

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу У Сі “ Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм щурів ”, представлену до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми. Дисертаційна робота У Сі присвячена дуже важливій проблемі – впливу малих концентрацій кадмію на організм ссавців. Кадмій - один з найбільш токсичних хімічних елементів. Він має отруйні властивості як у вигляді металевого пилу або аерозолів, так і в іонній формі в розчинах. Проте кадмій широко використовується буквально в усіх галузях нашого життя – промисловості, сільському господарстві, мистецтві і т. і.

Природно, що першочерговим завданням при використанні кадмію є дотримання норм безпеки. Однак ці норми, які встановлюються різними державними і міжнародними організаціями, дуже сильно розрізняються між собою. Так що мимоволі виникає питання – наскільки ці норми умовні. І чи існують взагалі абсолютно безпечні кількості кадмію ? Такі, щоб протягом усього життя організму не викликали ніяких патологічних змін на будь-якому з рівнів його організації.

Відповідь на це питання можливо дати тільки за ретельного вивчення впливу / не впливу найнижчих концентрацій кадмію на структуру і властивості кожного з рівнів організації тваринного організму.

Але до роботи дисертанта такий комплексний підхід ще не привертав уваги дослідників. Тому дисертація У Сі, в якій проведено експериментальне дослідження цих складних питань, здається необхідною, своєчасною і актуальною.

Структура, обсяг і зміст дисертації. Дисертація побудована за класичним зразком і складається із вступу, огляду літератури, розділів, в яких надаються відомості про матеріал і методи дослідження, результати цих досліджень, їх узагальнення та обговорення, висновків. Список використаної в роботі літератури становить 253 найменувань. Додаються також 2 акти про впровадження отриманих результатів у навчальний процес.

У вступі містяться всі необхідні дані щодо загальної характеристики дисертації – її актуальність, мета, задачі дослідження, наукова новизна і практичне значення роботи.

Огляд літератури містить 2 розділи з 8 підрозділами і дає досить детальне викладення сучасних уявлень про розповсюдженість кадмію, його хімічні властивості, вплив на робітників виробництв, де використовується цей метал та мешканців регіонів, котрі ним збагачені.

Особливо докладно дисертант аналізує літературні дані щодо розподілення кадмію в організмі та особливостям його накопичення у різних органах людини та тварин. Розглядаючи втручання кадмію у метаболізм, він описує відомі дані про зміни структури та обміну білків і вуглеводів, показує, що в основі виникнення оксидативного стресу, викликаного кадмієм, лежать його міметичні по відношенню до міді та заліза властивості. Автор приділяє також увагу впливу кадмію на структуру ДНК, генну експресію і апоптоз клітин, вказуючи, що дія малих та великих концентрацій має протилежний характер.

Закінчуючи огляд, він дає стисле зведення про основні захворювання, викликані кадмієм - серцево-судинні, кістково-м'язові, видільної, нервової, ендокринної систем та онкологічних захворювань.

Розділ “Матеріали і методи” написано стисло, але досить докладно і конкретно. В роботі використані сучасні методи клітинної і молекулярної біології - отримання і культивування фібробластів і клітин кісткового мозку, вилучення ДНК і визначення вмісту її одноланцюгової частки, гормонів щитоподібної залози, білкового та ліпідного обмінів, активності ферментів антиоксидантного захисту, вимірювання вмісту кадмію в органах, цитометрія, проточна цитофлуориметрія, імуноферментний та Комет-аналізи, спектрофотометрія, ультрафіолетова, флуоресцентна та фазово-контрастна інвертована мікроскопія, математичні методи аналізу і обробки результатів експериментів.

Експерименти проведено на 60 лабораторних щурах за правилами щодо проведення медико-біологічних досліджень та норм біомедичної етики відповідно до міжнародних постанов і законів України.

Результати власних досліджень викладені в 5 підрозділах розділу 3. У перших трьох, в експерименті *in vivo*, автор протягом 5 тижнів щоденно вводив 3-місячним щурам породи Вістар розчини кадмію з концентрацією Cd^{2+} 0,1 і 1 мкг/кг/добу. Ці концентрації були обрані тому, що вони у 5 і 8,3 разів менші за MRL та PTWI, які є загальноприйнятими міжнародними безпечними нормами для людини та лабораторних щурів і розглядаються, як

щоденна та тимчасова дози споживання кадмію без ризику виникнення побічних ефектів протягом до року відповідно.

За впливом цих концентрацій у перші 2 тижні ріст тварин зупиняється, їх маса зменшується і тільки починаючи з 3 тижня обидва показники відновлюються. В той же час маси і, відповідно, масові коефіцієнти внутрішніх органів – серця, печінки, нирок, легенів, сім'яників, збільшуються протягом усього експерименту.

Дисертант досить переконливо показує, що така динаміка впливу кадмію на масу тварин є результатом зрушення білкового обміну, а саме, активації руйнування білків м'язової тканини на перших етапах його дії, після чого компенсаторні механізми відновлюють нормальне співвідношення між синтезом і розпадом цих білків. На це вказує, насамперед те, що динаміка вмісту загального білка у сироватці тварин якісно співпадає, а креатиніну - протилежна динамікам як маси тварин, так і вмісту загального білка.

Обидві концентрації кадмію викликають гіпотиреоїдний стан у піддослідних тварин, причому ступінь його розвитку корелює з порушеннями ліпідного обміну - підвищенням концентрації загального холестерину і тригліцеридів у сироватці в 1,5 і 1,3 рази відповідно за дією дози 1 мкг/кг/добу.

Оксидантно-антиоксидантне відношення безперервно зсувається у бік розвитку і зростання ступеню оксидативного стресу як з тривалістю впливу (15 або 36 діб), так і з використанням більшої концентрації кадмію. Це впливає з того, що показники окиснення ліпідів та білків - 8-ізопростан та ступінь карбонілювання білків – збільшуються, а активності супероксиддисмутази і каталази, навпаки, зменшуються з тривалістю і підвищенням концентрації кадмію.

Дисертант пов'язує цей ефект з тим, що швидкість накопичення і кінцева концентрація кадмію змінюється протягом експерименту таким же чином у досліджених ним органах – печінці, нирках, насінниках.

Підсумовуючи результати досліджень, проведених в цих підрозділах, слід констатувати, що використані концентрації (دوزи) кадмію, що менші, ніж рекомендовані як безпечні протягом тривалого часу, все ж впливають на процеси метаболізму, хоча на рівні цілісного організму вони не викликають зовнішньо видимих ефектів вже на 36 добу дії.

У двох останніх підрозділах цього розділу автор дослідив показники життєздатності фібробластів, які вилучив з шкіри, легенів, нирків та рогівки

і клітин кісткового мозку щурів, які *in vivo* отримували розчини кадмію з концентрацією Cd^{2+} 0,1 і 1 мкг/кг/добу, а також *in vitro* - клітин кісткового мозку у первинній культурі за дією концентрацій іонів кадмію 0,1 і 1,0 мкМ/л.

Він визначав ступені адгезії, міграційної здатності та апоптозу фібробластів і адгезії та апоптозу клітин кісткового мозку. Крім того, у останніх вивчався вплив Cd^{2+} на структуру ДНК клітин кісткового мозку

Згідно з отриманими ним даними, ступінь адгезії та кількість мігруючих фібробластів зменшуються, а рівень апоптозу збільшується з підвищенням концентрації і тривалістю дії кадмію. Відзначається й органна специфічність життєздатності - найбільший ступінь апоптозу виявився у фібробластів з нирків.

Вплив кадмію на адгезію та апоптоз клітин кісткового мозку аналогічний його дії на фібробласти. Показано також, що кількість мікроядер, ступінь фрагментації ДНК і її одноланцюгова частина збільшуються з ростом концентрації і часом дії кадмію. Це вказує на руйнування частини ДНК в клітинах кісткового мозку за дією кадмію.

Всі ці результати, зібрані разом, говорять про те, що на молекулярному рівні, навіть при дуже малих концентраціях, кадмій може порушувати структуру молекул, що призводить до зміни функціональних властивостей клітин і, як наслідок - тканин і органів.

Цікавими є результати порівняння впливу кадмію на структуру ДНК *in vivo* і *in vitro*, відповідно до яких кількісно однакові порушення *in vitro* досягаються при значно більших концентраціях кадмію, ніж в організмі.

Це може свідчити про те, що в організмі порушення структури ДНК - кооперативний процес, де кадмій виконує, крім прямої дії, функцію тригера, який включає дію інших руйнуючих чинників.

Заключення присвячено узагальненню всіх отриманих даних, даних наукової літератури, їх узагальнення і запропоновано погляд про те, що токсичність кадмію – це результат еволюційного розвитку багатоклітинних тварин, які обрали для біохімічних процесів метали, що схожі за властивостями з кадмієм.

Обґрунтуванням цього твердження автор вважає існування одноклітинних водоростей, які використовують кадмій у якості есенціального хімічного елемента. Крім того, автор вважає - його результати вказують на те, що прийняті величини безпечного споживання кадмію є умовними. На його думку, вони знаходяться на межі абсолютної токсичності,

тому що на рівні організму можуть не справляти видимої дії.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій дисертації. Як виходить з того, що сказано, огляд літератури написаний кваліфіковано. Направлене відображення й узагальнення автором літературних даних дозволяє добре висвітлити ще не вирішені проблеми, чітко сформулювати мету та задачі дисертаційного дослідження, що й зроблено в анотації до огляду.

Об'єкти і предмет дослідження обрані вдало, планування дослідів, послідовність експериментальних досліджень, методи, що використані, цілком адекватні вирішенню поставлених задач. Зроблені автором висновки логічно впливають з наведених результатів. Все це свідчить про тривку обґрунтованість наукових положень, висунутих дисертантом і дозволяють вважати, що твердження, які він пропонує, є доцільними.

Вірогідність одержаних результатів та їх новизна. Вірогідність одержаних результатів обумовлюється розумно розробленими експериментальними моделями, сучасними методами дослідження, адекватними методами статистичної обробки отриманих результатів, їх логичного аналізу і зважених висновків.

Новизна одержаних результатів полягає, перш за все, у результатах, які продемонстрували оборотність зупинки росту і втрати маси у тварин під дією кадмію за рахунок існування в організмі компенсаторних метаболічних систем.

Автор вперше показав, що швидкість накопичення кадмію в усіх органах протягом експерименту підвищується, що є результатом негативного зворотного зв'язку зі зниженням активностей ферментів першої лінії антиоксидантного захисту.

Він також вперше визначив, що за дією кадмію у двох цілком різних типів клітин – фібробластів та клітин кісткового мозку - адгезійна і міграційна здатності знижуються, а ступінь апоптозу зростає як при підвищенні концентрації, так і при зростанні часу введення кадмію тваринам.

Суттєву новизну являє також виявлене автором явище про те, що дні і ті ж кількісні значення показників впливу кадмію на структуру ДНК *in vitro* досягаються при значно більших концентраціях Cd^{2+} , ніж *in vivo*.

Повнота викладу отриманих результатів у публікаціях. Результати наведених в дисертації досліджень повністю 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

Практичне значення отриманих результатів і рекомендації щодо їх використання. Отримані в дисертації експериментальні дані насамперед доповнюють уявлення про характер і молекулярно-біохімічні механізми хронічного впливу малих доз кадмію на організм ссавців.

Цей не аби-який результат має істотно загальнобіологічне значення, не кажучи вже про його важливість для багатьох окремих розділів біології, а саме: біології індивідуального розвитку, токсикології і т.і.

В той же час результати роботи, як методичні розробки, так й ідеологія, можуть знайти застосування в багатьох курсах, що викладаються в аудиторіях студентам-біологам і медикам. Це й підтверджується актами впровадження, що додони до дисертації.

Крім того, ці результати можуть бути корисними при розробці нових критеріїв токсичності кадмію у клінічній практиці при перенесенні їх на людину.

Зауваження.

1. Перше за все, як можна зіставити відновлення зростання тварин після його зупинки і безперервну зміну властивостей клітин і ДНК в сторону їх порушення під дією кадмію? Які саме механізми має на увазі автор, кажучи про "компенсаційні механізми"?

2. Чому автор використовує лише міжнародні норми безпеки отримання кадмію? Як його результати відносяться до норм українського законодавства?

3. Не проведено кореляційний аналіз між швидкістю накопичення кадмію в органах і змінами показників оксидативного стресу, хоча автор каже про зворотний негативний зв'язок між цими показниками. Це зменшує доказовість запропонованих висновків.

4. На мій погляд, результати розподілу клітин кісткового мозку на субпопуляції за дією кадмію занадто розтягнуті і мають описовий характер. Ці результати безсумнівно виграли б при зіставленні кожної "субпопуляції" з конкретними клітинами кісткового мозку за показниками виявлених морфологічних особливостей.

5. В розділі, присвяченому вивченню оксидантно-антиоксидантному статусу в організмі поряд з даними щодо вмісту глутатіону слід було б

дослідити активність глутатіонметаболізуючих ферментів, а крім того вміст ТБК-активних сполук.

6. В "Узагальненні" з нашої точки зору недоречно обговорювати можливі механізми виникнення життя на землі, оскільки дисертація не присвячена цьому питанню.

7. В методичному розділі слід було б замінити оберти за хвилини на "g".

8. Природно, що в тексті дисертації є і помилки, і невдалі вирази, на яких я не зупиняюсь, хоча, слід зазначити, що порівняно з середньою кількістю в більшості дисертаційних робіт, їх відносно небагато

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

Загальний висновок На підставі вищезазначеного вважаю, що кандидатська дисертація У Сі «Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм щурів.» за актуальністю проблеми, методичними підходами, практичною цінністю та науковою новизною отриманих даних 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.

Зав. кафедри біохімії Одеського
національного університету
імені І. І. Мечнікова,
доктор біологічних наук, професор



С. А. Петров

Підпис С. А. Петрова
засвідчую

Вчений секретар Одеського національного
університету ім. І.І.Мечникова, доцент



С. В. Курандо

12. 12. 2019 року

Відукт овертано 17.12.19
Вчений секретар *Доб.*