

УДК 618.36-092.9:611.018:546.81:661.8:616-099

Майор В.В., Шаторна В.Ф.

ВПЛИВ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЙ З ЦИТРАТАМИ МЕТАЛІВ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЛАЦЕНТИ ВАГІТНИХ САМИЦЬ ЩУРІВ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м.Дніпро

Проведене експериментальне дослідження виявило, що при введенні цитратів металів дослідним тваринам на фоні інтоксикації свинцем до 20-ї доби вагітності формуються компенсаторні пристосування у плаценті, що призводять до покращення морфофункціональних показників розвитку у порівнянні із групою ізольованого введення свинцю, а саме: збільшення діаметру плаценти, розростання лабіринтного відділу, зростання відносного об'єму клітин Кащенко-Гофбауера, збільшення діаметру центральної матково-плацентарної артерії, що призводить до посиленого кровопостачання плаценти. Сукупність даних ознак сприяє формуванню живого плоду під час вагітності, що супроводжується хронічною свинцевою інтоксикацією.

Ключові слова: ацетат свинцю, цитрат золота, цитрат срібла, плацента щурів.

Дослідження виконано відповідно договору про наукову співпрацю між Національним медичним університетом ім. О. О. Богомольця, Інститутом нанобіотехнологій та ресурсозбереження України та ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» в рамках науково-дослідної роботи «Біологічні основи морфогенезу органів та тварин під впливом нанометалів в експерименті», № держ. реєстрації 0115U004879.

Вступ

У теперішній час загальновідомим фактом є забруднення оточуючого середовища сполуками важких металів, найпоширенішим серед яких є свинець та його сполуки. Свинець є металом, що контролюється у багатьох країнах в якості пріоритетного забруднювача довколишнього середовища, його сполуки легко поширюються в атмосфері у вигляді аерозолів, пилу та смогу. потрапляючи в організм людини, свинець уражає органи кровотворення, нервову, серцево-судинну, травну та інші системи органів [1, 5, 7, 9], досить значним є вплив сполук свинцю на репродуктивну систему, він здатний проходити гемато-плацентарний бар'єр та призводити до патологічних процесів в організмі плоду та плаценті [2, 3, 6].

Останнім часом дослідники особливу увагу приділяють вивченню впливу на організм низьких концентрацій свинцю, які в умовах техногенних забруднень ототожнюють з гранично допустимими для об'єктів навколишнього середовища [9, 11, 14, 16]. Для оцінки впливу речовин на організм потрібно враховувати інформацію про сукупний вплив елементів на стан біологічних систем. Хімічні елементи функціонуючи в організмі взаємодіють один з одним, ці взаємодії можуть виявлятися у формі синергічних або антагоністичних ефектів [8]. Фізіологічними антагоністами свинцю є цинк, залізо, кальцій, магній, фосфор, селен, а також вітаміни А, С, Е, В-комплекс, фолієва кислота, сірковмісні амінокислоти [8]. Пошук нових біоантагоністів для свинцю є актуальною задачею, дослідження модифікуючого впливу тих чи інших мікроелементів може дозволити вирішити питання профілактики інтоксикації населення промислових територій.

Мета дослідження

Виявлення особливостей морфофункціонального стану плаценти щурів, особливостей фетоплацентарного кровообігу та гістологічної бу-

дови плаценти, що виникають під впливом низьких доз ацетату свинцю та при його комбінованому введенні з цитратами золота або срібла.

Об'єкт і методи дослідження

Експериментальну частину дослідження проведено на 64 білих самицях щурів лінії «Вістар» початковою вагою 150-180г, віком 2,5-3 місяці. На підготовчому етапі перед проведенням експерименту вивчали функціональний стан яєчників, визначали стадії естрального циклу шляхом вивчення вагінального мазка, перший день вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у вагінальних мазках.

Усі досліди проводили у відповідності до законодавства України [Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – 2006. - № 27. – с.230], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.]. Комісією з біоетики Дніпропетровської державної медичної академії (протокол №1 від 22 січня 2015 р.) встановлено, що проведені наукові дослідження зародків експериментальних тварин відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01.11.2000 року.

Тварини були поділені на чотири групи по 16 особин: 1 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05мг/кг; 2 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05мг/кг та розчин цитрату золота у дозі 1,5 мкг/кг; 3 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг та розчин цитрату срібла у дозі 2 мкг/кг; 4 група – контрольна. Розчини досліджуваних речовин вводили щоденно протягом вагітності внутрішньошлунково через зонд у один й той самий час. Частину тварин (n=32) виводили з експерименту на 16-ту

добу вагітності, іншу частину (n=32) на 20-ту добу шляхом передозування ефірного наркозу, вилучали плоди та плаценти вагітних щурів.

Для вивчення плацент на тканинному рівні відібраний матеріал був зафіксований у розчині 10% нейтрального формаліну з наступним виготовленням серійних парафінових гістологічних зрізів, що після депарафінування були пофарбовані гематоксиліном та еозином. Для виявлення ступені накопичення глікогену у плаценті проводили ШИК-реакцію. Отримані дані оброблялись методом варіаційної статистики з використанням критеріїв Стюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз результатів морфометричних показників контрольної та дослідних груп показав, що середня маса плацент на 16-тій добі вагітності знаходиться у межах $0,282 \pm 0,004$ - $0,311 \pm 0,008$ г, на 20-тій добі вагітності у межах $0,54 \pm 0,01$ - $0,59 \pm 0,02$ г. Найбільша маса плацент на обох досліджуваних термінах вагітності визначається в контрольній групі, для дослідної групи ізольованого введення ацетату свинцю характерним є зниження маси у порівнянні із нормою на 9,3% ($p < 0,001$) на 16-тій добі вагітності та на 3,4% ($p > 0,05$) на 20-тій добі. Отримані результати схожі з даними, отриманими іншими вченими щодо морфометричних показників плаценти під дією розчинів свинцю [2, 3], а також інших важких металів, зокрема кадмію. В групах комбінованого введення ацетату свинцю з цитратами золота або срібла характерна тенденція до зниження маси плаценти на обох термінах вагітності у порівнянні із контролем без достовірної різниці, але перевищує показники групи ізольованого введення на 16-тій добі вагітності на 9,2% ($p < 0,05$) у групі ацетат свинцю + цитрат золота та на 8,8% ($p < 0,01$) у групі ацетат свинцю + цитрат срібла, що свідчить про наявність компенсаторних реакцій, направлених на посилення кровопостачання плаценти за умов гіпоксії, спричиненої введенням ацетату свинцю.

Показники діаметру плаценти контрольної та дослідних груп на 16-тій добі вагітності коливаються в межах $1,04 \pm 0,02$ - $1,10 \pm 0,01$ см, на 20-тій добі вагітності – у межах $1,44 \pm 0,03$ (ацетат свинцю) - $1,51 \pm 0,04$ см (контроль) та не мають статистично достовірної різниці. Діаметр плацент груп комбінованого введення дещо вищий за показник діаметру плацент групи ізольованого введення та складає $1,47 \pm 0,02$ см у групі ацетат свинцю + цитрат золота та $1,46 \pm 0,02$ см у групі ацетат свинцю + цитрат срібла.

При гістологічному дослідженні зрізів плаценти 16-ї та 20-ї доби вагітності за допомогою світлової мікроскопії були виявлені основні зони у плаценті щурів, яка складається з двох частин: материнської та плодової. Загальний план будови плаценти контрольної та дослідних груп не відрізняється – материнська частина плаценти включає шар децидуальної оболонки та губчасту

зону спонгіотрофобласту, плодова частина представлена лабіринтною зоною, в якій безпосередньо відбувається обмін між материнською та плодовою кров'ю.

В результаті гістоморфометричних досліджень були виявлені зміни товщини плаценти 16-ї та 20-ї доби вагітності у всіх дослідних групах, а також зміна співвідношення материнського та плодового шарів. На 16-тій добі вагітності у всіх дослідних груп відзначається відставання розвитку плаценти, зниження її загальної товщини у порівнянні із контролем. У групі введення ацетату свинцю цей показник нижчий від контрольних значень на 5% ($p < 0,05$), у групі комбінованого введення ацетату свинцю з цитратом золота – на 14,2% ($p < 0,0001$), у групі комбінації ацетату свинцю з цитратом срібла – на 8,1% ($p < 0,001$). При цьому у всіх дослідних групах змінюється співвідношення материнського та плодового шарів за рахунок зменшення плодової частки (лабіринтної зони) та зростання материнської (децидуальна оболонка та спонгіотрофобласт).

На 20-тій добі вагітності проявляються компенсаторні пристосування плаценти у групах комбінованого введення ацетату свинцю та цитратів металів, відбувається нормалізація показника відсоткового співвідношення материнської та плодової частин, зростання загальної товщини плаценти за рахунок розростання лабіринтної зони, в якій активно проходять процеси ангіогенезу. На 20-тій добі вагітності загальна товщина плаценти контрольної групи складає $2638,47 \pm 62,88$ мкм, в групі ізольованого введення цей показник вищий у порівнянні із контрольною групою у на 12,5% ($p < 0,001$), у групі ацетат свинцю + цитрат золота вищий на 14,5% ($p < 0,0001$), у групі ацетат свинцю + цитрат срібла вищий на 14,7% ($p < 0,0001$).

Адаптивні реакції, що виникають з боку материнської та плодової частин плаценти, направлені на компенсацію нестачі кисню, відбувається збільшення кількості судин лабіринту та перебудови у материнській зоні, що не змінює співвідношення материнської та плодової частин та сприяє підтримці співвідношення об'ємів крові матері та плоду в плаценті.

Збільшенню товщини зони лабіринту, який складається із фетальних капілярів та плодових судин, а також синусів, в яких знаходиться материнська кров, на нашу думку, сприяв високий рівень клітин Кащенко-Гофбауера, які як відомо, впливають на процеси морфогенезу плаценти, виробляючи різні фактори росту та цитокіни [12, 17]. У групах комбінованого введення ацетату свинцю та цитратів металів рівень цих макрофагів в декілька разів перевищував норму на 20-тій добі вагітності (табл.1). Збільшення кількості клітин Кащенко-Гофбауера за даними літератури може виникати за умов хронічних гіпоксичних станів [13, 15, 18].

Таблиця 1

Показники відносного об'єму клітин Кащенко-Гофбауера плацент контрольної та дослідних груп, %

Показник	Контроль		Ацетат свинцю		Ацетат свинцю + цитрат золота		Ацетат свинцю + цитрат срібла	
	16-та доба	20-та доба	16-та доба	20-та доба	16-та доба	20-та доба	16-та доба	20-та доба
Клітини Кащенко-Гофбауера	15,66±0,87	3,66±0,10	21,57±0,96***	8,88±0,43***	20,81±1,35**	17,19±0,47***; ***	17,90±1,45°	12,30±0,61***; °

Примітка: ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ по відношенню до контрольної групи;

° $p < 0,05$; °° $p < 0,001$; °°° $p < 0,0001$ по відношенню до групи свинцевої інтоксикації.

Таблиця 2

Показники діаметру центральної матково-плацентарної артерії плаценти щура

Доба вагітності	Контроль	Дослідні групи		
		Ацетат свинцю	Ацетат свинцю + цитрат золота	Ацетат свинцю + цитрат срібла
16	238,68±4,85	215,57±10,10	283,23±8,18**;***	274,85±11,72*
20	344,91±12,07	358,08±9,38	349,70±9,54	359,28±15,43

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по відношенню до контрольної групи

*** $p < 0,0001$ по відношенню до групи свинцевої інтоксикації.

Аналіз результатів дослідження плацент щурів показав, що в результаті введення дослідним тваринам протягом вагітності низьких доз ацетату свинцю відбувається погіршення матково-плацентарного кровообігу, плодові судини та капіляри містили невелику кількість формених елементів крові, зустрічалось також явище сладжу еритроцитів в капілярах та материнських лакунах. Дослідження плацент груп комбінованого введення ацетату свинцю та цитратів металів виявило високу ступінь кровонаповнення плацент, що сприяє посиленню доставки кисню та поживних речовин та сприяє нормальному розвитку плоду.

Аналіз результатів вимірювання діаметру центральної матково-плацентарної артерії показав, що на 16-тій добі вагітності у групах комбінованого введення ацетату свинцю та цитратів металів відбувається достовірне збільшення цього показника відносно контрольної групи (табл. 2). На 20-тій добі вагітності достовірна різниця між контрольною та дослідними групами відсутня.

На нашу думку, розширення діаметру центральної матково-плацентарної артерії, що несе кров матері, є пристосувальною реакцією, що сприяє кращому кровопостачанню плаценти.

Висновки

Як показав аналіз отриманих експериментальних даних, при введенні цитратів металів дослідним тваринам на фоні інтоксикації свинцем до 20-ї доби вагітності формуються компенсаторні пристосування у плаценті, що призводять до покращення морфофункціональних показників розвитку у порівнянні із групою ізольованого введення свинцю, а саме: збільшення діаметру плаценти, розростання лабіринтного відділу, зростання відносного об'єму клітин Кащенко-Гофбауера, збільшення діаметру центральної матково-плацентарної артерії, що призводить до посиленого кровопостачання плаценти. Сукупність даних ознак сприяє формуванню живого плоду під час вагітності, що супроводжується хронічною свинцевою інтоксикацією.

Перспективи подальших досліджень

В подальших дослідженнях планується провести порівняльний аналіз з впливу ацетату свинцю більш високих доз при ізольованому введенні та при комбінованому з цитратами металів на плацентогенез щурів.

Література

1. Апихтіна О. Л. Вазотоксична дія свинцю: ендотеліальна дисфункція як наслідок порушень у системі ендогенного оксиду азоту / О. Л. Апихтіна // Журнал АМН України. – 2009. – Т. 15, №2. – С. 346–354.
2. Білецька Е. М. Вплив свинцю у макроформі і у вигляді цитрату, отриманого за нанотехнологією, на перебіг вагітності та антенатальний розвиток щурів / Е. М. Білецька, Н. М. Онул // Медицина сьогодні і завтра. – 2013. – № 2 (59). – С. 5–9.
3. Грызлова Л. В. Влияние ацетата свинца на плацентарный барьер и на развитие костной ткани в раннем онтогенезе (экспериментальные исследования) : автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 16.00.02 «Патология, онкология и морфология животных» / Грызлова Л. В. – Саранск, 2006. – 21 с.
4. Динерман А. А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития / А. А. Динерман. – М. : Медицина, 1980. – 191 с.
5. Зербино Д. Д. Свинец - этиологический фактор поражения сосудов: основные доказательства / Д. Д. Зербино, Т. И. Соломенчук, Ю. А. Поспишиль. // Мистецтво лікування. – 2009. – № 8 (64). – С. 1214.
6. Куликова Г.В. Влияние низкой концентрации свинца на плаценту и плод (экспериментальное исследование) : автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 03.00.25 «Гистология, цитология, клеточная биология» / Г.В. Куликова. – М., 2008. – 27 с.
7. Киреева Ю. В. Морфометрический анализ почек белых крыс при воздействии ацетата свинца / Ю. В. Киреева, О. С. Шубина, Н. А. Мельникова [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 11. – С. 98–99.
8. Скальный А. В. Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М. : «Мир», 2004. – 271 с.
9. Трахтенберг И. М. Роль свинца и железа, как техногенных химических загрязнителей, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / И. М. Трахтенберг, И. П. Лубянова, Е. Л. Апыхтина // Therapia. – 2010. – № 7-8. – С. 36-39.
10. Шубина О. С. Влияние свинцовой интоксикации на морфофункциональное состояние системы плацента-плод / О. С. Шубина, Ю. В. Киреева. // Вестник ОГУ. – 2008. – № 6 (88). – С. 118–121.
11. Bellinger D. C. Teratogen update: lead and pregnancy / D. C. Bellinger // Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. – 2005. – Vol. 73, № 6. – P. 409–420.
12. Anteby E. Y. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching / E. Y. Anteby, S. Natanson-Yaron, C. Greenfield [et al.] // Placenta. – 2005. – № 6. – P. 476–480.
13. Kingdom J. C. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia / J. C. Kingdom, P. Kaufmann. // Placenta. – 1997. – № 18. – P. 613–621.

14. Lidsky T. I. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates / T. I. Lidsky, J. S. Schneider // *Brain*. – 2003. – Vol. 126, № 1. – P. 5–19.
15. Schwartz D. A. Chorangiomas and its precursors: Underdiagnosed placental indicators of chronic fetal hypoxia / D. A. Schwartz. // *Obstet. Gynecol. Surv.* – 2001. – № 56. – P. 523–525.
16. Semczuk M. New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy / M. Semczuk, A. Semczuk-Sikora // *Med. Sci. Monit.* – 2001. – Vol. 7, № 2. – P. 332–340.
17. Demir R. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis / R. Demir, U. A. Kayisli, Y. Seval [et al.] // *Placenta*. – 2004. – № 6. – P. 560–572.
18. Stanek J. Hypoxic Patterns of Placental Injury: A Review / J. Stanek // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2013. – № 137. – P. 706–720.

Реферат

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА И ЕГО КОМБИНАЦИЙ С ЦИТРАТАМИ МЕТАЛЛОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЦЕНТЫ БЕРЕМЕННЫХ САМОК КРЫС

Майор В.В., Шаторная В.Ф.

Ключевые слова: ацетат свинца, цитрат золота, цитрат серебра, плацента крыс.

Проведенное экспериментальное исследование показало, что при введении цитратов металлов экспериментальным животным на фоне интоксикации свинцом к 20 суткам беременности формируются компенсаторные приспособления в плаценте, приводящие к улучшению морфофункциональных показателей развития по сравнению с группой изолированного введения свинца, а именно: увеличение диаметра плаценты, разрастание лабиринтного отдела, увеличение относительного объема клеток Кащенко-Гобфауэра, увеличение диаметра центральной маточно-плацентарной артерии, что приводит к усиленному кровоснабжению плаценты. Совокупность данных признаков способствует формированию живого плода во время беременности, сопровождающейся хронической свинцовой интоксикацией.

Summary

INFLUENCE LEAD ACETATE AND ITS COMBINATIONS WITH CITRATE METALS ON MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATUS PLACENTA OF PREGNANT FEMALE RATS

Maior V.V., Shatorna V.F.

Key words: lead acetate, gold citrate, silver citrate, rat placenta.

At the present time it is well known fact that environmental contamination with heavy metal compounds, the most common of which is lead and its compounds is quite common. Entering the body, lead affects hemopoietic organs, nervous, cardiovascular, digestive system and other organs. The reproductive system becomes one of the most severely affected. Lead compounds can pass through blood-placental barrier and result in pathological processes in the body of the fetus and placenta. To assess the influence of these substances on the body it is important to be aware of cumulative effect of the elements toward the biological systems. Chemical elements functioning in the body interact with one another; these interactions can be detected in the form of synergistic or antagonistic effects. Lead is a physiological antagonist to zinc, iron, calcium, magnesium, phosphorus, selenium, and vitamins A, C, E, B complex, folic acid, sulphur-containing amino acids. Searching for new bio-antagonists for lead is an urgent task, as well as studying the impact of certain micronutrients can help to solve the issues on prevention of intoxication in industrial areas.

The aim of the research work was to investigate morphological and functional state of rat placenta, placental circulation under the influence of gold and silver citrates in lead intoxication.

The study was conducted on 64 white mature pregnant female Wistar rats. All animals were divided into 4 groups (16 animals in each group): Group I involved animals injected with lead acetate solution in a dose of 0.05 mg/kg, group II included animals injected with lead acetate solution in a dose of 0.05 mg/kg and gold citrate solution in a dose of 1.5 mcg/kg; III group involved animals injected with lead acetate solution in a dose of 0.05 mg/kg and silver citrate solution in a dose of 2 mcg/kg; IV group included control, animals injected with distilled water. Rats were mated by the standard scheme. First day of pregnancy was identified from the moment of determining sperm in vaginal smear. Solutions of heavy metals and nano-metals were injected to pregnant female through a tube once a day, at one and the same time. Operative slaughter was performed on 16th and 20th day of pregnancy. The animals were taken out of the experiment by an overdose of ether anaesthesia. Histological slides of placenta were prepared by standard techniques, placentas were fixed in a solution of 10% neutral formalin, dehydrated with successively stronger concentrations of ethyl alcohol, embedded in paraffin wax and sectioned on a microtome, and stained with haematoxylin and eosin.

The experimental research has shown the injection of citrate metal to experimental animals in condition of lead intoxication up to the 20th day of pregnancy develops compensatory adaptation in the placenta that leads to improved morphological parameters compared to the group, which was injected with isolated lead acetate. The mechanisms include increasing the diameter of the placenta, the expansion of labyrinthine zone, and increase in the relative volume of the Hofbauer cells, in the diameter of the central uterine-placental arteries, which leads to increased blood flow to the placenta. The combination of these features contributes to the formation of a living fetus during pregnancy followed by chronic lead intoxication.