

THE INFLUENCE OF CADMIUM CHLORIDE ON THE HISTOSTRUCTURE OF THE OVARIES OF PREGNANT AND NON- PREGNANT RATS**Dnipro State Medical University (Dnipro, Ukraine)**irakolosova0405@gmail.com

Cadmium compounds have a negative impact on reproductive health and can lead to the formation of diseases during the prenatal period. The problems of female infertility require in-depth knowledge of the structure, blood supply and functioning of the ovaries both in normal conditions and under the influence of toxicants. Our study aimed to experimentally determine the potential gonadotoxic effect of cadmium chloride (at a dose of 1.0 mg/kg). For the study, 40 female Wistar rats were used, divided into 2 groups (control and experimental) depending on the solutions received. In each group, females were divided in half: pregnant and non-pregnant. The test substances were administered to the females intragastrically through a gavage tube once a day, at the same time throughout pregnancy, and on day 13, the animals were surgically killed, and the body was dissected, removing the ovaries for histological examination.

In the control and experimental groups, the ovaries of female rats had a structure typical of other mammals, but in the experimental group exposed to cadmium chloride, changes in the histological structure of the ovaries of pregnant and non-pregnant females were found, namely thickening of the protein membrane, decreased follicle growth, increased number of antral and atretic follicles, irregular follicle borders, reduced, damaged, fragmented/absent oocytes, degeneration of follicular granulosa cells; disorganisation, swelling and decreased number of corpus luteum, as well as increased number of fibrils in the connective tissue, hyperaemia of capillaries and venous vessels, thinning of blood vessel walls, and edema.

Key words: reproductive system, ovaries, cadmium chloride, experiment, gonadotoxicity.

Relationship of the publication to planned research works.

The experimental study was carried out within the framework of the research work of the Department of Medical Biology, Pharmacognosy and Botany of Dnipro State Medical University "Biological basis of morphogenesis of organs and animals under the influence of trace elements and ultramicroelements in the experiment" (state registration number 0118U006635).

Introduction.

An unfavourable demographic situation has characterised the last decades in Ukraine, deterioration of not only quantitative but also qualitative characteristics of the population reproduction mechanism. In the context of declining birth rates and high overall mortality, reproductive health issues are of particular importance [1]. According to the WHO, reproductive health is a state of complete physical, mental and social well-being and not merely the absence of disease and infirmity in all aspects of the reproductive system, its functions and processes [2].

The female reproductive system is the most dynamic biological object. The female genital organs are susceptible to adverse environmental factors through the emergence of several new adaptation mechanisms that acquire the properties of a pathological process under certain conditions and can subsequently cause pathological changes. Reproductive dysfunction is often associated with exposure to toxic substances, including toxic metals, namely cadmium, lead and mercury, which affect the majority of the population [3-7]. These metals are listed by the World Health Organization (WHO) as toxicants of major public health concern [8].

The widespread use of heavy metal cadmium (Cd) in fuels, fertilisers, ore dumps, along with the use of this element in industrial production as a galvanic coating to

make parts shiny and corrosion-resistant, as a colourant in the production of plastics, ceramics, and facing materials, as a stabiliser in the production of PVC plastics, as a pigment in the painting of vehicles, processing of high-quality industrial products, etc. leads to a gradual increase in the concentration of this element in the environment [9-14]. Cadmium has a high capacity for accumulation in the body and is excreted very slowly. In ultra-low doses (up to 35 µg per day), the body must produce the protein metallothionein, which removes heavy metals from the blood; large doses of cadmium can cause acute poisoning in the body, and constant intake of small amounts of it can cause chronic poisoning. The chronic effect of this metal has been observed in the musculoskeletal system, impaired cardiovascular and excretory systems, damage to liver cells, muscular system, vascular thrombosis, and destruction of immunity [3-6, 9-14]. Cadmium salts affect the absorption and metabolism of several essential trace elements, including copper, iron and zinc, have a mutagenic effect, affect spermatogenesis, disrupting the functioning of the testes and causing their dysfunction, and suppress the synthesis of male sex hormones [15-17].

The body is sensitive to the effects of cadmium salts throughout life, starting in utero, and especially during growth and puberty and pregnancy [18-19]. Depending on the dose, Cd either enhances or inhibits progesterone biosynthesis, disrupts sex hormone levels, estrus cycles and endometrial morphometry, and intrafollicular processes during oocyte maturation in animal and human ovaries, reducing fertility [6, 10, 20-26].

Since cadmium is the most widespread toxicant, an essential area of research is determining the morphological changes in the reproductive system under the influence of cadmium compounds.

The aim of the study.

Experimental determination of changes in the ovarian histology of pregnant and non-pregnant female rats after thirteen days of intragastric administration of cadmium chloride at a dose of 1.0 mg/kg.

Object and methods of the study.

Experiments to study the gonadotropic effect of intragastric administration of cadmium chloride for 13 days were performed in isolation on 40 mature white female Wistar rats. The rats were kept in the vivarium of Dnipro State Medical University under natural light, on a standard diet and with free access to water and food. The experiment was conducted in a ventilated room at an air temperature of 20-25°C and relative humidity of 50-65%, with animals housed in standard plastic cages with no more than 3-4 animals each.

The animals were kept, and the experiments were carried out following the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 2005), the Law of Ukraine "On Protection of Animals from Cruelty" (2006, Article 26), and the "General Ethical Principles for Animal Experiments" adopted by the Fifth National Congress on Bioethics (Kyiv, 2013).

All procedures with animals at all stages of the study were performed in the morning in compliance with generally accepted international requirements. By the method of "blind ranking", the animals were divided into 2 groups, depending on the administration of intragastric solutions: Group 1 (D#1, $n_{\text{females}}=20$) – isolated cadmium chloride at a dose of 1.0 mg/kg; Group 2 – control ($n_{\text{females}}=20$) – a proportional volume of sterile saline solution by the same route. In each group, rats were divided into 2 subgroups of 10 females: pregnant and non-pregnant.

According to generally accepted experimental procedures, solutions of the test substances were administered to females intragastrically through a gavage tube once a day, at the same time throughout pregnancy. During the administration of the solutions, the condition and behaviour of females, body weight dynamics, rectal temperature, and gestation duration were recorded. On the 13th day of the experiment, the animals were surgically slaughtered and necropsied. After opening the abdominal cavity, the ovaries were removed, a thorough examination was performed using a binocular magnifying glass to identify possible macroscopic pathological changes, examined by macroscopic and microscopic methods, their weight and size were determined, and the number of corpora lutea of estrus and pregnancy was counted. The absolute values of the measured parameters and the indices and indicators calculated on their basis (quantitative morphology) were used to determine the morphological characteristics of the animals. Morphological analysis was carried out using histological research methods, using light microscopy of paraffin sections, which were made using accepted methods. The number of follicles at different stages of development and corpus luteum was counted on histological sections; the surface epithelial layer's height and the protein membrane's thickness were measured. In pregnant females, the number of implantation sites and the presence of live and dead fetuses were counted in the uterus.

The Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test with the Bonferroni correction were used to obtain statistical conclusions when comparing samples in the Statistika 10 software (StatSoft Inc., USA) (significance level $p \leq 0.05$).

Research results and their discussion.

According to the results of the morphological study, it was found that the ovaries of the control group animals (non-pregnant and pregnant) are covered with squamous epithelium (mesothelium), there are areas of single-layer cuboidal and prismatic epithelium, on the apical surface of which microvilli are visualised. Under the epithelium is a protein membrane. It consists mainly of collagen, elastic fibres, and a small number of smooth myocytes that lie parallel and tangential to the surface (fig. 1E).

The ovarian stroma is divided into the peripheral cortex and central medulla under the lining of the protein membrane. The cortex is formed by connective tissue containing collagen and a small number of elastic fibres, as well as a large number of follicles of all generations (primordial, primary, secondary, tertiary), atretic bodies, corpus luteum, and blood vessels.

The cortex, except for the ovarian gland, surrounds the medulla in a horseshoe shape (fig. 1B).

The medulla of the ovaries of rats in the control group is represented by a connective tissue stroma containing many elastic fibers, blood vessels, nerve fibers and nerve endings.

Primordial follicles (fig. 1A) are located singly or in groups directly under the protein shell between the cavity follicles, corpora lutea, which occupy a large part of the parenchyma.

Each primordial follicle consists of a small primary oocyte surrounded by a simple flat follicular epithelium, which, in the development process, differentiates into a single layer of columnar cells, forming a primary follicle.

Primary follicles are slightly larger than primordial follicles, located singly under the protein shell deeper in the cortex (fig. 1A).

Primary follicles gradually turn into secondary follicles. The follicular epithelium of which is multi-layered.

Around the oocyte, the zone of granulosa cells becomes multi-layered (fig. 1 A, C). A shiny glycoprotein membrane develops between the oocyte and the granular zone – *zona pellucida*. Subsequently, one large (vesicle) or several smaller cavities filled with follicular fluid, which has a crystallized appearance – a vesicular follicle, is formed in the granulosa zone. Stromal cells of the ovary, which surround the developing follicle, are arranged in concentric layers and form *theca folliculi*, or theca. This layer is separated from the *zona granulosa* by the basal membrane.

Tertiary, antral, or mature (Graaf) follicles have a fully formed large central cavity (follicular antrum, FA), which occupies most of its volume. The cavity is filled with fluid and surrounded by the zone granulosa (ZG). On the inner wall of the follicle, a granular layer forms a protrusion – an egg-bearing tubercle (cumulus) – *cumulus oophorus*, which contains an eccentrically located oocyte surrounded by many layers of follicular cells. The granulosa cells that directly surround the oocyte are called radial crowns. The theca of the follicle is formed from the connective tissue around it, which consists of a basement membrane, inner and outer layers. The inter-

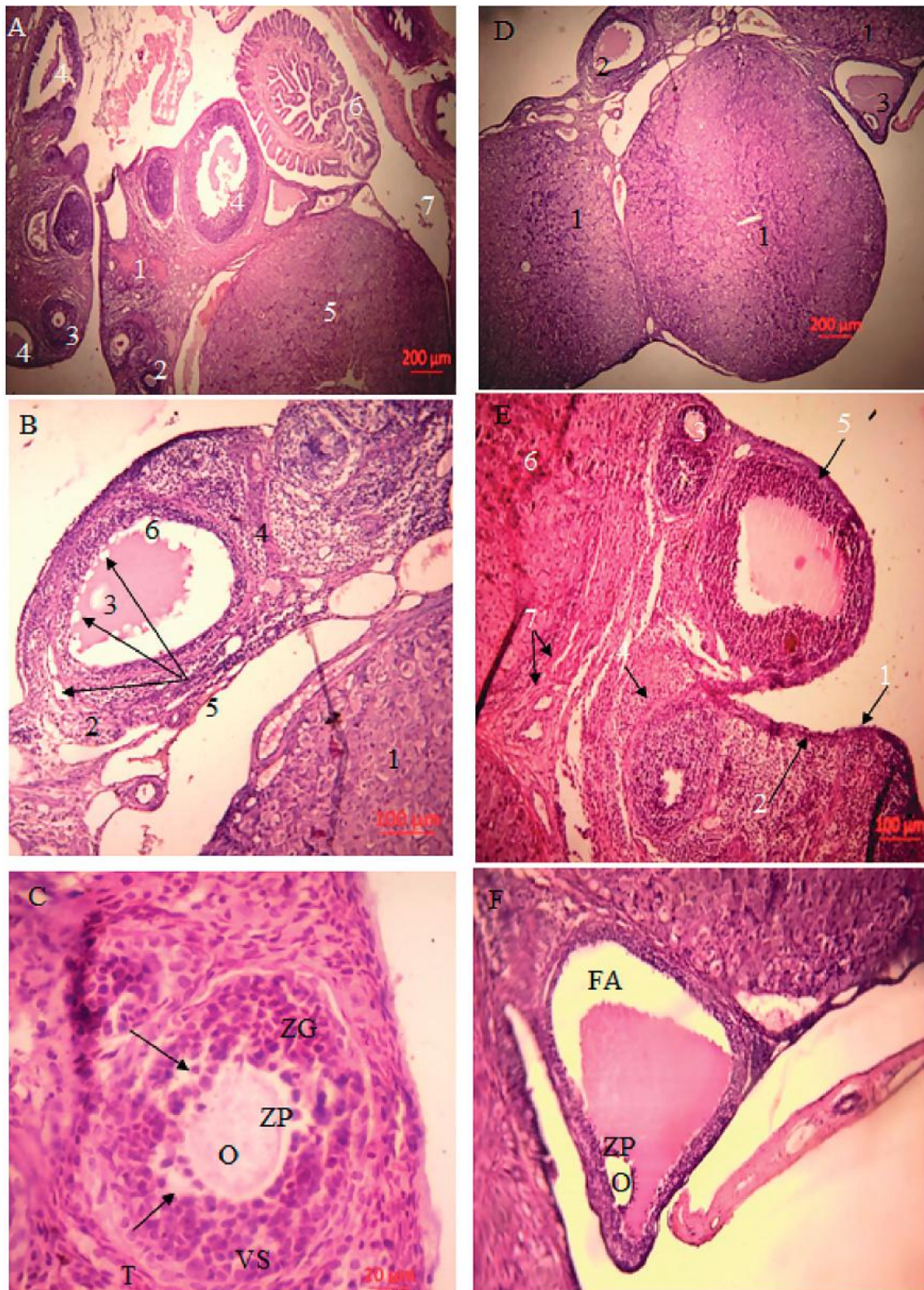


Figure 1 – Section of the ovary of pregnant (A-C) and non-pregnant (D-F) female rats of the control group on the 13th day of the experiment. Staining: hematoxylin and eosin. Magnification: A, D x 40; B, C, E, F x 100. Normal structure of ovaries with corpora lutea and follicles at different stages of development was observed in rats of the control group: A – Structure of the ovary of a pregnant female rat. Designation: 1 – primordial follicle, 2 – primary follicle, 3 – secondary follicle, 4 – atretic follicles, 5 – corpus luteum, 6 – oviducts, 7 – ovarian bursa; B – The structure of the cortex of the ovary. Designation: 1 – corpus luteum, 2 – preovulatory follicle, 3 – oocyte, 4 – theca, 5 – vacuolization in ovoplasm and granulosa cells, 6 – thin shiny zone; C – Secondary (late antral) follicle: a multilayered zone of granulosa cells – *zone granulosa* (ZG), around the oocyte (O), separated by a shiny membrane – *zona pellucida* (ZP), in the granulosa zone spaces are formed – *vesicular spaces* (VS), filled with liquid. Arrows indicate vacuolization of granulosa cells. Stromal ovary cells surround the follicle, forming a *theca folliculi*; D – Rat ovary with tertiary follicles and corpora lutea. Designation: 1 – corpora lutea, 2 – tertiary follicle with a degenerate oocyte, vacuolization in ovoplasm and granulosa, 3 – tertiary follicle with a follicular antrum, an eccentrically located oocyte and a refined shiny membrane; E – Structure of the ovary of a non-pregnant female rat. Designation: 1 – mesothelium (surface epithelium), 2 – protein shell, 3 – primary follicle, 4 – secondary follicle, 5 – tertiary follicle, 6 – corpus luteum, 7 – blood vessels; F – Tertiary follicle with follicular antrum (FA), eccentrically located oocyte (O) and thin zona pellucida (ZP) at the stage of atresia. Flattening and destroying the layer of granulosa cells, degenerative changes of the oocyte are observed.

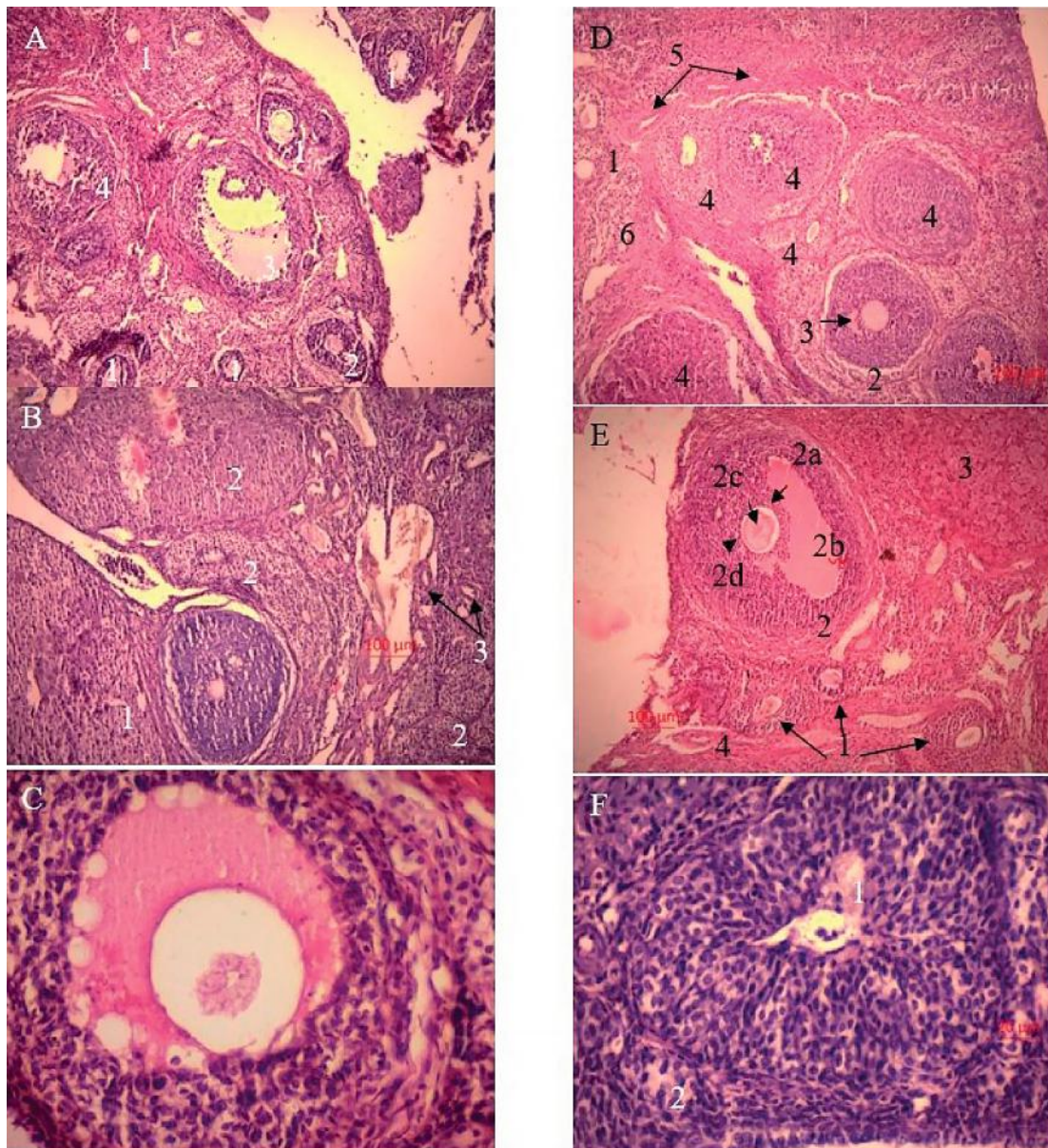


Figure 2 – Micrograph of the ovary of pregnant (A-C) and non-pregnant (D-F) females of the cadmium chloride group on day 13 of gestation. Staining: hematoxylin and eosin. Magnification: A x 40, B, C, D, E x 100, F x 400. Notation: A: 1 – primary follicles, 2 – secondary follicle, 3 – tertiary follicle, 4 – corpus luteum; B: 1 – forming secondary follicle, 2 – corpora lutea, 3 – vessels; C: preovulatory follicle with vacuolization in the ooplasm and granulosa layer and ruptures of the membrane; D: 1 – primary follicles, 2 – secondary follicle, 3 – antrum, 4 – corpora lutea at different stages of development, 5 – vessels, 6 – white body; E: 1 – primary follicles, 2 – tertiary (mature) follicle: 2a – cumulus, 2b – follicle cavity, 2c – oocytes, 2d – corpus luteum, 3 – corpus luteum, 4 – vessels; F: 1 – corpus luteum, 2 – ovarian stroma.

nal theca (*theca interna*) is not uniform in thickness in all follicles, the cells are round, sometimes polygonal with vacuolated cytoplasm, it contains vessels, collagen fibers, a large number of nerve fibers and thecaocytes cells (interstitial cells) that produce estrogen hormones. The outer theca is made of dense connective tissue. On the contrary, cells of *theca externa* are spindle-shaped and merge with the surrounding stroma of the ovary; they do not perform an endocrine function (fig. 1 D, E, F).

After ovulation, a temporary additional endocrine gland – the yellow body (*corpus luteum*) is formed from the remains of a mature follicle (granulosa and theca remain from it). The transformation of follicular granulosa cells into granulosa-lutein cell mass of the corpus luteum is accompanied by the formation of new vessels, they are located closest to the central connective tissue nucleus of the corpus luteum and produce progester-

one. Theca cells are smaller and darker with dark nuclei located on the periphery.

The identified yellow bodies often had a round, sometimes oval shape and were covered with a layer of connective tissue, were in the stage of formation or maturity (fig. 1 A, B, D, E). Inside the corpus luteum are granular cells – luteocytes, which develop through the reproduction of granulosa epitheliocytes and cells of the internal theca of a mature follicle after ovulation. Lutein cells forming the corpus luteum are loose and polygonal; they contain large nuclei and moderate eosinophilic cytoplasm. Cytoplasmic vacuoles are formed in the luteal cells as the corpus luteum matures and degenerates. Numerous blood vessels are present.

When examining the luteal cells that form the basis of the corpus luteum, it was found that they are closely spaced and have an irregular multifaceted shape. The

cellular composition in different parts of the corpus luteum is different. Small luteocytes predominate in the periphery, and large ones closer to the center. The nuclei of luteal cells are relatively large, dark due to the uniform distribution of chromatin granules, and are usually located in the center of the cell. Histologic signs of regression include wrinkling of the granulosa cells. The theca and granulosa cells are gradually vacuolized (fig. 1 D, E, F).

The corpus luteum of estrus is smaller than the corpus luteum of pregnancy. During pregnancy, the corpus luteum is usually enlarged, mainly due to the increased volume of the central cavity.

In the cadmium chloride-treated rats, the ovarian histology corresponded to that of the control animals, but there were some changes (fig. 2 A-F). The corpus luteum was significantly thickened, opaque, and the surface epithelium was single-layered flat, sometimes cuboidal.

Under the protein membrane, individual primary follicles with vacuolated cytoplasm, often with elements of lysis, and large antral follicles with signs of degeneration or incipient atresia were detected. Against the background of progressive processes of stromal sclerosis, the formation and development of cystic degenerated follicles, grouping of collagen fibers into thick bundles, some of which are intertwined with the protein membrane, forming thickening, are expressed. There was a violation of the structural components of the cortex and medulla, primarily blood vessels. In the cortex of the ovaries, there was a characteristic tortuosity of arterioles, the capillary network was branched, and stasis was observed in the venules. In the ovaries, the number of primordial follicles entering growth decreased. Accordingly, the number of follicles of subsequent generations decreased.

Follicles of different developmental levels showed signs of atresia or cystic degeneration. Corpus luteum was found at all stages of development: proliferation, luteinization of theca interna and granulosa, vascularization with sprouting of blood vessels in theca interna and formation of a central nucleus presented as a clot; as well as at the stage of growth with transformation of granulosa and theca. The number of corpus luteum in the ovaries of experimental rats decreases; they are chaotically localized in the organ's parenchyma, and their disorganization and edema are observed (fig. 2 A-F).

Conclusions.

In the course of the experimental study, it was found that intragastric administration of cadmium chloride at a dose of 1.0 mg/kg (in terms of metal) to Wistar rats resulted in changes in the histological structure of the ovaries of pregnant and non-pregnant females. The most significant changes are: decreased follicle growth, increased number of antral and atretic follicles, irregular follicle borders, reduced, damaged, fragmented/absent oocytes, degeneration of follicular granulosa cells; disorganization, swelling and decreased number of corpus luteum, as well as increased number of fibrils in connective tissue, hyperemia of capillaries and venous vessels, thinning of blood vessel walls, edema. Structural changes can be explained by the toxic effect of cadmium chloride on the rat ovaries, so minimising the ingestion of cadmium compounds into the human body is necessary.

Prospects for further research.

In our opinion, it is promising to study histomorphometric changes in the ovaries of rats under the influence of cadmium compounds.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-401-411

УДК 612.3:591.39:661.852:661.782-092.9

Колосова І. І.

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА ГІСТОСТРУКТУРУ ЯЄЧНИКІВ ВАГІТНИХ ТА НЕВАГІТНИХ ЩУРІВ

Дніпровський державний медичний університет (м. Дніпро, Україна)

irakolosova0405@gmail.com

Сполуки кадмію негативно впливають на репродуктивне здоров'я та можуть призвести до формування захворювань під час внутрішньоутробного періоду. Проблеми жіночого безпліддя вимагають глибоких знань особливостей будови, кровопостачання та функціонування яєчників як в нормі, так і під дією токсикантів. Метою нашого дослідження було експериментальне визначення потенційного гонадотоксичного впливу хлориду кадмію (у дозі 1,0 мг/кг). Для дослідження використовували 40 молодих самиць щурів лінії Wistar, яких було розділено на 2 групи (контрольна та дослідна) в залежності від отримуваних розчинів. В кожній групі самиці були розподілені навпіл: вагітні та невагітні. Досліджувані речовини вводили самкам внутрішньошлунково через зонд один раз на добу, в один і той же час впродовж всієї вагітності, а на 13-ту добу проводили оперативний забій та розтин тіла, видаляючи яєчники для гістологічного дослідження.

В контрольній та дослідній групах яєчники самок щурів мали характерну для інших ссавців будову, але в дослідній групі впливу кадмію хлориду були виявлені зміни в гістоструктурі яєчників вагітних та невагітних самиць, а саме: стовщення білкової оболонки, зниження росту фолікулів, збільшення кількості антральних та атретичних фолікулів, неправильні межі фолікулів, зменшені, пошкоджені, фрагментовані/відсутні овоцити, дегенерація фолікулярних гранульозних клітин; дезорганізація, набряк і зменшення кількості жовтих тіл, а також збільшення кількості фібрил у сполучній тканині, гіперемія капілярів та венозних судин, втончення стінок кровоносних судин, набряк.

Ключові слова: репродуктивна система, яєчники, хлорид кадмію, експеримент, гонадотоксичність.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Експериментальне дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи кафедри медичної біології, фармакогнозії та ботаніки Дніпровського державного медичного університету «Біологічні основи морфогенезу органів та тварин під впливом мікроелементів та ультрамікроелементів в експерименті» (№ державної реєстрації 0118U006635).

Вступ.

Останні десятиріччя в Україні характеризуються несприятливою демографічною ситуацією, погіршенням не лише кількісних, а й якісних характеристик механізму відтворення населення. В умовах зниження народжуваності та високого рівня загальної смертності, проблеми охорони репродуктивного здоров'я набувають особливого значення [1]. За визначенням ВООЗ, репродуктивне здоров'я – це стан повного фізичного, розумового та соціального благополуччя, а не тільки відсутність хвороб та недугів в усіх сферах репродуктивної системи, її функції та процесів [2].

Репродуктивна система жінки є найбільш динамічним біологічним об'єктом. Жіночі статеві органи надзвичайно чутливо реагують на несприятливі фактори зовнішнього середовища виникненням цілому ряду нових адаптаційних механізмів, що набувають в певних умовах властивості патологічного процесу і в подальшому можуть викликати патоморфологічні зміни. Порушення репродуктивної функції часто пов'язане з впливом токсичних речовин, у тому числі токсичних металів, а саме кадмію, свинцю та ртуті, впливу яких піддається більшість населення [3-7]. Ці метали включені Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) до токсикантів, що викликають серйозне занепокоєння для охорони здоров'я [8].

Широке поширення важкого металу кадмію (Cd) в паливі, добривах, рудних відвалах поряд з використанням цього елемента в промисловому виробництві як гальванічне покриття для надання блиску та корозійної стійкості деталям, як барвника при виробництві пластмас, кераміки, облицювальних матеріалів, як стабілізатора при виробництві полілорвінілових пластмас, як пігменту при фарбуванні транспортних засобів, обробці високоякісних промислових виробів тощо призводить до поступове збільшення концентрації даного елемента в навколишньому середовищі [9-14]. Кадмій має високу здатність до нагромадження в організмі і дуже повільно виводиться з організму. В ультрамалих дозах (до 35 мкг на день) він необхідний організму для вироблення білка металотіонеїну, що виводить з крові важкі метали, великі дози кадмію можуть викликати в організмі явища гострого отруєння, а постійне надходження невеликих його кількостей – хронічне отруєння. Хронічна дія цього металу відмічена в ураженні опорно-рухового апарату, порушенні функцій серцево-судинної, видільної систем, пошкодженні клітин печінки, м'язової системи, тромбозу судин, руйнуванні імунітету [3-6, 9-14]. Солі кадмію впливають на всмоктування і обмін ряду необхідних мікроелементів, у тому числі міді, заліза та цинку, мають мутагенну дію, впливають на сперматогенез, порушуючи роботу тестікул і спричиняючи їхню дисфунк-

цію, пригнічують синтез чоловічих статевих гормонів [15-17].

До дії солей кадмію організм чутливий протягом всього життя починаючи з внутрішньоутробного періоду, а особливо в період росту та статевого дозрівання та вагітності [18-19]. Залежно від дози, Cd або посилює, або інгібує біосинтез прогестерону, порушує рівень статевих гормонів, циклічність еструсу та морфометрію ендометрію, внутрішньофолікулярні процеси у період дозрівання ооцитів у яєчниках тварин та людини знижує фертильність [6, 10, 20-26].

Через те що кадмій найбільш розповсюджений токсикант, актуальним напрямком досліджень є визначення морфологічних змін, що виникають в репродуктивній системі під дією сполук кадмію.

Мета дослідження.

Експериментальне визначення змін гістоструктури яєчників вагітних та невагітних самок щурів при тринадцятиденному внутрішньошлунковому введенні хлориду кадмію в дозі 1,0 мг/кг.

Об'єкт і методи дослідження.

Експерименти по вивченню гонадотропної дії при внутрішньошлунковому введенні кадмію хлориду протягом 13-ти днів ізольовано проводили на 40 білих статевозрілих самицях щурів лінії Wistar. Щурів утримували у віварії Дніпровського державного медичного університету при природному освітленні, на стандартному раціоні і з вільним доступом до води та корму. Експеримент проводили в провітрюваному приміщенні при температурі повітря 20-25°C і відносній вологості 50-65% та утриманні тварин у стандартних пластикових клітках не більш 3-4 осіб в кожній.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Всі процедури з тваринами на усіх етапах дослідження проводили в ранковий час з дотриманням загальноновизнаних міжнародних вимог. Методом «сліпого ранжування» тварини були розподілені на 2 групи, в залежності від введення внутрішньошлунково розчинів: 1 група (Д№1, n_{самиць} =20) – ізольовано хлорид кадмію у дозі 1,0 мг/кг; 2 група – контрольна (n_{самиць} =20) – пропорційний об'єм стерильного фізіологічного розчину тим же шляхом. В кожній групі щурів поділили на 2 підгрупи по 10 самиць: вагітні та невагітні.

Згідно загальноприйнятим інструкціям проведення експериментальних робіт розчини досліджуваних речовин вводили самкам внутрішньошлунково через зонд один раз на добу, в один і той же час впродовж всієї вагітності. Під час введення розчинів реєстрували стан та поведінку самок, динаміку маси тіла, ректальну температуру, тривалість вагітності. На 13-й день експерименту проводили оперативний забій та розтин тіла. Після розкриття черевної порожнини видаляли яєчники, за допомогою бінокулярної лупи проводили ретельний огляд з метою виявлення можливих макроскопічних патоморфологічних змін, досліджували макро- та мікроскопічними методами,

визначали їх вагу та розміри, підраховували кількість жовтих тіл тічки та вагітності. За абсолютними значеннями вимірних параметрів та розрахованих на їх основі індексів і показників (кількісна морфологія). Морфологічний аналіз здійснювали за допомогою гістологічних методів дослідження, використовуючи світлову мікроскопію парафінових зрізів, які виготовляли відповідно до прийнятих методик. На гістологічних зрізах підраховували кількість фолікулів на різних стадіях розвитку, жовтих тілі; вимірювалася висота поверхневого епітеліального шару та товщина білкової оболонки. У вагітних самиць в матці підраховували кількість місць імплантації, наявність живих і мертвих плодів.

Для отримання статистичних висновків при порівнянні вибірок, використані критерій Крускала-Уоліса та критерій Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні в програмі «Statistika 10» (StatSoft Inc., США) (рівень значущості $p \leq 0,05$)

Результати досліджень та їх обговорення.

За результатами проведеного морфологічного дослідження було встановлено, що яєчники тварин контрольної групи (невагітних та вагітних) вкриті плоским епітелієм (мезотелієм), трапляються ділянки одношарового кубічного та призматичного епітелію, на апікальній поверхні якого візуалізуються мікрворсинки. Під епітелієм розташована білкова оболонка. Вона складається переважно з колагенових та еластичних волокон, а також невеликої кількості гладких міоцитів, які лежать паралельно та тангенціально до поверхні (рис. 1Е).

Строма яєчника під білковою оболонкою поділяється на периферичну кору та центральну мозкову речовину. Кіркова речовина утворена сполучною тканиною, що містить колагенові та незначну кількість еластичних волокон, а також велику кількість фолікулів всіх генерацій (примордіальні, первинні, вторинні, третинні) та атретичні тіла, жовті тіла і кровоносні судини.

Кіркова речовина оточує мозкову у вигляді підкови, крім ділянки воріт яєчника (рис. 1В).

Мозкова речовина яєчників щурів контрольної групи представлена сполучнотканинною стромою, що містить велику кількість еластичних волокон, багато кровоносних судин, нервові волокна та нервові закінчення.

Примордіальні фолікули (рис. 1А) розташовані поодинокі або групами безпосередньо під білковою оболонкою між порожнинними фолікулами, жовтими тілами, які займають значну частину паренхіми.

Кожен примордіальний фолікул складається з первинного овоцита невеликих розмірів, оточеного простим плоским фолікулярним епітелієм, який в процесі розвитку диференціюється в один шар стовпчастих клітин, у результаті чого утворюється первинний фолікул.

Первинні фолікули трішки більші примордіальних, розташовані поодинокі під білковою оболонкою глибше в кірковій речовині (рис. 1А).

Первинні фолікули поступово перетворюються у вторинні. Фолікулярний епітелій яких є багатшаровим.

Навколо овоцита зона гранульозних клітин стає багатшаровою (рис. 1 А, С). Між овоцитом і зернистою зоною розвивається глікопротеїнова блискуча

оболонка – *zona pellucida*. Згодом, в гранульозній зоні утворюється одна велика (везикула) чи кілька менших порожнин заповнених фолікулярною рідиною, яка має кристалізований вигляд – везикулярний фолікул. Стромальні клітини яєчника, які оточують фолікул, що розвивається, розташовуються концентричними шарами й утворюють *theca folliculi*, або теку. Цей шар відокремлений від *zona granulosa* базальною мембраною.

Третинні, антральні, або зрілі (Граафові) – це фолікули із повністю сформованою великою центральною порожниною (фолікулярний антрум, FA), яка займає більшу частину його об'єму. Порожнина заповнена рідиною і оточена зернистою зоною (ZG). На внутрішній стінці фолікула зернистий шар утворює виступ – яйцесносний горбок (кумуляс) – *cumulus oophorus*, у якому міститься розташований ексцентрично овоцит, оточений багатьма шарами фолікулярних клітин. Клітини гранульози, які безпосередньо оточують овоцит, називаються променевими вінцями. Зі сполучної тканини навколо формується тека фолікула, яка складається з базальної мембрани, внутрішнього та зовнішнього шарів. Внутрішня тека (*theca interna*) не в усіх фолікулах рівномірна за товщиною, клітини круглі, іноді полігональні із вакуолізованою цитоплазмою, містить судини, колагенові волокна, велику кількість нервових волокон і клітини текоцити (інтерстиційні клітини), що продукують гормони естрогени. Зовнішня тека побудована із щільної сполучної тканини. Навпаки, клітини *theca externa* мають веретеноподібну форму і зливаються з навколишньою стромою яєчника; вони не виконують ендокринної функції (рис. 1 D, E, F).

Після овуляції із залишків зрілого фолікула (від нього залишається гранульоза і тека) утворюється тимчасова додаткова ендокринна залоза – жовте тіло (*corpus luteum*). Трансформація фолікулярних гранульозних клітин у гранульозо-лютеїнову клітинну масу жовтого тіла супроводжується утворенням нових судин, вони розташовані найближче до центрального сполучнотканинного ядра жовтого тіла і продукують прогестерон. Тека-клітини маленькі темніші з темними ядрами розташовані на периферії.

Виявлені жовті тіла частіше мали круглу, іноді овальну форму і покриті шаром сполучної тканини, перебувають у стадії утворення чи зрілості (рис. 1 А, В, D, E). Усередині жовтого тіла містяться зернисті клітини – лютеоцити, які розвиваються шляхом розмноження епітеліоцитів гранульози і клітин внутрішньої теки зрілого фолікула після овуляції. Лютеїнові клітини, що утворюють жовте тіло, пухкі та багатокутні; вони містять великі ядра і помірну кількість еозинофільної цитоплазми. Цитоплазматичні вакуолі утворюються в лютеїнових клітинах, коли жовте тіло дозріває і згодом дегенерує. Присутні численні кровоносні судини.

При дослідженні лютеїнових клітин, що становлять основу жовтого тіла, виявлено, що вони розташовуються щільно одна до одної і мають неправильну багатогранну форму. Клітинний склад у різних ділянках жовтого тіла тічки неоднаковий. По периферії переважають дрібні лютеоцити, а ближче до центру великі. Ядра лютеїнових клітин відносно великі, темні внаслідок рівномірного розподілу гранул хроматину, і розташовуються, як правило, в центрі кліти-

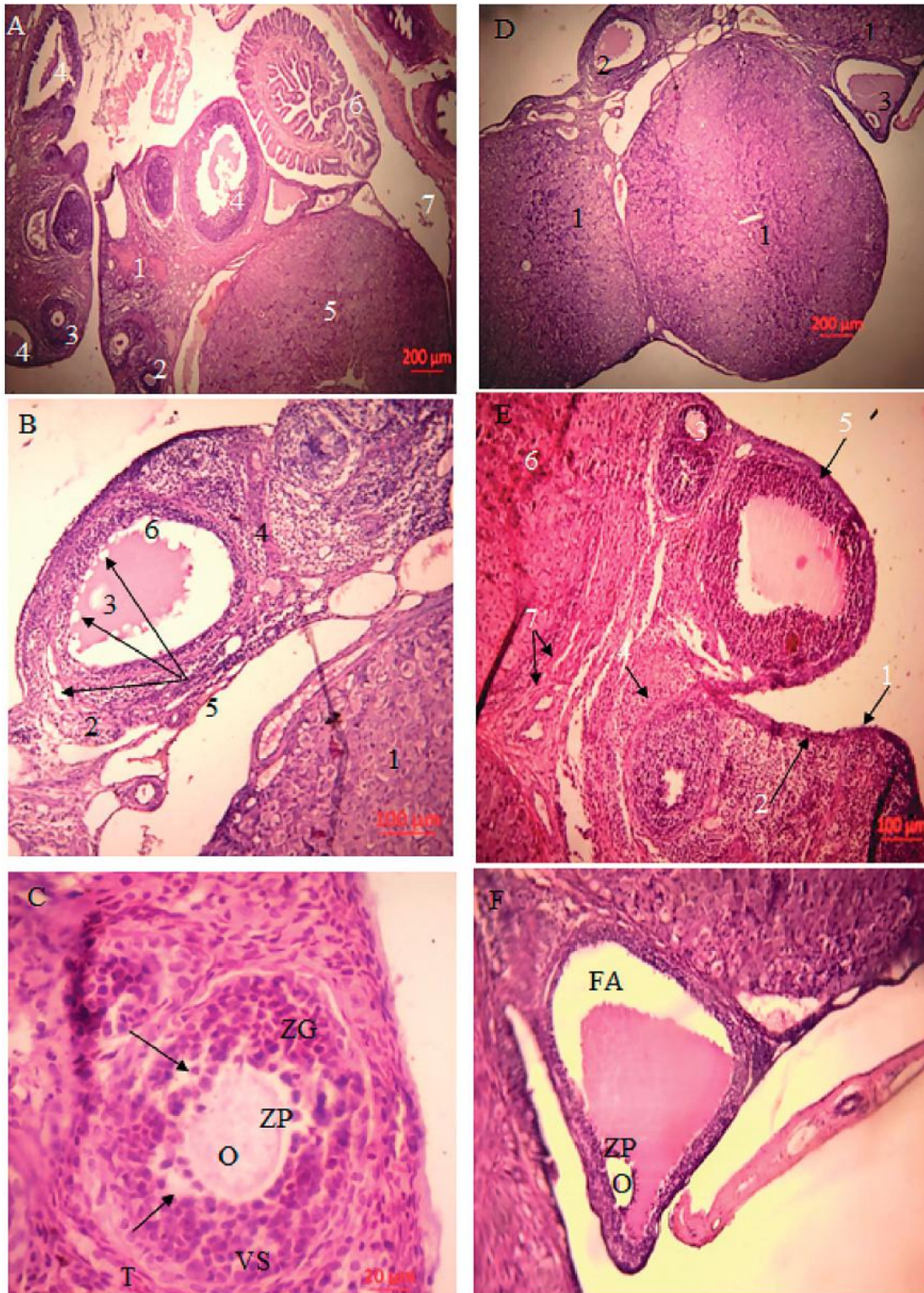


Рисунок 1 - Зріз яєчника вагітних (А–С) та невагітних (D–F) самиць щурів групи контролю 13-ї доби експерименту. Забарвлення: гематоксиліном і еозином. 36.: А, D x 40; В, С, Е, F x 100. У щурів контрольної групи спостерігали нормальну будову яєчників з жовтими тілами та фолікулами на різних стадіях розвитку: А – Будова яєчника вагітної самиці щура. Позначення: 1 – примордіальний фолікул, 2 – первинний фолікул, 3 – вторинний фолікул, 4 – атретичні фолікули, 5 – жовте тіло, 6 – яйцеводи, 7 – яєчникова bursa; В - Будова кіркової речовини яєчника. Позначення: 1 – жовте тіло, 2 – преовуляторний фолікул, 3 – овоцит, 4 – тека, 5 – вакуолізація в овоплазмі та клітинах гранульози, 6 – тонка блискача зона; С - Вторинний (пізній антральний) фолікул: багатшарова зона гранульозних клітин – zone granulosa (ZG), навколо овоцита (O), відділеного блискачкою оболонкою – zona pellucida (ZP), у гранульозній зоні утворюються простори – vesicular spaces (VS), заповнені рідиною. Стрілками вказано вакуолізація гранульозних клітин. Стромальні клітини яєчника, які оточують фолікул, утворюють теку – theca folliculi; D - Яєчник щура з третинними фолікулами та жовтими тілами. Позначення: 1 – жовті тіла, 2 – третинний фолікул з дегенеративним овоцитом, вакуолізацією в овоплазмі та гранульозі, 3 – третинний фолікул з фолікулярним антрумом, ексцентрично розташованим овоцитом та витонченою блискачкою оболонкою; Е - Будова яєчника невагітної самиці щура. Позначення: 1 – мезотелій (поверхневий епітелій), 2 – білкова оболонка, 3 – первинний фолікул, 4 – вторинний фолікул, 5 – третинний фолікул, 6 – жовте тіло, 7 – судини; F - Третинний фолікул з фолікулярним антрумом (FA), ексцентрично розташованим овоцитом (O) та витонченою блискачкою оболонкою (ZP) на стадії атрезії. Спостерігається сплюснення та руйнування шару гранульозних клітин, дегенеративні зміни овоциту.

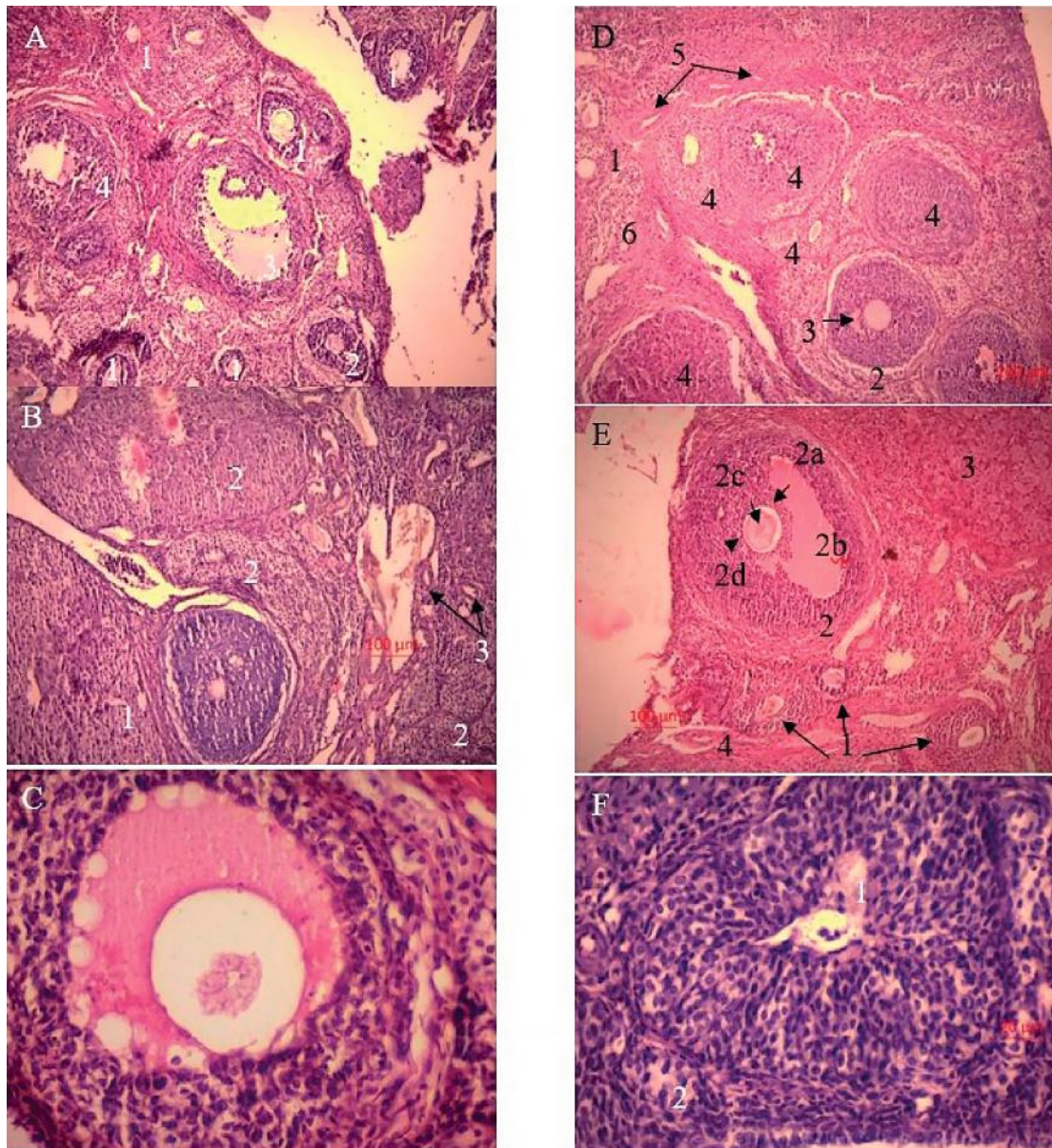


Рисунок 2 – Мікрофотографія яєчника вагітних (A-C) та невагітних (D-F) самиць щура групи хлориду кадмію 13-ї доби гестації. Забарвлення: гематоксилином і еозином. Зб.: А x 40, В, С, D, Е x 100, F x 400. Позначення: А: 1 – первинні фолікули, 2– вторинний фолікул, 3 – третинний фолікул, 4 – жовте тіло; В: 1 – вторинний фолікул, що формується. 2 – жовті тіла, 3 – судини; С: преовуляторний фолікул з вакуолізацією в ооплазмі та шарі гранульозних клітин та розривами оболонки; D: 1 – первинні фолікули, 2 – вторинний фолікул, 3 – антрум, 4 – жовті тіла на різних стадії розвитку, 5 – судини, 6 – біле тіло; Е: 1 – первинні фолікули, 2 – третинний (зрілий) фолікул; 2a – яйценосний горбик, 2b – порожнина фолікула, 2c – овоцит, 2d – блискачка оболонки, 3 – жовте тіло, 4 – судини; F: 1 – жовте тіло, 2 – строма яєчника.

ни. Гістологічні ознаки регресії включають зморщування клітин гранульозного шару. Клітини теки та гранулози поступово вакуолізуються (рис. 1 D, E, F).

Жовте тіло тічки в менше від жовтого тіла вагітності. Під час вагітності жовте тіло зазвичай збільшено, переважно за рахунок збільшеного обсягу центральної порожнини.

У щурів групи введення хлориду кадмію гістоструктура яєчників відповідала будові контрольних тварин, але відбувалися певні зміни (рис. 2 A-F). Білкова оболонка значно стовщена, непрозора, поверхневий епітелій одношаровий плоский, місцями кубічний.

Під білковою оболонкою виявлялися окремі первинні фолікули з вакуолізованою цитоплазмою, нерідко з елементами лізису та великі антральні фолікули з ознаками переродження або атрезії, що

починається. На тлі прогресуючих процесів склерозування строми, виражені процеси утворення та розвитку кістозно-перероджених фолікулів, групування колагенових волокон у товсті пучки, деякі з яких вплятаються в білкову оболонку, утворюючи потовщення. Спостерігалось порушення структурних компонентів кіркової та мозкової речовин, перш за все кровоносних судин. У кірковій речовині яєчників виникала характерна звивистість артеріол, капілярна мережа була розгалужена, у венулах спостерігалися явища стазу. У яєчниках скоротилася кількість премордальних фолікулів, що вступають у зростання. Відповідно зменшувалась кількість фолікулів наступних генерацій.

У фолікулах різних рівнів розвитку спостерігалися ознаки атрезії чи кістозного переродження. Жовті тіла знаходились на всіх стадіях розвитку: проліфе-

рації, лютеїнізації theca interna і гранульози, васкуляризації з проростанням кровоносних судин у theca interna і формуванням представленого у вигляді згустку центрального ядра; а також в стадії розквіту з трансформацією гранульози і теки. Кількість жовтих тіл у яєчниках піддослідних щурів зменшується, вони хаотично локалізуються в паренхімі органа, спостерігається їх дезорганізація, набряк (рис. 2 А-Ф).

Висновки.

В ході проведеного експериментального дослідження встановлено, що результатом внутрішньошлункового введення щурам лінії Вістар хлориду кадмію в дозі 1,0 мг/кг (в перерахунку на метал) були зміни в гістоструктурі яєчників вагітних та невагітних самоць. Найбільш значні зміни: зниження росту фо-

лікулів, збільшення кількості антральних та атретичних фолікулів, неправильні межі фолікула, зменшені, пошкоджені, фрагментовані/відсутні овоцити, дегенерація фолікулярних гранульозних клітин; дезорганізація, набряк і зменшення кількості жовтих тіл, а також збільшення кількості фібрил у сполучній тканині, гіперемія капілярів та венозних судин, витончення стінок кровоносних судин, набряк. Структурні зміни можна пояснити токсичним впливом хлориду кадмію на яєчники щурів, тому треба мінімізувати потрапляння сполук кадмію в організм людини.

Перспективи подальших досліджень.

Перспективним на наш погляд, є вивчення гістоморфометричних змін в яєчниках щурів під впливом сполук кадмію.

References / Література

1. Pyrohova VI, Ts'olko OR. Vyvchennya sotsial'no-medychnykh aspektiv reproduktyvnoho zdorov'ya pidlitktiv. Reproduktyvne zdorov'ya zhinky. 2020;2(2):40-4. [in Ukrainian].
2. Kabinet Ministriv Ukrainy. Rozporyadzhennya № 244-р. Pro skhvalennya Kontseptsiyi Derzhavnoyi prohramy «Reproduktyvne zdorov'ya natsiyi na 2006-2015 roky». Kyiv: Kabinet Ministriv Ukrainy; 2006 Kvit 27. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/244-2006-%D1%80#Text>. [in Ukrainian].
3. Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. International J of Environmental Research and Public Health. 2020;17:3782. DOI: [10.3390/ijerph17113782](https://doi.org/10.3390/ijerph17113782).
4. Repić A, Bulat P, Antonijević B, Antunović M, Džudović J, Buha A, et al. The influence of smoking habits on cadmium and lead blood levels in the Serbian adult people. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2020;27:751-60.
5. Rafati Rahimzadeh M, Rafati Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA. Cadmium toxicity and treatment: An update. Caspian J Intern Med. 2017;8(3):135-45.
6. Lee S, Min J, Min K. Female infertility associated with blood lead and cadmium levels. International journal of environmental research and public health. 2020;17(5):1794. DOI: [10.3390/ijerph17051794](https://doi.org/10.3390/ijerph17051794).
7. Canipari R, De Santis L, Ceconi S. Female Fertility and Environmental Pollution. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(23):8802. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17238802>.
8. World Health Organization. The public health impact of chemicals: knowns and unknowns. Geneva: WHO; Available from: https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/.
9. Hryhoryuk IP, Kovbasenko RV, Dmytryiev OP, Teslyuk VV, Kovbasenko VM. Biologichni osoblyvosti diyi kadmiyu na ekolohichnyy stan fitotsenoziv. Kyiv: TSP «Kompriynt»; 2019. 329 s. [in Ukrainian].
10. Sukhodol's'ka NV. Vmist tsynku, midi, svyntsyu ta kadmiyu v systemi maty - platsenta – plid. Eksperymental'na ta klinichna fiziolojiya i biokhimiya. 2015;2:69-77. [in Ukrainian].
11. Lamas GA, Navas-Acien A, Mark DB, Lee KL. Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of edetate chelation therapy. J Am Coll. Cardiol. 2016;67:2411-8.
12. Parizi MG, Sedaghat Z, Mazloomi M, Fararouei M. Serum level of lead and cadmium is linked to facial cosmetics use among Iranian young women. Environ. Sci.Pollut. Res. Int. 2021;28:13913-8.
13. Sun J, Fang R, Wang H, Xu DX, Yang J, Huang X, et al. A review of environmental metabolism disrupting chemicals and effect biomarkers associating disease risks: where exposomics meets metabolomics. Environ. Int. 2022;158:106941. DOI: [10.1016/j.envint.2021.106941](https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106941).
14. Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. J. Cell Biochem. 2018;119:157-84.
15. de Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Salzano C, Gianfrilli D, Piscitelli P, et al. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. Reprod Toxicol. 2017;73:105-27.
16. Liu H, Wang R, OuYang H, Wang Y, Wu J, Li M, et al. Cadmium induced mouse spermatogonia apoptosis via mitochondrial calcium overload mediated by IP3R-MCU signal pathway. Toxicology. 2023;486:153448. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153448>.
17. Massányi M, Satarug S, Madeddu R, Stawarz R, Massányi P. Evidence for Ovarian and Testicular Toxicities of Cadmium and Detoxification by Natural Substances. Stresses. 2022;2(1):1-16.
18. Zhan S, Huang J. Effects of Cigarette Smoking on Preimplantation Embryo Development. Adv Exp Med Biol. 2021;1300:137-50.
19. Gull A, Dar A, Sharma M. Effects of Heavy Metals on the Health of Pregnant Women and Fetus: A Review. International J of Theoretical, Applied Sciences. 2018;10(1):1-9.
20. Nasiadek M, Danilewicz M, Sitarek, K, Świątkowska E, Daragó A, Stragierowicz J, et al. The effect of repeated cadmium oral exposure on the level of sex hormones, estrous cyclicity, and endometrium morphology in female rats. Environ. Sci. Pollut. Res. 2018;25:28025-38.
21. Cheng Y, Zhang J, Wu T, Jiang X, Jia H, Qing S, et al. Reproductive toxicity of acute Cd exposure in mouse: Resulting in oocyte defects and decreased female fertility. Toxicol Appl Pharmacol. 2019 Sep 15;379:114684. DOI: [10.1016/j.taap.2019.114684](https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114684).
22. Dong F, Li J, Lei WL, Wang F, Wang Y, Ouyang YC, et al. Chronic cadmium exposure causes oocyte meiotic arrest by disrupting spindle assembly 25 checkpoint and maturation promoting factor. Reprod Toxicol. 2020 Sep;96:141-9.
23. Massányi M, Satarug S, Madeddu R, Stawarz R, Massányi P. Evidence for Ovarian and Testicular Toxicities of Cadmium and Detoxification by Natural Substances. Stresses. 2022;2(1):1-16.
24. Li Z, Li T, Leng Y, Chen S, Liu Q, Feng J, et al. Hormonal changes and folliculogenesis in female offspring of rats exposed to cadmium during gestation and lactation. Environ. Pollut. 2018;238:336-47.
25. Massanyi P, Lukac N, Uhrin V, Toman R, Pivko J, Rafay J, et al. Female reproductive toxicology of cadmium. Acta Biol. Hung. 2007;58:287-99.
26. Nasiadek M, Danilewicz M, Klimczak M, Stragierowicz J, Kilanowicz A. Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in Female Wistar Rats. Oxidative Med. 2019 Dec 17:2019:6490820. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6490820>.

ВПЛИВ ХЛОРИДУ КАДМІЮ НА ГІСТОСТРУКТУРУ ЯЄЧНИКІВ ВАГІТНИХ ТА НЕВАГІТНИХ ЩУРІВ

Колосова І. І.

Резюме. Кадмій (Cd) – екологічний токсикант та руйнівник ендокринної системи у людей і тварин, до якого надзвичайно чутлива репродуктивна система. Кадмій використовується в різних сферах промисловості для покриття сталі, як стабілізатор пластику, як матеріал електродів у нікель-кадмієвих батарейках і т.і. Видобуток,

виплавка та промислове використання призвели до підвищення біодоступності Cd у навколишньому середовищі, а антропогенні джерела є найбільшою загрозою для здоров'я людини. Кадмій має високу здатність до нагромадження в організмі та дуже повільно виводиться з організму. Акумуляючись в організмі кадмій негативно впливає на здоров'я, вражаючи нирки, печінку, кровоносні та репродуктивні системи та може призвести до формування захворювань під час внутрішньоутробного періоду. Метою нашого дослідження було експериментальне визначення потенційного гонадотоксичного впливу хлориду кадмію (у дозі 1,0 мг/кг). Для дослідження використовували 40 молодих самиць щурів лінії Wistar, яких було розділено на 2 групи (контрольна та дослідна) в залежності від отримуваних розчинів. В кожній групі самиці були розподілені навпіл: вагітні та невагітні. Досліджувані речовини вводили самкам внутрішньошлунково через зонд один раз на добу, в один і той же час впродовж всієї вагітності, а на 13-ту добу проводили оперативний забій та розтин тіла, видаляючи яєчники для гістологічного дослідження.

В контрольній та дослідній групах яєчники самок щурів мали характерну для інших ссавців будову, але в групі введення хлориду кадмію відбулися значні зміни, а саме: зниження росту фолікулів, збільшення кількості антральних та атретичних фолікулів, неправильні межі фолікула, зменшені, пошкоджені, фрагментовані/відсутні овоцити, дегенерація фолікулярних гранульозних клітин; дезорганізація, набряк і зменшення кількості жовтих тіл, а також збільшення кількості фібрил у сполучній тканині, гіперемія капілярів та венозних судин, витончення стінок кровоносних судин, набряк. Структурні зміни можна пояснити токсичним впливом хлориду кадмію на яєчники щурів, тому треба мінімізувати потрапляння сполук кадмію в організм людини.

Ключові слова: репродуктивна система, яєчники, хлорид кадмію, експеримент, гонадотоксичність.

THE INFLUENCE OF CADMIUM CHLORIDE ON THE HISTOSTRUCTURE OF THE OVARIES OF PREGNANT AND NON-PREGNANT RATS

Kolosova I. I.

Abstract. Cadmium (Cd) is an environmental toxicant and disruptor of the endocrine system in humans and animals, to which the reproductive system is extremely sensitive. Cadmium is used in various industries to coat steel, as a plastic stabilizer, as a material for electrodes in nickel-cadmium batteries, etc. Mining, smelting, and industrial using have increased the bioavailability of Cd in the environment, and anthropogenic sources represent the greatest threat to human health. Cadmium has a high ability to accumulate in the body and is removed from the body very slowly. Accumulating in the body, cadmium has a negative effect on health, affecting the kidneys, liver, circulatory and reproductive systems and can lead to the formation of diseases during the fetal period. The aim of our study was to experimentally determine the potential gonadotoxic effect of cadmium chloride (at a dose of 1.0 mg/kg). For the study, 40 young female Wistar rats were used, which were divided into 2 groups (control and experimental) depending on the received solutions. In each group females were divided into two groups: pregnant and non-pregnant. The studied substances were administered to females intragastrically through a tube once a day, at the same time throughout pregnancy, and on the 13th day, operative slaughter and body dissection were performed, removing the ovaries for histological examination.

In the control and experimental groups, the ovaries of female rats had a structure characteristic of other mammals, but in the cadmium chloride group, significant changes occurred, namely: reduced follicle growth, increased number of antral and atretic follicles, irregular follicle boundaries, reduced, damaged, fragmented/absent oocytes, degeneration of follicular granulosa cells; disorganization, swelling and decrease in the number of yellow bodies, as well as an increase in the number of fibrils in the connective tissue, hyperemia of capillaries and venous vessels, thinning of the walls of blood vessels, edema. Structural changes can be explained by the toxic effect of cadmium chloride on the ovaries of rats, so it is necessary to minimize the entry of cadmium compounds into the human body.

Key words: reproductive system, ovaries, cadmium chloride, experiment, gonadotoxicity.

ORCID and contributionship: / ORCID автора та його внесок до статті:

Kolosova I. I.: <https://orcid.org/0000-0003-2285-9134> ^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Kolosova Iryna Ivanivna / Колосова Ірина Іванівна
Dnipro State Medical University / Дніпровський державний медичний університет
Ukraine, 49000, Dnipro, 9 Volodymyr Vernadskyi str. / Адреса: Україна, 49000, м. Дніпро, вул. Володимира Вернадського 9

Tel.: +380507349616 / Тел.: +380507349616

E-mail: irakolosova0405@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 02.10.2023 / Стаття надійшла 02.10.2023 року
Accepted 01.03.2024 / Стаття прийнята до друку 01.03.2024 року