В.Ф.Шаторная [2]
В.Г.Каплуненко [1]
И.С.Чекман [3]
В.И.Гарец [2]
Э.Н.Белецкая [2]
Е.А.Нефедова [2]
Н.М.Онул [2]

[1] Научно-исследовательский институт нанобиотехнологий и ресурсосбережения Украины, Киев
[2] ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»
[3] Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца, Киев

Ключевые слова: ацетат свинца, цитрат золота, цитрат серебра, цитрат железа, эмбриогенез, яичники.

Надійшла: 03.03.2014
Прийнята: 25.03.2014

УДК: 611.12-034:591.33-092.9

АНАЛИЗ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ЦИТРАТОВ ЗОЛОТА, СЕРЕБРА И ЖЕЛЕЗА НА ЭМБРИОТОКСИЧНОСТЬ АЦЕТАТА СВИНЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Исследование выполнено согласно договору о научном сотрудничестве между Национальным медицинским университетом им. А.А.Богомольца, Институтом нанобиотехнологий и ресурсосбережения Украины и ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины» в рамках научно-исследовательской работы "Развитие и морфофункциональное состояние органов и тканей экспериментальных животных и человека в норме, в онтогенезе, под воздействием внешних факторов" (номер государственной регистрации 0111U009598).

Реферат. Изучено влияние низких доз ацетата свинца отдельно и в комбинации с цитратами металлов на репродуктивную функцию и эмбриогенез крыс в эксперименте. Результаты эксперимента показали, что введение цитратов золота, железа или серебра оказывает модифицирующее действие на эмбриотоксичность ацетата свинца, а также предупреждает негативное влияние последнего на репродуктивную систему.
Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 99-103.
© В.Ф.Шаторная, В.Г.Каплуненко, И.С.Чекман, В.И.Гарец, Э.Н.Белецкая, Е.А.Нефедова, Н.М.Онул, 2014
✉ verashatornaya@yandex.ru

Shatornaya V.F., Kaplunenko V.G., Chekman I.S., Garets V.I., Beletskaya E.N., Nefedova E.A., Onul N.M. The analysis of modifying effect of gold, silver and iron citrates on embryotoxicity of lead acetate in experiment.
ABSTRACT. Background. Metals and their nanoforms are widely used in modern medicine and veterinary as antimicrobial bandage and films in surgery (silver) and also as an agent for targeted delivery of medicines in oncology (gold). At the same time their impact on embryogenesis and reproductive system is still poorly understood. **Objective**. The purpose of this experimental work was to investigate the possible modification effect of iron, gold and silver citrates on toxicity of low doses of lead acetate on reproductive function and embryogenesis of rats. Methods. 40 female rats were subdivided into 5 groups: 1st – administration of lead acetate; 2nd – lead acetate + gold citrate; 3rd – lead acetate + silver citrate; 4th – lead acetate + iron citrate; 5th – control. Solutions were administered to pregnant rats through a catheter once a day, daily from the 1st to the 19th days of pregnancy. **Results**. Introduction of ultra-low doses of lead acetate to pregnant female rats caused embryotoxicity; it resulted in significant decrease in the number of alive fetuses (17%) and corpora lutea in ovaries. The combined administration of low doses of lead acetate + metal citrates resulted in the increased number of corpora lutea of pregnancy and percentage of alive fetuses, due to a decrease in general and pre-implantation embryonic mortality compared with the 1st experimental group at almost the same weight of fetuses. **Conclusion**. Results of the experiment have shown that the administration of gold, iron and silver citrates in combination with lead acetate prevents the negative impact of the latter on the reproductive system and on the processes of embryonic development.
Key words: lead acetate, gold citrate, silver citrate, iron citrate, embryogenesis, ovaries.

Citation:
Shatornaya VF, Kaplunenko VG, Chekman IS, Garets VI, Beletskaya EN, Nefedova EA, Onul NM. [The analysis of modifying effect of gold, silver and iron citrates on embryotoxicity of lead acetate in experiment]. Morphologia. 2014;8(1):99-103. Russian.

Введение

В настоящее время в медицине активно развивается учение о микроэлементозах. Исследователи уже давно обратили внимание на то, что многие болезни связаны с недостаточностью содержания в организме жизненно необходимых минералов [1; 2]. Из 92 встречающихся в природе химических элементов 81 обнаружен в организме человека, 12 элементов называют структурными, так как они составляют 99% от всего

элементного состава. Данные, полученные в ходе обследования населения, позволяют заключить, что частота отклонений в элементном составе очень высока, (на уровне 70-90% обследованных), что в целом провоцирует развитие хронических патологических и иммунодефицитных состояний, особенно у детей [3; 4; 5]. Значение микроэлементов в жизнедеятельности организма определяется их участием практически во всех видах обмена веществ организма, они являются кофакторами многих ферментов, составляющими витаминов, гормонов, участвуют в процессах кроветворения, роста, размножения, дифференцировки и стабилизации клеточных мембран, тканевом дыхании, иммунных реакциях и многих других процессах, обеспечивающих нормальную функциональную активность. Общеизвестно, что лучше усваиваются микроэлементы в виде соединений с органическими молекулами, так называемыми биолигандами (хелатные соединения – ацетаты, глюконаты, цитраты, аспарагинаты, глутаматы).

Кроме эссенциальных микроэлементов, являющихся незаменимыми факторами питания, дефицит которых приводит к различным патологическим состояниям, существуют токсичные микроэлементы, представляющие собой основные загрязнители окружающей среды и вызывающие у человека заболевания и интоксикации [6; 7; 8; 9]. Одним из наиболее распространённых токсикантов промышленно развитых регионов Украины является свинец и его соединения. Соединения свинца известны своей высокой токсичностью, особенно чувствительны к отравлению свинцом дети [10; 11; 12]. Классическим проявление токсичности свинца в организме человека есть развитие анемии в результате поражения органов кроветворения, в связи с тем, что клетки крови одними из первых подвергаются негативному влиянию свинца или его соединений [13]. Механизмом гематотоксического действия является нарушение эритропоэза и угнетение синтеза гема и глобина, также мембрано- и цитотоксическое действие, что сокращает период жизнеспособности эритроцитов. Поэтому интерес в экспериментальной медицине и биологии к изучению влияния соединений свинца на репродуктивную систему и эмбриогенез оправдан.

Большинство микроэлементов принимают участие в формировании ферментов, металлосодержащих ферментов только в организме человека несколько сотен и их биологическая роль чрезвычайно важна [4]. Нарушение структуры или удаление из организма даже одного из них приводит к тяжелым расстройствам функций организма, а затем и к его гибели. В металлоферментах ион металла составляет основную часть кофермента.

Сегодня растет научный и практический интерес к роли биометаллов в фармакологии. Широко применяются в современной медицине и ветеринарии металлы и их наноформы в виде противомикробных повязок и пленок в хирургии (серебро), а также золото – как средство адресной доставки препаратов при онкологических заболеваниях [14; 15; 16; 17]. Активно исследуется также железо как противоанемичное средство. Но их влияние на эмбриогенез и репродуктивную систему остаются малоизученными. Не выявленной остается и способность представленных металлов оказывать модифицирующую роль на токсичность соединений свинца.

Поэтому **целью** настоящей экспериментальной работы явилось изучение возможного модифицирующего действия цитратов железа, золота, серебра на эмбриотоксичность ацетата свинца и на репродуктивную функцию крыс.

Материалы и методы

Материалом исследования были выбраны в качестве экспериментальных животных крысы (40 белых половозрелых самок стандартного веса и возраста). Исследования на животных проводили в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Киев, 2001), которые согласуются с Европейской конвенцией о защите экспериментальных животных (Страсбург, 1985).

В экспериментальных моделях использовали раствор ацетата свинца и растворы цитрата серебра, цитрата золота, цитрата железа, полученных с применением аквананотехнологии по оригинальным авторским методикам [18; 19]. Цитраты биометаллов безопасные, более того, они проявляют антиоксидантное и радиопротекторное действие, положительно влияют на сердечно-сосудистую и иммунную системы организма [20].

Моделирование влияния растворов микроэлементов на организм самки и на эмбриогенез у крыс проводили по следующей схеме. Все крысы были разделены на 5 групп: 1 группа – животные, которым вводили раствор ацетата свинца в дозе 0,05 мг/кг; 2 группа – животные, которым вводили раствор ацетата свинца в дозе 0,05 мг / кг и раствор цитрата золота в дозе 1, 5 мкг/кг; 3 группа – животные, которым вводили раствор ацетата свинца в дозе 0,05 мг/кг и раствор цитрата серебра в дозе 2мкг/кг; 4 группа животные, которым вводили раствор ацетата свинца в дозе 0,05 мг/кг и раствор цитрата железа в дозе 1, 5 мкг/кг; 5 группа – контрольная. Согласно общепринятым инструкциям проведения экспериментальных работ, растворы микроэлементов вводили самкам через зонд один раз в сутки, в одно и то же время, с 1 по 19 день беременности (на 20-й день беременности проводили оперативный забой). Исследуемых животных выводили из эксперимента способом передозировки эфирного наркоза после удаления матки с эмбрионами. Крысят извлекали из матки, проверяли на тест

живы-погибшие, взвешивали, фотографировали и фиксировали в 10% растворе формалина для последующего гистологического исследования. Особенно внимательно изучались яичники крысы: на нефиксированных извлеченных яичниках, кроме массометрических показателей, подсчитывали количество желтых тел и их соответствие количеству эмбрионов в маточном роге.

Эмбриотропное действие исследуемых веществ оценивали по следующим показателям:

1. Общая эмбриональная смертность (ОЭС)

$$ОЭС = \frac{В-А}{В} \times 100\%,$$

где А – количество живых плодов,

В – количество желтых тел беременности.

2. Предимплантационная смертность (ПИС)

$$ПИС = \frac{В-(А+Б)}{В} \text{ (од.)},$$

где А – количество живых плодов,

Б – количество погибших (резорбированных) плодов,

В – количество желтых тел беременности.

3. Постимплантационная смертность (ПостИС)

$$ПостИС = \frac{Б}{А+Б} \text{ (од.)},$$

где А – количество живых плодов,

Б – количество погибших (резорбированных) плодов.

4. Количество плодов на 1 самку.

Результаты и их обсуждение

Сравнение результатов эмбриотропного действия низких доз свинца с показателями контрольной группы выявило его эмбриотоксичность. У одной самки группы свинцовой интоксикации наблюдалась резорбция всех эмбрионов, эти результаты были исключены нами из статистики. В целом в группе интоксикации ацетатом свинца определяется достоверное снижение количества живых плодов на 17% – 7,5±0,53 против 9,0±0,4 в контрольной группе соответственно (рис. 1).

В экспериментальных группах с использованием комбинации ацетата свинца и микроэлементов (цитрата золота, железа, серебра) наблюдалось уменьшения токсического действия, а именно увеличение количества эмбрионов на 1 самку и количества желтых тел в яичниках, что свидетельствует в пользу положительного влияния последних на репродуктивную систему и эмбриогенез (рис. 1, 2).

Анализ общих показателей в группе, получавшей комбинацию ацетата свинца и цитрата серебра обнаружил улучшения показателей репродуктивной системы и эмбрионального развития по сравнению с интактной группой, что проявляется достоверным повышением количества живых эмбрионов на 1 самку на 12,6% – 10,13±0,4 против 9,0±0,4 (p<0,05), а также обусловлено увеличением количества желтых тел беременности почти на 10% – 11,13±0,27 против 12,88±1,06 (p <0,05) при практически одинаковых показателях общей и доимплантационной смертности и отсутствия постимплантационной смертности.

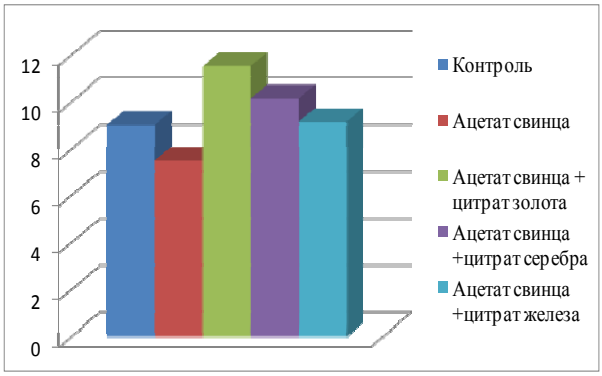

Рис. 1. Количество живых эмбрионов на 1 самку в контрольной и экспериментальных группах.

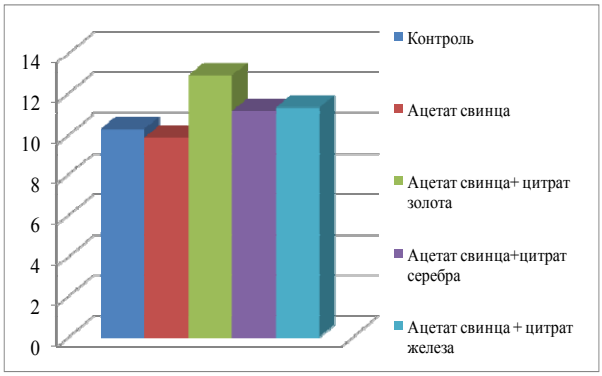

Рис.2. Количество желтых тел беременности в яичниках на 1 самку в контрольной и экспериментальных группах.

Количество живых эмбрионов на 1 самку в эксперименте с цитратом железа (9, 13±0,27) и количество желтых тел в яичниках (10,53±0,5) было недостоверно больше чем в группе контроля, но ниже, чем в группах комбинированного воздействия с серебром и золотом, в то время, как индекс плодовитости в группе контроля и всех группах комбинированных воздействий был одинаковым (0,8).

При комбинированном введении растворов ацетата свинца и цитрата серебра мы наблюдали отсутствие постимплантационной смертности по сравнению с интактной группой животных.

При сравнении показателей эмбрионального развития группы комбинированного воздействия (ацетат свинца + цитрат серебра) с группой, получавшей ацетат свинца, можно отметить увеличение количества живых плодов на 35,13% (p<0,001), что обусловлено увеличением на 32,7% (p<0,05) желтых тел беременности, уменьшением в 2,7 раза (p <0,001) уровня общей смертности за счет уменьшения доимплантаци-

онной смертности в 2,6 раза (p=0,052) и отсутствием постимплантационной смертности (рис. 1, 2, 3).

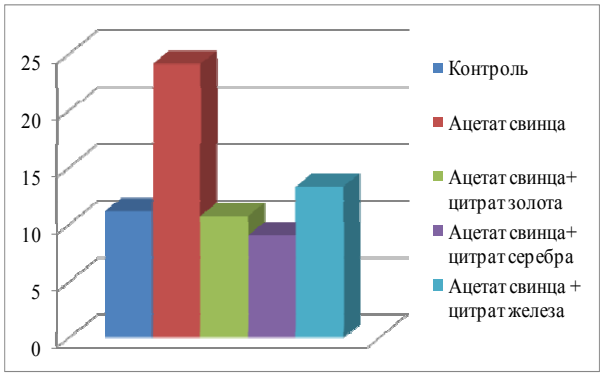

Рис. 3. Показатели общей эмбриональной смертности в контрольной и экспериментальных группах.

Аналогичные изменения наблюдались нами и в группе эксперимента при комбинированном введении ацетата свинца и цитрата золота (рис. 1, 2, 3).

При сравнении показателей эмбрионального развития в группе, получавшей комбинацию ацетата свинца и цитрата золота с группой, получавшей чистый препарат ацетата свинца нами отмечено существенное увеличение количества живых плодов – на 53,3% (p <0,001), что обусловлено несколькими факторами: увеличением на 30,4% (p <0,05) желтых тел беременности, уменьшением в 2,3 раза (p <0,001) уровня общей смертности за счет недостоверного уменьшения доимплантационной смертности в 2,1 раза и отсутствием постимплантационной смертности.

Заключение

Таким образом, при введении ацетата свинца нами наблюдалось у экспериментальных животных выраженное эмбриотоксическое действие, которое выражалось в достоверном снижении количества живых плодов и снижении количества желтых тел беременности яичников самок.

При комбинированном введении низких доз ацетата свинца + цитратов металлов наблюдается увеличение количества желтых тел беременности, количества живых плодов, что обусловлено снижением общей и доимплантационной эмбриональной смертности по сравнению с группой со свинцовой интоксикацией при практически одинаковой массе плодов. Результаты проведенного эксперимента показали, что введение цитрата золота, цитрата железа или цитрата серебра на фоне интоксикации ацетатом свинца предупреждает негативное влияние последнего на репродуктивную систему и процессы эмбрионального развития у крыс. Наиболее выраженным модифицирующим влиянием, как показали результаты эксперимента, обладает цитрат золота.

В **перспективе дальнейших исследований** интересным является определение возможных изменений на гистологическом уровне в яичниках самок и органах плодов экспериментальных групп.

Литературные источники
References

1. Avtsyn AP, Zhavoronkov AA, Rish MA, Strochkova LS. [Human microelementoses]. Moscow: Meditsina; 1991. 496p. Russian.
2. Skalny AV, Zalavina SV, Efimov SV. [Bioelements and indicators of embryonic mortality in laboratory rats]. Vestnik of OSU. 2006; 2: 78-81. Russian.
3. Wojnar AI. [The biological role of trace elements in the body of animals and human]. Moscow: Vysshaya shkola; 1960. 544p. Russian.
4. Skalny AV, Yatsyk GV, Odinaeva ND. [Microelementoses in childhood: prevalence and ways of correction]: Practical guide for physicians. Moscow: Meditsina; 2002. 86p. Russian.
5. Skalny AV, Maymulov VG, Nagorno SV, Shabrov AV. [Diagnosis and prevention of microelementoses based on the results of medical and environmental assessment]. In: [Basics of system analysis in ecological and hygienic studies]. St Petersburg: St Petersburg State Medical Academy named after I.I. Mechnikov; 2000a. p.175-200. Russian.
6. Biletska EM. [Hygienic aspects of heavy metals in the environment]. Bukovina Medical Journal. 1999; 3(2): 207-11. Ukrainian.
7. Dinerman AA. [The role of environmental pollutants in violation of embryonic development]. Moscow: Meditsina; 1980. 191 p. Russian.
8. Korbakova AI, Sorkin NS, Molodkina NN. [Lead and its effect on organism]. Work Medicine and industrial ecology. 2001;5:29-34. Russian.
9. Skalny AV. [Lead and human health (diagnosis and treatment of saturnism)]. Ivanovo: Publisher IMGU; 1997. 36p. Russian.
10. Trakhtenberg IM. [Heavy metals as chemical pollutants of industrial and biological environment]. Environment and Health. 1997; 2: 48-51. Russian.
11. Skalny AV, Yesenin AV. [Monitoring and evaluation of the risk of lead exposure to humans and the environment with the use of human biological substrates]. Toxicological Herald. 1997; 6: 16-23. Russian.
12. Chekman IS. Nanofarmakologiya. Kiev: Zadruga; 2011. 424 p. Ukrainian.

13. Shatorna VF. [Modifying effect of some trace elements on the toxicity of lead acetate]. Bulletin of the problems of biology and medicine. 2013;3(2):310-5. Ukrainian.

14. Petrenko AF, Borisevich VB, Petrenko OO, Lopatko KG. [Recommendations for the use of nanoparticles Ag, Cu, Zn for treatment of wounds in dogs and for the prevention of helminthiasis in animals]. Kyiv, Ukraine: NUBiP; 2009. 40 p. Ukrainian.

15. Mikhaleva LM, Kaktursky LV, Moroz EA, Skalny AV. Trace elements in the hair of patients with serious ovarian tumors In: Abstracts of the 11th International Symposium on trace elements in man and animals, Berkeley, USA, June 2-6; California, Berkley; 2002. 78-9.

16. Skalny A, Anke M, Muller R, Shaefer U. Recognizing and correlation of trace elements related to human pathology in Russia - Probabilistic model for Third World Countries. In: Mineralstoffe: Mengen-, Spuren- und Ultraspurenelemente in der Pravention; Diagnostik, Ernaehrung, Stoffwechsel und Praevention, Intoxikation und Praevention, Jena, 1. und 2. Dezember 2000. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges: 2001. p.275-85.

17. Hernandez-Sierra JF**.,** Ruiz F**.,** Cruz Pena DC**.,** Martinez-Gutierrez F**.** The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutants to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine. 2008; 17. p.19.

18. Kosinov MV, Kaplunenko VH. [Process for the preparation of metal carboxylates Nanotechnology of metal carboxylates preparation]. Ukrainian patent UA 38391. 2009 Dec 01. Int. C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/126 (2008.01), C07C 53/10 (2008.01), A23L 1/00, B82B 3/00. Ukrainian.

19. Kosinov MV, Kaplunenko VH. [Kaplunenko-Kosinov process for the preparation of carboxylates using nanotechnology]. Ukrainian patent UA 49050. 2010 Dec 04 C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/00, B82B 3/00. Ukrainian.

20. Novinyuk LV. [Citrates - safe nutrients]. Food ingredients: raw materials and additives. 2009; 1: 70-1. Russian.

Шаторная В.Ф., Каплуненко В.Г., Чекман І.С., Гарец В.І., Білецька Е.М., Нефедова О.А., Онул Н.М. Аналіз модифікуючого впливу цитратів золота, срібла та заліза на ембріотоксичність ацетату свинцю в експерименті.

Реферат. Вивчено вплив низьких доз ацетату свинцю окремо і в комбінації з цитратами металів на репродуктивну функцію і ембріогенез щурів в експерименті. Результати дослідження показали, що введення цитратів золота, заліза або срібла спричинює модифікуючий вплив на ембріотоксичність ацетату свинцю, а також попереджає негативний вплив останнього на репродуктивну систему.

Ключові слова: ацетат свинцю, цитрат золота, цитрат срібла, цитрат заліза, ембріогенез, яєчники.