

© НОНИАШВИЛИ Е.М., 2023

Нониашвили Е.М.

Развитие доимплантационных зародышей мышей в условиях воздействия сублетальных доз хлорида кадмия на материнский организм

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

Введение. Кадмий – тяжёлый металл, широко распространённый в окружающей среде, попадая в организм человека приводит к развитию различных заболеваний.

Цель работы – исследование влияния сублетальных доз хлорида кадмия на доимплантационное развитие мышинных эмбрионов *in vivo*.

Материал и методы. Самкам мышей в течение первых трёх дней беременности вводили по 10 мкг хлорида кадмия ($CdCl_2$). На четвёртый день эксперимента зародышей извлекали из утробы матери и оценивали развитие по количеству морул и бластоцист в каждой группе и среднему количеству бластомеров в контрольных и экспонированных зародышах.

Результаты. Зародыши, подвергавшиеся воздействию $CdCl_2$ в утробе матери, быстрее проходили начальные стадии дробления и формирования бластоцисты по сравнению с контрольными зародышами. На стадии бластоцисты темп дробления экспонированных и контрольных зародышей статистически не отличался.

Ограничения исследования. Оценка влияния токсиканта проведена только на доимплантационных зародышах мышей при интраперитонеальном введении препарата матерям и в одной дозе. Исследования зародышей мышей на постимплантационном сроке развития позволили бы детальнее раскрыть действие препарата на эмбриогенез.

Заключение. Инъекции сублетальных доз $CdCl_2$ самкам мышей в дебюте беременности ускоряют развитие зародышей до стадии бластоцисты.

Ключевые слова: хлорид кадмия; доимплантационные зародыши мыши; *in vivo*; бластомеры; морулы; бластоцисты; кавитация

Соблюдение этических стандартов. Проведенные исследования соответствовали требованиям Этического комитета по использованию лабораторных животных, принятым Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», выписка из протокола № 2/21 от 27.05.2021.

Для цитирования: Нониашвили Е.М. Развитие доимплантационных зародышей мышей в условиях воздействия малых доз хлорида кадмия на материнский организм. *Токсикологический вестник*. 2023; 31(4): 232–236. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-4-232-236>

Для корреспонденции: Нониашвили Екатерина Михайловна, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация. E-mail: katinka.04@list.ru

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 24 апреля 2023 / Принята к печати: 29 июля 2023 / Опубликовано: 30 августа 2023

Noniashvili E.M.

The development of pre-implantation mouse embryos under the influence of sublethal doses of cadmium chloride on the maternal organism

FSBSI «Institute of Experimental Medicine», St. Petersburg, 197022, Russian Federation

Introduction. Cadmium (CD) is a heavy metal widely distributed in the environment, when it enters the human body, it leads to the development of various diseases.

The aim of this work was to study the effect of sublethal doses of cadmium chloride on the preimplantation development of mouse embryos *in vivo*.

Material and methods. During the first three days of pregnancy, female mice were injected with 10 μM cadmium chloride (CdCl_2). On the fourth day of the experiment, the embryos were explanted from the uterus and assessed development by the number of morules and blastocysts in each group and the number of blastomeres in the control and exposed embryos.

Results. Embryos exposed to cadmium chloride in utero passed the initial stages of cleavage and blastocyst formation faster than the control embryos. At the blastocyst stage, the rate of cleavage of exposed and control embryos statistically did not differ.

Limitations. The influence of the toxicant was assessed only on preimplantation mice embryos with intraperitoneal administration of the drug to mothers and in a single dose. Studies of mouse embryos at the postimplantation period of development would reveal in more detail the effect of the drug on embryogenesis

Conclusion. Injections of sublethal doses of cadmium chloride to female mice at the debut of pregnancy force the development of embryos to the blastocyst stage.

Keywords: *cadmium chloride; preimplantation mouse embryos; in vivo; blastomeres; morula; blastocysts; cavitation*

Compliance with ethical standards. The conducted studies met the requirements of the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals, adopted by the Local Ethical Committee of the Federal State Budgetary Scientific Institution “IEM”, protocol No. 2/21 dated May 27, 2021.

For citation: Noniashvili E.M. The development of pre-implantation mouse embryos under the influence of sublethal doses of cadmium chloride on the maternal organism. *Toxikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2023; 31(4): 232-236. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-4-232-236> (In Russian)

For correspondence: Ekaterina M. Noniashvili, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular cytogenetics of mammalian development, Department of Molecular genetics, FSBSI «Institute of Experimental Medicine», 197022, St. Petersburg, Russian Federation. E-mail: katinka.04@list.ru

Information about the authors:

Noniashvili E.M., <https://orcid.org/0000-0002-2347-6920>

Scopus Author ID: 6602403829; Researcher ID: E-4173-2014; e-Library SPIN: 1799-7736

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Funding. The study was not sponsored.

Received: April 24, 2023 / Accepted: July 29, 2023 / Published: August 30, 2023

Введение

Кадмий (Cd) – высокотоксичный металл, широко распространённый в окружающей среде. Попадание Cd в организм человека и животных происходит не только через потребление продуктов растительного происхождения и некоторых видов морепродуктов, но также посредством курения сигарет и через промышленные выбросы [1]. Как оказалось, женщины имеют более высокие внутренние уровни Cd, чем мужчины, а у беременных женщин накапливается больше Cd, чем у небеременных [2]. О влиянии токсического воздействия в ходе развития на начало заболеваний в более позднем периоде жизни впервые обратил внимание Дэвид Баркер [3]. Позднее его гипотеза о фетальном происхождении болезней нашла своё подтверждение в многочисленных работах по возникновению рака, нарушениям развития, неврологических заболеваний и метаболическим синдромам [4–6].

Цель данной работы – исследование влияния инъекций сублетальных доз хлорида кадмия самкам мышей в первые дни беременности на доимплантационное развитие зародышей.

Материал и методы

Работа выполнена на гормонально стимулированных самках мышей F1 (СВАХС57BL) из питомника «Рапполово». Животные около 2 нед содержались при постоянном световом режиме, тёмный период продолжался 8 ч. Все работы с животными проводились в соответствии с требованиями этического комитета по уходу и использованию лабораторных животных, принятыми и обнародованными Институтом экспериментальной медицины, протокол № 1/22 от 18.02.2022).

Самкам в первый день беременности [7] вводили интраперитонеально по 10µM/кг массы тела (м.т.) водный раствор CdCl₂ (Sigma-Aldrich, США) в течение трёх дней. Суммарно каждая самка получала по 30µM/кг м.т. CdCl₂. При такой дозе воздействия препарата беременность наступала у 80% самок мышей [8]. В экспериментальной и контрольной группах использовано по 4 беременных самок мышей. На четвёртый день животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков и вымывали зародыши из матки. Контролем служили интактные зародыши аналогичного возраста. В обеих группах эксперимента подсчитывали количество зародышей на стадии морулы и бластоцисты. Затем из всех зародышей готовили суховоздушные препараты [9], на которых подсчитывали количество бластомеров в каждом зародыше, используя фазово-контрастный микроскоп AxioLab. A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения (<https://vassarstats.net>). Количество бластомеров в зародышах рассчитывали как среднее значение в каждой группе ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SE$) Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В работе исследованы 58 контрольных зародышей и 61 от экспонированных CdCl₂ самок мышей (см. таблицу). В левой части таблицы представлены абсолютные и процентные значения количества зародышей на стадии морулы и бластоцисты, а в правой её части отражено среднее количество бластомеров в общей группе зародышей (морулы + бластоцисты) и отдельно в морулах и бластоцистах. Из таблицы видно, что в контроль-

Развитие доимплантационных зародышей мышей в условиях воздействия на материнский организм по 10 µM CdCl₂ в течение первых трех дней беременности

The development of preimplantation mouse embryos under conditions of maternal exposure to 10 µM cadmium chloride during the first three days of pregnancy

Группа	Количество животных	Всего зародышей	Из них		Среднее количество бластомеров в группах, $M \pm SE$		
			морулы, %	бластоцисты, %	морулы + бластоцисты	морулы	бластоцисты
Интактный контроль	4	58	20 (34,5)	38 (65,5)	39,19 ± 1,54	30,60 ± 1,63	43,71 ± 1,82
CdCl ₂ (10 µM 3x)	4	61	14 (23,0)	47 (77,0)	44,51 ± 1,05	41,50 ± 2,27	45,40 ± 1,16

Примечание. M – среднее значение; SE – стандартная ошибка среднего. Различия статистически достоверны между опытными группами и контролем при $p < 0,05$.

Note: M – average value; SE – standard error. Differences are statistically significant between the experimental groups and control at $p < 0.05$.

ной группе 38 (65,5%) зародышей находились на стадии бластоцисты, а среди зародышей, подвергавшихся внутриутробному воздействию хлорида кадмия, доля бластоцист составляла 47 (77%). Среднее количество бластомеров в группе (морулы+бластоцисты) в контрольных зародышах составляло 39,19 – это в 1,2 раза меньше ($p = 0,001$), чем в экспонированных зародышах – 44,5. Однако если рассматривать количество бластомеров в зародышах отдельно на стадии морулы и бластоцисты, то становится очевидным, что статистически значимые различия ($p = 0,003$) наблюдались только среди зародышей на стадии морулы – 30,6 в контрольной группе, что в 1,4 раза меньше, чем в экспонированных зародышах – 41,5. Несмотря на то, что 77% экспонированных зародышей находились на стадии бластоцисты, а в контрольной группе число бластоцист составляло всего 65,5%, статистически значимых различий в темпе дробления бластомеров в бластоцистах между группами не было выявлено – 45,4 в опыте и 43,71 в контроле ($p = 0,288$).

Обсуждение

Доимплантационное развитие зародышей млекопитающих сопровождается двумя важными процессами – компактизацией бластомеров на стадии морулы и кавитацией – формированием бластоцисты. Эти два процесса протекают независимо от темпа дробления и, как следствие, от числа бластомеров в зародыше. Поэтому критерием оценки развития доимплантационных зародышей является не только количество морул и бластоцист, но и количество бластомеров в каждом зародыше.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что введение самкам мышей сублетальных доз $CdCl_2$ в первые три дня беременности ускоряет развитие зародышей, вплоть до стадии бластоцисты. Затем темп дробления зародышей снижается и практически сравнивается с контрольными зародышами. Эти данные отличаются от результатов, полученных нами на зародышах аналогичного возраста в экспериментах *in vitro*, где $CdCl_2$ тормозил развитие зародышей, и эффект усиливался с увеличением дозы токсиканта [7]. Такое расхождение результатов экспериментов *in vivo* и *in vitro*, возможно объясняется тем, что в утробе матери зародыши защищены плацентарным барьером от прямого воздействия токсиканта в отличие от экспериментов *in vitro*, где развивающиеся зародыши непосредственно соприкасаются с токсикантом в культуральной среде.

Известно, что Cd в значительной степени задерживается в плаценте, где он может накапли-

ваться до высоких концентраций [10]. Повышенные концентрации Cd были также обнаружены в плацентах матерей, родивших детей с низкой массой тела при рождении [11], а плацента курящих матерей содержала вдвое больше Cd, чем у некурящих [12]. При парентеральном введении Cd беременным крысам содержание его в плаценте было в 10 раз выше, чем в крови и у плода [13]. Известны также данные о том, что низкие дозы Cd, в отличие от высоких доз, не оказывали существенного влияния на ограничение роста плода [14].

Поскольку биологический период полувыведения Cd из организма очень велик: быстрый компонент составляет 75–128 дней, а медленный – 7,4–26,0 лет [15], последствия воздействия кадмия проявляются на более поздних стадиях онтогенеза и во взрослом организме. Возможно, что большая часть Cd в начальном периоде беременности задерживается в плаценте и накопление его в зародышах происходит позднее. Этим обстоятельством, возможно, объясняется снижение темпа дробления экспонированных зародышей до уровня контрольных только со стадии бластоцисты.

Механизмы токсичности Cd в раннем возрасте ещё не ясны.

Предполагают, что воздействие Cd во время беременности, приводящее к накоплению его в плаценте, по-видимому, нарушает перенос цинка к плоду, нарушает баланс глюкокортикоидов и влияет на регуляцию белков, связанных с фактором повышения уровня инсулина [16].

Оценка влияния токсиканта проведена только на доимплантационных зародышах мышей при интраперитонеальном введении препарата матерям и в одной дозе. Исследования зародышей мышей на постимплантационном сроке развития позволили бы детальнее раскрыть действие препарата на эмбриогенез.

Заключение

Инъекции сублетальных доз $CdCl_2$ самкам мышей в дебюте беременности форсируют развитие зародышей до стадии бластоцисты.

Выводы

1. Экспонированные $CdCl_2$ эмбрионы быстрее проходят начальные стадии дробления и формирования бластоцисты. Ускорение дробления экспонированных $CdCl_2$ зародышей приостанавливается на стадии бластоцисты.

2. Исследование влияния экотоксикантов на развитие доимплантационных зародышей необходимо проводить не только *in vitro*, но и повторять в экспериментах *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–6, 8–16 см. в References)

7. Нониашвили Е.М., Чан В.Ч., Грудинина Н.А., Софронов Г.А., Епринцев А.Т., Паткин Е.Л. Особенности развития доимплантационных зародышей мышей в присутствии малых доз хлористого кадмия *in vitro*. *Вестник Воронежского гос. университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2019; 1: 48–55.

REFERENCES

- Zhang J., Tian Y., Wang W., Ouyang F., Xu J., Yu X., Luo Z., Jiang F., Huang H., Shen X. Letal Cohort profile: the Shanghai Birth Cohort. *Int. J. Epidemiol.* 2019; 48(1): 21.
- Nishijo M., Satarug S., Honda R., Tsuritani I., Aoshima R. The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 255: 87–92.
- Barker D., Eriksson J., Forsen T., Osmond C. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *Int. J. Epidemiol.* 2002; 31: 1235–9.
- Barker D.J., Clark P.M. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 1997; 2: 105–12.
- Lin H.C., Hao W.M., Chu P.H. Cadmium and cardiovascular disease: An overview of pathophysiology, epidemiology, therapy, and predictive value. *Rev Port Cardiol (Engl Ed)*. 2021; 40(8): 611–67.
- Fagerberg B., Barregard L., Sallsten G., Forsgard N., Ostling G., Persson M., et al. Cadmium exposure and atherosclerotic carotid plaques – Results from the Malmö diet and Cancer study. *Environ Res.* 2015; 136: 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.004>
- Noniashvili E.M., Chan V.Ch., Grudinina N.A., Sofronov G.A., Eprintsev A.T., Patkin E.L. Features of the development of preimplantation mouse embryos in the presence of low doses of cadmium chloride *in vitro*. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2019; 1: 48–55. (in Russian)
- Dalton T., Fu K., Enders G.C., Palmiter R.D., Andrews G.K. Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-1 in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium. *Environmental Health Perspectives*. 1996; 104(1): 68–76.
- Dyban A.P. Improved method for chromosome preparations from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres. *Stain Technology*. 1983; 58(2): 69–72. <https://doi.org/10.3109/10520298309066756>
- Sakamoto M., Yasutake A., Domingo J.L., Chan H.M., Kubota M., Murata K. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ Int.* 2013; 60: 106–11.
- Llanos M.N., Ronco A.M. Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reprod. Toxicol.* 2009; 27(1): 88–92.
- Piasek M., Blanusa Kostial K., Laskey J.W., Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod. Toxicol* 2001; 15: 673–81. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.915779>
- Piasek M., Micolic A., Sekovanic A., Grgec A.S., Jurasovic J. Cadmium in placenta – a valuable biomarker of exposure during pregnancy in biomedical research. *J. Toxicol. Environ. Health.* 2014; 77(18): 1071–4. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.915779>
- Guo J., Wu C., Qi X., et al. Adverse associations between maternal and neonatal cadmium exposure and birth outcomes. *Science of The Total Environment*. 2016; 16: 31934–9.
- Jarup L., Rogenfelt A., Elinder C.G., Nogawa K., Kjellstrom T. Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure. *Scand. J. Work Environ Health.* 1983; 9: 327–31.
- Turgut S., Kaptanoglu B., Turgut G., et al. Effects of cadmium and zinc on plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor-binding protein 3. *Biol Trace Elem Res.* 2005; 108(1–3): 197–204.

ОБ АВТОРЕ:

Нониашвили Екатерина Михайловна (Noniashvili Ekaterina Mikhailovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация. E-mail: katinka.04@list.ru

