

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ ТА ЦИТРАТІВ МЕТАЛІВ
НА СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ****Державний заклад Дніпропетровська медична академія МОЗ України****(м. Дніпропетровськ)**

Дане дослідження є фрагментом міжкафедральної планової наукової теми Державного закладу «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України «Розвиток та морфофункціональний стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в нормі, в онтогенезі, під впливом зовнішніх чинників», № державної реєстрації 0111U012193.

Вступ. Дослідження учених підтверджують виключно важливу роль мікроелементів в здоров'ї людини. Вони відіграють значну роль у формуванні та побудові тканин організму, особливо кісток скелета, підтримують кислотно-лужну рівновагу в організмі, осмотичний тиск клітинних і позаклітинних рідин, визначають стан водно-сольового обміну, згортання крові, беруть участь у м'язовому скороченні, створюють необхідні умови для нормального перебігу процесів обміну речовин і енергії. Значна роль мікроелементів припадає на підтримання репродуктивної функції, гормонального статусу та розвитку ембріону [1, 2, 6, 8, 11].

Значення мінеральних речовин для утворення та формування білка, для ферментативних процесів досліджуються все більше. Порушення мінерального обміну призводить до розвитку важких патологічних станів – остеопорозу, остеомалачії, рахіту, підвищенню нервово-м'язової збудливості і ін. Підвищення або зниження вмісту певних мінеральних речовин в організмі характерно для багатьох захворювань [14, 16].

Для промислових областей проблема забруднення важкими металами особливо актуальна. Об'єктом інтересу стають зміни в навколишньому середовищі, що виникають під впливом антропогенних факторів, збільшення відсотку солей важких металів, які є тератогенами та можуть провокувати порушення розвитку органів [4, 5, 6, 7]. При цьому, пріоритетним токсикантом є свинець. Незважаючи на відповідність його змісту в харчових продуктах гігієнічним нормативам, рівень сумарного добового надходження знаходиться на рівні верхньої межі допустимого добового споживання за даними ВООЗ. Концентрація сполук свинцю в крові дорослого населення, особливо вагітних, а також дітей суттєво перевищує гігієнічний норматив – до 3 разів [4, 5, 7].

Але в сучасному суспільстві неможливо не приділяти увагу новим технологіям, що розвиваються дуже стрімко. В усіх галузях господарства і в

медицині все більше місця займають нанотехнології [7, 9, 10, 12]. У зв'язку з розвитком технологій одержання та використання наноматеріалів, які завдяки особливим фізичним, хімічним та механічним властивостям здатні завдавати непрогнозованого впливу на біологічні об'єкти, в сучасній науці постає проблема оцінки ризику для організму людини і навколишнього середовища при виробництві та застосуванні наноречовин [14, 15]. Загальновідомо, що наночастки металів володіють не тільки більш вираженою фармакологічною активністю, але і токсичністю в порівнянні із звичайними мікроелементами, здатні проникати в незміненому вигляді через клітинні бар'єри, а також через гематоенцефалічний бар'єр в центральну нервову систему, циркулювати і накопичуватися в органах і тканинах, викликаючи більш виражені патоморфологічні зміни у внутрішніх органах, а також мають тривалий період напіввиведення [17, 18]. Тому вивчення впливу наночастинок металів на ембріогенез та репродуктивну систему є нагальним та актуальним. Не дивлячись на те, що наноматеріали у світі вже використовуються друге десятиліття, жоден з їх різновидів не був у повному обсязі вивчений щодо впливу на ембріогенез взагалі та на органогенез зокрема.

Експериментів, спеціально присвячених рішення питань впливу мікроелементів та їх наноформ на організм матері та репродуктивну функцію і розвиток ембріону незначна кількість, а задачі, що вирішуються не є комплексними [3, 12, 13]. В цьому аспекті набувають значення експериментальні методи дослідження.

Мета дослідження. Дослідити вплив ацетату свинцю та комбінації ацетату свинцю з нанозолотом, або наносріблом на репродуктивну систему та хід ембріогенезу дослідних тварин.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом дослідження було обрано в якості експериментальних тварин щурів. Годування, пиття, пересаджування тварин, зміна підстилки, миття кліток, прибирання приміщень проводилось з дотриманням стандартних умов, описаних в рекомендаціях. Дослідження на тваринах проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджуються з Європейською конвенцією про захист експериментальних тварин (Страсбург, 1985).

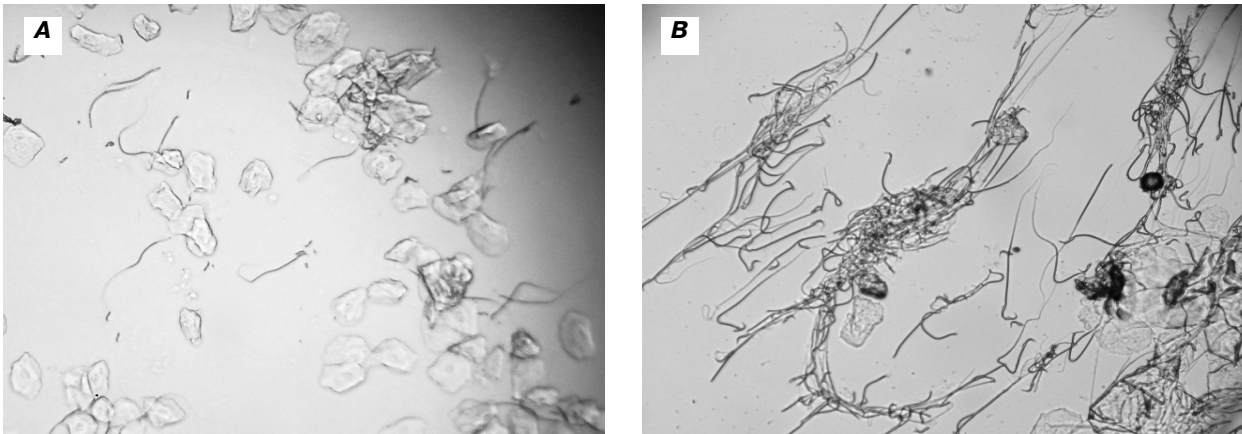


Рис. 1. Мікрофотографія незабарвленого нефіксованого вагінального мазка самиці щура та визначення першого дня вагітності. **А** – естральні клітини в мазках самиці. **В** – сперматозоїди та естральні клітини. **Зб. 7х8.**

В експериментальних моделях використовували розчини цитрату срібла та цитрату золота, отриманих за аквананотехнологією. Цитрати біометалів безпечні, більше того, вони проявляють антиоксидантну і радіопротекторну дію, позитивно впливають на серцево – судинну і імунну системи організму [12, 13].

В якості токсиканта обрано ацетат свинцю. Вибір свинцю як досліджуваної речовини обґрунтовується широким його розповсюдженням в об'єктах довкілля промислового регіону, при цьому свинець, як політропний токсин і найбільш глобальний токсикант, який впливає на якість гамет та на перебіг вагітності.

Експериментальна частина роботи виконана на 42 білих статевозрілих щурах-самицях лінії Вістар вагою 180-200 грам у віці 95-110днів. Моделювання впливу розчинів нанометалів на організм самиці та на ембріогенез у щурів проводили за наступним планом.

Всі щури були розділені на 4 групи: 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 нанозолота у дозі 1,5 мкг/кг; 3 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05мг/кг та розчин наносрібла у дозі 2мкг/кг; 4 група – контрольна. Згідно загальноприйнятим інструкціям проведення експериментальних робіт, розчини металів та нанометалів вводили самицям через зонд один раз на добу, в один і той же час, з 1 по 19 день вагітності (на 20-й день вагітності проводили оперативний забій).

Результати досліджень та їх обговорення. На підготовчому етапі перед проведенням експерименту вивчали функціональний стан яєчників у 80 самиць з початковою масою 150-180 г, віком 2,5-3 міс., у яких досліджували естральний цикл методом піхвих мазків. Щури – поліестричні тварини з тривалістю естрального циклу 4-5 днів і спонтанним типом овуляції. Всього за 12 днів (період карантину) було проаналізовано 800 препаратів, що дозволило визначити у кожній самки тривалість циклу та окремих його фаз, наявність усіх 4 фаз циклу та ритмічність їх чергування. Перший день вагітності

визначали за наявністю сперматозоїдів у піхвих мазках (**рис. 1**). У період статевого спокою в піхві переважають дрібні клітини – лейкоцити – стадія естрального циклу щура – дієструс. Передтічкова стадія характеризується різким зменшенням числа лейкоцитів, появою овальних клітин з ядрами і великих ороговілих естральних лусочок – без'ядерних клітин – стадія про еструс – цю стадію визначали в наших дослідженнях для подальшого спарювання експериментальних тварин. При типовій тічці в полі зору мікроскопа виявляються тільки одні естральні лусочки різної форми, що нагадують розбиті крижинки – еструс (**рис. 1. А**). Саме в цей період відбувається запліднення, яке і визначалось нами по наявності сперматозоїдів в піхві самиці. Після тічки у піхві з'являються лейкоцити і клітини з ядрами, відбувається зменшення естральних лусочок – метаетрус – запліднення в цей період не відбувається. Вагінальні мазки бралися в один і той самий час, а саме – з 9. 00. до 11. 00. ранку і при наявності в мазку сперматозоїдів самиць відсаджували в окремі клітини та починали відлік терміну вагітності (**рис. 1. В**).

На 20-й добі вагітності проводили оперативний забій. Під час операції приділяли особливу увагу органам репродукції та змінам, що виникають після впливу розчину важких металів та в комбінуванні з нанометалами. Для визначення фертильності самок щурів досліджували будову самих репродуктивних органів: матки та яєчників як вагітних так і невагітних самок (**рис. 2**).

Щури – це ссавці, що мають двороздільну матку (правий та лівий ріг), кожен ріг якої фіксується на брижі і наприкінці якого розташовано яєчник. Окремо вивчалися форма та вагові показники гонад.

В цей же час визначали постімплантаційну смертність по різниці між кількістю місць імплантації і кількістю живих плодів. Місця імплантації добре помітні неозброєним оком – плацента темного кольору і виглядає як виступ стінки матки (**рис. 3**). Ембріонів разом з плацентою обережно вилучали з матки не порушуючи пупкового канатику для подальших термінових прижиттєвих аналізів. Тест «живі-мертві» ембріонів проводили відразу після вилучення з

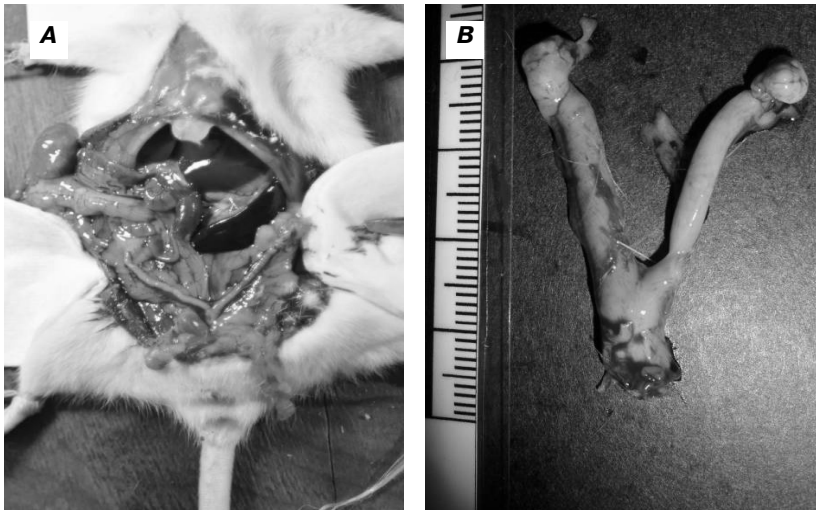


Рис. 2. Фотографія матки невагітної (А) самиці щура під час оперування та відпрепарованої матки і яєчників (нефіксований препарат) (В).

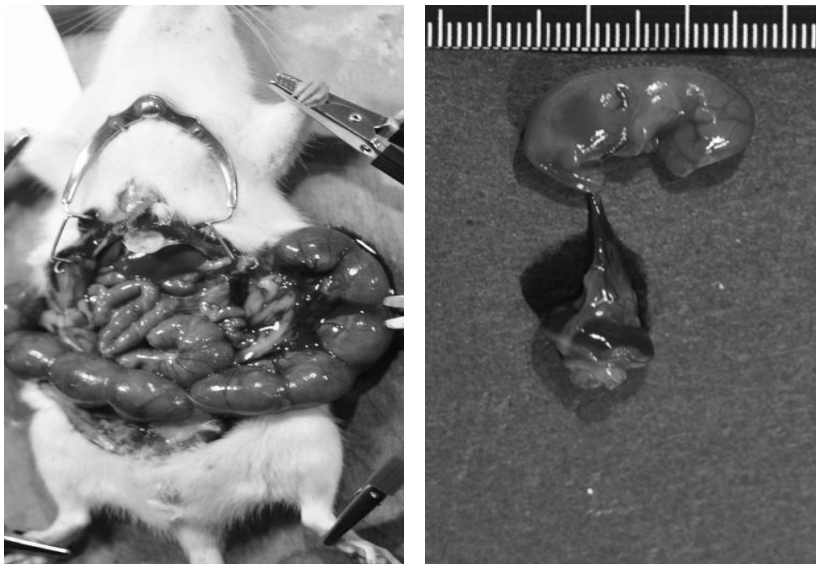


Рис. 3. Фотографія матки з ембріонами вагітної самиці щура контрольної групи під час оперування. Ембріони в маткових трубах. Ембріони з плацентою та пупковим канатиком, вилучені з маткових труб.

матки: доторкання голкою до ембріона у живих викликає рефлекторні рухи. Результати тестування заносилися до протоколу і використовували для визначення наступних показників можливого токсичного впливу досліджуваних агентів (табл.).

Порівняння результатів дії низьких доз свинцю з показниками контрольної групи виявило його ембріотоксичність. Так, при практично однаковій кількості жовтих тіл вагітності в цих двох групах, спостерігається достовірне зниження кількості живих плодів на $17\% - 7,5 \pm 0,53$ проти $9,0 \pm 0,4$ у контрольній групі відповідно (табл.).

В другій та третій експериментальних групах з використанням комбінації ацетату свинцю і нанометалів золота та срібла визначалося зменшення токсичної дії ацетату свинцю, а саме: збільшення кількості ембріонів, кількості жовтих тіл (рис. 4), що



Рис. 4. Фотографія матки з ембріонами вагітної самиці щура експериментальної групи (розчин ацетату свинцю + розчин нанозолота) під час оперування. Кількість ембріонів в маткових трубах збільшено в порівнянні з контролем (див. рис. 3).

свідчить на користь позитивної дії останніх на репродуктивну систему та ембріогенез.

Визначаючи вплив досліджуваних агентів на стан репродуктивної функції дослідних тварин, нами детально вивчалися яєчники самиць усіх експериментальних груп. Яєчники щурів мають округлу форму, горбисту поверхню, їх розміри та вага змінюються з віком та залежать від стадії естрального циклу у невагітних та під час вагітності. У статевозрілих самок фолікули видно неозброєним оком, за рахунок чого сам орган і має горбисту поверхню (рис. 5).

В фазу метеструсу з'являються жовті тіла, що мають більший діаметр у порівнянні з зрілими фолікулами. Жовті тіла видні під оболонкою яєчника як білувато-жовті сферичні угруповання, що виступають над поверхнею органа (рис. 6).

Аналіз отриманих результатів в групі, що отримувала комбінацію ацетату свинцю та наносрібло виявив покращення показників репродуктивної системи та ембріонального розвитку порівняно з інтактною групою, що проявляється достовірним підвищенням кількості живих ембріонів на 1 самицю на $12,6\%$, що обумовлено підвищенням кількості жовтих тіл вагітності майже на 10% при практично однакових показниках загальної та доімплантаційної смертності та відсутності постімплантаційної смертності.

МОРФОЛОГІЯ

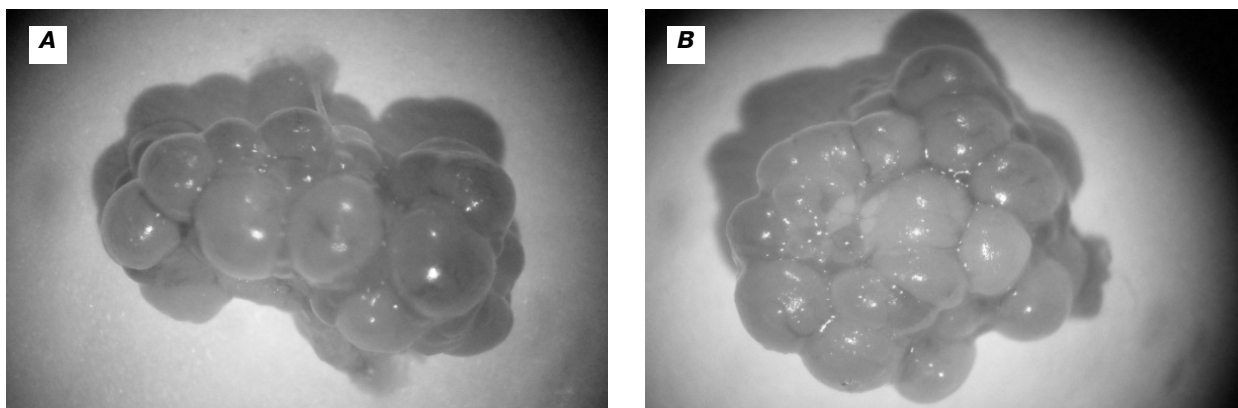


Рис. 5. Макроскопічна фотографія нефіксованих яєчників статевозрілої невагітної самиці щура овальної (А) та сферичної (В) форми. Добре видно фолікули різного ступеню зрілості.

Таблиця

Результати впливу ацетату свинцю та комбінованого впливу з нанометалами на стан репродуктивної системи в експерименті

Показник	Контроль	Дослідні групи		
		ацетат свинцю	ацетат свинцю + нанозолото	ацетат свинцю + наносрібло
Кількість тварин	8	8	8	8
Кількість живих плодів	72	60	92	81
Кількість живих плодів на 1 самицю	9,0±0,4	7,50±0,53*	11,50±0,93*, **	10,13±0,4*, **
Кількість жовтих тіл вагітності	81	79	103	89
Кількість жовтих тіл вагітності на 1 самицю	10,13±0,53	9,88±0,53	12,88±1,06*, **	11,13±0,27**

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ° – $p = 0,05-0,1$ по відношенню до контролю; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; ° – $p = 0,05-0,1$ по відношенню до групи з ацетатом свинцю.

Отже, при комбінованому введенні препаратів свинцю та наноаквахелату срібла, не зважаючи на наявність ембріотоксичних проявів при ізольованому введенні свинцю, спостерігається покращення показників репродуктивної здатності експериментальних тварин.

Аналогічні зміни спостерігались нами і в групі експерименту при комбінованому введенні препаратів свинцю та наноаквахелату золота, не зважаючи на наявність ембріотоксичних проявів при ізольованому введенні свинцю, визначалось покращення показників ембріонального розвитку, що проявляється суттєвим збільшенням кількості жовтих тіл вагітності, живих плодів на одну самицю. Результати експерименту виявили суттєве збільшення кількості живих плодів – на 53,3% ($p < 0,001$), що обумовлено збільшенням на 30,4% ($p < 0,05$) жовтих тіл вагітності.

Висновок. Таким чином, при комбінованому введенні низьких доз свинцю + наносрібло та свинцю+ нанозолото спостерігається збільшення кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів, що обумовлено зниженням загальної та доімплантаційної ембріональної смертності порівняно з групою зі свинцевою інтоксикацією. Введення розчинів наноаквахелату золота або срібла на фоні інтоксикації синцем попереджує негативний вплив останнього на репродуктивну систему та процеси

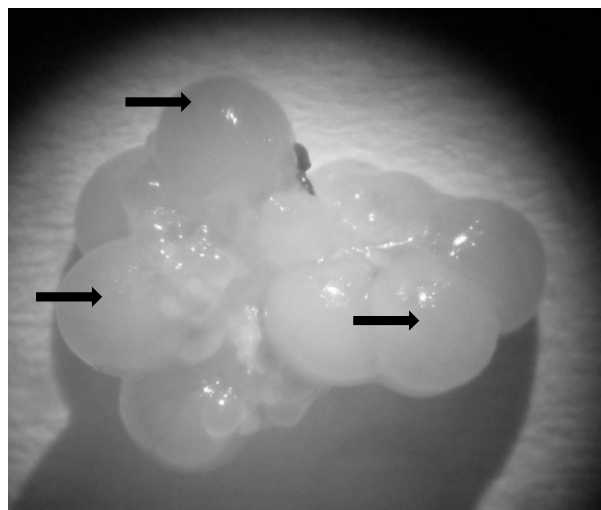


Рис. 6. Макроскопічна фотографія нефіксованих яєчників статевозрілої вагітної самиці щура. Добре видно жовті тіла (вказано стрілками).

ембріонального розвитку плодів в експериментальних умовах та свідчить про їх біоантагонізм.

Перспективи подальших досліджень. Пошуки нових біоантагоністів токсикантам, що присутні в навколишньому середовищі промислово-розвинених регіонів є актуальною задачею сучасних морфологічних досліджень.

Література

1. Джумгазієва Д. С. Дослідження мутагенної дії золотих наночасток в мікроядерному тесті / Джумгазієва Д. С., Маслякова Г. Н., Сулейманова Л. В., Бучарская А. Б. // Бюлетень експериментальної біології і медицини. – 2011. – № 6. – С. 45-53.
2. Динерман А. А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития / А. А. Динерман. – М.: Медицина, 1980. – 191 с.
3. Доклад для международного совета по управлению риском. Управление риском для применений нанотехнологий в продуктах питания и косметических средствах / А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко [и др.] // Сб.: Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. Обзорная информация. – Москва, 2009. – Вып. 5. – С. 3-79.
4. Експериментальне вивчення механізмів комбінованої дії малих доз пестицидів, нітратів, солей свинцю та кадмію / М. М. Коршун, Н. А. Колесова, М. І. Веремій [та ін] // Сучасні проблеми токсикології. – 2001. – №3. – С. 46-50.
5. Зербино Д. Д. Свинец – этиологический фактор поражения сосудов: основные доказательства / Д. Д. Зербино, Т. Н. Соломенчук, Ю. А. Поспишил // Архив патологии. – 1997. – № 1. – С. 9-12.
6. Казачков В. И. Модифицирующее действие свинца на эмбриотоксичность кадмия / В. И. Казачков, З. М. Гасимова, Л. Ф. Астахова // Медицина труда и пром. экол. – 2002. – № 3. – С. 60-63.
7. Картель М. Т. Концепція методології ідентифікації та токсикологічних досліджень наноматеріалів і оцінки ризику для людського організму та довкілля при їх виробництві і застосуванні / М. Т. Картель, В. П. Терещенко // Химия, физика и технология поверхности : Межвед. сб. науч. труд. – К.: Наукова Думка, 2008. – Вып. 14. – С. 565-583.
8. Коршун М. М. Проблема комбінованої дії на організм пріоритетних хімічних забруднювачів ґрунту / М. М. Коршун // Довкілля та здоров'я. – 2002. – № 4. – С. 50-56.
9. Купша Е. И. Морфологическая характеристика некрозов как маркеров деструкции в печени белых крыс в условиях длительного поступления в организм субтоксических доз ацетата свинца / Е. И. Купша, В. В. Бондаренко, А. Н. Грабовой // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения Труды Крымского государственного университета им. С. И. Георгиевского. – 2010. – Т. 146, Ч. V. – С. 86-89.
10. Луковникова Л. В. Металлы в окружающей среде, проблемы мониторинга / Л. В. Луковникова, А. Д. Фролова, Л. П. Чекунова // Эфферентная терапия. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 74-79.
11. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования // Методические рекомендации №1744. – 1977. – 10 с.
12. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- та мікроелементів / [А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов] // Журнал Академії медичних наук України. – 2010. – Т. 16, №3. – С. 467-471.
13. Новинюк Л. В. Цитраты – безопасные нутриенты / Л. В. Новинюк // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2009. – №3 – С. 70-71.
14. Свинец и его действия на организм (обзор литературы) / А. И. Корбакова, Н. С. Соркина, Н. Н. Молодкина [и др.] // Медицина труда и пром. экол. – 2001. – № 5. – С. 29-34.
15. Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды / И. М. Трахтенберг // Довкілля та здоров'я. – 1997. – № 2. – С. 48-51.
16. Якубчак О. М. Ефективність використання наноконвенту порошку феромагнетика в якості мікродобавки до корму для курчат-бройлерів / О. М. Якубчак, Л. В. Коваленко, Л. В. Бусол // Науковий Вісник НУБіП України. – 2010. – Вип. 151, Ч. 2. – С. 366-370.
17. Hoshno A. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on their Surface Modification / A. Hoshno, K. Fujioka, T. Oku [et al.] // Nano Letters. – 2004. – Vol. 4, № 11. – P. 2163-2169.
18. Oberdorster G. . Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects From Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy, Particle, Fibre / G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson [et al.] // Toxicology. – 2005. – Vol. 2, № 8. – P. 235-246.

УДК 611.12-034:591.33-092.9

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ ТА ЦИТРАТІВ МЕТАЛІВ НА СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Савенкова О. О.

Резюме. Метою дослідження було визначення впливу ацетату свинцю та нанометалів на репродуктивну систему та хід ембріогенезу дослідних тварин.

В експериментальних моделях використовували розчини цитрату срібла, золота, отриманих за аквананотехнологією та розчин ацетату свинцю. Експериментальна частина роботи виконана на щурах-самцях лінії Вістар.

Результати експерименту показали, що при комбінованому введенні низьких доз свинцю + наносрібло та свинцю+ нанозолото спостерігається збільшення кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів порівняно з групою зі свинцевою інтоксикацією при практично однаковій масі плодів. Дослідження показали, що прийом препаратів нанозолота та наносрібла на фоні інтоксикації синцем попереджує негативний вплив останнього на процеси ембріонального розвитку плодів в експериментальних умовах та свідчить про їх біоантагонізм.

Ключові слова: наноаквахелат золота, наноаквахелат срібла, ацетат свинцю, ембріогенез, ембріотоксичність.

УДК 611. 12-034:591. 33-092. 9

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА И ЦИТРАТОВ МЕТАЛЛОВ НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Савенкова Е. А.

Резюме. Целью исследования было определение влияния ацетата свинца и нанометаллов на репродуктивную систему и ход эмбриогенеза подопытных животных.

В экспериментальных моделях использовали растворы цитрата серебра, золота, полученных по аква-нанотехнологии и раствор ацетата свинца. Экспериментальная часть работы выполнена на крысах-самках линии Вистар.

Результаты эксперимента показали, что при комбинированном введении низких доз свинца + наносеребра и свинца + нанозолото наблюдается увеличение количества желтых тел беременности, количества живых плодов по сравнению с группой со свинцовой интоксикацией при практически одинаковой массе плодов. Исследования показали, что прием препаратов нанозолота и наносеребра на фоне интоксикации свинцом предупреждает негативное влияние последнего на процессы эмбрионального развития в экспериментальных условиях и свидетельствует об их биоантагонизме.

Ключевые слова: наноаквахелат золота, наноаквахелат серебра, ацетат свинца, эмбриогенез, эмбриотоксичность.

UDC 611. 12-034:591. 33-092.

The Influence of Acetate and Lead Citrate Metals on Reproductive Function in the Experiment

Savenkova O. O.

Summary. With the present state of environmental problems, when many chemical, physical and pharmacological factors affect to humans living in industrialized zone, relevant and timely is the study of the influence of certain trace metals and their nanoform on health in general and reproductive function and embryogenesis. Information about safety and potential risks of nanomaterials is desperately needed, both for the health of the adult and for the developing organism. Unfortunately researches on the effects of nanomaterials on the body almost touching research to identify the extent and possible teratogenicity embryotoxicity of nano products.

The aim of the research was to determine the effect of lead acetate and nanometals on the reproductive system and the process of embryogenesis of experimental animals (determined before and postinplantation fetal mortality).

In experimental models using citrate solutions of silver, gold, obtained by aquanotechnology and lead acetate solution. Experimental work performed at 42 white mature rats of Wistar- line female rats weighing 180-200 g at the age of 95-110 days. All rats were divided into 4 groups: the first group – animals injected with a solution of lead acetate at a dose of 0.05 mg / kg, the 2nd group – animals injected with a solution of lead acetate at a dose of 0.05 mg / kg and nanogold solution at a dose of 1, 5 mg / kg, the 3rd group – animals injected with a solution of lead acetate at a dose of 0.05 mg / kg and at a dose of solution of nanosilver 2mkh/kh, and the 4th group – control one. According to generally accepted guidelines for experimental work, solutions of metals and nanometals injected females gavaged once a day, at one and the same time, from 1 to 19 days of pregnancy (on the 20th day of pregnancy was performed operative slaughter).

Experimental results showed that the combined administration of low doses of lead and lead + nanosilver+ nanogold growing number of corpora lutea of pregnancy, number of live fetuses, due to the decrease in general and preinplantation embryonic mortality compared with the group with lead intoxication is almost the same weight of embryos. The above gives grounds to assert that taking drugs of nanogold and nanosilver on a black background intoxication prevents negative impact on the latter processes of embryonic development of the fetus in the experimental conditions and shows their bioantagonism.

Key words: nanoaquahelat of gold, nanoaquahelat of silver, lead acetate, embryogenesis, embryotoxicity.

Рецензент – проф. Шаторна В. Ф.

Стаття надійшла 14. 06. 2013 р.