

DOI 10.31718/2077–1096.24.1.154

УДК 616.61:591.3:546.48:612.6

Шаторна В.Ф., Краснов О.О.

## АНАЛІЗ ХРОНІЧНОГО ВПЛИВУ ХЛОРИДОМ КАДМІЮ НА НЕФРОГЕНЕЗ ЩУРА

Дніпровський державний медичний університет, м.Дніпро, Україна

*Кадмій є широко поширеним забрудником, важко піддається біологічному розкладу та становить серйозну проблему здоров'я людини, а стрімкий індустріальний розвиток різко збільшив його концентрацію у навколишньому середовищі. Кадмій визнаний клітинним токсикантом, різні тканини можуть демонструвати різну швидкість накопичення кадмію та різну сприйнятливості до токсичності, спричиненої ним. Базові клінічні, морфологічні та статистичні дослідження визначають кадмій як одну з причин, що викликає токсичне ураження нирок та цілу низку захворювань, здійснює токсичний вплив на печінку, долає плацентарний бар'єр та має ембріотоксичну дію. Визначення змін які виникають в морфології органів при впливі хлоридом кадмію у вагітних самиць щурів є актуальним завданням для сучасних морфологічних досліджень. В даній роботі ми визначали ступінь нефротоксичності щоденного хронічного введення хлориду кадмію в експерименті на вагітних самицях щурів. Для проведення експерименту ми отримували вагітних самиць з датованим терміном вагітності і з першого дня вагітності проводили внутрішньошлунково (зондуванням) введення іонного розчину хлориду кадмію у дозі 2,0 мг/кг. На 13-ту та 19-ту добу оперативно вилучали ембріонів та нирки самиць для подальшого дослідження. Обрахування отриманих результатів у співставленні до контролю продемонструвало, що при хронічному впливі хлоридом кадмію знижувалась маса нирок вагітних самиць. На гістологічному рівні у 17,3% визначалось розширення капсули нефрону у поєднанні з фрагментарним склерозом капілярів клубочку, що свідчить про нефротоксичний ефект хлориду кадмію в зазначеній дозі в експерименті на щурах.*

Ключові слова: кадмій, нирки, щури, експеримент, нефрон, важкі метали, сечова система.

*Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Експериментальне дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи кафедри медичної біології, фармакогнозії, ботаніки та гістології ДДМУ «Біологічні основи морфогенезу організмів та тварин під впливом мікроелементів та ультрамікроелементів в експерименті» (№ державної реєстрації 0118U006635)*

### Вступ

Починаючи з середини ХХ століття у світових наукових дослідженнях почалося зростання інтересу до досліджень наслідків впливу антропогенної діяльності на навколишнє середовище. Промислові підприємства та транспорт зробили свій внесок у забруднення повітря, ґрунту, поверхневих та підземних вод планети, що спонукало багато країн розгорнути комплексні програми з моніторингу стану довкілля. Важливу негативну роль в забрудненні довколишнього середовища відіграють важкі метали, їх сполуки здатні переміщатися і перерозподілятися, тобто мігрувати у вигляді органо-мінеральної складової біогеоценозу [1, 2, 3]. Кадмій, свинець є найбільш важливими металами при вивченні проблеми забруднень, так як вони широко поширені у світі і мають доведені токсичні властивості. Внаслідок атмосферних процесів ці елементи легко потрапляють до океанів, ґрунтів, рослин і стають частиною біологічних систем. Важкі метали, потрапляючи до організму, накопичуються, а досягаючи певної концентрації, викликають отруєння, мутації, негативно впливають на перебіг вагітності та розвиток ембріону [4, 5, 6].

Одне з перших місць серед екополутантів посідає кадмій та його сполуки. В організмі людини кадмій накопичується, в основному, в нирках, печінці та дванадцятипалій кишці, з віком вміст кадмію в організмі збільшується. Сполуки кадмію порушують функцію ниркових каналців, протоків печінки, таким чином, знижуючи фільтраційну здатність цих органів. Важкі метали ма-

ють високу здатність до різноманітних хімічних, фізико-хімічних і біологічних реакцій, деякі з них мають змінну валентність і беруть участь в окисно-відновних процесах. Велике практичне значення має проблема органотоксичності та важких металів, тому що значна кількість жінок працює в промисловості та в шкідливих умовах виробництва і нерідко стикається з дією важких металів, що дуже небезпечно для її організму, для плода та взагалі для потомства [7, 8, 9].

### Мета дослідження

Визначити вплив хронічного щоденного внутрішньошлункового введення хлориду кадмію в дозі 2 мг/кг на морфологічний стан нирок вагітних самиць щурів в експерименті.

### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на 34 самицях щурів лінії Wistar (розплідник «Далі 2000» м. Київ), масою 180-300 г. Для проведення експерименту отримували самиць з датованим терміном вагітності з використанням методу вагінальних мазків. Вагітні самиці розподілялись на групи: перша група – контроль; друга група - ізольованого введення розчину кадмію хлориду у дозі 2,0 мг/кг. Вплив іонним розчином хлориду кадмію самицям щурів проводили щоденно з 1-го по 19-й день вагітності введенням розчину внутрішньошлунково, через зонд один раз на добу. На 13-й та 19-й день вагітності самиць проводили оперативний забій. Для виконання мети дослідження під час експерименту проводили вилучення нирок вагітних самиць, які зважувались та

підлягали фіксації в нейтральному 10% розчині формаліну для подальшого гістологічного дослідження.

На гістологічних препаратах досліджувались елементи нефронів: діаметр ниркового тільця, площа капсули нефрону, діаметр проксимальних каналців нефрону. Заміри проводили на цифрових фотографіях з використанням програми світлової мікроскопії ZEISS AxioCam ERc 5s з адаптером P95-C 1/2" 0,5x, приєднаного до мікроскопу Primo Star компанії ZEISS. Зазначена програма ZEN 2.0 є ліцензованою для гістологічних вимірювань та дозволяє проводити морфометричні дослідження як лінійних параметрів так і проводити обрахування сплайнового контуру.

Дослідження виконувались у відповідності до принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000р.), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997р.), відповідних положень ВООЗ, «Загальним етичним принципам експериментів над тваринами», що затверджені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.) згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» (Страсбург, 18.03.1986р.). Статистична обробка отриманих даних виконано за допомогою стандартної програми Microsoft Excel. Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики. Оцінку вірогідності статистичних досліджень проводили за допомогою t-критерію Стьюдента.

### Результати дослідження

Всі самиці в експерименті вижили, були активні та добре споживали їжу і воду. Нирки оперативно вилучались і досліджувались на 13-ту та 19-ту добу вагітності щурів. Макроскопічний аналіз показав, що нирка самиць щурів має бобоподібну форму, щільно-еластичної консистенції, поверхня її гладенька, верхній та нижній полюси мають округлу форму. На подовжній та поперечних зрізах добре визначається зональність паренхіми нирок, внутрішні шари диференціюються на мозкову речовину та кіркову, межа між якими не є чіткою і рівною.

Обрахування масометричних показників виявило наступне: права нирка має більшу масу у порівнянні до лівої у всіх групах. Тому нами розраховувався середній ваговий показник обох нирок. Середня маса обох нирок самиць в контрольній групі становила на 13-ту добу експерименту  $0,737 \pm 0,019$  г, а на 19-ту добу -  $0,790 \pm 0,03$  г. Тобто, наприкінці ембріогенезу маса нирки вагітної самиці в контролі недостовірно збільшувалася, а в групі ізольованого введення хлориду кадмію середня маса нирок на 13-тій добі ембріогенезу становила  $0,730 \pm 0,015$  г, а на 19-ту добу -  $0,751 \pm 0,014$  г, що було недостовірно нижче контрольних показників.

Нирки морфологічно і фізіологічно є надзви-

чайно складним органом, а структурно-функціональною одиницею нирки є нефрон. Він являє собою систему структур, що складається з капсули нефрону і каналців, які переходять один в одного: проксимальних звивистого і прямого, тонкого сегмента, дистальних звивистого та прямого. В петлі Генле (тонкий сегмент) здійснюється концентрація сечі завдяки механізму контротоку. Нефрон приймає участь в патогенезі токсичних уражень нирок, найвища концентрація ксенобіотиків відзначається в мозковому шарі нирок. Важливою функцією нирок, що позначається на нефротоксичності ряду речовин, є їх здатність метаболізувати ксенобіотики, що обумовлює високу чутливість цього органу до багатьох ксенобіотиків (важкі метали та їх солі, токсини блідої поганки, діючі речовини деяких ліків).

Капсула нефрона має структуру двохстінної чаші, до якої входить приносна артеріола, утворює капілярну первинну сітку, яка є важливою функціональною структурою ниркового тільця (Мальпігієве тільце). Сама капсула нефрону складається з двох листків: вісцерального внутрішнього та парієтального зовнішнього. Аналіз та порівняння до контрольних гістологічних серійних зрізів нирки в дослідній групі продемонстрували наступні морфологічні зсуви в будові паренхіми нирок. Хронічний ізольований вплив хлоридом кадмію призводив до збільшення площі капсули нефрону, що розцінювалось нами як можливий результат набряку капсули та симптом ушкодження нефрону (рис.1). Також в групі ізольованого впливу хлоридом кадмію визначався набряк каналців нефрону, що призводило до ущільнення паренхіми, яке добре визначається під мікроскопом.

Для підтвердження висунутих припущень ми використовували морфометричні показники гістологічних структур паренхіми нирок, а саме площа капсули ниркового тільця, площа судинного клубочку та їх співвідношення.

Вимірювання мікроструктур проводили з використанням програми ZEN 2.0 світлової мікроскопії мікроскопа дозволяє провести морфометричні дослідження як діаметру судинного клубочку так і провести обрахування сплайнового контуру площі капсули клубочку, що дозволило розрахувати індекс площі ниркового тільця нефрону.

Даний показник дає змогу оцінити ступінь ураження структурно-функціональної одиниці нирки – нефрону. Під час вагітності відбуваються морфо-функціональні зміни в нирках самиці: наприкінці вагітності в контролі спостерігається зменшення співвідношення площі капсули до площі клубочка нефрону. Такі зміни є фізіологічними і пов'язані зі збільшенням морфо-фізіологічного навантаження на нирки вагітної самиці.

В контрольній групі на 13-ту добу індекс площі нефрону нирок самиць щура становив  $76,60047 \pm 3,5$ , а в групі ізольованого впливу кадмієм визначалось зменшення площі капсули нефрону  $50,0481 \pm 1,8$  (рис.2).

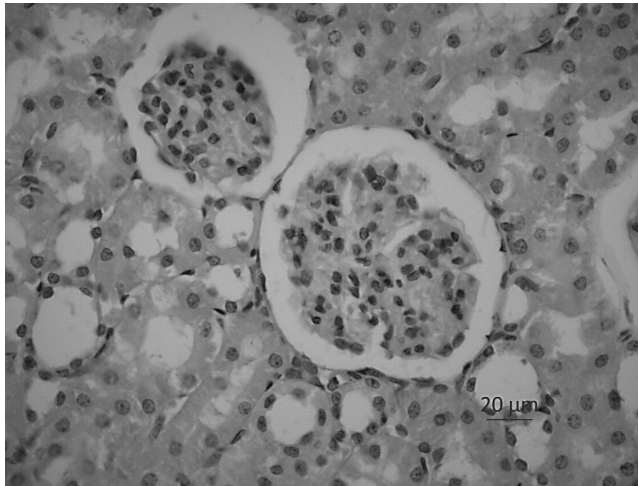


Рис.1. Фото гістологічного зрізу паренхіми нирки самиці щура групи ізолюваного введення хлориду кадмію на 13-ту добу експерименту. Зб. 10x40. Забарвлення гематоксилін-еозин.

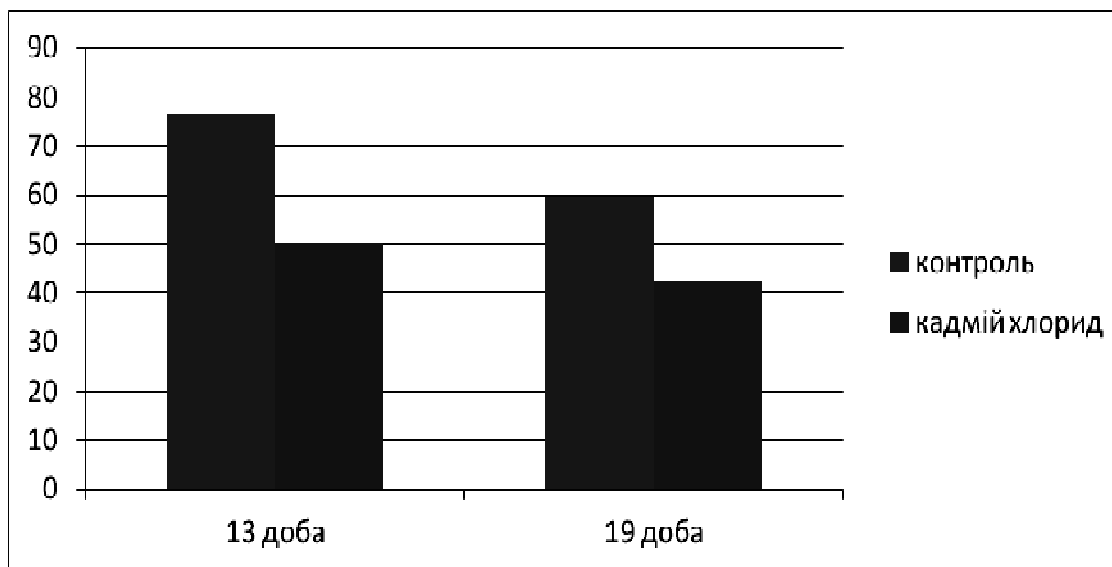


Рис.2. Динаміка змін індексу площі судинного клубочку нефрону нирок самиць щура в контрольній та групі ізолюваного введення хлориду кадмію на обох термінах вагітності.

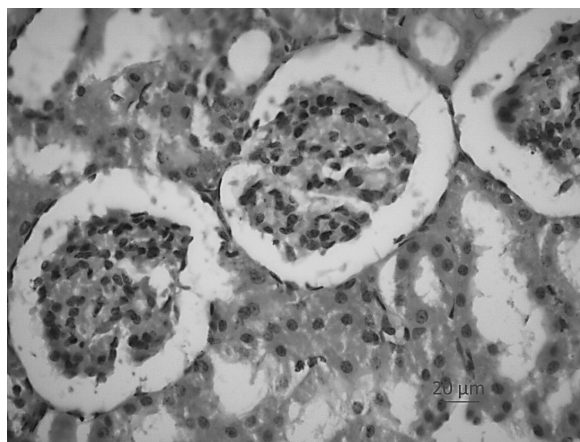


Рис.3. Мікрофото гістологічного зрізу паренхіми нирки самиці щура групи ізолюваного введення хлориду кадмію на 19-ту добу експерименту. Ниркові тільця містять збільшення порожнини капсули та фрагментарне склерозування судинного клубочку нефрону. Забарвлення гематоксилін еозин. Зб. 40x10.

На 19-тій добі експерименту досліджувані параметри становили  $59,64693 \pm 4,5$  у контролі, та продовжували зменшуватись в групі ізольованого впливу до  $42,16393 \pm 2,8$ . Така різниця була достовірною ( $p < 0,001$ ) (рис.2). У 63,4% досліджень в групі ізольованого введення хлориду кадмію визначалось розширення капсули нефрону. Отримані дані свідчать про формування та наростання набряку в капсулі нефрону нирок вагітних самиць щурів під хронічним впливом хлориду кадмію.

Окрім збільшення площі капсули нефрону в наших експериментальних групах визначались наступні зміни гістологічного рівня в нефронах. У 42,7% на 13-ту добу експерименту досліджень гістологічних зрізів паренхіми нирок дослідних тварин спостерігався фокально-сегментарний гломерулосклероз, коли до патологічного процесу залучаються окремі клубочки (фокальні зміни), в яких відбувається склероз деяких сегментів судинного клубочка (сегментарні зміни) (рис. 3).

Склероз структур клубочку виявлявся не у всіх нефронах одночасно та мав частковий характер. Таким чином, ми спостерігали зміни на гістологічному рівні паренхіми нирок, що формуються при хронічному введенні хлориду кадмію у вагітних самиць.

Зміни в клубочках нефронів виявлялися в різних його частинах, проте найчастіше зустрічались в області, ближче розташованій до судинного полюсу, тобто до входу і виходу артеріол з клубочка, а також в місці виходу з капсули клубочка проксимального канальця. Розглядаючи динаміку патологічних змін в гломерулах, визначили певну тенденцію у часі впливу. Спочатку (на 13-ту добу експерименту) вражаються юкстагломерулярні клубочки, потім (19-та доба) ушкодження стає більш генералізоване. Ми спостерігали впри впливі хлоридом кадмію зміни юкстамедулярних нефронів, що проявлялись у збільшенні самих нефронів поєднаних з розширенням капсули та склерозом судин клубочку. На гістологічних препаратах визначалось також збільшення діаметру проксимальних канальців нефронів у нирках дослідних тварин при впливі хлоридом кадмію. В контрольній групі на 13-ту добу експерименту даний показник становив в середньому  $17,24 \pm 1,32$  мкм, а в групі впливу кадмієм діаметр достовірно ( $p = 0,001$ ) збільшувався до  $25,67 \pm 2,58$  мкм. Хронічний вплив хлоридом кадмію на 19-ту добу викликав збільшення діаметру проксимальних канальців нефронів нирок до  $29,62 \pm 2,91$  мкм (контрольний показник на цьому терміні дослідження дорівнював  $19,19 \pm 2,48$  мкм). Таким чином, наприкінці експерименту, тобто на 19-ту добу дослідження прояви вищезазначених гістологічних змін ставали виразнішими. Отримані результати беззаперечно доводять нефротоксичність хлориду кадмію в зазначеній дозі та способі введення в хронічному експерименті на вагітних самицях щурів.

### Обговорення результатів дослідження

Порівнюючи отримані нами результати з аналогічними науковими експериментальними роботами з впливу солей кадмію на морфологію нирок дослідних тварин ми знайшли доказові факти реактивності нирок самиць щурів на хронічний вплив важких металів. Як фільтраційний орган, нирки приймають активну участь у виведенні ксенобіотиків, накопичують в паренхімі кадмії і мають значні зміни в будові структурно-функціональної одиниці – нефроні. В роботах Гоженко А.І. (Одеський державний медичний університет) доведено, що вплив кадмію в дозі  $0,1$  мг/кг маси тварини має виражений нефротоксичний ефект вже на 2 добу введення, який проявляється як на порушенні фільтраційної функції нирок так і канальцевого транспорту [8, 9]. В морфологічних експериментальних роботах під керівництвом Нефьодової О.О. (Дніпровський державний медичний університет) доведено, що вплив ізольованого внутрішньошлункового хронічного введення солей кадмію в дозі  $1,0$  мг/кг призводив до зменшення у 2 рази по відношенню до контролю діаметру нефрону та формувал фрагментарний гломерулосклероз ниркових тілець та зниження активності проліферативних процесів в нирках плодів щура [10].

### Висновки

1. При хронічному впливі хлоридом кадмію у дозі  $2,0$  мг/кг знижувалась маса нирок вагітних самиць.
2. У 63,4% досліджень в групі введення хлориду кадмію визначалось розширення капсули нефрону, що свідчить про формування та наростання набряку в капсулі нефрону нирок вагітних самиць щурів під хронічним впливом хлориду кадмію.
3. При хронічному впливі хлориду кадмію у 17,3% зразків в нирках самиць щурів на гістологічному рівні визначалось формування розширення капсули нефрону у поєднанні з фрагментарним склерозом капілярів клубочку та розширення проксимальних канальців нефронів, що свідчить про нефротоксичний ефект хлориду кадмію в зазначеній дозі в експерименті на щурах.
4. Індекс площі нефрону нирок самиць щура при хронічному впливі кадмієм мав чітко виражену тенденцію до зменшення площі капсули нефрону з достовірною різницею ( $p < 0,001$ ) на обох досліджуваних термінах.

### Перспективи подальших досліджень

На наш погляд, перспективним напрямком досліджень є визначення впливу хлориду кадмію на морфогенез нирок ембріонів щурів дослідних тварин на гістологічному рівні.

### Внесок авторів

Шаторна Віра Федорівна - концепція роботи та дизайн, статичний аналіз, критичний огляд,

остаточне затвердження статті. Краснов Олександр Олександрович - збір та аналіз даних, статичний аналіз, написання статті.

### Конфлікт інтересів

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

### Література

1. Czczot H, Skrzycki M. Kadm--pierwiastek całkowicie zbędny dla organizmu [Cadmium--element completely unnecessary for the organism]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2010; 64:38-49. (Polish).
2. Paranyak RP, Vasylytseva LP, Makukh KHI. Shlyakhy nadkhodzhennya vazhkykh metaliv v dovkillya ta yikh vplyv na zhyvi orhanizmy. *Biolojiya tvaryn [Ways of heavy metals entering the environment and their impact on living organisms]*. 2017; 9(1-2): 83-89. (Ukrainian).
3. Johri N, Jacquillet G, Unwin R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*. 2010 Oct;23(5):783-92. doi: 10.1007/s10534-010-9328-y.
4. Järup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Aug 1;238(3):201-8. doi: 10.1016/j.taap.2009.04.020.
5. Shatorna VF, Krasnov OO. Effect of cadmium chloride on kidney morphology in rats in isolated introduction and in combination with copper and zinc succinates [Effect of cadmium chloride on kidney morphology in rats when administered alone and in combination with copper and zinc succinates]. *Vistnyk problem biolojiyi i medytsyny*. 2022; 1(163): 97-102. (Ukrainian).
6. Shatorna VF, Krasnov OO. Khronichnyy vplyv khlorodyu kadmiyu na embriogenez shchuriv pry izol'ovanomu ta kombinovanomu z suksynatamy tsynku ta midy vnurishn'oshlunkovomu vvedenni v eksperymenti [Chronic effect of cadmium chloride on embryogenesis of rats with isolated and combined with zinc and copper succinates intragastric administration in the experiment]. *Ukrayins'kyi zhurnal medytsyny, biolojiyi ta sportu*. 2022; 7(2):254-260. (Ukrainian).
7. Hordienko VV. Funktsional'ni zminy v diyal'nosti nyrok shchuriv za kadmiyevoyi intoksykatsiyi u systemi «maty-plid» [Functional changes in the activity of rats' kidneys at cadmium intoxication in "mother-fetus" system]. *Bukovyns'kyi medychnyy visnyk*. 2014; 18(71):46-49. (Ukrainian).
8. Hozhenko AY. Znachenye vozzrastnykh osobennostey v reaktsyyi pochek krysa na odnokratnoe vvedenye dykhloryda kadmya [The significance of age-related characteristics in the reactions of kidneys to a single injection of cadmium dichloride]. *Bukovyns'kyi medychnyy visnyk*. 2003;1-2:27-31. (Russian).
9. Hozhenko AY. Patohenez toksycheskykh nefropaty [Pathogenesis of toxic nephropathies] Aktual'ni problem transportnoyi medytsyny. 2006; 2(4):9-15. (Russian).
10. Nefodova OO, Azarov OI, Harets' VI, Kuznetsova OV, Zhytniy MI, Shevchenko IV, Mal'chuhin RK. Vplyv soley kadmiyu na nefrohenez u shchuriv pry izol'ovanomu vvedenni ta v kombinatsiyi z tsytatamy metaliv [Effect of cadmium salts on nephrogenesis in rats when administered alone in combination with metal citrates]. *Visnyk problem biolojiyi i medytsyny*. 2021; 1(159):224-230. (Ukrainian).

### Summary

#### ANALYSIS OF CHRONIC EFFECTS OF CADMIUM CHLORIDE ON NEPHROGENESIS IN RATS

Shatorna V.F., Krasnov O.O.

Key words: cadmium, kidneys, rats, experiment, nephron, heavy metals, urinary system.

Basic clinical, morphological and statistical studies identify cadmium as one of the causes of toxic kidney damage and a number of diseases that overcomes the placental barrier. Determining the changes that occur in the morphology of organs under the impact of cadmium chloride in pregnant female rats is an urgent task for modern morphological research.

Objectives. In this work, we investigate the nephrotoxic effects of chronic cadmium chloride exposure in pregnant rats in experiment. Material and methods. Pregnant rats with confirmed gestational age were administered a 2.0 mg/kg cadmium chloride solution daily via intragastric gavage. Surgical removal of the kidneys was performed on days 13 and 19 of gestation for subsequent analysis. We determined the kidney mass and assessed nephron elements on histological preparations. These measurements included the diameter of the renal corpuscle, the nephron capsule area, the glomerulus area, and their ratio (glomerulus area index).

Results and discussion. Chronic exposure to cadmium chloride in a dose of 2.0 mg/kg reduced the weight of the kidneys in pregnant females at both periods of the study. At the histological level, an increase of the nephron capsule was found in combination with fragmentary sclerosis of glomerular capillaries that indicates the nephrotoxic effect of cadmium chloride in the indicated dose in the experiment on rats. The nephron area index of the kidneys of female rats with chronic exposure to cadmium had a pronounced tendency to decrease the area of the nephron capsule with a significant difference ( $p < 0.001$ ) at both time points.

Conclusion. Chronic cadmium chloride exposure resulted in reduced kidney weight in females. Histological examination revealed enlarged nephron capsules alongside glomerular capillary sclerosis, indicating the nephrotoxic effect of the administered dose in this rat experiment. Notably, the nephron area index displayed a consistent decline in the area of the nephron capsule at both time points in cadmium-exposed female rats.