

Е.А.Нефедова

ГУ «Днепропетровская
медицинская академия
МЗ Украины»

Ключевые слова: ацетат свинца, цитрат железа, кардиогенез, миокард, межжелудочковая перегородка.

Надійшла: 22.09.2014

Прийнята: 05.11.2014

УДК: 611.12-034:591.33-092.9

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА ЖЕЛЕЗА НА КАРДИОТОКСИЧНОСТЬ АЦЕТАТА СВИНЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Исследование выполнено 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. Изучали влияние низких доз ацетата свинца при изолированном введении и в комбинации с цитратом железа на кардиогенез крыс. Результаты эксперимента продемонстрировали кардиотоксичность ацетата свинца, которая проявлялась в уменьшении толщины компактного миокарда стенки желудочков сердца, истончении межжелудочковой перегородки, образовании дополнительных аномальных сухожильных струн предсердно-желудочковых клапанов. Комбинированное введение ацетата свинца и цитрата железа снижает кардиотоксичность ацетата свинца и восстанавливает толщину миокарда сердца эмбриона.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 63-68.

© Е.А.Нефедова, 2014

Nefedova E.A. Modifying effect of iron citrate to cardiotoxicity of lead acetate in an experiment.

ABSTRACT. Background. Generally recognized and urgent problem for industrial regions of Ukraine are heavy metal pollution, with priority toxicants are lead and its compounds. Search for new possible bioantagonists of lead compounds - a problem relevant to modern medicine. **Objective.** The aim of this experimental work was to study the effect of low doses of lead acetate alone and lead acetate in combination with iron citrate, obtained with nanotechnology, to the course of cardiogenesis of rats. **Methods.** The study conducted on embryos of white rats. In the experiment, there were 3 groups of animals: control group isolated administration of lead acetate group and the combined administration of lead acetate and iron citrate. **Results.** Experimental results showed cardiotoxicity of lead acetate, which was determined to reduce the thickness of the compact myocardium wall of ventricles of the heart, reducing thickness fibrillation, ventricular septal thinning. Violation of delamination processes and ventricular myocardium compaction, under the influence of isolated lead acetate, manifest violation of the formation of trabecular ventricular myocardium layer and formation of atrioventricular valve openings: shortening valves, change the content and scope of the atrioventricular valves accompanied by the formation of additional anomalous tendon chords. **Conclusion.** The influence on the course of cardiogenesis in the group combined effects of lead acetate and iron citrate showed recovery of myocardial thickness and ventricular fibrillation, no violations in the formation of valvular heart rat embryos, indicating a positive impact on iron citrate cardiotoxicity of lead acetate.

Key words: lead acetate, iron citrate, cardiogenesis, myocardium, interventricular septum.

Citation:

Nefedova EA. [Modifying effect of iron citrate to cardiotoxicity of lead acetate in an experiment]. *Morphologia*. 2014;8(4):63-8. Russian.

Введение. Общепризнанной и актуальной проблемой для промышленных областей Украины является загрязнение тяжелыми металлами, при этом приоритетным токсикантом является свинец и его соединения [1- 4]. Вследствие способности свинца к кумуляции, даже влияние на уровне низких концентраций приводит к значительному нарушению работы организма. Свинец занесен в перечень приоритетных загрязняющих веществ рядом международных организаций, в том числе ВОЗ и ЮНЕП, но разработки влияния соединений свинца на кардиогенез являются ма-

лоисследованной темой.

Поиск возможных новых биоантогонистов для соединений свинца - задача актуальная для медиков и биологов. Современное стремительное развитие микроэлементологии привлекло внимание исследователей к возможности естественных технологий уменьшать токсическое действие свинца, поэтому исследование модифицирующего влияния тех или иных микроэлементов на токсичность соединений свинца в экспериментальных моделях может позволить решить важные вопросы профилактики интоксика-

ции населения промышленных регионов [5, 6].

За последние годы ученые мира все большее внимание обращают на особенности взаимодействия микроэлементов, как важную медико-биологическую и социальную проблему, поэтому актуальным является четкое понимание особенностей обмена и взаимодействия отдельных микроэлементов в организме при их совместном поступлении, а также последствий дефицита микроэлементов и их избыточного поступления в организм человека. Микроэлементный дефицит никогда не бывает изолированным, а всегда характеризуется микроэлементным дисбалансом и проявляется нарушением различных видов обмена с соответствующими морфологическими проявлениями [7-10]. Наличие ряда минеральных веществ в организме в строго определенных количествах – неперемное условие для сохранения здоровья человека. При этом макро- и микроэлементы не синтезируются в организме, а поступают с пищевыми продуктами, водой, воздухом. Степень их усвоения зависит от состояния органов дыхания и пищеварения. Элементы способны депонироваться в тканях, а по мере необходимости – поступать в кровь. При избыточном поступлении макро- и микроэлементов начинает работать система элиминации, в желудочно-кишечном тракте блокируется всасывание элементов, и они выводятся с калом. Дефект какого-либо звена является причиной избытка или недостатка элемента либо дисбаланса других биологически активных веществ (гормонов, витаминов, ферментов), участвующих в сложных процессах регуляции, и проявляется различными клиническими симптомами [11].

Общеизвестные антагонисты свинца и его соединений - это кальций, магний, цинк и железо. Но влияние указанных этих антагонистов на кардиогенез является мало исследованными.

В последнее десятилетие нанотехнологии и наноматериалы находят все более широкое применение в биологии и медицине. Использование нанотехнологий в медицинской практике сводится к трем основным направлениям: диагностика социально значимых заболеваний, направленная доставка молекул лекарственных веществ в поврежденные ткани и создание новых наноматериалов медицинского назначения с заданными свойствами [12-14]. К сожалению, довольно активные исследования по влиянию наноматериалов на организм почти не касаются исследований по выявлению влияния на эмбриогенез и развитие сердца. Внимание исследователей главным образом сосредоточена на изучении биологических эффектов воздействия нанометаллов на клеточном уровне или в сельскохозяйственном направлении [15, 16]. Таким образом, исследование биоэффектов взаимодействия между эссенциальными и токсичными микроэлементами и особенности такого взаимодействия в организме

беременной самки - тема важная и требует активного научного исследования.

Поэтому **целью** настоящей экспериментальной работы явилось изучение модифицирующего действия цитрата железа на кардиотоксичность ацетата свинца у эмбрионов крыс.

Материалы и методы. Материалом исследования были выбраны в качестве экспериментальных животных крысы (24 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 раствор цитрата железа, полученного с применением аквананотехнологии по оригинальным авторским методикам [17, 18]. Цитраты биометаллов безопасны, более того, они проявляют антиоксидантное и радиопротекторное действие, положительно влияют на сердечно-сосудистую и иммунную системы организма.

Моделирование влияния растворов микроэлементов на организм самки и на эмбриогенез у крыс проводили по следующей схеме. Все крысы были разделены на 3 группы: 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 железа в дозе 1, 5 мкг/кг; 3 группа - контрольная. Согласно общепринятым инструкциям проведения экспериментальных работ, растворы 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, фиксировали в 10% растворе формалина для последующего гистологического исследования. После фиксации извлекали сердце эмбриона, взвешивали, разрезали в сагитальной и фронтальной плоскости для изучения внутреннего рельефа камер сердца и предсердно-желудочковых клапанов. Изготавливали гистологические препараты сердца для выявления на микроскопическом уровне возможных отклонений в развитии сердца.

Учитывая специфику поставленных задач, в данном исследовании была проведена количественная оценка следующих показателей на этапах кардиогенез:

- толщина сердечной стенки (предсердия и желудочка) эмбриона в норме и при воздействии ацетата свинца (мкм), $M \pm m$;

- толщина сердечной стенки (предсердия и желудочка) эмбриона при комбинированном

воздействии ацетата свинца и цитрата железа (мкм), $M \pm m$;

- толщина межжелудочковой перегородки сердца эмбриона в норме, при воздействии ацетата свинца и при комбинированном воздействии ацетата свинца и цитрата железа (мкм), $M \pm m$;

Полученные данные обрабатывались статистически с использованием компьютерных программ.

Результаты и их обсуждение. У эмбрионов в группе изолированного введения ацетата свинца нами не обнаружено внешних пороков развития сердца, хотя исследования влияния на развитие сердца ацетата свинца выявило определенные отклонения в развитии сердца по сравнению с контрольной группой. Нарушение хода кардиогенеза сказывалось уже на уровне определения массы сердца эмбрионов крыс, а именно в группе свинцовой интоксикации наблюдалось достоверное уменьшение массы сердца.

Даже на макроуровне отмечалось истончение миокарда стенок сердечных камер и нарушения внутреннего рельефа желудочков. Трабекулы желудочков в группе свинцовой интоксикации дезориентированы, сосцевидные мышцы не выражены, сухожильные нити предсердно-желудочковых клапанов были укорочены, а сами створки проявляли полиморфность. Такие морфологические изменения безусловно влияли на сократительную функцию сердца и гемодинамику.

Анализ полученных результатов свидетельствует о нарушении процессов септации и трабекуляции под влиянием свинцовой интоксикации в течение эмбриогенеза. На ранних этапах кардиогенеза основным этапом, обеспечивающим формообразующие процессы развития сердца является процесс деaminaции, в результате которого формируются трабекулы желудочков, сухожильные струны и створки клапанов предсердно-желудочковых отверстий. Поэтому влияние негативного фактора отражается сразу на строении всех компонентов клапанного аппарата сердца и трабекул.

Дальнейшие исследования проводились на гистологических срезах. В конце эмбриогенеза мы наблюдали изменения ориентации трабекул желудочков с радиально расположенных на спирально ориентированные, отражающие направление основных функциональных нагрузок сердца при сокращениях. В норме трабекулы люминального слоя в этот период уже объединяются и образуют специфические для данного желудочка паттерны, формируя внутренний рельеф желудочковой поверхности. Дальнейшая компактизация приводит к утолщению трабекул, а утолщение компактного слоя происходит вследствие дифференцировки клеток и сопровождается васкулогенезом.

При оценке хода кардиогенеза одним из по-

казателей формообразующих процессов сердца является процесс компактизации миокарда желудочков. Одним из основных этапов формирования миокарда является пространственное изменение направлений слоев миокарда желудочков, этот процесс идет параллельно компактизации миокарда сердца и совпадает по времени с ангиогенезом. В контрольной группе нами определялись на гистологическом уровне хорошо развитые слои миокарда и развивающиеся сосуды.

Как показали результаты исследований, толщина стенки желудочка после воздействия ацетатом свинца уменьшается и это уменьшение не является однозначным для миокарда правого и левого желудочков. Больше повреждается миокард правого желудочка, левый желудочек меньше подвержен воздействию токсиканта, возможно это обусловлено его большей гемодинамической нагрузкой, что срабатывает как защитный механизм. Как показали результаты измерения толщины компактного миокарда стенки сердца в норме в правом желудочке в среднем составляет $201,6 \pm 8,3$ мкм, а при воздействии ацетата свинца достоверно уменьшалась до $179,1 \pm 12,3$ мкм ($p < 0,05$). Толщина стенки левого желудочка (компактного слоя) составляла в норме $215,3 \pm 10,7$ мкм, в то время, как при воздействии ацетата свинца составляла $198,2 \pm 14,3$ мкм ($p < 0,05$). Микроскопические исследования серийных гистологических срезов сердца эмбрионов крыс позволили оценить изменения не только толщины стенки, но и толщину трабекул, образующих внутренний рельеф желудочка. Трабекулы в сердцах контрольной группы хорошо сформированы, в сердечной стенке группы интоксикации трабекулы истончены, не содержат сосудов.

Анализируя морфометрические показатели толщины межжелудочковой перегородки, мы определили, что влияние ацетата свинца при изолированном введении на организм самки приводит к истончению межжелудочковой перегородки сердца эмбриона по сравнению с контрольной группой. Как известно, в межжелудочковой перегородке выделяется 3 части: апикальная - ближе к верхушке сердца, средняя часть (наибольшая) и верхняя - базальная, что расположена возле предсердно-желудочковых клапанов. Толщина миокарда каждого отдела значительно отличается, так как формируется из разных зачатков раннего эмбрионального сердца. Начинает формироваться межжелудочковая перегородка как плотный мышечный вырост - в виде мышечного гребня от верхушки раннего эмбрионального сердца навстречу мезенхиме эндокардиальных подушек атриовентрикулярного канала и заканчивается процесс септации желудочков слиянием этих закладок. Верхушечная часть - мышечная с момента образования, сред-

няя часть в основном мышечная и отчасти мезенхимного происхождения, а верхняя часть перепончатая - производная мезенхимы. Таким образом, происхождения различных частей перегородки будет разным с самого начала эмбриогенеза, а влияние токсического агента будет отражаться на строении и развитии каждой части. Как показали результаты наших экспериментов, под влиянием ацетата свинца происходит истончение всех отделов межжелудочковой перегородки по сравнению с контролем.

Нами также исследовались структуры предсердно-желудочковых клапанов сердца эмбриона крысы: створки, сосцевидные мышцы и сухожильные нити. Формирование сосцевидных мышц происходит в течение раннего кардиогенеза в процессе деляминации, результатом которого является образование створки предсердно-желудочкового клапана, первичной сухожильной нити и верхушки сосцевидной мышцы желудочка. Створки предсердно-желудочковых клапанов в контрольной группе были достаточно хорошо сформированы, хотя и не являлись гистологически зрелой структурой. Как известно, гистологическое созревание структур клапанного аппарата сердца завершается после рождения крысы, но

форма и длина створок, а также длина сухожильных нитей в группе, подлежащей свинцовой интоксикации были значительно уменьшены.

В наших дальнейших гистологических исследованиях в группе свинцовой интоксикации выявлено формирование дополнительных сухожильных нитей, которые прикреплены не к краю створки, а к нижней ее поверхности, чего не встречалось в группе контроля. Такое anomальное расположение сухожильных нитей расценивалось нами как патология клапанного аппарата, которая возникала в результате нарушения процесса деляминации стенки желудочка под влиянием ацетата свинца.

Таким образом, суммируя все данные, полученные нами по воздействию ацетата свинца на кардиогенез эмбриона крысы, мы пришли к выводу, что процесс септации, формирования стенок камер сердца и клапанного аппарата нарушается по сравнению с контролем. Значительную часть нарушений составляли изменения толщины миокарда предсердий и желудочков (28,3%), истончение межжелудочковой перегородки 7,6%, что было почти вдвое меньше показателей нарушения формирования клапанного аппарата - 13,4% (рис. 1).

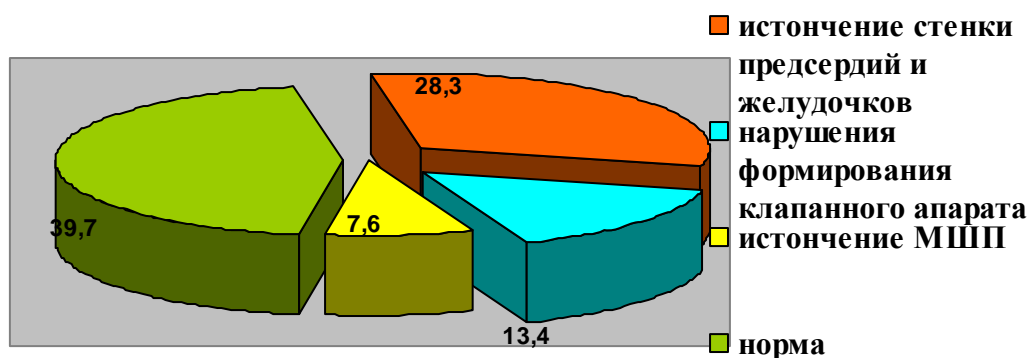


Рис. 1. Нарушения развития камер сердца и клапанного аппарата сердца эмбрионов крысы в эксперименте под влиянием ацетата свинца (%).

Высокий процент (около 40%) отсутствия значимых нарушений в кардиогенезе исследуемых животных группы свинцовой интоксикации объясняется высоким уровнем эмбриональной смертности в данной группе. Таким образом, большинство эмбрионов, имевших пороки развития сердца погибли на ранних этапах эмбриогенеза. Однако необходимо учитывать, что в данном исследовании наблюдались комбинированные группы нарушений развития сердца, например: увеличение объема предсердий часто совпадало с нарушением формирования межжелудочковой перегородки сердца или полиморфностью створок предсердно-желудочковых и аортальных клапанов.

Исследование толщины компактного миокарда в группе комбинированного воздействия

ацетата свинца с цитратом железа выявили восстановление толщины компактного миокарда правого ($201,3 \pm 7,3$ мкм) и левого ($234,3 \pm 12,9$ мкм) желудочков, что свидетельствует о положительном влиянии цитрата железа на кардиотоксичность ацетата свинца.

Гистологические исследования показали, что в группе комбинированного воздействия ацетата свинца и цитрата железа наблюдается локальное утолщение миокарда средней части межжелудочковой перегородки (499 ± 18 мкм) как по отношению к группе контроля (447 ± 16 мкм) так и к группе свинцовой интоксикации (412 ± 15 мкм). В среднем утолщение компактного миокарда средней части перегородки наблюдалось почти в 32%. Толщина базальной части перегородки восстанавливалась до нормы. Такие дан-

ные говорят о снижении кардиотоксичности ацетата свинца при его комбинированном введении с цитратом железа.

Заключение. Таким образом, при введении ацетата свинца нами наблюдалось у экспериментальных животных выраженное кардиотоксическое действие, которое выражалось в достоверном снижении толщины компактного миокарда желудочков, укорочении створок предсердно-желудочковых клапанов и формировании аномальных сухожильных струн. Такие результаты свидетельствуют о нарушении под влиянием ацетата свинца процесса деяминации миокарда в раннем эмбриогенезе.

При комбинированном введении низких доз

ацетата свинца + цитрат железа наблюдается восстановление толщины компактного миокарда желудочков и отсутствие патологических изменений в клапанном аппарате сердца, что свидетельствует о том, что введение цитрата железа на фоне интоксикации ацетатом свинца предупреждает негативное влияние последнего на кардиогенез у крыс.

В перспективе дальнейших исследований интересным выглядит определение возможных изменений на гистологическом уровне в сердцах плодов экспериментальных групп с использованием иммуногистохимических маркеров пролиферации и апоптоза.

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 embryonic mortality and indicators of 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 humans]. Moscow: Vysshaya shkola; 1960. 544 p. Russian.
4. Skalny AV, Yatsyk GV, Odinaeva ND. [Microelementoses children: prevalence and ways of correction]; Practical guide for physicians. Moscow: Meditsina; 2002. 86 p. Russian.
5. Skalny AV, Maymulov VG, Nagorno SV, Shabrov AV. [Diagnosis and prevention 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; 2000:175-200. 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. 36 p. Russian.
10. Trachtenberg IM. [Heavy metals such as chemical pollutants and production 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 treatment of wounds in dogs and for the prevention of helminthiasis animals]. Kyiv: Ukraine NUBiP; 2009. 40 p. Ukrainian.
15. 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 Ultrapurenelemente in der Pravektion; Diagnostik, Ernaehrung, Stoffwechsel und Praevention, Intoxikation und Praevention, Jena, 1. und 2. Dezember 2000. – Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2001:275-85.
16. 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;17:19.
17. 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.
18. 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.

Нефьодова О.О. Модифікуючий вплив цитрату заліза на кардіотоксичність ацетату свинцю в експерименті.

Реферат. Вивчали вплив низьких доз ацетату свинцю при ізольованому введенні та в комбінації з цитратом заліза на кардіогенез щурів. Результати експерименту продемонстрували кардіотоксичність ацетату свинцю, яка проявлялася у зменшенні товщини компактного міокарда стінки шлуночків серця, витонченні міжшлуночкової перегородки, утворенні додаткових аномальних сухожильних струн передсердно-шлуночкових клапанів. Комбіноване введення ацетату свинцю і цитрату заліза знижує кардіотоксичність ацетату свинцю та відновлює товщину міокарда серця ембріона.

Ключові слова: ацетат свинцю, цитрат заліза, кардіогенез, міокард, міжшлуночкова перегородка.