

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ В ПРИСУТСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ ХЛОРИСТОГО КАДМИЯ IN VITRO

Е. М. Нониашвили<sup>1</sup>, В. Ч. Чан<sup>1,2,3</sup>, Н. А. Грудинина<sup>1</sup>, Г. А. Софронов<sup>1</sup>,  
А. Т. Епринцев<sup>2</sup>, Е. Л. Паткин<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

<sup>3</sup>Российско-Вьетнамский тропический Научно-исследовательский и технологический центр

Поступила в редакцию 11.06.2018 г.

**Аннотация.** Кадмий (Cd) - тяжелый металл, поллютант, ассоциированный с некоторыми современными индустриальными процессами. Значительное количество кадмия абсорбируется из сигаретного дыма, влияет на здоровье, поражая почки, печень, кровеносные и репродуктивные системы. С другой стороны, становится общепринятым взгляд, что патологии во взрослом состоянии возникают из-за эпигенетических нарушений в ходе эмбриогенеза. Какие отклонения в развитии возникают под действием кадмия остается в основном неизвестным. Показано нарушение развития гонад у половозрелых самцов крыс в результате орального или подкожного введения кадмия. При однократном введении самцам крыс 100-150 мг Cd/кг орально в течение двух недель наблюдали угнетение сперматогенеза и отдельные участки некроза в тестикулах. Также описано воздействие кадмия на репродуктивные ткани и развивающиеся зародыши. Малые дозы (2-20 мкМ) хлористого кадмия вызывали понижение количества яйцеклеток, находящихся на второй метафазе мейоза и числа оплодотворенных яйцеклеток в культуре, а также повышали частоту дегенерации яйцеклеток. Показано, что кадмий аккумулируется в эмбрионах с 4-х клеточной стадии и в высоких дозах тормозит развитие до стадии бластоцисты, а также может быть причиной декомпактизации и дегенерации в бластоцистах.

В работе изучали влияние малых доз хлорида кадмия на доимплантационное развитие мышечных эмбрионов in vitro. Одно - или двухклеточные эмбрионы мышей культивировали в присутствии хлористого кадмия (10 мкМ, 20 мкМ, 25 мкМ и 50 мкМ). Оценивали развитие зародышей до стадии морулы/бластоцисты и уровень метилирования ДНК после культивирования в течение 72-96 часов. Установлено, что развитие одно - двухклеточных эмбрионов в присутствии малых доз хлористого кадмия на протяжении 72-96 часов in vitro тормозит их развитие до стадии морулы/бластоцисты, снижает скорость кавитации и число бластомеров в зародышах, а также понижает уровень метилирования ДНК в морулах и бластоцистах. Мы установили, что ранний эмбриогенез является высокочувствительным периодом к воздействию хлористого кадмия. Такое влияние, наиболее вероятно, обусловлено активными процессами репрограммирования, связанными с метилированием ДНК, как всего генома, так и отдельных генов.

**Ключевые слова:** ранние зародыши мыши; воздействие хлористого кадмия in vitro; бластомеры; морулы; бластоцисты; кавитация; иммунофлуоресценция CpG-сайтов in situ; метилирование ДНК.

Кадмий принадлежит к группе тяжелых металлов, является ксенобиотиком, ассоциированным с современными индустриальными процессами. Значительное количество кадмия поступает в организм с продуктами питания и при курении. Именно кадмий считают наиболее токсичным из

тяжелых металлов [1]. Период полувыведения кадмия из организма составляет 15-30 лет [2]. Эффекты кадмия на организм сильно зависят от пути поступления, дозы и длительности воздействия [3, 4]. Считается, что основной мишенью токсического действия кадмия являются почки [5]. Пагубное влияние кадмия особенно сказывается на органах репродуктивной системы: нарушение внутрифолликулярных процессов в период созре-

© Нониашвили Е. М., Чан В. Ч., Грудинина Н. А., Софронов Г. А., Епринцев А. Т., Паткин Е. Л., 2019

Горбачева Т. М., Паневина А. В., Гуреев А. П., Башмаков В. Ю., Солодских С. А., Мошуров И. П., Михайлов А. А., Маслов А. Ю., Попов В. Н.

вания ооцитов в яичниках [6, 7], а также в период имплантации и последующего развития эмбрионов [8]. Также негативно кадмий влияет и на мужскую репродуктивную систему, нарушая работу тестикулов и вызывая их дисфункцию [9, 10]. Отрицательное действие кадмий оказывал не только на уровне гамет, но и на последующем развитии эмбрионов [11, 12, 13].

В настоящей работе исследовали влияние малых доз хлористого кадмия ( $\text{CdCl}_2$ ) на доимплантационное развитие мышинных эмбрионов *in vitro*. Одно- или двухклеточные эмбрионы мышей культивировали в среде M16, содержащей 10, 20, 25 и 50 мкМ  $\text{CdCl}_2$ . Контролем служила группа зародышей, развивающихся в среде M16. Зародыши анализировали через 72-96 часов. Критерием оценки развития зародышей служило: способность зародышей развиваться до стадии морулы/бластоцисты, количество бластомеров в зародышах и уровень общегеномного метилирования ДНК *in situ*.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовались 8 - 10-недельные мыши - гибриды F1 (СВА х С57BL) из питомника «Рапполово». Для получения животных с датированным сроком беременности применяли гормональную стимуляцию самок [14]. Животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков и извлекали яйцеводы. Одноклеточные зародыши - зиготы получали через 20-22 часа, а двухклеточные - через 42-44 часа после введения хорионического гонадотропина (ХГ). Все манипуляции с зародышами проводили под контролем стереомикроскопа МБС-9.

Перед культивированием зародышей готовили рабочие растворы среды M16 с содержанием 10, 20, 25 или 50 мкМ  $\text{CdCl}_2$  (Sigma-Aldrich, USA). В каждую чашку-Петри (диаметр 35 см, Sarsted) наносили несколько порций по 40 мкл соответствующей среды и покрывали слоем минерального масла (Sigma). Зародыши посредством стеклянного микрокапилляра переносили в приготовленные среды на 72-96 часов в термостат при температуре  $+37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в воздухе. Контрольные зародыши культивировали в среде M16. Через 72-96 часов оценивали развитие эмбрионов: подсчитывали количество морул и бластоцист в каждой группе, а также количество зародышей, не достигших этой стадии и остановившихся в развитии на стадии 3-6 бластомеров, либо погибших. После этого из морул и бластоцист готовили суховоздуш-

ные препараты по модифицированной методике А.П.Дыбана [15]. На препаратах подсчитывали количество бластомеров в каждом зародыше, используя фазовый контраст микроскопа Axio Lab. A1, Carl Zeiss. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения (<http://vassarstats.net>). Количество морул, бластоцист и бластомеров рассчитывали как среднее значение в каждой группе  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически достоверными при  $P < 0.05$ .

Для оценки общегеномного уровня метилирования ДНК полученные препараты зародышей окрашивали антителами к 5-метилцитозину (5-MeC). До обработки антителами препараты зародышей подвергались специальной предобработке по разработанной нами методике [16] и затем окрашивали моноклональными антителами к 5-MeC. Подробная методика окрашивания описана в нашей предыдущей публикации [17]. Для микроскопии и обработки изображений использовали стандартную методику, описанную нами ранее [18]. Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 Meta (Zeiss, Германия). Обработку и анализ изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения LSM 510 и программного обеспечения 1.44p (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>). Для каждого эксперимента получали не менее 10-15 изображений препаратов ядер из разных зародышей. Уровень метилирования ДНК рассчитывали как среднее значение уровня флуоресценции метилированных сайтов на единицу площади (вторичных антител к 5-метилцитозину), определенного при помощи программы ImageJ в условных единицах MGv (Mean gray value)  $\pm$  стандартная ошибка среднего для каждого эксперимента.

Статистическая обработка данных и работа с графикой проводилась с помощью языка программирования R (<https://www.r-project.org/>) и в программе Microsoft Office Excel 2007. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при  $P < 0.05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было проведено три серии экспериментов: в первой серии зародыши находились в культуре с одноклеточной стадии (зиготы) на протяжении 72 часов и использовали четыре концентрации  $\text{CdCl}_2$  (10, 20, 25 и 50 мкМ); во второй серии экс-

периментов зародыши культивировались со стадии зиготы, но в течение 96 часов в 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub>; в третьей серии в эксперимент брали двухклеточные зародыши и культивировали в течение 72 часов в присутствии 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub>. В [табл.1] представлены результаты развития одно- и двухклеточных зародышей до стадий морулы и бластоцисты в присутствии различных концентраций CdCl<sub>2</sub> и продолжительности воздействия. В последнем столбце указано среднее количество бластомеров в каждой группе зародышей. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрации 25 и 50 мкМ CdCl<sub>2</sub> в среде [табл.1 п.п. 4, 5] оказались летальными для одноклеточных зародышей. Поэтому в последующих экспериментах использовали только две сублетальные концентрации CdCl<sub>2</sub>: 10 и 20 мкМ.

#### **Развитие одно- и двухклеточных зародышей до стадии морулы/бластоцисты**

В первой серии экспериментов через 72 часа воздействия на зиготы процент зародышей, достигших стадии морулы/бластоцисты в контрольной группе и в группе с 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> был сопоставим - 98.2% и 98.4% [табл.1, п.п.1, 2]. При увеличении концентрации кадмия в два раза, т.е. до 20 мкМ, число таких зародышей уменьшалось до 92.3% и 7.7% зародышей прекращали дробление на 3-6 клетках [в табл.1, п.3]. Увеличение времени экспонирования до 96 часов не отражалось на зародышах, развивающихся в 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 98.4% [табл.1, п.п.7]. Однако, при увеличении дозы агента в два раза, количество зародышей, до-

стигших стадии морулы/бластоцисты снижалось до 95.3% [табл.1, п.п.8]. При этом, 4.7% зародышей гибли, а 3% прекращали дробление на 3-6 бластомерах. Действие токсиканта на развитие двухклеточных зародышей до стадии морулы/бластоцисты также носило дозозависимый характер [табл.1, п.п. 9-11]. В контроле 100% зародышей формировали морулы и бластоцисты; в 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> таких зародышей было 98.5%, а при воздействии 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> процент морул и бластоцист понижался до 92.3%. Во всех трех сериях экспериментов действие CdCl<sub>2</sub> на развитие зародышей до морулы/бластоцисты зависело от дозы агента и не усиливалось с увеличением времени экспонирования зародышей.

#### **Характеристика бластоцист**

Как известно, доимплантационное развитие зародышей млекопитающих сопровождается двумя важными процессами - компактизацией бластомеров на стадии морулы и кавитацией (образованием полости внутри зародыша) при формировании бластоцисты. Процесс кавитации оценивали, подсчитывая количество бластоцист в каждом эксперименте. В зародышах, находившихся под воздействием токсиканта со стадии зиготы на протяжении 72 часов [табл.1, п.п. 1, 2, 3] количество бластоцист в обеих опытных группах примерно на 13% было меньше, чем в контроле. При увеличении времени воздействия на такие зародыши до 96 часов [табл.1, п.п. 6, 7, 8] картина была иной. В 10 мкМ CdCl<sub>2</sub>, процесс формирования бластоцист протекал быстрее (92.1%), чем в

Таблица 1.

*Развитие одноклеточных и двухклеточных зародышей в присутствии малых концентраций хлористого кадмия на протяжении 72-96 часов in vitro.*

Варианты эксперимента (стадия зародыша, время воздействия)	Всего исследовано зародышей, N	Всего морул и бластоцист, n (%)	К-во морул, % ± m <sub>p</sub>	К-во бластоцист, % ± m <sub>p</sub>	К-во 3-6 кл. зародышей, % ± m <sub>p</sub>	Погибшие зародыши, % ± m <sub>p</sub>	Среднее к-во бластомеров в зародыше, M ± S.E.
1. Контроль (зиготы+72ч).	57	56 (98.2)	52.6±6.6	45.6±6.6	1.8±1.8	-	32.3±2.2
2. CdCl <sub>2</sub> , 10мкМ	61	60 (98.4)	65.6±6.1	32.8±6.1	1.6±1.6	-	27.7±1.6*
3. CdCl <sub>2</sub> , 20мкМ	65	60 (92.3)	60.0±6.1	32.3±5.8	7.7±3.3	-	20.9±1.2**
4. CdCl <sub>2</sub> , 25мкМ	22	-	-	-	-	100±0	-
5. CdCl <sub>2</sub> , 50мкМ	22	-	-	-	-	100±0	-
6. Контроль (зиготы+96 ч)	60	60 (100)	13.3±4.4	86.7±4.4	-	-	68.5±3.7
7. CdCl <sub>2</sub> , 10мкМ	63	62 (98.4)	6.3±3.1	92.1±3.4	-	1.6±1.7	60.6±3.5*
8. CdCl <sub>2</sub> , 20мкМ	64	61 (95.3)	10.9±3.9	84.3±4.6	3±2.1	4.7±2.6	50.9±2.4**
9. Контроль (2-х кл.+72 ч)	73	73 (100)	9.2±4.6	80.8±4.6	-	-	59.0±3.0
10. CdCl <sub>2</sub> , 10мкМ	66	65 (98.5)	15.2±4.5	83.3±4.5	1.5±1.5	-	47.6±4.9*
11. CdCl <sub>2</sub> , 20мкМ	65	60 (92.3)	12.3±4.2	80.0±5.1	-	7.7±3.4	38.5±5.6**

Примечание: % ± m<sub>p</sub> – процент ± ошибка процента; M - среднее значение; S.E. - стандартная ошибка; \*, \*\*: Различия статистически достоверно между опытными группами и контролем при P < 0.05 и P < 0.01, соответственно.

контроле (86.7%). Удвоенная доза агента - 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> этот процесс, напротив, тормозила - (84.3% бластоцист).

Такая же закономерность в формировании бластоцист наблюдалась и при экспонировании двухклеточных зародышей на протяжении 72 часов [табл.1, п.п. 9, 10, 11]. В 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> в среде процесс формирования бластоцист ускорялся (83.3%) по сравнению с контрольными зародышами (80.8%). Увеличение дозы агента в два раза не стимулировало процесс кавитации (80.0%).

Таким образом, действие малых доз хлористого кадмия по-разному влияло на процесс кавитации (формирования бластоцист) в зародышах. При воздействии на одноклеточные зародыши в течение 72 часов 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> процесс кавитации в зародышах замедлялся независимо от дозы агента. С увеличением времени воздействия до 96 часов в малых дозах (10 мкМ CdCl<sub>2</sub>) процесс кавитации протекал быстрее, чем в контрольных зародышах. Увеличение дозы воздействия до 20 мкМ CdCl<sub>2</sub>, наоборот, слегка тормозило этот процесс. Двухклеточные зародыши реагировали на воздействие токсиканта так же, как зародыши, подвергавшиеся воздействию со стадии зиготы в течение 96 часов, т.е. при малых дозах воздействия процесс формирования бластоцист ускорялся. Возможно, это объясняется тем, что возраст зародышей в этих двух сериях эксперимента был сопоставим (116-118 ХГ).

#### Оценка среднего количества бластомеров в зародышах

Процессы компактизации и кавитации в зародышах протекают независимо от темпа дробления и, как следствие, от числа бластомеров в зародыше. Поэтому подсчет бластомеров в каждом зародыше является важным критерием оценки доимплантационного развития.

Через 72 часа культивирования одноклеточных зародышей отмечалось уменьшение среднего количества бластомеров во всех группах экспонированных зародышей: контроль - 32.3; в 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 27.7; в 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 20.9 бластомеров [табл.1, п.п. 1, 2, 3]. Такая же закономерность прослеживалась и при воздействии токсиканта в течение 96 часов [табл.1., п.п. 6, 7, 8]. В контрольной группе - 68.5, в 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 60.6 и в 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 50.9 бластомеров на зародыш.

В двухклеточных зародышах, находившихся в среде с токсикантом 72 часа, тенденция уменьшения числа бластомеров в зародышах под воздействием хлористого кадмия сохранялась: в контроле

- 59.0, в 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 47.6 и в 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> - 38.5 бластомеров на зародыш [табл.1., п.п. 9, 10, 11].

Таким образом, во всех сериях экспериментов с одно- и двухклеточными зародышами количество бластомеров в зародышах уменьшалось под воздействием CdCl<sub>2</sub> и носило дозозависимый характер. Этот процесс не зависел от возраста, в котором зародыши подвергались воздействию и продолжительности воздействия агента.

**Исследования уровня метилирования ДНК *in situ*.** Сравнительную оценку общегеномного метилирования ДНК в морулах и бластоцистах проводили после окраски препаратов зародышей антителами к 5-МеС и измерения уровня флуоресценции (в условных единицах, у.е.) в ядрах бластомеров. На рис. 1 представлены данные по общегеномному метилированию ДНК, полученные на зародышах, подвергавшихся воздействию токсиканта со стадии зиготы на протяжении 72-96 часов. Статистически достоверное отличие в уровне флуоресценции антител к 5-метилцитозину в ядрах зародышей наблюдалось между контрольными зародышами и группой зародышей, развивающихся в присутствии 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> (при P < 0.01), а также между двумя опытными группами 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> (при P < 0.001). Разница в метилировании ДНК между контролем и группой в 10 мкМ была статистически не достоверной (P > 0.05).

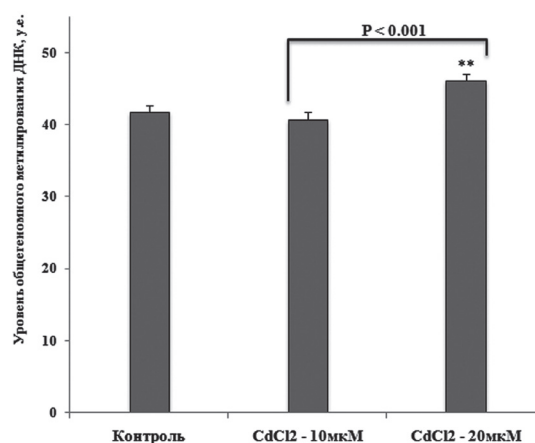


Рис.1. Уровень общегеномного метилирования ДНК ядер бластомеров при культивировании одноклеточных зародышей в течение 72 - 96 часов в присутствии 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub>.

Примечание: «Контроль» - 41.84 ± 0.88 у.е.; «CdCl<sub>2</sub> - 10 мкМ» - 40.78 ± 1.07 у.е.; «CdCl<sub>2</sub> - 20 мкМ» - 46.22 ± 0.88 у.е. (у.е. - условные единицы). \*\*: Различие между группой «CdCl<sub>2</sub>-20 мкМ» и «контролем» статистически достоверно при P < 0.01; между опытными группами при P < 0.001; между контролем и группой «CdCl<sub>2</sub>-10 мкМ» разница не достоверна (P > 0.05).

При определении эпигенетического статуса зародышей, развивающихся в присутствии хлористого кадмия с двухклеточной стадии на протяжении 72 часов (рис. 2), было обнаружено значительное понижение уровня общегеномного метилирования ДНК в обеих опытных группах по сравнению с контролем (при  $P < 0.001$ ).

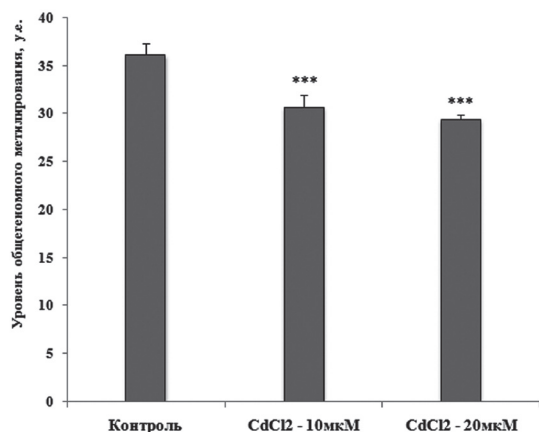


Рис. 2. Уровень общегеномного метилирования ДНК интерфазных ядер бластомеров при культивировании двухклеточных зародышей в течение 72 часа в присутствии 10 и 20 мкМ хлористого кадмия (в условных единицах, у.е.).

Примечание: Уровень общегеномного метилирования ДНК измеряли в условных единицах,  $M \pm S.E.$ ,  $M$  - среднее значение,  $S.E.$  - стандартная ошибка. «Контроль» -  $36.17 \pm 1.22$ ; «CdCl<sub>2</sub> - 10µM» -  $30.73 \pm 1.26$ ; «CdCl<sub>2</sub> - 20µM» -  $29.47 \pm 0.43$ ; \*\*\*: Различия статистически достоверно при сравнении опытных групп с контролем при  $P < 0.001$ .

Таким образом, нами были выявлены отличия в изменении уровня общегеномного метилирования ДНК после воздействия CdCl<sub>2</sub> на зародыши, отличающиеся по возрасту на старте экспонирования агентом. Эффект воздействия токсиканта на одноклеточные зародыши зависел от дозы агента. При воздействии 10 мкМ CdCl<sub>2</sub> уровень метилирования ДНК оставался практически неизменным, а при воздействии 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> уровень флуоресценции значительно повышался и разница флуоресценции составляла 4.8 условных единиц.

Понижение уровня метилирования ДНК в зародышах, экспонированных с двухклеточной стадии на протяжении 72 часов, не зависело от дозы агента. В обеих опытных группах разница флуоресценции по сравнению с контролем составляла 6-7 у.е. при  $P < 0.001$  [рис.2].

Метилирование ДНК участвует в регуляции многих клеточных процессов, в том числе в струк-

турировании хроматина, геномном импринтинге, стабильности хромосом и транскрипции генов [19]. Доимплантационное развитие является периодом активации эмбрионального генома. В этот период происходит деметилирование большинства собственных генов зародыша. Предполагается, что при воздействии экотоксиканта в пренатальном периоде развития организма происходят разного рода нарушения метилирования ДНК, ведущие к изменению эпигенетического статуса эмбриона [20]. Наши данные, полученные при воздействии двух сублетальных доз хлористого кадмия на ранние зародыши *in vitro*, начиная с зиготы и двух бластомеров, свидетельствуют о том, что воздействие токсиканта в таких низких дозах сказывается на раннем развитии зародышей. Это проявляется в замедлении процессов дробления и кавитации зародышей, а также в изменении общегеномного уровня метилирования ДНК, которое зависело от дозы агента и возраста зародышей на старте воздействия токсикантом. Воздействия неблагоприятных условий окружающей среды на организм в период раннего развития могут приводить к эпигенетическим модификациям, которые в свою очередь, влияют на все последующее развитие, включая взрослый организм [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышеописанные данные по воздействию хлористого кадмия на развитие ранних зародышей мышей, можно заключить:

1. Воздействие 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub> на одно- и двухклеточные зародыши мышей замедляет процесс дробления и развития эмбрионов до стадии морулы/бластоцисты, а концентрация 25 и 50 мкМ CdCl<sub>2</sub> оказалась летальной для одноклеточных зародышей.

2. Эффект воздействия CdCl<sub>2</sub> зависел от дозы токсиканта и стадии развития зародыша, на которой они подвергались воздействию. Одноклеточные зародыши более чувствительны к воздействию 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub>.

3. Общегеномное метилирование ДНК в зародышах понижается под воздействием 10 и 20 мкМ CdCl<sub>2</sub>. Этот эффект может служить маркером нарушения последующего развития, как в эмбриональном периоде, так и во взрослом организме.

*Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств проекта РФФИ № 18-015-00122*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cadmium. WHO Food additives series 46. Режим доступа: <http://www.inchem.org/documents/>

jecfa/jecmono/v46je11.htm.

2. Thompson J., Bannigan J. // *Reprod. Toxicol.* 2008. No. 25. pp. 304-315.

3. Emmerson B.T. // *Ann.Intern.Med.* 1970. Vol.73. pp. 854-855.

4. Satarug S., Moore MR. // *Environ. Health. Perspect.* 2004. Vol.112(10). pp. 1099-3103.

5. Jung K., Pergande M., Graubaum H.J., Fels M., Endl U., Stoke H. // *Clin. Chem.* 1998. Vol. 39. pp. 757-765.

6. Mlinarcikova A, Fickova M, Scsukova S. // *Endocr. Regul.* 2005. Vol. 39. pp. 20-31.

7. Vranska S, Nagyova E, Mlinarcikova A, Fickova M, Kolena J. // *Physiol. Res* 2003. Vol. 52. pp. 83-387.

8. Yu H.S., Tam PPL, Chan S.T. // *Teratology.* 1985. Vol. 32(3). pp. 347-353.

9. Fende P.L., Niewenhuis R.J. // *Biol. Reprod.* 1977. Vol.1. pp. 298-305.

10. Niewenhuis R.J. // *Biol. Reprod.* 1980. Vol. 23. pp. 171-179.

11. De S.K., Paria B.C., Dey S.K., Andrews G.K. // *Toxicology.* 1993. Vol. 80(1). pp. 13-25.

12. Yu H.S., Chan S.T. // *Pharmacol. Toxicol.* 1987. Vol. 60(2). pp. 129-134.

13. Abraham R., Charles A.K., Mankes R., LeFevre R., Renak V., Ashok L. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1986. Vol. 12(3). pp. 213-219.

14. Gates A.H. // *Methods in Mammalian Embryology.* Daniel J. (Ed.). 1971. San Francisco. Freeman Co., pp. 64-75.

15. Dyban A.P. // *StainTechniligy.* 1983. Vol. 58. pp. 60-72.

16. Грудина Н.А., Сасина Л.К., Нониашвили Е.М., Неронова Е.Г., Павлинова Л.И., Сучкова И.О., Софронов Г.А., Паткин Е.Л. // *Цитология.* 2015. Т. 57(8). С. 592-601.

17. Нониашвили Е.М., Грудина Н.А., Кустова М.Е., В.Ч. Чан, Сучкова И.О., Павлинова Л.И., Сасина Л.К., Дергачева Н.И., Софронов Г.А., Паткин Е.Л. // *Экол. Генет.* 2017. Т.15. № 3. С. 42-53.

18. Sasina L.K., Fedorova E.V., Grudinina N.A., Belotserkovskaya E.V., Solovyov K.V., Suchkova I.O., Patkin E.L. // *Int. J. Biol. Engeneering.* 2013. Vol. 3(1). pp. 1-10.

19. Reik W., Dean W., Walter J. // *Science.* 2001. Vol. 293. pp. 1089-1093.

20. Паткин Е.Л., Павлинова Л.И., Софронов Г.А. // *Биосфера.* 2013. № 4. С. 450-472.

21. Паткин Е.Л., Софронов Г.А. // *Экологическая генетика.* 2012. Т. 10(4). С. 14-28.

*ФГБНУ «ИЭМ»*

*Нониашвили Е. М., к.б.н., Старший научный сотрудник Лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих Отдела молекулярной генетики*

*E-mail: katinka.04@list.ru*

*Грудина Н. А., к.б.н., Старший научный сотрудник Лаборатории биохимической генетики Отдела молекулярной генетики*

*E-mail: strangecatnap@gmail.com*

*Софронов Г. А., д.м.н., проф., академик РАН*

*E-mail: gasofronov@mail.ru,*

*Паткин Е. Л., д.б.н., профессор, Заведующий Лабораторией молекулярной цитогенетики развития млекопитающих Отдела молекулярной генетики*

*E-mail: elp44@mail.ru*

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университета»*

*Чан В. Ч., Аспирант*

*E-mail: truongleky@gmail.com*

*FSBSI «ИЕМ»*

*Noniashvili E. M., PhD., Senior Researcher, Laboratory of Molecular cytogenetics of mammalian development, Department of Molecular genetics*

*E-mail: katinka.04@list.ru*

*Grudinina N. A., PhD., Senior Researcher, Laboratory of Biochemical genetics, Department of Molecular genetics*

*E-mail: strangecatnap@gmail.com*

*Sofronov H. A., DSci, PhD, Prof.,*

*E-mail: gasofronov@mail.ru*

*Patkin E. L., DSci, PhD, Prof., Head of Laboratory of Molecular cytogenetics of mammalian development, Department of Molecular genetics*

*E-mail: elp44@mail.ru*

*Voronezh State University*

*Tran V. T., post-graduate student of Faculty of Medicine and Biology*

*E-mail: truongleky@gmail.com*

## FEATURES OF THE DEVELOPMENT OF PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYOS IN THE PRESENCE OF SMALL DOSES CADMIUM CHLORIDE IN VITRO

E. M. Noniashvili<sup>1</sup>, N. A. Grudinina<sup>1</sup>, V. T. Tran<sup>1,2,3</sup>, G. A. Sofronov<sup>1</sup>,  
A. T. Eprintsev<sup>2</sup>, E. L. Patkin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine RAS

<sup>2</sup>Voronezh State University

<sup>3</sup>Russia-Vietnam research and technological centre

**Abstract.** Cadmium (Cd) is heavy metal, a pollutant associated with several modern industrial processes. Cd is absorbed in significant quantities from cigarette smoke, effects on health, targeting the kidneys and liver, vascular and reproductive systems. On the other hand, it is generally accepted that adult pathologies arise from epigenetic deviations during embryogenesis. What embryonic and epigenetical changes in development occur under the action of cadmium remains largely unknown. Adult male rats have been shown to develop gonadal damage following administration of Cd orally or subcutaneously. Focal testicular necroses and reduced spermatogenesis were seen in rats that received a single dose of 100-150 mg/kg orally within 2 weeks of administration. Effects of Cd on the reproductive tissues and the developing embryos have also been described. Small doses (2-20  $\mu$ M) of cadmium chloride decreased numbers of oocytes resting in second metaphase of meiosis, reduced numbers of fertilized oocytes in culture and increased the rate of oocyte degeneration. Cadmium has been shown to accumulate in embryos from the four-cell stage and higher dosage exposure inhibits progression to the blastocyst stage and can cause degeneration and decompaction in blastocysts. Exposure of low doses of Cd on preimplantation mouse embryos development in vitro was studied. The rate of blastocysts development, and the level of DNA methylation were estimated following culture of one - or two cells mouse embryos in the presence of CdCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M or 50  $\mu$ M) during 72-96 hours. CdCl<sub>2</sub> decreased the rate of embryos development to morula and blastocyst stages, cavitation, the number of blastomeres and the level of DNA methylation of embryos after cultured during 72-96 hours in vitro. We have determined that early embryogenesis is highly sensitive period to the effects of Cd. Such effect is, most likely, due to active reprogramming processes in this period, primarily related to DNA methylation the whole genome and individual genes.

**Keywords:** early mouse embryos; exposure of Cadmium chloride in vitro; blastomeres; morula; blastocysts; cavitation; immunofluorescence CpG sites in situ; DNA methylation.

### REFERENCE

1. Cadmium. WHO Food additives series 46. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je11.htm>.
2. Thompson J., Bannigan J. *Reprod. Toxicol.* 2008. No. 25. pp. 304-315.
3. Emmerson B.T. *Ann.Intern.Med.*, 1970, Vol.73, pp. 854-855.
4. Satarug S., Moore M.R. *Environ. Health. Perspect.*, 2004, Vol. 112(10), pp. 1099-3103.
5. Jung K., Pergande M., Graubaum H.J., Fels M., Endl U., Stoke H. *Clin. Chem.*, 1998, Vol. 39, pp. 757-765.
6. Mlinarcikova A., Fickova M., Scsukova S. *Endocr. Regul.*, 2005, Vol. 39, pp. 20-31.
7. Vranska S., Nagyova E., Mlinarcikova A., Fickova M., Kolena J. *Physiol. Res.*, 2003, Vol. 52, pp. 83-387.
8. Yu H.S., Tam PPL., Chan S.T. *Teratology*, 1985, Vol. 32(3), pp. 347-353.
9. Fende P.L., Niewenhuis R.J. *Biol. Reprod.*, 1977, Vol. 1, pp. 298-305.
10. Niewenhuis R.J. *Biol. Reprod.*, 1980, Vol. 23, pp. 171-179.
11. De S.K., Paria B.C., Dey S.K., Andrews G.K. *Toxicology*, 1993, Vol. 80(1), pp. 13-25.
12. Yu H.S., Chan S.T. *Pharmacol. Toxicol.*, 1987, Vol. 60(2), pp. 129-134.
13. Abraham R., Charles A.K., Mankes R., LeFevre R., Renak V., Ashok L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*,

1986, Vol. 12(3), pp. 213-219.

14. Gates A.H. Methods in Mammalian Embryology. Daniel J. (Ed.), 1971, San Francisco. Freeman Co., pp. 64-75.

15. Dyban A.P. Stain Techniligy. 1983, Vol. 58, pp. 60-72.

16. Grudinina N.A., Sasina L.K., Noniashvili E.M., Neronova E.G., Pavlinova L.I., Suchkova I.O., Sofronov G.A., Patkin E.L. Tsitologiya, 2015, Vol. 57(8), pp. 592-601.

17. Noniashvili E.M., Grudinina N.A., Kustova M.E., V.T. Tran., Suchkova I.O., Pavlinova L.I., Sasi-

na L.K., Dergacheva N.I., Sofronov G.A., Patkin E.L. Ekol. Genet., 2017, Vol. 15, No. 3, pp. 42-53.

18. Sasina L.K., Fedorova E.V., Grudinina N.A., Belotserkovskaya E.V., Solovyov K.V., Suchkova I.O., Patkin E.L. Int. J. Biol. Engeeneering, 2013, Vol. 3(1), pp. 1-10.

19. Reik W., Dean W., Walter J. Science, 2001, Vol. 293, pp. 1089-1093.

20. Patkin E.L., Pavlinova L.I., Sofronov G.A. Biosfera, 2013, No. 4, pp. 450-472.

21. Patkin E.L., Sofronov G.A. Ekologicheskaya genetika, 2012, Vol. 10(4), pp. 14-28.