

## **МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОСТІ ТА ТЕРАТОГЕННОСТІ В МОРФОЛОГІЧНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАХ**

**ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»**

**(м. Дніпропетровськ)**

Дане дослідження є фрагментом міжкафедральної планової наукової теми ДЗ «ДМА 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.** При сучасному стані екологічних проблем, коли безліч хімічних, фізичних та фармакологічних факторів впливає на організм людини, що живе в промислових зонах, актуальним і своєчасним є дослідження впливу мікроелементів певних металів та їх наночастин на здоров'я людини взагалі та репродуктивну функцію і ембріогенез. Зокрема, для промислово розвинених областей України проблема забруднення важкими металами особливо актуальна. Загальновідомо, що одним з найбільш поширених токсикантів є свинець та його сполуки [1, 2, 3].

Одне з центральних місць в сучасних дослідженнях посідають виявлення морфологічних змін та вад розвитку організму, що виникають внаслідок дії різних факторів [3, 7, 11, 12]. Серед сучасних досліджень з нанобіотехнологій зовсім незначна їх частина присвячена дослідженню впливу тих чи інших нанопродуктів на ембріогенез та органогенез. Останнім часом, за даними науково-медичної інформації, вплив на загальний хід ембріогенезу та на розвиток окремих органів досліджується все більше. Однак, незважаючи на інтенсивні дослідження останніх років, відомості щодо ефектів впливу наночастинок металу на організм та на ембріон є досить обмеженими і суперечливими, тому експериментальні роботи з зазначеного напрямку актуальні сьогодні як ніколи. Аналіз даних світової наукової літератури на предмет можливого тератогенного та ембріотоксичного впливу важких металів та нанометалів на організм довів доцільність проведення експериментальних робіт в зазначеному напрямку. [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12].

Дослідження впливу на ембріогенез тих чи інших чинників експериментальним шляхом у людини неможливе, тому доцільним є використання експериментальних моделей впливу на дослідних тваринах та визначення ембріотоксичності та тератогенності з використанням адекватних методик.

**Мета дослідження** – дослідити можливий ембріотоксичний та тератогенний вплив ацетату свинцю та нанометалів в експерименті на щурах з використанням методики визначення ембріотоксичності та тератогенності.

**Об'єкт і методи дослідження.** Експериментальна частина роботи виконана на 42 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар вагою 180-200 грам у віці 95-110 днів. В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю та цитрату срібла, золота, отриманих за аквананотехнологією [8]. 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).

Для виконання досліджень використовували наступні речовини: ацетат свинцю (виробник – ЗАТ «Науково-дослідний центр фармакотерапії», м. Санкт-Петербург, Росія), розчини нанозолота та наносрібла (виробник – Інститут нанобіотехнологій та ресурсозбереження України, м. Київ).

Моделювання впливу ацетату свинцю та 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 0,05 мг/кг; 2 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг та розчин нанозолота у дозі 1,5 мкг/кг; 3 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг та розчин наносрібла у дозі 2 мкг/кг; 4 група – контрольна. 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). Дослідних тварин виводили з експерименту способом передозування ефірним наркозом після видалення матки з ембріонами.

Показниками ембріотоксичності служать: доімплантаційна та постімплантаційна ембріональна смертність, морфологічні (анатомічні) вади розвитку, а також загальна затримка розвитку плодів. Доімплантаційну смертність визначають за різницею між кількістю жовтих тіл в яєчниках і кількістю місць імплантації в матці; постімплантаційну смертність по

різниці між кількістю місць імплантацій і кількістю живих плодів. Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками [2]:

## 1. Індекс плодовитості:

кількість отриманих послідів  
кількість спарених маток

## 2. Загальна ембріональна смертність (ЗСЕ)

$$\text{ЗСЕ} = \frac{B-A}{B} \times 100\%, \quad (1)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість жовтих тіл вагітності

## 3. Доімплантаційна смертність (ДІС), од.

$$\text{ДІС} = \frac{B - (A+B)}{B} \quad (2)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість загиблих (резорбованих) плодів

В – кількість жовтих тіл вагітності

## 4. Постімплантаційна смертність (ПостІС)

$$\text{ПостІС} = \frac{B}{A+B} \text{ (од.)}, \quad (3)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість загиблих (резорбованих) плодів

## 5. Кількість плодів на 1 самку

Визначення **тератогенності** проводили за загальноприйнятими методиками, згідно W. Wilson. Показниками тератогенної дії є:

1) Наявність зовнішніх аномалій розвитку, що встановлюється при зовнішньому огляді ембріонів

2) Наявність аномалій розвитку внутрішніх органів. Для їх виявлення застосовують метод сагітальних зрізів, запропонований W. Wilson (1965).

За цим методом через ембріон, фіксований у розчині Буена та промитий водопровідною водою здійснюють 9 стандартних зрізів. Всі зрізи розглядають через бінокулярну лупу та виявляють наявність зовнішніх та внутрішніх аномалій (рис. 1).

## Результати досліджень та їх обговорення.

Для виявлення самиць з фіксованим терміном вагітності визначали стадії естрального циклу шляхом вивчення вагінального мазка. Першим днем вагітності вважали день виявлення сперматозоїдів в вагінальному мазку (рис. 2). У період статевих 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 проєструс. При типовій тічці в полі зору мікроскопа виявляються тільки

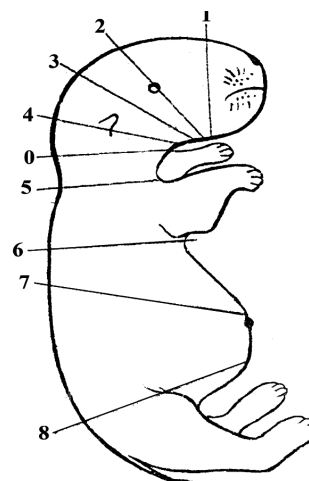


Рис. 1. Стандартні лінії розсічення ембріону для визначення тератогенності за W. Wilson.

Рівні проведення сагітальних зрізів через ембріон щура:

- відокремлення голови від тулуба
- зріз за вібрисами для розглядання стану твердого піднебіння
- зріз через очі для розглядання стану очей
- зріз через великі півкулі головного мозку для оцінки їх стану
- зріз через потиличні доли та мозочок для оцінки їх стану
- зріз через серце та верхівки легень для оцінки їх стану
- зріз через печінку для оцінки стану печінки та діафрагми
- зріз через нирки для оцінки їх стану
- зріз на рівні малого тазу для встановлення статі тварини та оцінки стану статевих органів.

одні естральні лусочки різної форми, що нагадують розбиті крижинки – еструс (рис. 2 А).

Саме в цей період відбувається запліднення, яке і визначалось по наявності сперматозоїдів в піхві самиці. Після тічки у піхві з'являються лейкоцити і клітини з ядрами, відбувається зменшення естральних лусочок – метаєструс – 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

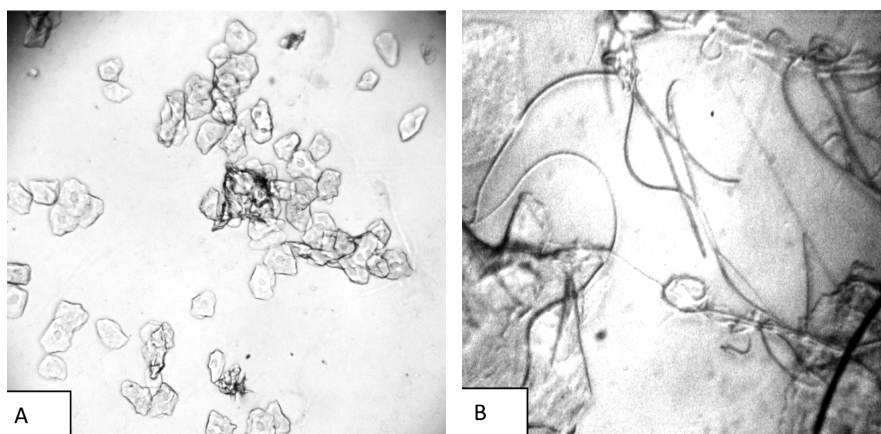
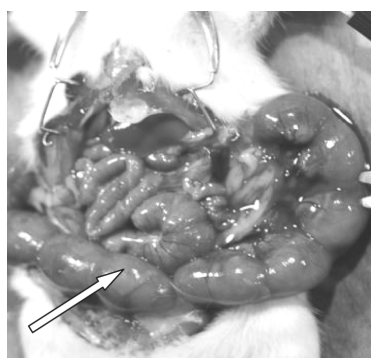


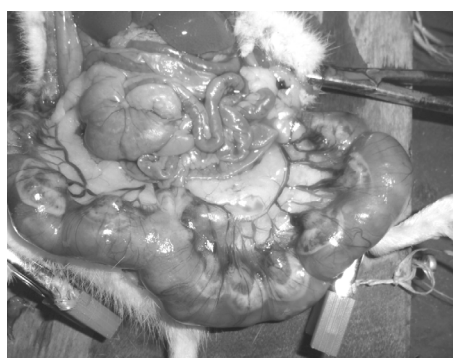
Рис. 2. Мікрофотографія незабарвленого нефіксованого вагінального мазка самиці щура та визначення першого дня вагітності. А – естральні клітини в мазках самиці. В – сперматозоїди та естральні клітини. 36. 7x8.



**Рис. 3.** Фотографія матки невагітної (А) самиці щура під час оперування та відпрепарованої матки і яєчників (нефіксований препарат) (В).



**Рис. 4.** Фотографія матки з ембріонами вагітної самиці щура контрольної групи під час оперування. Ембріони в маткових трубах вказано стрілкою.



**Рис. 5.** Фотографія матки з ембріонами вагітної самиці щура експериментальної групи №3 під час оперування. Кількість ембріонів в маткових трубах збільшено в порівнянні з контролем (див. рис. 4).

окремі клітки та починали відлік терміну вагітності (**рис. 2 В**).

Під час операції приділяли особливу увагу органам репродукції та змінам, що виникають після впливу розчину металів та нанометалів. Щури – поліестральні ссавці, що мають двороздільну матку (правий та лівий ріг), кожен ріг якої фіксується на брижі і наприкінці якого розташовано яєчник. Роги матки можуть бути в нормі як повністю симетричні та однакові по діаметру так і асиметричні (**рис. 3**).

Під час проведення операції вагітних самок, уважно оглядали внутрішні органи, матку, судини, яєчники, визначали кількість ембріонів в кожному відділі двороздільної матки і заносили дані до протоколу для визначення ембріотоксичності (**табл.**). Таким чином, визначали постімплантаційну смертність по різниці між кількістю місць імплантації і кількістю живих плодів за формулою (3). Місця імплантації добре помітні неозброєним оком – плацента темного кольору і виглядає як виступ стінки матки (**рис. 4, 5**).

Ембріонів разом з плацентою обережно вилучали з матки не порушуючи пупкового канатику для подальших термінових прижиттєвих аналізів. Після фіксації ембріонів проводилось визначення тератогенного впливу досліджуваних чинників. Вивчення стандартних зрізів у ембріонів усіх груп не виявило тератогенної дії (**рис. 6**).

Порівняння результатів ембріотропної дії низьких доз свинцю з показниками контрольної групи виявило його ембріотоксичність. Так, при практично однаковій кількості жовтих тіл вагітності спостерігається достовірне зниження кількості живих плодів на 17 % –  $7,5 \pm 0,53$  проти  $9,0 \pm 0,4$  відповідно. В експериментальних групах з використанням нанометалів визначалося зменшення токсичної дії на репродуктивну систему, а саме: збільшення кількості ембріонів, кількості жовтих тіл та інші досліджувані показники (**рис. 4**). Це свідчить на користь

Таблиця

**Показники ембріотоксичності досліджуваних агентів в експерименті**

| Показник                            | Контроль         | Дослідні групи        |                            |                            |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                     |                  | ацетат свинцю         | ацетат свинцю + нанозолото | ацетат свинцю + наносрібло |
| Загальна ембріональна смертність, % | $11,11 \pm 4,43$ | $24,05 \pm 1,33^{**}$ | $10,68 \pm 3,82^{***}$     | $8,99 \pm 4,46^{***}$      |
| Доімплантаційна смертність, од      | $0,10 \pm 0,05$  | $0,23 \pm 0,06$       | $0,11 \pm 0,10$            | $0,09 \pm 0,04 \cdot$      |
| Постімплантаційна смертність, од    | $0,01 \pm 0,01$  | $0,02 \pm 0,02$       | -                          | -                          |

**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.



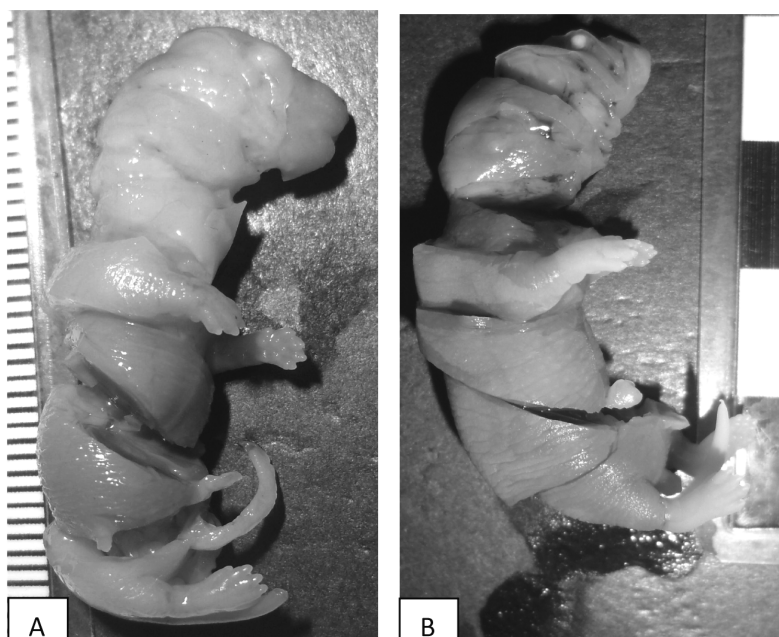


Рис. 6. Фотографія стандартних зрізів проведених через ембріони щура контрольної (А) та експериментальної (В) груп після фіксації.

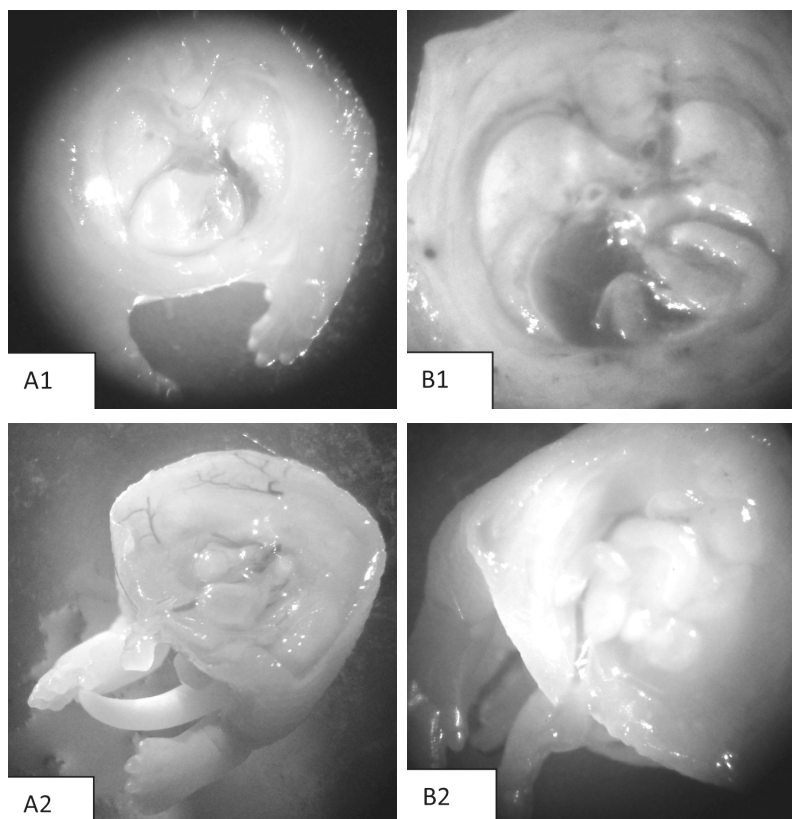


Рис. 7. Фотографія стандартних зрізів №5 та №8 ембріонів щура контрольної (А1, А2) та експериментальної (В1, В2) груп після фіксації.

компенсаторної дії нанометалів на ембріотоксичність ацетату свинцю.

При порівнянні зрізів через ембріон щура експериментальних груп з контрольною на всіх рівнях нами не було виявлено відхилень як зовнішнього розвитку, так і розвитку внутрішніх органів. Зріз №5

(рис. 7) дозволив оцінити стан розвитку серця та легень.

Органи сформовані згідно стадії розвитку, в серці добре виражена міжшлуночкова перетинка, дефекти розвитку відсутні (рис. 7 А1, В1). Зріз №8 показав, що органи тазу розвинуті теж відповідно до стадії нормального розвитку. Добре сформованими є сечовий міхур, статеві залози та задня кишка (рис. А2, В2).

Аналіз загальних показників тератогенного впливу досліджуваних речовин не виявив вад розвитку у ембріонів груп №1, №2, №3.

**Висновок.** Таким чином, використання зазначених методик дозволило виявити та обрахувати показники ембріотоксичного впливу у експериментальних тварин. Використання методу стандартних зрізів, за W. Wilson при впливі наднизьких доз ацетату свинцю та в групах комбінованого впливу тератогенної дії досліджуваних агентів не виявило.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальших наукових дослідженнях доцільним є визначення впливу ацетату свинцю та цитратів металів на гістологічному рівні.

## Література

1. Білецька Е. М. Техногенне навантаження важкими металами та зміни глибокого кисневого статусу у вагітних в умовах інтенсивної промислової зони / Е. М. Білецька, К. В. Воронін, В. А. Потапов, Т. В. Лещева // Медичні перспективи. – 2000. – Т. 5, № 1. – С. 83-89.
2. 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.
3. Динерман А. А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития / А. А. Динерман. – М.: Медицина, 1980. – 191 с.
4. Динерман А. А. Накопление свинца в плаценте и эмбрионе при его введении беременным самкам / А. А. Динерман, Н. А. Рождественская, С. И. Храмова // Свинец в окружающей среде (гигиенические аспекты). – М., 1978. – С. 63-65.
5. Картель М. Т. Концепція методології ідентифікації та токсикологічних досліджень наноматеріалів і оцінки

- ризик для людського організму та довкілля при їх виробництві і застосуванні / М. Т. Картель, В. П. Терещенко // Хімія, фізика і технологія поверхності : Межвед. сб. науч. труд. – К.: Наукова Думка, 2008. – Вып. 14. – С. 565–583.
6. Лавриненко В. Є. Тератогенні ефекти різних класів наноматеріалів / В. Є. Лавриненко, С. С. Зінабадінова // Український науково-медичний молодіжний журнал «YouthNanoBioTech-2010. Молодіжний форум з нанобіотехнологій» Матеріали конференції 19 травня 2010 р. – Київ, 2010 – №3. – С. 57-58.
  7. Морфологічні передумови виникнення природжених вад та варіантів будови жіночих статевих органів / В. М. Круцяк, Ю. Т. Ахтемійчук, Д. Г. Манчуленко, О. М. Слободян // Матер. наук. -практ. конф. «Акт. пит. морфогенезу та регенерації» // Укр. мед. альманах. – 2000. – Т. 3, № 1. – С. 34.
  8. Новинюк Л. В. Цитрати – безопасные нутриенты / Л. В. Новинюк // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2009. – №3 – С. 70-71.
  9. Сердюк А. М. Перспективы использования достижений нанотехнологии для решения проблемы дефицита микро-элементов в питании населения / А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко, Н. В. Косинов // В сб.: Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання та організаційно-правові засади співробітництва України та КНР у сфері високих технологій», Київ, 2 червня 2009 р. . – К., 2009. – С. 135-140.
  10. Якубчак О. М. Ефективність використання наноконструкції 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.
  11. Hoshino A. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on their Surface Modification / A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku [et al.] // Nano Letters. – 2004. – Vol. 4, № 11. – P. 2163-2169.
  12. 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

### МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОСТІ ТА ТЕРАТОГЕННОСТІ В МОРФОЛОГІЧНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАХ

Шаторна В. Ф., Гарець В. І., Колосова І. І., Майор В. В., Нефьодова О. О., Бельська Ю. О.

**Резюме.** Досліджували можливий ембріотоксичний та тератогенний вплив ацетату свинцю та нанометалів в експерименті на щурах з використанням адекватних методик. Експериментальна частина роботи виконана на 42 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар вагою 180-200 грам у віці 95-110 днів. В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю як токсикант окремо та в комбінації з цитратом срібла, або цитратом золота, отриманих за аквананотехнологією. Визначали показники ембріотоксичності обрахуванням доімплантаційної і постімплантаційної ембріональної смертності. Визначення тератогенності проводили за загальноприйнятими методиками. Показниками тератогенної дії є: наявність зовнішніх аномалій розвитку та наявність аномалій розвитку внутрішніх органів. Для їх виявлення застосовували метод стандартних зрізів, запропонований W. Wilson.

Використання зазначених методик дозволило виявити та обрахувати показники ембріотоксичного впливу у експериментальних тварин. Використання методу стандартних зрізів тератогенної дії досліджуваних агентів не виявило.

**Ключові слова:** тератогенність, ембріотоксичність, ацетат свинцю, цитрат золота, цитрат срібла.

УДК 611. 12-034:591. 33-092. 9

### МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ И ТЕРАТОГЕННОСТИ В МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

Шаторная В. Ф., Гарец В. И., Колосова И. И., Майор В. В., Нефедова Е. А., Бельская Ю. А.

**Резюме.** Исследовали возможное эмбриотоксическое и тератогенное влияние ацетата свинца и нанометаллов в эксперименте на крысах с использованием адекватных методик. Экспериментальная часть работы выполнена на 42 белых половозрелых крысах-самках линии Вистар весом 180-200 грамм в возрасте 95-110 дней. В экспериментальных моделях использовали растворы ацетата свинца как токсиканта отдельно и в комбинации с цитратом серебра, или цитратом золота, полученных по аквананотехнологии. Определяли показатели эмбриотоксичности путем вычисления пред- и постимплантационной эмбриональной смертности. Определение тератогенности проводили по общепринятым методикам, согласно Вильсона. Показателями тератогенного действия являются: наличие внешних аномалий развития и наличие аномалий развития внутренних органов. Для их выявления применяли метод стандартных срезов, предложенный W. Wilson.

Использование указанных методик позволило выявить и подсчитать показатели эмбриотоксического влияния у экспериментальных животных. Использование метода стандартных срезов, по W. Wilson тератогенного действия исследуемых агентов не выявило.

**Ключевые слова:** тератогенность, эмбриотоксичность, ацетат свинца, цитрат золота, цитрат серебра.

UDC 611. 12-034:591. 33-092. 9

### Methods of the Detection of Teratogenicity and Embryotoxicity in Morphological Experiments

Shatorna V. F Harets V. I. Kolosova I. I., Maier V. V., Nefedova O. O., Belska I. O.

**Abstract.** *Purpose* of research to investigate possible embryotoxic and teratogenic effect of lead acetate and nanometals in experiments on rats.

Experimental work was performed on 42 white mature female rats line Wistar. Middle weight of animals was 180-200 grams, age was from 95 to 110 days. For the holding of experiment were obtained female rats with a fixed term of pregnancy. Estrous cycle was determined by studying of vaginal smears. The day of detection of sperm in the vaginal smear was defined as the first day of pregnancy.

Solutions of lead acetate, silver and gold citrates, obtained by aquanotechnology were used in experimental models.

All rats were divided into 4 groups: in 1<sup>st</sup> group were animals that received a solution of lead acetate in dose 0.05 mg/kg; 2<sup>nd</sup> group – animals that received combined solution of lead acetate in dose 0.05 mg/kg and nanogold in dose 1.5 mc/kg; 3<sup>rd</sup> group - animals that received combined solution of lead acetate in dose 0.05 mg/kg and nanosilver in dose 2mc/kg; 4<sup>th</sup> group was control.

**Methods.** That used for detection of the embryotoxicity and teratogenicity. Indicators of embryotoxicity – pre- and postimplantation embryonic mortality. Pre-implantation mortality was determined by the difference between the number of corpora lutea in the ovaries and the number of places of implantation in the uterus; postimplantation mortality was found by the difference between the number of implantation places and number of live fetuses. Teratogenic effects were determined by the presence of morphological (anatomical) defects. Method of standard sections proposed W. Wilson used to identify possible internal defects.

**The results of research.** Using methods we established the stability of the estrous cycle of rats and determined the first day of pregnancy by the presence of sperm in vaginal smears. Calculation of the results have shown indicators of embryotoxicity in groups.

Indicators of teratogenic effects are: the external anomalies, found by external examination of embryos; the presence of anomalies of internal organs. For their detection used method of standard sections proposed W. Wilson (1965). By this method through the embryo fixed in a Buen solution made 9 standard sections that examined through binocular loupe and identify external and internal abnormalities.

Holding 9 standard sections method teratogenic effect was not found.

**Conclusion.** Thus, using these methods were identified and calculated indicators of embryotoxicity in experimental animals. Using the standard sections teratogenic effects of studied agents were not found.

**Keywords:** teratogenicity, embryotoxicity, lead acetate, gold citrate, silver citrate.

Рецензент – проф. Старченко І. І.

Стаття надійшла 11. 06. 2014 р.