

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХРОНІЧНОГО ВПЛИВУ СОЛЕЙ КАДМІЮ НА ПОКАЗНИКИ ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ У ЩУРА

Нефьодова О.О.

Білишко Д.В.

Кононова І.І.

Земляний О.О.

Стрижак О.В.

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Зміна стану навколишнього середовища в промислово розвинених країнах спонукає проводити інтенсивне вивчення впливу екологічних факторів на біологічні об'єкти. Серед найбільш небезпечних техногенних забрудників довкілля пріоритетне положення займають важкі метали, а тривалий контакт з токсикантами, навіть на рівні порогових та підпорогових значень, призводить до порушення функціонування як дорослого організму так і призводить до формування внутрішньоутробних дизадаптивних процесів. Актуальною задачею для дослідників є визначення морфологічних змін, що виникають в організмі під дією сполук кадмію як в пренатальному так і в постнатальному онтогенезі. Питання взаємодії мікроелементів під час вагітності та їх опосередкований вплив на ембріон залишається відкритим як і пошук нових біоантогоністів токсичним речовинам.

Мета дослідження – експериментально дослідити вплив низьких доз солей кадмію на загальний хід ембріогенезу щурів ізольовано та в комбінації з цитратом германію/цитратом селену. Визначити динаміку накопичення кадмію та цинку в печінці ембріона щура при ізольованому введенні солей кадмію та при комбінованому впливі кадмію з цитратами металів.

Для моделювання впливу і токсичної дії експозиції кадмію протягом всієї вагітності самицям щурів лінії Wistar щодня *per os* через зонд вводили цитрат кадмію або хлорид кадмію ізольовано (в дозі - 1,0 мг/кг) або в комбінації з цитратом германію або з цитратом селену. Нами обрано дози, що наближаються до тих, які можуть надходити в організм із навколишнього середовища. 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. Всі щури були розділені на 7 груп: 1 група – контрольна (n ембріонів=145). 2 група – тварини, яким вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг (n=126). 3 група – вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг (n=135). 4 група – вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату селену у дозі 0,1мг/кг (n=147). 5 група – вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату селену у дозі 0,1мг/кг (n=129). 6 група - вводили розчин хлориду кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату германію у дозі 0,1 мг/кг (n=147). 7 група – вводили розчин цитрату кадмію у дозі 1,0 мг/кг та розчин цитрату германію у дозі 0,1 мг/кг (n=135). Оперативний забій та забір ембріонального матеріалу відбувався на 13 та 20 добу ембріогенезу.

Про можливу негативну дію досліджуваної речовини на ембріональний розвиток судили за здатністю підвищувати рівень ембріональної смертності (ембріолетальний ефект); загальний розвиток плодів оцінювали за показниками кількості ембріонів, кількості жовтих тіл вагітності яєчників самиць, його відповідності стадії розвитку за загальноприйнятими критеріями ембріонального розвитку щурів. Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками: загальна ембріональна смертність, передімплантаційна смертність, постімплантаційна смертність, 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.

Статистичне опрацювання та аналіз результатів виконані за загальноприйнятими методиками з використанням ліцензійних програм статистичного аналізу Statistica v.6.1 (StatSoft Inc., серійний № AGAR909E415822FA) та Microsoft Excel. Оцінку вірогідності статистичних досліджень проводили за допомогою t-критерію Стьюдента.

Всі самиці в експерименті вижили. Аналіз результатів дослідження продемонстрував, 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 та цитратом селену не виявив формування зовнішніх каліцтв, тобто тератогенного ефекту агенти впливу в зазначеній дозі та способу введення не мають. Обрахування середніх значень показників ембріогенезу продемонструвало, що в групах ізольованого впливу солями кадмію спостерігалось зменшення кількості ембріонів та жовтих тіл вагітності в яєчниках самиць на обох термінах вагітності та збільшення загальної ембріональної смертності. 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 (резорбцію ембріона), 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 недостовірного перевищення показників контролю) у порівнянні із групою, яка впродовж вагітності отримувала цитрат кадмію ізольовано. Аналіз отриманих результатів продемонстрував, що на 13-ту добу ембріогенезу найменший показник середніх значень кількості живих ембріонів на 1 самицю спостерігався в групі ізольованого впливу хлоридом кадмію і дорівнював $8,13 \pm 0,31$. На 20-у добу показник зменшувався до $7,62 \pm 0,34$, що, певно, пояснюється продовженням впливу дестабілізуючого фактора. В групі ізольованого впливу цитрату кадмію кількість живих плодів знижувалась наступним чином: 13-та доба вагітності - $8,38 \pm 0,19$, 20-та - $8,50 \pm 0,34$. Тобто за даним показником цитрат кадмію є менш токсичною речовиною у порівнянні з хлоридом кадмію.

В групах комбінованого введення солей кадмію з цитратами селену та германію кількість ембріонів в посліді щурів підвищувалась, що свідчить про модифікуючий вплив цитратів металів на ембріотоксичність сполук кадмію в експерименті. 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 хлориду кадмію та германію гонадотоксична та ембріотоксична дія кадмію виразно зменшувалась, що свідчить про модифікуючий вплив цитратів германію і селену на токсичність солей кадмію в експерименті на щурах.

Наступним досліджуваним показником ембріогенезу була загальна ембріональна смертність, яка прямо залежить від доімплантаційної та післяімплантаційної смертності ембріонів. В групах ізольованого введення солей кадмію даний показник був найвищим як на 13-ту так і на 20-ту добу ембріонального розвитку. Так, в групі ізольованого введення кадмію хлориду рівень загальної смертності ембріонів на 13-ту добу дорівнював $0,15 \pm 0,02$ (контроль $0,05 \pm 0,02$) і втричі перевищував контрольні значення, а наприкінці ембріогенезу зростав до $0,25 \pm 0,02$ (в контролі залишався $0,05 \pm 0,02$), тобто збільшувався в 5 разів, що є логічним, бо інтоксикація кадмієм тривала. В групі ізольованого впливу цитратом кадмію даний показник: на 13-ту добу становив $0,15 \pm 0,02$ як і при впливі хлориду кадмію, а на 20-ту добу був дещо нижчим за такий при дії хлориду кадмію - $0,16 \pm 0,03$ ($p \leq 0,05$ порівняно з контролем). Порівняння в групах впливу ізольованого та комбінованого введення хлориду кадмію виявило модифікуючий вплив цитратів на ембріотоксичність кадмію за даним показником. Як на 13-ту добу розвитку ембріонів так і наприкінці ембріогенезу цитрати селену та германію знижували загальну ембріональну смертність у порівнянні з ізольованим введенням солей кадмію. Така ситуація пояснюється зниженням як доімплантаційної так і післяімплантаційної смертності в цих групах. Доімплантаційна смертність при експозиції з хлоридом кадмію на 13-ту добу ембріогенезу становила $0,07 \pm 0,03$ (контроль $0,025 \pm 0,02$), а на 20-ту добу збільшувалась вдвічі і добігала $0,14 \pm 0,03$ (контроль $0,025 \pm 0,02$). В групах комбінованого введення хлориду кадмію з цитратами металів даний показник достовірно знижувався в 2-2,5 разів (у порівнянні до групи введення кадмію хлориду) у обидва терміни дослідження. Експозиція з цитратом кадмію доводила показник доімплантаційної смертності до $0,09 \pm 0,03$ як на 13-ту так і на 20-ту добу, що свідчило про ембріотоксичний вплив цитрату кадмію на ембріон до початку імплантації, яка відбувається на 3-5-ту добу вагітності самиці щура.

ВИСНОВОК

Аналіз базових показників ембріонального розвитку проведеного експерименту довів ембріотоксичну дію солей кадмію при ентеральному введенні в низьких дозах, що виражається в зменшенні кількості ембріонів та збільшенні показників ембріональної смертності по відношенню до групи контролю на всіх досліджуваних термінах розвитку у щура як на 13-ту так і на 20-ту добу ембріогенезу у щурів. Зниження показників ембріональної смертності та збільшення кількості ембріонів на всіх стадіях гестації в експерименті при комбінованому введенні солей кадмію з цитратом германію та цитратом селену свідчить про їх антагоністичну дію щодо ембріотоксичності кадмію.