

УДК 618.2-053.13-092.9:612.014.46:669.018.674

**Е.М. Білецька,
І.С. Чекман*,
Н.М. Онул,
В.Г. Каплуненко**,
В.П. Стусь**

БІОПРОТЕКТОРНА ДІЯ ЦИНКУ В МАКРО- І НАНОАКВАХЕЛАТНІЙ ФОРМІ НА ЕМБРИОГЕНЕЗ ЩУРІВ ЗА УМОВИ СВИНЦЕВОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Дніпропетровськ, 49044, Україна

*Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця**

Київ, 01601, Україна

Український державний науково-дослідний інститут

*нанобіотехнологій та ресурсозбереження***

Київ, 03150, Україна

SE "Dnipropetrovsk medical academy Ministry of Health of Ukraine"

Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine

e-mail: sangreena@mail.ru

*Bogomolets National Medical University**

Kiev, 01601, Ukraine

e-mail: nmu@nmu.edu.ua

*Ukrainian State Scientific Research Institute of Nanobiotechnologies and Resources saving***

Kiev, 03150, Ukraine

Ключові слова: *ембріотоксичність, експеримент, важкі метали, нанометали, свинець*

Key words: *embryotoxicity, experiment, heavy metals, nanometals, lead*

Реферат. Біопротекторное действие цинка в макро- и наноаквахелатной форме на эмбриогенез крыс в условиях свинцовой интоксикации. Белецкая Э.Н., Чекман И.С., Онул Н.М., Каплуненко В.Г., Стусь В.П. В статье представлены результаты изучения воздействия низких доз свинца и цинка (наноцинка) на эмбриональное развитие в условиях лабораторного эксперимента на крысах. Установлено негативное влияние свинца на протекание беременности у лабораторных животных, что проявляется в нарушении физиологической динамики ректальной температуры и снижении прироста массы тела. Эмбриотоксический эффект низких доз свинца проявляется в увеличении эмбриональной смертности в 2,16 раза по сравнению с контрольной группой животных, ухудшении морфометрических показателей плодов, нарушении плацентогенеза. Одновременное введение препаратов цинка при свинцовой интоксикации оказывает протекторное действие на организм беременных крыс и эмбриональное развитие потомства, более выраженное для цитрата цинка, полученного с использованием акваанотехнологии по сравнению с хлоридом цинка. При этом по морфометрическим показателям плоды мужского пола оказались более чувствительны к пренатальному воздействию свинца по сравнению с плодами женского пола.

Abstract. Bioprotective effect of zinc in macro- and nanoaquachelate form on embryonal development of rats in conditions of lead intoxication. Beletskaya E.M., Chekman I.S., Onul N.M., Kaplunenko V.G., Stus V.P. The article presents results of studied influence of low doses of lead and zinc (nanozinc) on embryonal development in a laboratory experiment on rats. Negative influence of lead on pregnancy of laboratory animals, manifested in violation of the physiological dynamics of the rectal temperature and decrease in body weight gain was revealed. Embryotoxic effect of low doses of lead results in increased fetal mortality by 2.16 times compared to the control group of animals, deterioration of the morphometric indices of fetuses, violation of placentogenesis. Simultaneous injections of zinc on background of lead intoxication causes a protective effect on the body of pregnant rats and embryonal development of the offspring, more pronounced for zinc citrate, received by using aquananotechnology, as compared to zinc chloride. Thus, by morphometry indices, male fetuses were more sensitive to prenatal lead exposure in comparison to female fetuses.

Несприятлива, а подекуди кризова екологічна ситуація у промислово розвинених регіонах нашої держави є одним з провідних чинників порушення репродуктивної функції у чоловіків і жінок та фактором ризику для здоров'я дитини [5], а тому «енвіронментальна» теорія погіршення репродуктивного здоров'я сучасної людини набуває все більшого поширення.

Серед найбільш небезпечних техногенних забруднювачів докільля пріоритетне місце посідає свинець та його сполуки [8, 10]. Встановлено, що в умовах техногенних біогеохімічних провінцій біосубстрати системи «мати-плацента-плід» містять свинець у підвищених концентраціях, що детермінує розвиток ускладнень вагітності, положів та післяпологового періоду і потенціюється

дефіцитом есенціальних мікроелементів, у першу чергу – цинку [1, 9], що зумовлено як недостатнім його надходженням з харчовими раціонами, так і біоантагонізмом зі свинцем [10]. Цинк відіграє важливу роль в організмі людини та тварин завдяки його морфофункціональним зв'язкам з понад 200 функціонально активними білками, зокрема ферментами [8, 9], він особливо необхідний для процесів росту та розвитку організму, репродуктивної функції.

На сьогоднішній день проблема хімічного забруднення довкілля та внутрішнього середовища організму залишається надзвичайно важливою та потребує нових науково-обґрунтованих підходів щодо її вирішення [9]. Теорії, що пов'язують розвиток багатьох хвороб з дефіцитом макро- і мікроелементів, належать до найсучасніших наукових розробок, а проблема ліквідації дефіциту мікроелементів шляхом збагачення продуктів харчування з принципово новими властивостями набуває все більшої популярності завдяки інтенсивному розвитку за останні роки нанотехнологій [4].

В останні роки частка токсикологічних досліджень з вивчення впливу наночасток на об'єкти довкілля та людину суттєво зросла. На жаль, досить активні дослідження з впливу наноматеріалів на організм майже не торкаються аспектів ембріотоксичності при їх ізольованому та/або комбінованому надходженні, а також у порівняльному аспекті зі звичайними формами металів.

Таким чином, незважаючи на інтенсивні дослідження останніх років, відомості щодо протекторного впливу препаратів біометалів, зокрема цинку, на токсичність свинцю, а також ефектів впливу нанометалів на організм матері та ембріон є досить обмеженими і суперечливими, тому експериментальні роботи із зазначеного напрямку є надзвичайно актуальними на сьогоднішній день.

Тому метою нашого дослідження є вивчення комбінованої дії свинцю та цинку в макро- і наоаквахелатній формі на ембріональний розвиток в умовах лабораторного експерименту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для проведення експериментальних досліджень було обрано самиць щурів лінії Wistar віком 2,5-3 міс. з масою тіла 150-170 г. Вибір об'єктом дослідження саме цих лабораторних тварин зумовлений тим, що у щурів та людини однаковий гемохоріальний тип плаценти, а також у них низький рівень спонтанних вад розвитку [2].

В експерименті використано методичні підходи, що відповідають сучасним міжнародним

вимогам щодо проведення токсикологічних експериментів з використанням тварин відповідно до Європейської конвенції [11]. Тварин утримували в оптимальних умовах віварію на стандартному раціоні із вільним доступом до води та їжі відповідно до існуючих вимог [3]. Адаптаційний період становив 12 днів, протягом якого визначали загальний стан самиць, а також циклічність і тривалість естрального циклу. Тварин зі стійким ритмом естрального циклу у віці 3-3,5 міс. з масою тіла 170-200 г у стадії проеструс і еструс парували з інтактними самцями за схемою 2:1. Перший день вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у піхвових мазках [2].

В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю, хлориду цинку та цитрату цинку. Цитрат цинку був отриманий за аквананотехнологією (наноцинк) і наданий Українським державним НДІ нанобіотехнологій та ресурсозбереження (м. Київ).

Самиць щурів з датованим терміном вагітності розподілили на 4 групи, одна з яких – контрольна, 3 – дослідні (по 8-9 самиць у кожній групі). Впливу хімічних чинників самок щурів піддавали з 1-го по 19-й день вагітності. Був змодельований ізольований вплив свинцю та комбінований вплив бінарних систем свинець-цинк, свинець-наноцинк, який віддзеркалив реальне їх співвідношення у системі життєдіяльності населення промислово розвинутої території [1]. Дози металів збільшено у 10 разів порівняно з рівнем їх сумарного добового надходження, що відповідає 0,05 мг/кг маси тіла для ацетату свинцю (близько 1/30000 LD₅₀), який вводили ізольовано (дослідна група № 1), та в комбінації з хлоридом цинку в дозі 1,5 мг/кг маси тіла (дослідна група № 2) та з цитратом цинку в дозі 1,5 мг/кг (дослідна група № 3). Щурам контрольної групи в ці ж строки вводили розчинник, що використовувався при приготуванні агенту впливу, тобто дистильовану воду.

Під час введення препарату реєстрували загальний стан і поведінкові реакції самок, масу та розміри тіла, ректальну температуру, які визначали кожні 3-4 дні. Всього проведено 1152 вимірювання.

На кінцевому етапі дослідження проводили миттєву декапітацію тварин під тіопенталовим наркозом і взяття біологічних матеріалів для виконання подальших досліджень. Виділяли матку з рогами, плоди з плацентами вилучали з матки, перевіряли на тест «живі-загиблі», зважували, вимірювали краніокаудальний розмір та діаметр, визначали стать, фотографували,

розраховували масо-ростовий коефіцієнт плодів і плодово-плацентарний коефіцієнт, показники ембріональної смертності за загальноприйнятими методиками [2].

Статистична обробка та аналіз результатів виконані за загальноприйнятими методиками з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel та Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати оцінки ембріотоксичної дії ацетату свинцю при ізольованому та комбінованому його введенні з препаратами цинку в організм тварин свідчать про порушення перебігу вагітності самиць щурів та повноцінного розвитку потомства.

Так, ректальна температура тіла вагітних самиць щурів, яка є інтегральним показником загального стану організму, в усіх експери-

ментальних групах за середніми значеннями коливалася в межах $37,2 \pm 0,17$ - $38,0 \pm 0,27$ °С, що знаходиться в межах норми [7]. Проте лише у тварин контрольної групи протягом всього терміну вагітності спостерігалось поступове зниження ректальної температури на $0,61$ °С, що фізіологічно детерміновано змінами гормонального фону. Отже, відсутність фізіологічно нормальної динаміки ректальної температури при вагітності самиць щурів під дією низьких доз свинцю може розглядатись як прояв його негативного впливу, який, за цим показником, повністю не нівелюється введенням препаратів цинку. При цьому найвищі показники ректальної температури наприкінці вагітності виявилися у дослідній групі, що отримувала комбінацію ацетату свинцю та хлориду цинку.

Таблиця 1

Показники динаміки ректальної температури тіла вагітних самиць щурів (M ± m)

Група тварин	Ректальна температура, °С			
	початкова	у різні терміни вагітності		
		1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень
Контрольна	37,85±0,25	37,69±0,27	37,33±0,28	37,24±0,16*
Дослідна №1	37,3±0,17	37,3±0,16	37,33±0,19	37,25±0,24
Дослідна №2	37,5±0,28	37,3±0,41	37,36±0,31	38,0±0,27**
Дослідна №3	37,2±0,17	37,35±0,2	37,23±0,16	37,33±0,20

П р и м і т к и : * - динаміка ректальної температури порівняно з початковим значенням достовірна ($p < 0,05$); ** - розбіжності на 3-му тижні вагітності з контрольною та дослідними групами №1 і №3 достовірні ($p < 0,05$).

Приріст маси тіла вагітних самиць (табл. 2), що отримували ацетат свинцю ізольовано, на 20 день вагітності виявився на 17,38 г нижчим порівняно з групою контролю ($p < 0,05$). При корегуючому введенні ацетату цинку на фоні свинцевої інтоксикації динаміка приросту маси тіла вагітних самиць практично відповідала значенням групи інтактних тварин – $131,11 \pm 3,79\%$. У групі, що отримувала як протекторний по відношенню до свинцевої інтоксикації агент - цитрат цинку, динаміка маси тіла, хоча й перевищувала таку в дослідній групі № 1, проте виявилась нижчою порівняно з групою контролю.

Така ситуація, ймовірно, зумовлена зменшенням середньої кількості живих плодів на одну самицю та їх морфометричних параметрів в експериментальних групах. Так, при ізольованому введенні свинцю кількість живих плодів зменшилась у 1,2 разу - $7,5 \pm 0,53$ проти $9,0 \pm 0,4$ у групі контролю (рис. 1) ($p < 0,05$), що зумовлено збільшенням ембріолетальності у 2,16 разу ($p < 0,01$) переважно в доімплантаційний період. Отримані дані пояснюються існуванням механізму регуляції чисельності плодів самкою на фоні впливу дестабілізуючого фактору, який діє протягом всього періоду вагітності, але особливо активно відбувається в початковий період [6].

Приріст маси тіла самиць щурів у різні терміни вагітності, %, $P \pm m$

Група тварин	Термін вагітності, дні			
	0-7	8-14	15-20	0-20
Контрольна	107,3±3,4	107,61±2,9	114,49±2,7	132,2±3,7
Дослідна №1	106,6±3,5	105,66±3,6	109,40±3,5	122,6±3,7*
Дослідна №2	107,7±3,0	110,45±2,7	110,21±2,8	131,1±3,7
Дослідна №3	105,0±2,4	107,77±2,9	112,27±4,25	127,1±4,5

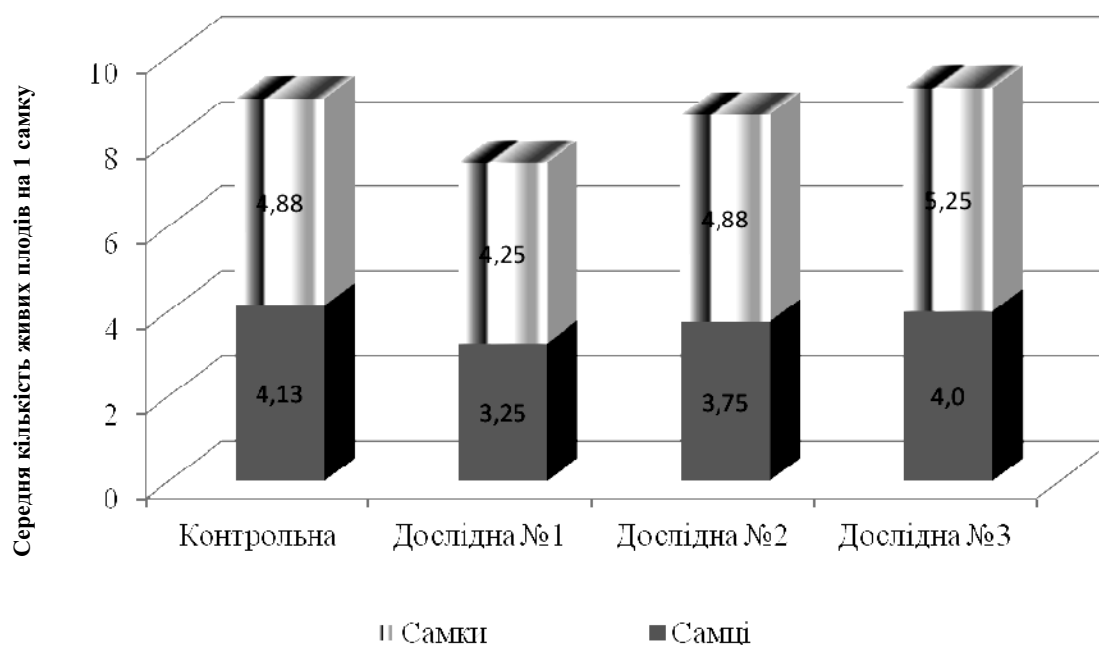
Примітка: * - розбіжності з контрольною групою достовірні ($p < 0,05$)

У групі, що отримувала комбінацію ацетат свинцю – хлорид цинку, спостерігалася тенденція до збільшення кількості живих плодів порівняно з дослідною групою № 1 – $8,75 \pm 0,4$ ($p = 0,06$), що зумовлено достовірним зниженням загальної ембріональної смертності на 37,6% ($p < 0,001$). При цьому вищезазначені показники практично не відрізнялися від контрольної групи.

При комбінованому введенні свинцю та наноцинку виявлено підвищення загальної кількості живих плодів у посліді на 23,3% ($p < 0,05$) за рахунок суттєвого – у 3,2 рази зниження рівня загальної ембріональної смертності ($p < 0,001$) по-

рівняно з групою зі свинцевою інтоксикацією. При цьому спостерігалось покращення вищезазначених показників порівняно з групою контролю, хоча без достовірної різниці.

У контрольній групі тварин розподіл плодів за статтю у посліді знаходився в межах, притаманним білим щурам (самок – $54,17 \pm 3,8\%$, самців – $45,83 \pm 3,58$) [2]. В усіх дослідних групах спостерігалось деяке зниження плодів чоловічої статі порівняно з контролем, найбільш виражене у групі зі свинцевою інтоксикацією (рис.), проте ці відмінності недостовірні.



Вплив препаратів цинку на чисельність посліду за умови свинцевої інтоксикації

Показники маси та розмірів тіла плодів у експериментальній групі № 1 достовірно не відрізнялися від тварин контрольної групи (табл. 3). Проте, при аналізі статевих відмінностей цих показників нами виявлено достовірне зниження краніокаудального розміру самців, що становив $30,11 \pm 0,44$ мм проти $31,6 \pm 0,46$ мм у групі контролю. Статевих відмінностей інших морфометричних показників плодів не виявлено. У дослідній групі, що отримувала ацетат свинцю та хлорид цинку, спостерігалось деяке зниження маси та розмірів плодів, хоча достовірними виявилися лише відмінності краніокаудального

розміру, який на 3,69% нижчий порівняно з групою контролю, що зумовлено достовірним його зниженням серед плодів чоловічої статі ($30,44 \pm 0,29$ мм) ($p < 0,05$). У дослідній групі № 3 спостерігалось зниження показників розвитку плодів порівняно з контрольною групою за середньою масою - на 11,3% ($p < 0,01$) та краніокаудальним розміром - на 3,46% ($p < 0,001$), що зумовлено достовірним зменшенням вищезазначених показників серед плодів чоловічої статі. Вищенаведені дані можуть свідчити про більшу чутливість плодів чоловічої статі по відношенню до впливу низьких доз свинцю під час вагітності.

Таблиця 3

Показники загального розвитку плодів контрольної та дослідної груп (M ± m)

Група тварин	Маса плоду, г	Краніокаудальний розмір, мм	Діаметр плоду, мм	Маса плаценти, г	Розмір плаценти, мм
Контрольна	2,38±0,08	31,21±0,37	10,85±0,27	0,59±0,02	1,51±0,04
Дослідна №1	2,21±0,17	30,17±0,40	10,73±0,30	0,57±0,02	1,44±0,03
Дослідна №2	2,22±0,05	30,06±0,20*	10,11±0,47	0,59±0,02	1,58±0,03**
Дослідна №3	2,11±0,06*	30,13±0,16*	10,17±0,51	0,57±0,01	1,49±0,01

Примітки: * - розбіжності з контрольною групою достовірні ($p < 0,01$), ** - розбіжності з дослідною групою №1 достовірні ($p < 0,001$).

Маса та розміри плаценти у самиць шурів дослідної групи №1 за середніми значеннями нижчі, а плодово-плацентарний коефіцієнт – вищий порівняно з групою контролю, проте без достовірних розбіжностей ($p > 0,05$). Цей факт може свідчити про порушення плацентогенезу за умови впливу свинцю. У дослідних групах, які отримували комбінацію ацетату свинцю та препаратів цинку, спостерігалось збільшення розмірів плаценти порівняно з ізольованим введенням свинцю, що свідчить про певну нормалізацію процесів плацентогенезу для забезпечення кращого живлення плодів за умови свинцевої інтоксикації.

Таким чином, у результаті проведеного експерименту доведено протекторний вплив препаратів цинку на ембріональний розвиток тварин за умови свинцевої інтоксикації, більш виражений для наноцинку порівняно з хлоридом цинку, що проявляється достовірним збільшенням кількості живих плодів та суттєвим зниженням рівня загальної ембріональної смертності, хоча зумовлює дещо нижчі масо-ростові показники плодів.

Всебічний аналіз отриманих даних дозволяє припустити такий механізм впливу цинку в

умовах свинцевої інтоксикації. Під впливом свинцю виникають зміни стану здоров'я вагітних і новонароджених з розвитком синдрому екологічної дезадаптації, при цьому антиоксидантна система материнського організму не здатна повною мірою протистояти впливу негативних факторів, а захисні механізми плода в цей період ще не сформувались. Внаслідок дії препаратів цинку змінюються кінетичні параметри свинцю та інтенсивність його зв'язування з SH-групами ферментів. При цьому наноцинк внаслідок більшої біодоступності порівняно зі звичайним цинком [3] швидше проникає через кишковий бар'єр і зв'язується з активними центрами ферментів, перешкоджаючи формуванню стійких комплексів зі свинцем, проте це припущення потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Сvineць у низькій дозі пригнічує ембріональний розвиток експериментальних тварин, що проявляється у збільшенні ембріональної смертності, погіршенні морфометричних показників плодів, порушенні плацентогенезу.
2. Цинк у макро- та наноформі попереджує негативний вплив свинцю, що проявляється у

зниженні показників ембріолетальності та збільшенні кількості живих плодів при деякому зниженні показників їх загального розвитку, що може розцінюватись як компенсаторна реакція організму вагітної самиці для забезпечення кращої трофіки більшої кількості плодів за умови свинцевої інтоксикації.

3. Співвідношення плодів за статтю як при ізольованому впливі свинцю, так і в разі його комбінації з препаратами цинку суттєво не відрізняється від контрольної групи, хоча спостерігається деяке збільшення осіб жіночої статі у посліді. В той же час морфометричні показники

плодів, особливо краніокаудальний розмір, достовірно знижуються лише для плодів чоловічої статі. Отримані дані, ймовірно, свідчать про нижчу резистентність плодів чоловічої статі до низьких доз свинцю.

4. Протекторна дія цинку в наноаквахелатній формі при свинцевій інтоксикації більш виражена порівняно з хлоридом цинку за показниками ембріолетальності та кількості плодів у посліді. В той же час морфометричні показники плодів дещо вищі при введенні хлориду цинку, що потребує більш глибокого аналізу та є перспективою наших подальших досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белецкая Э.Н. Биопрофилактика экозависимых состояний у населения индустриально развитых территорий / Э.Н. Белецкая, Т.А. Головкова, Н.М. Онул // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2011. – №3 (23). – С. 48-56.

2. Динерман А.А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития / А.А. Динерман. – М.: Медицина, 1980. – 191 с.

3. Лабораторні тварини в медико-біологічних експериментах / В.П. Пішак, В.Г. Висоцька, В.М. Магала [та ін.]. – Чернівці: Мед. ун-т, 2006.- 350 с.

4. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- і мікроелементів / А.М. Сердюк, М.П. Гуліч, В.Г. Каплуненко, М.В. Косінов // Журнал АМН України. – 2010. – Т.16, №1. – С. 107-114.

5. Сердюк А.М. Екологія довкілля та безпека життєдіяльності населення у промислових регіонах України / А.М. Сердюк, В.П.Стусь, В.І.Ляшенко. – Дніпропетровськ: Пороги, 2011. – 486 с.

6. Скальный А.В. Биоэлементы и показатели эмбриональной смертности лабораторных крыс /

А.В. Скальный, С.В. Залавина, С.В. Ефимов // Вестник ОГУ. – 2006. – №2. – С. 78-81.

7. Станишевская Т.И. Характеристика уровня основного обмена у белых крыс за пределами верхней границы нормы циркулирующего трийодтиронина / Т.И. Станишевская, В.И. Соболев // Ученые записки Таврич. нац. ун-та им. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), №1. – С. 105-112.

8. Стусь В.П. Особливості поєднаного впливу радіаційних та хімічних чинників інтенсивного промислового регіону на сечостатеву систему / В.П. Стусь. – Дніпропетровськ: Пороги, 2009. – 352 с.

9. Трахтенберг І.М. Профілактична токсикологія та медична екологія / І.М.Трахтенберг. – К.: Авіцена, 2011. – 120 с.

10. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин / А.М. Сердюк, Э.Н. Белицкая, Н.М. Паранько, Г.Г. Шматков. – Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС, 2004. – 148 с.

11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. – Strasburg, 1986. – 53 p.

REFERENCES

1. Beletskaya EN, Golovkova TA, Onul NM. Bioprofilaktika ekozavisimyykh sostoyaniy u naseleniya industrial'no razvitykh territoriy. Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny. 2011;3(23):48-56.

2. Dinerman AA. Rol' zagryazniteley okruzhayushchey sredy v narushenii embrional'nogo razvitiya.M: Meditsina. 1980;191.

3. Pishak VP, Visots'ka VG, Magalyas VM. Laboratorni tvarini v mediko-biologichnikh eksperimentakh. Chernivtsi: Med un-t. 2006;350.

4. Serdyuk AM, Gulich MP, Kaplunenko VG, Kosinov MV. Nanotekhnologii mikronutrientiv: problemi, perspektivi ta shlyakhi likvidatsii defitsitu makro- i mikroelementiv. Zhurnal AMN Ukraini. 2010;16(1):107-14.

5. Serdyuk AM, Stus' VP, Lyashenko VI. Ekologiya dovkillya ta bezpeka zhittediial'nosti naselennya u promislivikh regionakh Ukraini. Dnipropetrovs'k: Porogi. 2011;486.

6. Skal'nyy AV, Zalavina SV, Efimov SV. Bioelementy i pokazateli embrional'noy smertnosti laboratornikh krysv. Vestnik OGU. 2006;2:78-81.

7. Stanishevskaya TI, Sobolev VI. Kharakteristika urovnya osnovnogo obmena u belakh krysv za predelami verkhniy granitsy normy tsirkuliruyushchego triyodtironina. Uchenye zapiski Tavrich nats un-ta im Vernadskogo. Seriya «Biologiya, khimiya». 2010;23(62)(1):105-12.

8. Stus' VP. Osoblivosti poednanogo vplivu radiatsiynikh ta khimichnikh chinnikov intensivnogo promislivogo regionu na sechostatevu sistemu. – Dnipropetrovs'k: Porogi. 2009;352.

9. Trakhtenberg IM. Profilaktichna toksikologiya ta medichna ekologiya. K: Avitsena. 2011;120.

10. Serdyuk AM, Belitskaya EN, Paran'ko NM, Shmatkov GG. Tyazhelye metally vneshney sredy i ikh vliyanie na reproduktivnuyu funktsiyu zhenshchin. Dnepropetrovsk: ART-PRESS. 2004;148.

11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. 1986;53.