

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРДІОТОКСИЧНОСТІ СОЛЕЙ КАДМІЮ
ТА ЦИТРАТІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ**

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 ДЗ «ДМА» «Біологічні основи морфогенезу органів та тварин під впливом мікроелементів та ультрамікроелементів в експерименті» (№ державної реєстрації 0118U006635).

Вступ. Зміна стану навколишнього середовища в промислово розвинених країнах спонукає проводити інтенсивне вивчення впливу екологічних факторів на біологічні об'єкти, а зростання урбанізації неминуче призводить до ускладнення екологічної обстановки в містах, на площах, зайнятих промисловими підприємствами, транспортними магістралями, а також на прилеглих до них територіях. Практично у всіх містах з населенням понад 1 млн. чоловік екологічне неблагополуччя оцінюється як «найбільш високе». У багатьох країнах пріоритетною групою екоотоксикантів вважаються важкі метали і, зокрема, кадмій, який реагує з суперфосфатом і з легкістю засвоюється рослинами в досить великих кількостях. В останні роки інтерес до вивчення впливу якості середовища проживання на зростання так званих хвороб цивілізації або неінфекційної патології значно зріс у всьому світі, перш за все в державах з бурхливо розвинутою економікою [1,2].

Безпосереднє спостереження за розвитком порушень розвитку у людини неможливо, тому за допомогою індукованих експериментальних моделей стає можливим аналіз морфогенетичних змін, що виникають впродовж ембріогенезу під впливом різних чинників. Серед багатьох негативних факторів навколишнього середовища, що впливають на здоров'я населення, одне за найважливіших місць посідає хімічне забруднення важкими металами, серед яких найпоширенішим є кадмій та його сполуки.

Одним із актуальних завдань сучасної ембріології, морфології і токсикології є встановлення впливу солей кадмію на ембріогенез та пренатальний розвиток органів і систем органів та визначення морфологічних передумов можливого формування вад розвитку [3,4,5]. Однак дотепер недостатньо вивчений вплив солей кадмію на кардіогенез за умов експериментального хронічного введення. У джерелах наукової літератури є повідомлення щодо накопичення кадмію внаслідок гострої та хронічної інтоксикації, але не визначеним залишається ступінь накопичення солей важких металів в ембріонах та вплив солей кадмію на розвиток серця [5,6].

В якості кардіопротекторів в сучасній фармації широко досліджуються наноаквахелати цитратів мікроелементів: цитрат церію, цитрат германію, комплекс цитратів йоду та сірки. На сьогодні встанов-

лено, що властивості речовини у стані нанорозміру можуть змінюватися, а об'єкти нанорозмірів надзвичайно реакційно активні, оскільки мають велику питому поверхневу енергію і легко можуть агрегувати одна з одною, взаємодіяти з іншими речовинами в зовнішньому середовищі, руйнуватися, окислюватися і так далі. Цитрати біометалів безпечні, вони проявляють антиоксидантну і радіопротекторну дію, позитивно впливають на серцево-судинну та імунну системи організму, тому ці сполуки найбільш активно досліджуються як можливі нові біоантогоністи важким металам [7,8].

Мета дослідження: визначення морфогенетичних закономірностей формування ефектів ізольованого впливу солей кадмію та комбінованої дії кадмію з цитратами мікроелементів на розвиток серця зародків щурів в експерименті.

Об'єкт і методи дослідження. Моделювання впливу солями кадмію та розчинами цитратів мікроелементів, на організм самиці та на загальний хід ембріогенезу і розвиток серця у щурів проводили за наступним планом. Всі щури були розділені на 9 груп:

1 група – контрольна (n самиць=8; n ембріонів=76);

2 група – тварини, яким вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=63);

3 група – тварини, яким вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=70);

4 група – тварини, яким вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату церію у дозі 1,3 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=68);

5 група – тварини, яким вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату церію у дозі 1,3 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=72);

6 група – тварини, яким вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату германію у дозі 0,1 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=68);

7 група – тварини, яким вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату германію у дозі 0,1 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=71);

8 група – тварини, яким вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитратів сірки та йоду у дозі 0,003 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=73);

9 група – тварини, яким вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитратів сірки та йоду у дозі 0,003 мг/кг (n самиць=8; n ембріонів=71).

Введення досліджуваних речовин вагітним самкам охоплювало весь період вагітності з 1-ї по 19-ту добу. Досліджували стан розвитку серця ембріонів та плодів щура на 13-ту, 20-ту добу пренатального розвитку та 10-ту добу постнатального розвитку в групах. Впливу зазначених чинників самок щурів піддавали щоденно, в першій половині дня, тобто

формували модель хронічного експерименту. Отриманих ембріонів вилучали з матки, фіксували в нейтральному 10% розчині формаліну для подальших гістологічних досліджень. Враховуючи специфіку поставлених задач, в даному дослідженні була проведена кількісна оцінка наступних показників на етапах кардіогенезу:

- товщина серцевої стінки (передсердя та шлуночка) ембріону в нормі та при дії солями кадмію (мкм), $M \pm m$;

- товщина серцевої стінки (передсердя та шлуночка) ембріону в нормі та при комбінованому впливі сполук кадмію і цитратів мікроелементів (мкм), $M \pm m$;

- товщина міжшлуночкової перегородки серця ембріону в нормі, при впливі сполук кадмію при ізольованому введенні та при комбінованому впливі з цитратами мікроелементів (мкм), $M \pm m$.

Вимірювання вказаних параметрів серця проводили на тринокулярному цифровому мікроскопі Primo Star (ZEISS) з системою візуалізації на базі відеокамери AXIOCAM ERc5s з використанням ліцензійних програм для лінійних вимірювань мікроскопічних препаратів.

Імуногістохімічний метод використовували для оцінки перебігу змін базового гістогенетичного процесу, а саме – проліферації. Використання імуногістохімічних маркерів та систем візуалізації у зв'язку з їх високою чутливістю та інформативністю дозволяє на клітинному та тканинному рівнях напівкількісно оцінювати процеси клітинної проліферації. Ми проводили аналіз даних після впливу як солями кадмію, так і при комбінованому введенні кадмію з цитратами мікроелементів, що дало можливість співставити результати для визначення основних напрямків міотичної активності. У роботі використовували ядерний маркер Ki_{67} – маркер проліферації, що дозволяє позначити всі клітини, що знаходяться на різних стадіях мітозу в клітинах сердець 20-ти денних ембріонів. Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили з урахуванням критерію t Стьюдента.

Експериментальні дослідження було проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Результати дослідження та їх обговорення. Вплив хлоридом кадмію виявив, що на 13-ту добу ембріогенезу відбувалось потовщення в 1,2 рази стінки передсердь (тонка частина) до $30,63 \pm 1,28$ мкм (контроль – $25,38 \pm 1,60$ мкм) в той час як вплив цитрату кадмію зменшував товщину передсердь до $21,38 \pm 0,64$ мкм. Аналогічна тенденція зберігалась і в товстій частині стінки передсердь: контроль – $43,75 \pm 1,06$ мкм, хлорид кадмію – $53,25 \pm 1,92$ мкм, цитрат кадмію не формував достовірної різниці з контролем і становив – $42,85 \pm 0,71$ мкм. Товщина стінки шлуночку раннього ембріонального серця в контролі становила $61,13 \pm 2,44$ мкм, а при дії хлоридом кадмію потовщувалась в 1,25 рази до $74,87 \pm 1,24$ мкм. Вплив цитратом кадмію не призводив до достовірної різниці з даними цього показника з контр-

ольною групою і становив $61,88 \pm 1,28$ мкм. Таким чином, як показали результати морфометричних досліджень у ембріонів 13-тої доби, переживших вплив солей кадмію, відбуваються наступні зміни в розвитку камер серця: хлорид кадмію провокує збільшення товщини передсердь, шлуночків та міжшлуночкової перегородки, а дія цитрату кадмію збільшує товщину передсердь, товщина шлуночків та МШП не має достовірної різниці з досліджуваними показниками контрольної групи.

Наприкінці ембріогенезу (20-та доба) відмінності в досліджуваних показниках серця були більш вираженими, але мали різний рівень в лівій та правій половині серця. Введення хлориду кадмію вагітним самицям призводить до суттєвого потовщення в лівому шлуночку: у 2,13 разів в середній частині стінки шлуночку і сягала $1091,25 \pm 77,08$ мкм ($p < 0,01$), а базальна та апікальна частини збільшувались в 1,20 разів і становили $394,25 \pm 4,27$ мкм та $289,15 \pm 2,47$ мкм відповідно. В правому шлуночку спостерігались наступні зміни лінійних розмірів: середня частина потовщувалась у 1,5 разів ($487,50 \pm 79,87$ мкм) базальна частина потовщувалась у 1,14 разів ($252,50 \pm 3,91$ мкм), апікальна у 1,1 рази ($188,00 \pm 6,81$ мкм). Показники кардіогенезу в групі ізольованого введення цитрату кадмію були недостовірно нижчими за контроль. Вплив цитрату кадмію мав протилежний напрямок і призводив до витончення стінок шлуночків. Аналогічна тенденція визначалась і в передсердях ембріонального серця 20-ї доби розвитку.

Використання імуногістохімічного маркера Ki_{67} виявило різноспрямованість проліферативних процесів в міокарді сердець обох експериментальних груп. Ізольоване введення хлориду кадмію призводить на 20-й добу ембріогенезу до підвищення активності проліферативних процесів в міокарді, що в свою чергу провокує збільшення маси серця та пояснює підвищення кардіофетального індексу. В групі ізольованого введення цитрату кадмію накопичення маркеру не мало достовірної різниці з контролем, навіть було дещо зменшене, що свідчить про пригнічення цитратом кадмію процесів проліферації і пояснює зменшення кардіофетального індексу при даному способі введення зазначених доз в експерименті на щурах.

В групах комбінованого введення солей кадмію з цитратами германію та церію спостерігалась модифікуюча дія цитратів металів на кардіотоксичність кадмію. Передсердя та шлуночки ембріонального серця на 13-тій та 20-тій добі розвитку по різному реагували на вплив досліджуваних чинників: в групах комбінованого введення цитратів церію та германію з хлоридом кадмію: збільшення показників товщини стінок зберігалась лише в групі комбінації з цитратом германію, а при комбінованому введенні з цитратом церію досліджувані показники не мали достовірної різниці з контролем. При комбінованому введенні цитрату кадмію з цитратом церію відбувалось достовірне потовщення передсердь та недостовірне потовщення шлуночків та міжшлуночкової перегородки (МШП). Введення цитрату германію з цитратом кадмію зберігало тенденцію до збільшення показника товщини стінок камер серця, але в меншому ступені.

На 10-ту добу постнатального розвитку камери серця щура мали показники, що свідчили про відновлення морфогенетичних процесів після припинення впливу досліджуваних чинників і в більшому ступені наближались до контрольних. Так, товщина передсердь була достовірно нижчою ($p \leq 0,05$) у порівнянні до групи ізольованого введення хлориду кадмію та недостовірно перевищувала контроль. Товщина правого передсердя складала в середньому $83,72 \pm 9,01$ мкм та $13,74 \pm 1,82$ мкм в потовщених та витончених ділянках, лівого відповідно $112,32 \pm 14,71$ мкм та $51,17 \pm 4,82$ мкм відповідно. Компактний міокард середнього відділу шлуночків становив у лівого – $920,19 \pm 19,42$ мкм та правого $481,39 \pm 17,12$ мкм. Товщина МШП дорівнювала $947,84 \pm 17,62$ мкм. Отримані результати доводять, що при комбінованому введенні хлориду кадмію з цитратом германію морфометричні показники серця після припинення впливу наближаються до контрольних значень, що свідчить про зменшення кардіотоксичності хлориду кадмію цитратом германію при хронічному впливі впродовж ембріогенезу щура.

На 13-ту добу ембріогенезу в групі комбінованого введення хлориду кадмію з композитом цитратів йоду та сірки камери ембріонального серця по різному реагували на вплив: товщина шлуночків та міжшлуночкової перегородки збільшувалась, а товщина стінки передсердя знаходилась в межах контрольних значень. В групі комбінованого введення цитрату кадмію з композитом цитратів йоду та сірки товщина камер серця – і шлуночків і передсердь недостовірно перевищувала такий показник як в групах ізольованого введення так і в контролі, тобто відбувалось потовщення компактного міокарду.

На 20-ту добу ембріогенезу вплив композиту йоду та сірки з хлоридом кадмію продемонстрував потовщенням компактного міокарда шлуночків та міжшлуночкової перегородки на тлі витончення стінок передсердь. В групі комбінованого введення цитрату кадмію та композиту цитратів йоду і сірки на 20-ту добу розвитку ембріону товщина компактного міокарду правого та лівого шлуночків серця наближалась до контрольних значень, а товщина передсердь достовірно ($p < 0,05$) перевищувала такий показник групи ізольованого введення цитрату кадмію.

Отримані морфометричні результати підтвердились імуногістохімічними дослідженнями з використанням маркеру проліферації Ki_{67} , який в найвищому ступені (+++) накопичувався в міокарді передсердь (група комбінованого впливу цитрату кадмію з нанокомпозитом йод+сірка) та +++ в шлуночках серця в групі комбінованого введення з хлоридом кадмію.

На 10-ту добу після народження кардіофетальний індекс в групі комбінованого введення композиту йоду і сірки з хлоридом кадмію становив $0,29 \pm 0,08$, а в групі комбінованого введення цитрату кадмію та композиту – $0,28 \pm 0,06$, тобто маса серця в обох групах підвищувалась, що свідчить про підвищення проліферативних процесів в міокарді серця навіть після припинення впливу досліджуваних чинників. Збільшення маси відбувалось за рахунок гіпертрофії шлуночків (хлорид кадмію+композит) або за рахунок гіпертрофії передсердь (цитрат кадмію+композит).

Висновки

1. Введення хлориду кадмію на 13-ту добу ембріогенезу провокує збільшення товщини передсердь, шлуночків та МШП, а дія цитрату кадмію збільшує товщину передсердь, при цьому товщина шлуночків та міжшлуночкової перегородки не має достовірної різниці з відповідними показниками контрольної групи. Наприкінці ембріогенезу (20-та доба) відмінності в досліджуваних показниках серця були більш вираженими, але мали різний рівень в лівій та правій половині серця. Введення хлориду кадмію призводить до суттєвого потовщення компактного міокарду в лівому шлуночку у 2,1 разів у правому шлуночку у 1,5 разів, вплив цитрату кадмію мав протилежний напрям і призводив до витончення стінок шлуночків. На 10-ту добу після народження морфометричні дослідження серця продемонстрували, що незважаючи на припинення введення солей кадмію після народження, в анатомічній будові серця зберігаються відмінності, що притаманні зміні під впливом цитрату та хлориду кадмію у ембріонів.

2. На всіх досліджуваних термінах розвитку в групах комбінованого впливу спостерігався модифікуючий вплив цитратів на кардіотоксичність солей кадмію, що виражалось у відновленні товщини структур камер серця, тобто визначена компенсаторна дія цитратів мікроелементів на кардіотоксичність солей кадмію в експерименті на щурах. Найбільш виражене зменшення токсичності визначалось в групах введення солей кадмію з цитратом церію.

3. Використання імуногістохімічного маркеру Ki_{67} виявило найвищий рівень підвищення активності проліферативних процесів в міокарді при ізольованому введенні хлориду кадмію, що в свою чергу провокує збільшення маси серця та пояснює підвищення кардіофетального індексу.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним напрямом експериментального пошуку зниження кардіотоксичної дії солей кадмію є використання різних доз цитратів мікроелементів та їх комбінацій.

Література

1. Oberlis D, Kharland B, Skal'nyy A. Biologicheskaya rol' makro- i mikroelementov u cheloveka i zhivotnykh. Sankt-Peterburg: Nauka; 2008. 544 s. [in Russian].
2. Zerbino DD. Sistemnaya ekologicheskaya teoriya etiologii i razvitiya samykh rasprostranennykh zabolevaniy serdtsa. Sertse i sudini. 2011;2:6-11. [in Russian].
3. Trakhtenberg IM, Kolesnikov SV, Lukovenko VP. Tyazhelye metally vo vneshney srede. Sovremennyye gigiyenicheskiye i toksikologicheskyye aspekty. Minsk; 1994. 123 s. [in Russian].
4. Nagorna NV, Dubova GV, Alferov VV. Biologichna rol' makro- ta mikroelementov v organizmí ditini. Díagnostika, korektsiya ta profilaktika diselementoziv: metod. rek. Kíiv; 2010. 36 s. [in Ukrainian].
5. Ostrovs'ka SS. Rozvitok kal'tsiy-zalezhoí arterial'noy gipertenzíi na tli ustanovki shchuriv vazhnymi metallami. Vísni. probl. bíologíi i meditsini. 2014;1:189-92. [in Ukrainian].
6. Skal'nyy AV. Otsenka i korraktsiya elementanogo statusa naseleniya – perspektivnoye napravleniye otechestvennogo zdravookhraneniya i ekologicheskogo monitoringa. Mikroelementy v meditsine. 2018;19(1):5-13. [in Russian].

7. Kaplunenko VG, Avdos'eva IK, Pashchenko AG. Real'naya perspektiva ispol'zovaniya zdorovykh nanotekhnologiy v veterinarnoy praktike. Nauk.-tekhn. byul. In-tu biologii tvarin i Derzh. nauk.-doslid. kontrol'nogo in-tu vetpreparativ ta kormovikh dobavok. 2014;15(4):252-60. [in Russian].
8. Kaplunenko VG, Kosinov MV. Polucheniye novykh biogenykh i biotsidnykh materialov s pomoshch'yu erozivno-vzryvnogo dispergirivaniya metallov. V: Nanotekhnologii i nanomaterialy dlya biologii i meditsiny. Sb. tr. po materialam nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiye; 2007 Okt 11-12; Novosibirsk. Novosibirsk: SibUPK; 2007. s. 134-7. [in Russian].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРДІОТОКСИЧНОСТІ СОЛЕЙ КАДМІЮ ТА ЦИТРАТІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Шаторна В. Ф., Гарець В. І., Кононова І. І., Гальперін О. І.

Резюме. Експериментально визначена кардіотоксична дія цитрату/хлориду кадмію при ізольованому введенні та їх вплив на структуру камер серця на 13-ту та 20-ту добу ембріогенезу і 10-ту добу постнатального розвитку щура. На всіх досліджуваних термінах розвитку в групах комбінованого впливу спостерігався компенсаторний вплив цитратів мікроелементів на кардіотоксичність солей кадмію при їх комбінованому введенні, що виражалось у відновленні товщини структур камер серця, тобто визначена модифікуюча дія цитратів мікроелементів на кардіотоксичність солей кадмію в експерименті на щурах. Найбільш виражене зменшення кардіотоксичності визначалось в групах введення солей кадмію з цитратом церію.

Ключові слова: серце, кардіогенез, кадмій, цитрат церію, цитрат германію, йод, сірка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ СОЛЕЙ КАДМИЯ И ЦИТРАТОВ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Шаторная В. Ф., Гарец В. И., Кононова И. И., Гальперин А. И.

Резюме. Экспериментально определено кардиотоксическое действие цитрата/хлорида кадмия при изолированном введении и их влияние на структуру камер сердца на 13-е и 20-е сутки эмбриогенеза и 10-е сутки постнатального развития крысы. На всех исследуемых сроках развития в группах комбинированного воздействия наблюдалось компенсаторное влияние цитратов микроэлементов на кардиотоксичность солей кадмия при их комбинированном введении, что выражалось в восстановлении толщины структур камер сердца, то есть определялось модифицирующее действие цитратов микроэлементов на кардиотоксичность солей кадмия в эксперименте на крысах. Наиболее выраженное уменьшение кардиотоксичности определялось в группах введения солей кадмия с цитратом церия.

Ключевые слова: сердце, кардиогенез, кадмий, цитрат церия, цитрат германия, йод, сера.

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF CARDIOTOXICITY OF CADMIUM SALTS AND TRACE ELEMENTS CITRATES

Shatorna V. F., Garets V. I., Kononova I. I., Halperin O. I.

Abstract. The work is devoted to the study of morphological bases of disorders of the general course of cardiogenesis and to the establishment of changes in the structures of rat heart chambers in the prenatal and early postnatal period of ontogenesis under the influence of cadmium salts and under conditions of microelement citrate correction. The experimental study was performed on laboratory rats, the morphological material of the study were embryos and embryonic hearts on the 13th and 20th day of gestation and rat hearts on the 10th day of postnatal development. The use of histological, statistical and immunohistochemical methods allowed to study the rates of embryonic mortality and the main changes in the morphogenesis of the chambers of the heart under normal development and under the action of solutions of cadmium chloride/cadmium citrate at a dose of 1.0 mg/kg in isolated and combined cerium (1.3 mg/kg), germanium (0.1 mg/kg), iodine and sulfur composite (0.003 mg/kg).

Analysis of the effects of the studied factors on the formation of heart chambers on the 13th day of embryogenesis revealed that cadmium chloride provokes an increase in the thickness of the atria, ventricles and interventricular septum, and the action of cadmium citrate increases the thickness of the atria, however the thickness of ventricles and interventricular septum doesn't have significant difference with control group. At the end of embryogenesis (20th day), the differences in the studied parameters of the heart were more pronounced, but had different levels in the left and right halves of the heart. The administration of cadmium chloride leads to a significant thickening in the left ventricle 2.1 times and in the right ventricle 1.5 times, the effect of cadmium citrate had the opposite direction and led to a thinning of the ventricular walls. On the 10th day after birth, morphometric studies of the heart showed that despite the cessation of the introduction of cadmium salts after birth in the anatomical structure of the heart there are differences inherent in the changes under the influence of citrate and cadmium chloride in embryos. At all studied terms of development in the groups of combined exposure there was a modifying effect of citrates on the cardiotoxicity of cadmium salts, which was expressed in the restoration of the thickness of the heart chambers, ie the modifying effect of micronutrient citrates on embryotoxicity and cardiotoxicity of cadmium salts was determined. The most pronounced reduction in toxicity was determined in the groups of cadmium salts with cerium citrate.

The use of the immunohistochemical marker Ki₆₇ revealed the highest level of increased activity of proliferative processes in the myocardium within the group of isolated introduction of cadmium chloride, which in turn provokes an increase in heart weight and explains the increase in the cardiofetal index.

Key words: heart, cardiogenesis, cadmium, cerium citrate, germanium citrate, iodine, sulfur.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 19.08.2020 року*