

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертацію **У Сі** “ Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм щурів ”, поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Актуальність теми. Кадмій, поряд зі свинцем і ртуттю є одним з найбільш токсичних металів, які використовуються людиною, причому ступінь його небезпеки вища, ніж у кожного з них.

В останні десятиліття кадмій використовується все в більшій кількості різних галузей промислового виробництва і його внесок у забруднення навколишнього середовища неухильно зростає. Згідно зі статистичними даними, тільки в атмосферу викидається понад 25 000 т кадмію на рік. І частина його потрапляє, в кінцевому підсумку, в воду і ґрунт. Скиди промислових вод, з яких кадмій також потрапляє в ґрунт, збільшують цю кількість більш, ніж удвічі. Сільськогосподарські угіддя забруднюється і кадмієм, який міститься в мінеральних добривах.

А через ґрунт і рослини кадмій легко потрапляє в харчові ланцюги, і основна його кількість надходить в організм людей саме з їжею. У працівників же виробництв, де використовується кадмій, його надходження набагато вище.

Епідеміологічні дослідження останніх років свідчать, що у жителів великих міст і промислових районів з великою щільністю населення концентрація кадмію в організмі, в першу чергу, у нирках, безперервно підвищується. Так, в США і Японії вже у 5% населення вона знаходиться на межі критичного рівня безпеки, встановленого організаціями ВООЗ. Аналогічні процеси відзначені й у районах важкої промисловості в європейських країнах.

Саме ця загрозлива ситуація відповідальна, принаймні, частково, за спостережуване збільшення числа патологій, і в першу чергу, кістково-м'язової і видільної систем та онкологічних захворювань у людей.

Незважаючи на сказане, і, мабуть, у зв'язку з безперервним погіршенням екологічної ситуації, остаточних, абсолютних норм безпечного споживання кадмію ссавцями і людиною досі немає. Наявні міжнародні та державні норми пропонують концентрації, які не викликають видимих патологій протягом певного часу.

Поряд з цим існують і цікаві дані про те, що кадмій є умовно-есенціальним елементом - він токсичний тільки у високих концентраціях, а дуже малі його кількості можуть навіть стимулювати деякі процеси метаболізму.

Однак робіт, в яких досліджувалися би ці складні питання, практично немає.

Приймаючи це до уваги, слід констатувати, що дисертаційна робота У Сі, в якій проведено дослідження впливу концентрацій кадмію, менших за рекомендовані безпечні дози, на рівнях цілісного організму, його органів, клітинному та молекулярному, має важливе теоретичне і практичне значення, а її актуальність не підлягає сумніву.

Структура, обсяг і зміст дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить матеріали і методи, 8 розділів з результатами власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури, в якому налічується 253 посилання. Робота викладена на 156 сторінках друкованого тексту, містить 11 малюнків і 22 таблиці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на базі кафедри біохімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України.

Вступ містить всі необхідні дані щодо загальної характеристики дисертації – її актуальності, мети, задач дослідження, наукової новизни, практичного значення роботи, кількості публікацій та апробацій.

Огляд літератури (розділ 1 - “Загальна характеристика кадмію і його взаємодія з організмами”) здобувач присвятив загальновідомим на сьогодні даним щодо фізико-хімічних властивостей кадмію, його розповсюдженості у ґрунті, морських і прісних водах і атмосфері, та механізмам включення в харчові ланцюги.

Особливу увагу дисертант приділяє шляхам надходження кадмію до людини, його розподілення по органам і накопиченню в них, а також загальним і органним особливостям його впливу на організм. Він приводить дані про вміст кадмію у продуктах харчування, детально розглядає зміни білкового і ліпідного метаболізму у внутрішніх паренхіматозних органах, подає сучасні критерії оцінювання метаболізму органічної і мінеральної частини кісток і показує, що важливою стороною впливу кадмію на структуру білків, нуклеїнових кислот та ліпідів є схожість його властивостей з цинком та міддю.

Ця схожість є й основою розвитку оксидативного стресу, який, в свою чергу, є одною з причин великої кількості захворювань за накопиченням кадмію – хвороби ітаї-ітаї, остеопорозу, діабету II типу, діабетичної нефропатії, серцево-судинної та нервової систем, різних форм раку та т. і.

На закінчення розділу автор подає відомості про стимулюючі ефекти взаємодії кадмію з організмами, розуміння механізмів дії яких на цей час відсутнє.

Об'єкти, матеріал та методи дослідження – 2-й розділ дисертації, в якому надано детальний опис експериментальних тварин, досліджених органів, вилучення та культивування фібробластів і клітин кісткового мозку, що були використані в роботі.

Методи, застосовані у роботі, було обрано з урахуванням мети дисертаційної роботи, завдань, що були поставлені для її виконання, та досвіду попередніх дослідників, які працювали над проблемою вивчення впливу кадмію як на цілісний організм, так і на його окремі органи і клітинні культури.

У роботі було використано широке коло сучасних методів – клітинної біології, фізіологічні, біохімічні та фізико-хімічні - створення моделі кадмієвого впливу на щурах, вимірювання білкового та ліпідного метаболізму, окислювального стресу, стану щитоподібної залози, показників життєздатності фібробластів та клітин кісткового мозку, порушення структури ядерної ДНК.

Таким чином методологічна база дисертаційної роботи була обрана, виходячи з вимог сучасних методичних положень і дозволила дисертанту отримати переконливі і статистично достовірні результати. Всі застосовані методи коректні й не викликають претензій.

Результати досліджень і їх обговорення – 3-й розділ дисертації - можна поділити на 3 частини. Перша – підрозділи 3.1 - 3.3 автор присвятив впливу іонів кадмію у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси/добу на цілісний організм 3-місячних щурів. Ці концентрації менші за дві міжнародні норми, рекомендовані, як безпечні - MRL (minimal risk level) - та PTWI (provisional tolerable weekly intake) які становлять 0,5 мкг/кг/добу і 5,8 мкг/кг/тиждень на протязі року відповідно.

За дією обраних концентрацій кадмію протягом 15 і 36 діб маса тварин спочатку зменшувалася, а після досягнення мінімуму знов почала зростати, хоча й не досягала тих значень, що були у контрольних тварин. Для з'ясування причин цього ефекту автор виміряв вплив цих доз кадмію на вміст загального білка і креатиніну в сироватці крові - показників, що відображають загальну інтенсивність білкового обміну у тварин.

За отриманими результатами виявилось, що динаміка загального білку у сироватці співпадає з динамікою маси, а динаміка креатиніну прямо протилежна їй.

За думкою автора, ці дані свідчать про те, що обидві дози кадмію інтенсифікують процес краш-синдрому - масивного протеолізу м'язових білків, з виходом креатиніну з міобластів. Ця думка підтверджується тим, що при зменшенні загальної маси тіла тварин, маси їх внутрішніх органів, які не містять великої кількості м'язових білків – серця, печінки, нирок, легенів, сім'яників збільшуються протягом усього часу дії кадмію, хоча й повільніше, ніж у контролі.

Дія обох концентрації кадмію змінює і ліпідний обмін, підвищуючи у сироватці концентрації як загального холестерину, так і тригліцеридів, але не змінюючи величину їх відношення.

За дією кадмію концентрація ТТГ у сироватці піддослідних щурів зростає, а T_4 знижується, що свідчить про розвиток у них гіпотиреоїдного стану при збереженні між ними обернено пропорційної залежності.

Цікаво, що концентрація Ca^{2+} не змінюється у сироватці за дією і 0,1 і 1,0 мкг/кг маси/добу, хоча добре відоме, що його вміст збільшується у ній за більшими концентраціями кадмію, оскільки його іони спроможні витіснити іони кальцію, і переважно, з кісток.

Таким чином, обрані в даному експерименті концентрації кадмію виявляють не всі ефекти, які спостерігаються при його більш високих концентраціях

Природним продовженням отриманих результатів є підрозділи 3.4 і 3.5 дисертаційної роботи. В них дисертант дослідив вплив кадмію на функціональні показники фібробластів і клітин кісткового мозку *in vivo* та *in vitro*, а також на структурні параметри ядерної ДНК.

Вимірюючи в культурах фібробластів, що були вилучені з шкіри, легенів, нирків, рогівки щурів, які отримували іони кадмію у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг/добу, продукцію та накопичення колагену і глікозаміногліканів, їхню адгезію, міграційну здатність та апоптоз, він встановив, що у порівнянні з контролем продукція обох структурних біополімерів знижена, ступені адгезії і міграційної здатності зменшені, а рівень апоптозу підвищений.

Рівні адгезії та апоптозу клітин кісткового мозку, вилучені із стегнових кісток тих же експериментальних тварин, аналогічним до фібробластів чином зменшені та підвищені.

В окремому експерименті дисертант вивчив вплив іонів кадмію у концентраціях 0,1 і 1,0 мкМ/л на клітини кісткового мозку у первинній культурі протягом 30 діб інкубації. Крім вже отриманих у попередньому експерименті результатів про зменшення адгезійних і підвищення апоптичних властивостей клітин у присутності кадмію, він виявив ще й їх перерозподіл за розмірами – зменшення кількості великих і збільшення кількості малих клітин.

В цьому ж експерименті автор встановив, що вплив кадмію призводить до підвищення у клітинах кількості мікроядер, фрагментації ядерної ДНК і збільшення її однокільцевої частки.

При цьому важливим є виявлення того, що однакові порушення функціональних властивостей клітин і структури ДНК відбуваються *in vitro* при більших концентраціях кадмію, ніж *in vivo*.

Кожний подальший підрозділ цього розділу має змістовний зв'язок з попереднім.

Заключення – останній розділ дисертації - автор присвятив розгляду отриманих результатів, їх порівнянню з літературними даними і спробі об'єднати їх в рамках єдиного уявлення про токсичні і есенціальні властивості кадмію

Він вказує на те, що існує група одноклітинних організмів – діатомові мікроводорості, які виробляють карбоангідразу - фермент, каталізуючий поглинання неорганічного вуглецю для фотосинтезу. Цей фермент містить в каталітичному центрі іон Cd^{2+} . І тому кадмій не є абсолютним токсикантом для усіх організмів. Важливо, що ці мікроводорості існують у регіонах з дуже низькою концентрацією цинку, і кадмій, будучи міметиком, виконує його функцію.

А отримані автором дані він пояснює тим, що рекомендовані величини безпечного споживання кадмію знаходяться на межі токсичності і есенціальності. Тому вони і можуть не справляти видимої дії протягом тривалого часу на рівні цілісного організму.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій дисертації. В огляді літератури автор зібрав і повно, але стисло виклав сучасні уявлення про кадмій, особливості його взаємодії з організмом ссавців на різних рівнях організації і чітко виділив невирішені проблеми, пов'язані з оцінкою його токсичних властивостей, на основі чого логічно сформулював мету та завдання дисертаційного дослідження.

Вдалий вибір об'єкту, створення моделі, адекватної меті дослідження, планування етапів роботи, сучасні методи експерименту сприяли вирішенню поставлених задач. Отримано великий об'єм інформації, яка дозволила відповісти на деякі питання, що були ще не розкриті.

Висновки відповідають отриманим результатам. Обґрунтованість положень про умовний характер токсичності кадмію та норм безпеки, висунуті автором, не викликають протиріччя.

Достовірність одержаних результатів та їх новизна. Вірогідність одержаних результатів не викликає сумніву, оскільки вони отримані сучасними методами дослідження на адекватних експериментальних моделях, статистично оброблені і піддані логічному аналізу.

Вперше виявлено ефект спочатку зупинки росту тварин, а потім його відновлення під дією концентрацій кадмію, менших, ніж рекомендовані норми безпечних концентрацій.

Вперше показано, що виснаження ферментів антиоксидантного захисту є важливою причиною збільшення в часі швидкості накопичення кадмію в організмі.

Вперше визначено, що адгезійна і міграційна здатності знижуються, а ступінь апоптозу зростає за дією кадмію у фібробластів та клітин кісткового мозку.

Вперше виявлено, що руйнуючий вплив кадмію кадмію на структуру ДНК *in vitro* досягається при значно більших концентраціях іонів кадмію, ніж *in vivo*

Повнота викладу отриманих результатів у публікаціях. Основні результати наведених в дисертації досліджень відображені у 20 наукових працях, серед котрих 6 статей (5 статей у виданнях, які входять до Переліку фахових видань України, і 1 стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus) та 14 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

Зміст роботи і отримані автором результати повністю викладені в цих роботах. Основні положення автореферату відповідають дисертаційній роботі.

Практичне значення отриманих результатів і рекомендації щодо їх використання. Результати про вплив малих концентрацій кадмію на різні рівні тваринного організму збагачують існуючі знання про фізіологічні та біохімічні механізми його дії.

Постульований автором погляд на неоднозначну роль кадмію в біології може знайти підтвердження і подальший розвиток у дослідженнях в областях, перш за все, токсикології, захисту довкілля, а також в ембріології, молекулярній біології, генетиці і т.і. .

Він може бути застосований і при розробці та викладанні нових учбових курсів у ВНЗ біологічного та медичного профілів.

Природно, що принципово ці результати можуть бути використані при розробці нових норм безпеки по відношенню до кадмію.

Помічені недоліки у дисертації та авторефераті щодо їх змісту і оформлення. У роботі, природно, є окремі недоліки. Перш за все, необхідно задати такі питання:

1. Як автор може пояснити ефект спочатку затримання, а потім відновлення росту маси тварин за дією кадмію, при продовженні постійного зростання маси внутрішніх органів в цих умовах ?
2. В чому полягають механізми зв'язку між змінами обміну ліпідів під дією кадмію і розвитком гіпотиреозу у тварин?
3. Як автор може пояснити, що в його експериментах дія кадмію не призводить до підвищення вмісту кальцію у сироватці крові піддослідних тварин ?
4. На мій погляд, рівень експериментального стресу, який виникає за дією кадмію, слід було б оцінювати не тільки за змінами окисно-антиоксидантної рівноваги, а й вимірюючи концентрацію катехоламінів та глюкокортикоїдів в крові. Це дозволило б більш детально дослідити зв'язок між розвитком стресу і виміряними автором змінами метаболізму.
5. На думку автора – апоптоз, який виникає за дією кадмію у фібробластах та клітинах кісткового мозку в умовах його експерименту, визначається одними і тими ж або різними механізмами?
6. В чому полягає механізм зміни розподілу клітин кісткового мозку за розмірами за дією кадмію ? Чи може автор додати щось про зміни функціональних властивостей яких-небудь з цих клітин у цьому процесі ?
7. Чи може автор пояснити, або хоча б припустити, який зв'язок існує між виявленими ним конкретними порушеннями структури ДНК за дією кадмію (фрагментацією, підвищенням відсотку одноланцюгової частки) і деякими виявленими ним змінами властивостей клітин ?
8. У висновках до дисертації автор нічого не говорить про вплив кадмію на продукцію та накопичення колагену і глікозаміногліканів у культурах фібробластів. Чому ?
9. В тексті є граматичні та синтаксичні помилки, а також застарілі терміни, на яких я не зупиняюся.

Але ці, та інші незначні недоліки, що є в тексті дисертації, не мають, однак, принципового значення і не знижують високої наукової і практичної цінності роботи.

Загальний висновок. Вважаю, що кандидатська дисертація У Сі «Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм щурів» за актуальністю проблеми, методичним рівнем дослідження, практичною цінністю, науковою новизною, обґрунтованістю та достовірністю результатів є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам п.п.

9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ № 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.) щодо оформлення результатів та їх аргументованої оцінки, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Доктор біологічних наук,
доктор медичних наук, професор,
професор кафедри біологічної хімії
Харківського національного медичного
університету МОЗ України
12. 12. 2019 р.



В. І. Жуков

Підпис проф. В.І. Жукова засвідчую
Учений секретар
12.12.2019 р.

Відрук одержано 16.12.19
Вчений секретар Лоб.