинника на організм самиці і опосередкований вплив на хід розвитку ембріона.

В той самий час постімплантаційна смертність за умов введення кадмію хлориду на 13-у добу збільшується в 7 разів (p<0,01), а на 19-у добу в 9 разів (p<0,01) порівняно з контрольною групою **(рис.4).**

Таким чином, аналіз та співставлення отриманих даних довело високий ступінь ембріотоксичності хлориду кадмію при застосуванні зазначеної дози та даному способі введення в експерименті на щурах. Ембріотоксичність досліджуваної речовини проявлялась в зменшенні показників кількості ембріонів в посліді (M±m) з достовірністю p<0,05, зростанні рівня загальної ембріональної смертності з високим рівнем достовірності (p<0,001), що, відповідно, проявлялось в збільшенні доімплантаційної та післяімплантаційної ембріональної смертностей.

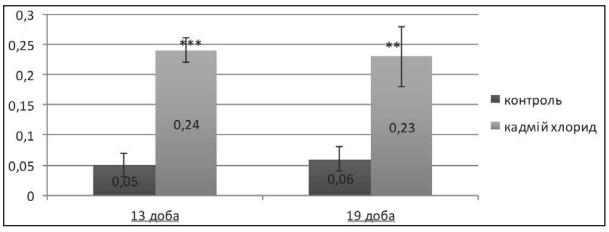

Рисунок 2 – Середні показники загальної ембріональної смертності на 13-й та 20-й добі ембріонального розвитку щурів в контрольній та експериментальній групах.
Примітки: ** – p<0,01,
***** – p<0,001 відносно контрольної групи.**

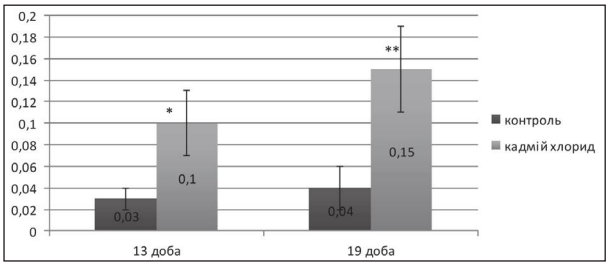

Рисунок 3 – Середні показники доімплантаційної ембріональної смертності на 13-й та 19-й добі ембріонального розвитку щурів в контрольній та експериментальній групах.
Примітки: * – p<0,05, ** – p<0,01 відносно контрольної групи.

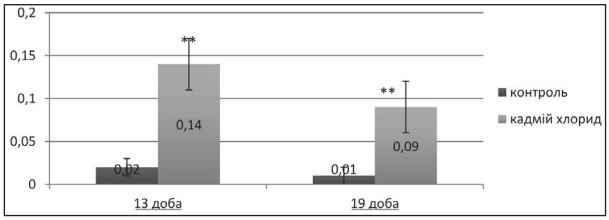

Рисунок 4 – Середні показники постімплантаційної ембріональної смертності на 13-й та 19-й добі ембріонального розвитку щурів в контрольній та експериментальній групах.
Примітка: ** – p<0,01 відносно контрольної групи.

Висновки. Отримані в ході дослідження данні довели, що хронічне внутрішньошлункове введення розчину хлориду кадмію в дозі 2,0 мг/кг призводить до зниження кількості ембріонів та підвищення показників ембріотоксичності в експерименті на щурах.

Перспективи подальших досліджень. Ми вважаємо перспективним у подальшому проведення гістологічних досліджень ранніх ембріонів з метою виявлення впливу досліджуваних факторів на органогенез.

Література

1. Geng HX, Wang L. Cadmium: Toxic efects on placental and embryonic development. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2019;67:102–107.
2. Mikolić A, Schonwald N, Piasek M. Cadmium, iron and zinc interaction and hematological parameters in rat dams and their offspring. J. Trace Elem. Med. Biol. 2016;38:108–116.
3. Astbury S, Mostyn A, Symonds ME, Bell RC. Nutrient availability, the microbiome, and intestinal transport during pregnancy. Appl. Physiologic Nutr. Metab. 2015;40:1100–1106.
4. Jacobo-Estrada T, Cardenas-Gonzalez M, Santoyo-Sanchez M, Parada-Cruz B, Uria-Galicia E, Arreola-Mendoza L, et al. Evaluation of the kidney injury biomarkers in rat amniotic fluid after gestational exposure to cadmium. J. Appl. Toxicol. 2016;36:1183–1193.
5. Jacobo-Estrada T, Santoyo-Sánchez M, Thévenod F, Barbier O. Cadmium Handling, Toxicity and Molecular Targets Involved during Pregnancy: Lessons from Experimental Models. Internat. J. of Molecular Sciences. 2017;18:136-55.
6. Taylor CM, Emond AM, Lingam R, Golding JP. Prenatal lead, cadmium and mercury exposure and associations with motor skills at age 7 years in a UK observational birth cohort. Environ. Int. 2018;11:40–47.
7. Zhang Y, Xu X, Chen A. Maternal urinary cadmium levels during pregnancy associated with risk of sex-dependent birth outcomes from an e-waste pollution site in China. Reprod. Toxicol. 2017;75:49–55.
8. Kolosova II, Shatorna VF. Vpliv solej kadmiyu (hloridu ta citratu) na pokazniki embriogenezu shchuriv. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2020;3(157):49-53. [in Ukrainain].
9. Shamelashvili KL, Shatorna VF. Eksperimental'ne viznachennya modifikuyu chogo vplivu sukcinatu cinku na embriotoksichnist' hloridu kadmiyu u shchuriv. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2020;3(157):58-61. [in Ukrainain].

10. Shatorna VF, Rudenko KM. Viznachennya stupenya embriotoksichnosti hloridu kadmiyu pri enteral'nomu vvedenni vprodovzh vs'ogo periodu vagitnosti shchuriv. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2020;3(157):66-70. [in Ukrainain].
11. Zhao LL, Ru YF, Liu M, Tang J, Zheng J, Wu B, et al. Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. PLoS One 2017;12(11):186-227.
12. Fedorenko VI. Obhrontuvannya dopustymykh dobovykh doz svyntsyu i kadmiyu v dobovykh ratsionakh kharchuvannya. Profilaktychna medytsyna. 2019;24(1):73-80. [in Ukrainain].

ЕМБРІОТОКСИЧНА ДІЯ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ.

Шамелашвілі К. Л., Шаторна В. Ф.

Резюме: Кадмій (Cd) – один з найбільш поширених і шкідливих перехідних металів, присутніх в нашому довкіллі. На жаль, він токсичний при дуже низьких дозах і не піддається біологічному розкладута має дуже тривалий період напіврозпаду. Вагітність це особливий фізіологічний стан, а пренатальний розвиток є критичним періодом в етіології патологічних змін в ембріогенезі. Тому актуальним на сьогоднішній день є вивчення впливу сполук кадмію на ембріональний розвиток.

Мета дослідження. Експериментально визначити ембріотоксичність хлориду кадмію при хронічному внутрішньошлунковому його введенні впродовж всього періоду вагітності у щурів.

Експериментальні дослідження проводили на самках щурів Wistar. Для ембріонального дослідження отримували самиць щурів з датованим терміном вагітності, використовуючи метод вагінальних мазків. З першого дня вагітності вводили досліджувані речовини. Для впливу та визначення токсичного ефекту впливу хлориду кадмію ми щодня вводили самицям per os розчин хлориду кадмію (у дозі 2,0 мг/кг) впродовж усієї вагітності. На 13-й та 19-й добі вагітності проводився хірургічний забій. Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками: 1. Загальна ембріональна смертність; 2. Предімплантаційна смертність; 3. Постімплантаційна смертність; 4. Кількість плодів на 1 самку в групі. Результати дослідження обробляли статистично за допомогою критерію Стьюдента.

При аналізі отриманих даних ми виявили, що хлорид кадмію негативно впливає на ембріональний розвиток щура. Кількість ембріонів при дії хлориду кадмію зменшується в середньому на 22%. При цьому ембріональна смертність збільшується в 4,8 рази 13-ту добу розвитку ембріона, та в 3,8 рази на 19-у добу порівняно з контролем.

Таким чином, обрахуванням базових критеріїв ембріотоксичності було доведено, що хлорид кадмію в досліджуваній нами дозі при внутрішньошлунковому хронічному введенні впродовж всього періоду вагітності є високо ембріотоксичним і підвищує ембріональну смертність щурів.

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

EMBRYOTOXIC EFFECT OF CADMIUM CHLORIDE ON RAT BODY

Shamelashvili K. L., Shatorna V. F.

Abstract. Cadmium (Cd) is one of the most abundant and harmful transition metals found in our environment. Unfortunately, this element is toxic at very low doses and is not biodegradable and has a very long half-life. Pregnancy is a special physiological condition, and prenatal development is a critical period in the etiology of diseases. Therefore, it is relevant today to study the effect of cadmium compounds on embryonic development.

The aim of the study was to experimentally determine the embryotoxicity of cadmium chloride after chronic intragastric administration during the entire period of pregnancy in rats.

Objects and research methods. Experimental studies were carried out on female Wistar rats. For embryonic studies, female rats with dated gestational age were obtained using the vaginal smear method. The test substances were administered from the first day of pregnancy. To simulate the exposure and toxic effect of cadmium chloride, we daily administered to women per os a solution of cadmium chloride (at a dose of 2.0 mg/kg) throughout pregnancy. On the 13th and 19th days of pregnancy, surgical slaughter was performed. The embryotoxic effect of the investigated substances was assessed according to the following indicators: 1. General embryonic mortality; 2. Pre-implantation mortality; 3. Post-implantation mortality; 4. The number of fruits per female in the group. The results of the study were processed statistically using the Student's test.

When analyzing the data obtained, we found that cadmium compounds negatively affect embryonic development. The number of rat embryos by the action of cadmium decreases by an average of 22%. At the same time, embryonic mortality increases 4.8 times on the 13th day of embryo development, and 3.8 times on the 19th day compared to the control.

Conclusions. Thus, from the data obtained, we see that cadmium compounds are quite embryotoxic and increase the embryonic mortality of rats several times.

Key words: cadmium chloride, embryogenesis, embryonic mortality, embryotoxicity.

Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 20.12.2020 року