

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

У СІ

УДК 615.916:577.121.9.12.24

**«БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ДОВГОСТРОКОВОГО ВПЛИВУ
МАЛИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КАДМІЮ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ»**

Спеціальність 03.00.04 – «Біохімія»

(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ У СІ

Науковий керівник: Перський Євген Ефроїмович, доктор біологічних наук,
професор

Харків - 2019

АНОТАЦІЯ

У СІ. Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія (Біологічні науки) - Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2019.

У дисертації в експериментах *in vivo* проведено дослідження тривалого впливу малих концентрацій кадмію на 3-місячних щурів породи Вістар на рівнях організму, ряду його органів і клітинному.

Вперше показано, що Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1 мкг/кг/добу, що у 5,0 і у 8,3 разів менші за MRL та PTWI відповідно, при щоденному надходженні в організм щурів протягом 5 тижнів, у перші 3 тижні зупиняє зростання тварин, яке поновлюється після 3 тижня експерименту.

На відміну від загальної маси тіла, маси всіх досліджених органів – серця, печінки, нирків, насинників зростають на всьому протязі експерименту при обох дозах кадмію. Природно, що в наслідок цього масові коефіцієнти органів за дією кадмію також збільшуються. Але кадмій все ж впливає і на зріст органів. Збільшення як їх маси за його дією, так і, відповідно, масових коефіцієнтів, відбувається суттєво повільніше, ніж у контролі.

Виявлений ефект пригнічення загального росту тварин і затримки росту паренхіматозних органів є, очевидно, інтегральним наслідком втручання кадмію в метаболічні процеси у різних системах органів. Для визначення метаболічних порушень, які виникають за цим втручанням, у крові щурів були вивчені особливості біохімічних показників, що характеризують різноманітні складові загального метаболізму.

Результати вимірювання впливу обох використаних доз Cd^{2+} на показники білкового обміну щурів у сироватці крові довели, що вміст загального білка у сироватці знижується до 15-ї доби експерименту, а далі, до 36-ї доби він декілька підвищується і, таким чином, динаміка вмісту загального білка у сироватці тварин

якісно співпадає з динамікою їхньої маси. Це може статися або при зниженні його загального синтезу, або при інтенсифікації розпаду.

Протягом експерименту динаміка у сироватці креатиніну повністю протилежна динамікам як маси тварин, так і вмісту загального білка в їх сироватці. Маємо дві можливі причини цього ефекту – це ниркова недостатність і масивне руйнування м'язової тканини, що супроводжується виходом креатиніну з клітин (краш синдром).

Таким чином, принаймні однією з причин зменшення маси тварин на перших етапах дії кадмію може бути стимуляція ним процесів деградації білків м'язової тканини на фоні незмінності, або, навіть, і зниження інтенсивності їх загального синтезу.

Вміст сечовини, яка є кінцевим продуктом розпаду білків, не змінюється вірогідно в сироватці протягом всього експерименту. Поряд з підвищеним рівнем креатиніну це може бути ще одним підтвердженням порушення роботи нирок, а саме – клубочкової фільтрації в них. При цьому зміни вмісту у загальному білку найбільшої його фракції – альбуміну свідчать, що кадмій індукує зміну фракційного складу сироваткових білків.

Ці зрушення показників білкового обміну вказують на перші стадії порушень функцій нирок, а, крім того, ще й печінки.

За результатами вимірювань концентрації загального холестерину і тригліцеридів у сироватках досліджених тварин виявлено, що тільки доза 1 мкг Cd^{2+} /кг маси, яку тварини отримували протягом 36 діб, привела до збільшення вмісту загального холестерину і тригліцеридів у сироватці в 1,5 і 1,3 рази відповідно.

Ці порушення ліпідного обміну у тварин, які є одними з найважливіших чинників ризику атеросклерозу і захворювань коронарних артерій та хронічних хвороб нирок, підсилюють ризик розвитку ниркових патологій.

Оскільки функціонування нирок тісно пов'язано з метаболізмом тиреоїдних гормонів, було проведено й дослідження впливу кадмію на вміст ТТГ і T_4 у сироватці експериментальних тварин.

Доза 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла на 15-у добу не впливає на вміст тиреотропного гормону у сироватці тварин, підвищуючи його вміст на 36-у добу вдвічі. В той же час доза 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла збільшує концентрацію цього гормону і на 15-удобу – на 82 %, і після цього, за час до 36-ї доби – ще на 38 %.

У порівнянні до контролю, дози 0,1 і 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин протягом 15-ти діб призводять до зниження концентрації T_4 у сироватці на 22 % і 39 % відповідно. Тенденція подальшого зниження вмісту T_4 зберігається до 36-ї доби.

Таким чином, від впливом кадмію у піддослідних тварин виникає гіпотиреодний стан, при якому, зменшується кровотік і швидкість клубочкової фільтрації у нирках. Але при цьому, навіть при зсуві абсолютних значень концентрації ТТГ і вільного T_4 , між вмістом цих гормонів у крові зберігається стандартна обернено пропорційна залежність.

Вимірювання концентрації Cd^{2+} , який накопився в досліджених органах виявило наступне.

По-перше, у найбільшій концентрації кадмій за дією обох доз увесь час експерименту знаходиться у нирках. По-друге, існує чітка дозова залежність вмісту кадмію в органах – його концентрація в них вища за дозою 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. По-третє, виявляється дуже важливий ефект – підвищення в усіх органах протягом експерименту швидкості накопичення кадмію.

Вимірювання показників оксидативного стресу показало, що тільки доза 1 мкг Cd^{2+} /кг маси підвищує вміст 8-ізопростану у сироватці на 15-у добу в півтори рази, а на 36-у – майже втричі.

Зростання ступеня карбонілювання білків у сироватці на 36-у добу за дозою 0,1 мкг /кг маси становить 42 %, а за дозою 1 мкг /кг маси – 58 %.

Узяті сумісно, ці результати свідчать, що при регулярному надходженні обох доз кадмію до організму щурів, оксидантно-антиоксидантне відношення безперервно зсувається у бік розвитку і зростання ступеню оксидативного стресу.

Вимірювання активностей супероксиддисмутази і каталази показало, що активність СОД за дією 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин зовсім не збільшилася на

15 добу, а за дією 1,0 мкг Cd^{2+} /кг незначно підвищилась. На 36-у ж добу за дією цих доз активність цього ферменту підвищилась лише на 10% і 20%.

Активність КАТ за дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси збільшується на 15-у добу на 60 %, а до 36-ї доби приріст активності падає удвічі. 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси не змінює активність КАТ на 15-у добу, а на 36-у зменшує її на 16 % у порівнянні з контролем.

Це свідчить, що важливою причиною наростаючого розвитку оксидативного стресу у тварин при постійній дії іонів кадмію є недостатня активність СОД і КАТ, особливо за дозою 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла.

Це і є однією з причин підвищення швидкості накопичення кадмію в органах протягом експерименту.

Вплив кадмію на клітинному рівні було досліджено на фібробластах різних органів і клітинах кісткового мозку за показниками їх функціональних властивостей.

Так, дія кадмію на перший показник – адгезію фібробластів у порівнянні з контролем призводить, по-перше, до зменшення ступеня їх адгезії як при підвищенні дозової концентрації, так і при зростанні часу введення кадмію тваринам. По-друге, ступінь адгезії у клітин, виділених з різних органів, також відрізняється і за дією дози 1 мкг Cd^{2+} /кг маси становить ряд: рогівка > шкіра > легені > нирки.

Дослідження другого показника – міграційної здатності фібробластів показало зменшення кількості мігруючих клітин із тривалістю введення тваринам кадмію та зростанням його дози. Найбільш виражену дію кадмію надає дозою 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. При цьому величини зменшення кількості мігруючих фібробластів, мають ту ж послідовність, що й у зменшенні ступеня адгезії: рогівка > шкіра > легені > нирки.

Збіг послідовності органів за зменшенням ступенів адгезії та міграції фібробластів при дії кадмію з великим ступенем ймовірності свідчить про тісний молекулярний зв'язок цих двох процесів.

Третій показник – апоптоз – теж збільшується із зростанням дози і часу впливу на організм тварин. При цьому ступінь апоптозу при постійних умовах має чітку органну специфічність. Найбільш апоптично чутливими до дії обох доз кадмію виявились фібробласти нирків, а найменш чутливими - фібробласти шкіри.

Клітини кісткового мозку досліджували *in vitro*, культивуючи їх протягом 30 діб в присутності Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкМ/л.

Вплив Cd^{2+} на ці клітини виявився якісно подібним його впливу на фібробласти. Рівень адгезії знижувався, а апоптозу - підвищувався при збільшенні як концентрації, так і часу культивування клітин кісткового мозку.

Дослідження ще двох важливих показників руйнуючої дії кадмію на клітини – кількості в них мікроядер, що відображає рівень фрагментації ДНК, та одноланцюгової ДНК виявило, що обидва ці показники значно підвищуються за дією концентрацій як 0,1 так і 1,0 мкМ/л Cd^{2+} у культуральному розчині.

Порівняння питомих концентрацій Cd^{2+} на клітину в експериментах *in vivo* та *in vitro* довело, що вплив кадмію на порушення структури ДНК у першому випадку суттєво ефективніший.

Така різниця впливу кадмію на руйнування ДНК полягає, очевидно, в наступному. На відміну від простого модельного середовища *in vitro*, *in vivo*, крім прямої дії Cd^{2+} , клітини піддаються і впливу амортизаційних чинників, які є наслідком його загальної цитотоксичності, зокрема, індукування продуктів оксидативного стресу.

Ключові слова: кадмій, білковий та ліпідний обмін, оксидативний стрес, ТТГ, T_4 , фібробласти, клітини кісткового мозку, адгезія і міграція клітин, апоптоз, мікроядра, одноланцюгова ДНК.

ABSTRACT

WU SI. Biochemical mechanisms of long-term effects of the cadmium low concentrations on the rats' organism. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Speciality 03.00.04 – Biochemistry. – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

In the thesis, *in vivo* experiments conducted a study of the long-term effects of low concentrations of cadmium on 3-month-old Wistar rats at the levels of the organism, a number of its organs and the cells.

It has been shown for the first time that Cd^{2+} at concentrations of 0.1 and 1 $\mu\text{g/kg/day}$, which is 5 and 8.3 times smaller than MRL and PTWI, respectively, with daily ingestion in rats for 5 weeks, in the first 3 weeks, stops growth animals Their growth resumes after 3 weeks of experiment.

Unlike the total weight of the body, the masses of all investigated organs - the heart, liver, kidneys, testes grow throughout the experiment with both doses of cadmium. Naturally, as a result, the massive coefficients of organs under the action of cadmium also increase. But cadmium still affects the growth of organs. The increase in both their mass by its action and, accordingly, the mass coefficients, is significantly slower than in the control.

The revealed effect of suppressing the overall growth of animals and the growth retardation of parenchymal organs is obviously an integral consequence of cadmium in metabolic processes in different organ systems. To determine the metabolic disturbances that arise from this intervention, in the blood of rats, features of biochemical parameters characterizing the various components of the general metabolism were studied.

The results of the measurements of the effect of both administered doses of Cd^{2+} on the parameters of protein exchange of rats in serum have shown that the total protein in serum is reduced to the 15th day of the experiment, and then, until the 36th day, it increases slightly and, thus, the dynamics of the total content protein in serum animals qualitatively coincides with the dynamics of their mass. This can occur either by reducing its overall synthesis, or with the intensification of decay.

During the experiment, the dynamics of serum creatinine is completely opposite to the dynamics of both the mass of animals and the content of total protein in their serum.

There are two possible reasons for this effect: renal insufficiency and massive destruction of muscle tissue, which is accompanied by the release of creatinine from cells (crash syndrome).

Thus, at least one of the reasons for reducing the mass of animals in the first stages of cadmium action can be stimulation of processes of degradation of muscle tissue proteins against the background of unchanging, or even, lowering the intensity of their overall synthesis.

The content of urea, which is the final product of the decomposition of proteins, does not change significantly in serum throughout the experiment. Along with the increased level of creatinine, this may be another confirmation of the disruption of the kidneys, namely - glomerular filtration in them. At the same time, changes in the content in the total protein of its largest fraction, albumin, indicate that cadmium induces a change in the fractional composition of serum proteins.

These changes in protein metabolism rates indicate the first stages of kidney function disorders, and, moreover, liver.

According to the results of measurements of the concentration of total cholesterol and triglycerides in the serum of the examined animals, it was found that only a dose of $1 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{kg}$ of the mass which animals received for 36 days, resulted in an increase in the content of total cholesterol and triglycerides in serum in 1.5 and 1.3 times, respectively.

The increase of these indicators of lipid metabolism – and in patients increased and mortality from cardiovascular diseases. And this is not to mention the direct risk of developing atherosclerosis and coronary artery disease.

These disorders of lipid metabolism in animals, which are one of the most important risk factors for atherosclerosis and coronary artery disease and chronic kidney disease, increase the risk of developing renal pathologies.

Since the functioning of the kidneys is closely related to the metabolism of thyroid hormones, a study of the effects of cadmium on the content of TSH and T_4 in the serum of experimental animals was conducted.

The dose of $0.1 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{kg}$ of body weight at day 15 does not affect the thyroid stimulating hormone in the serum of animals, doubling its content by 36 days. At the same time, a dose of $1 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{kg}$ of body weight increases the concentration of this hormone, and by the 15th day – by 82 %, and then, by the 36th day, by another 38 %.

Compared to control, doses of 0.1 and $1 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{kg}$ of body weight of animals during the 15 days lead to a decrease in T_4 serum concentrations by 22 % and 39 % respectively. The trend for further reduction of T_4 content persists until the 36th day.

Thus, from the influence of cadmium in experimental animals there is a hypothyroid state, in which the blood flow and velocity of glomerular filtration in the kidneys decreases. But even with a shift in the absolute values of the concentration of TSH and free T_4 , the content of these hormones in the blood retains the standard inverse proportional dependence.

Measurement of the concentration of Cd^{2+} accumulated in the investigated organs revealed the following.

First, in the highest concentration of cadmium on the action of both doses, the entire time of the experiment is in the kidneys. Secondly, there is a clear dose-dependent dependence of cadmium in organs – its concentration in them is higher than the dose of $1.0 \mu\text{g/kg}$ of body weight. Thirdly, a very important effect is manifested – an increase in the rate of accumulation of cadmium in all organs during an experiment.

Measurement of oxidative stress indicators showed that only a dose of $1 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{kg}$ of weight increased the content of 8-isoprostane in serum for 15 days and a half times, and at 36-th – almost tripled.

The increase in the degree of carbonylation of proteins in serum at 36 days at a dose of $0.1 \mu\text{g/kg}$ of weight is 42 %, and at a dose of $1 \mu\text{g/kg}$ of weight – 58 %.

Taken together, these results indicate that with the regular intake of both doses of cadmium in the body of rats, the oxidation-antioxidant ratio is continuously shifted towards the development and growth of oxidative stress.

Measurement of the activity of superoxidedismutase under conditions showed that SOD activity at the action of $0.1 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{kg}$ of body weight of animals did not increase

by 15 days, and by action of 1 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ / kg slightly increased. On the 36th day after the action of these doses, the activity of this farm increased only by 10 % and 20 %.

CAT activity at a dose of 0.1 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ / kg of weight increases by 15 days by 60%, and by the 36th day the activity increase drops twice. 1 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ / kg of the mass does not change CAT activity for the 15th day, and at the 36th it reduces it by 16 % compared to the control.

This suggests that an important cause of the increasing development of oxidative stress in animals with a constant effect of cadmium ions is the lack of activity of SOD and CAT, especially in the dose of 1 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ / kg body weight.

The influence of cadmium on the cellular level was investigated on fibroblasts of various organs and bone marrow cells in terms of their functional properties.

Thus, the action of cadmium on the first indicator – the adhesion of fibroblasts compared with control leads, firstly, to a decrease in the degree of their adhesion both in increasing the dose concentration, and with the increase in the time of introduction of cadmium to animals. Secondly, the degree of adhesion in cells isolated from different organs is also different and the action dose of 1 micrograms of Cd^{2+} / kg of mass is a series: cornea > skin > lungs > kidneys.

Study of the second indicator – the migration ability of fibroblasts showed a decrease in the number of migrating cells with the duration of introduction of cadmium in animals and an increase in its dose. The most pronounced action of cadmium is given at a dose of 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ / kg body weight. At the same time, the decrease in the number of migrating fibroblasts has the same effect as decreasing the degree of adhesion: cornea > skin > lungs > kidneys.

The coincidence of the sequence of organs by decreasing the degrees of adhesion and migration of fibroblasts by the action of cadmium with a high degree of probability indicates a close molecular relationship between these two processes.

The third indicator - apoptosis - also increases with increasing dose and time of exposure to the body of animals. In this case, the degree of apoptosis under constant conditions has distinct organ specificity. The most apoptotic responsive to both doses of cadmium were kidney fibroblasts, and the least sensitive were fibroblasts of the skin.

Bone marrow cells were investigated *in vitro*, cultivating them for 30 days in the presence of Cd^{2+} at concentrations of 0.1 and 1.0 $\mu\text{M/l}$.

The influence of Cd^{2+} on these cells was qualitatively similar to its effect on fibroblasts. The level of adhesion decreased, and apoptosis – increased with increasing both concentration and time of cultivation of bone marrow cells.

Investigation of two other important indicators of cadmium's destructive action on cells – the number of micronuclei and single-stranded DNA in them revealed that both of them are significantly increased by the action of concentrations of 0.1 and 1.0 $\mu\text{M/l}$ of Cd^{2+} in culture solution.

Comparison of the specific concentrations of Cd^{2+} on the cell *in vitro* and *in vivo* experiments has shown that the effect of cadmium on the disturbance of the DNA structure in the first case is significantly more effective.

Such a difference in the influence of cadmium on the destruction of DNA is, obviously, in the following. In contrast to the simple model environment *in vitro*, *in vivo*, in addition to the direct action of Cd^{2+} , the cells are exposed to the effects of amortization factors, which are the result of its overall cytotoxicity, in particular, oxidative stress products.

Keywords: Cadmium, protein and lipid metabolism, oxidative stress, TSH, T_4 , fibroblasts, bone marrow cells, adhesion and cell migration, apoptosis, micronucleis, single-stranded DNA.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у наукових фахових виданнях України:

1. **У Си**, Пырина И. С., Кот Ю. Г., Кот Е. В., Перский Е.Э. Особенности цитотоксичности длительного введения ультрамалых доз ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы крыс // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2015. Вип. 25. С. 332–340. *(Дисертант провів експеримент, здійснив аналіз літератури та отриманих результатів).*

2. **У Сі**, Плотников А., Кот К., Кот Ю., Перський Є. Дослідження ступеня ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при довготривалому вживанні ними малих доз кадмію // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Вип. 73. С. 109–113. *(Дисертант визначив ступінь пошкодження ДНК, спільно із співавторами підготував матеріали до друку).*

3. **У Си**, Корниенко Е. М., Плотников А. Д., Пырина И. С., Кот Е. В., Кот Ю. Г., Перский Е. Э. Влияние длительного воздействия *in vivo* низких доз Co^{2+} на гемолиз эритроцитов // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2016. Вип. 27. С. 163–166. *(Дисертант спланував експеримент, опрацював дані літератури, узагальнив результати експерименту, підготував статтю до друку).*

4. **У Сі**, Кот Ю., Кот К., Морс Р., Доран О., Амжад Х., Перський Є. Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd^{2+} // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2017. Вип. 29. С. 182–187. *(Дисертант визначив показники оксидативного стресу, провів узагальнення результатів, прийняв участь в оформленні і підготовці статті до друку).*

5. **У Си**, Харченко Т., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс *in vitro* // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія

«Біологія». 2018. Вип. 30. С. 68–76. *(Дисертант прийняв участь у плануванні експерименту, виміряв рівень токсичності Cd^{2+} , підготував статтю до друку).*

Наукові праці у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз:

6. Kovalchuk Y. P., Prischepa I. V., **U Si**, Nedzvetsky V. S., Kot Y. G., Persky E. E., Ushakova G. A. Distribution of glial fibrillary acidic protein in different parts of rat brain under cadmium exposure // The Ukrainian Biochemical Journal. 2015. Vol. 87, N 3. P. 117–123. (Scopus). *(Дисертант проаналізував літературу, спільно із співавторами підготував матеріали до друку).*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

7. Gritcenko M., **U Si**, Olijnichenko Y. Dependence of the dynamics collagen and glycosaminoglycans in fibroblast culture on the number of their divisions // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали IX Міжнародної конференції молодих науковців, 18–20 листопада 2014 р., Харків, 2014. С. 21. *(Дисертант виділив та культивував фібробласти, прийняв участь в оформленні тез до друку).*

8. Фоменко О. З., Шаульська О. Е., **У Сі**, Шевцова А. І., Ушакова Г. О. Вплив кадмію на активність протеолітичних ензимів у мозку та серці щурів // The Ukrainian Biochemical Journal, Vol. 86, N 5 (Suppl. 2): матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 2014 р., Київ, Р. 144. *(Дисертант виміряв активність ферментів в гомогенатах органів).*

9. **Wu Si**, Saposhnikova V., Kot Yu., Kot K., Barannik T., Persky E. Influence of hemin on exposition of CD29, CD90 and parameters of secretory activity of rat lung fibroblasts in vitro // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: матеріали III Міжнародної наукової конференції, 24–25 вересня 2015 р., Дніпропетровськ, 2015. С. 104. *(Дисертант виділив фібробласти з легенів, визначив концентрації CD29 і CD90, прийняв участь в оформленні тез до друку).*

10. **Wu Si**, Sapozhnikova V., Pyrina I., Kot K., Kot Yu. The features of cytotoxicity of cadmium ions ultra-low doses prolonged administration on rats skin, lungs, kidneys and cornea fibroblasts // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали X Міжнародної конференції молодих науковців, 2–4 грудня, 2015 р., Харків, 2015. С. 23–24. *(Дисертант виділив фібробласти із органів, прийняв участь у дослідженні та оцінці рівня цитотоксичності кадмію).*

11. Gritsenko M., Kot Yu., Kot K., **Wu Si**. Growth dynamics of primary fibroblast culture from rats of different ages // Proceedings of International Conference of Young Scientists, 21–25 Sept. 2015., Київ, 2015. С. 165. *(Дисертант виділив фібробласти із шкіри та легенів, провів їх культивування, прийняв участь в узагальненні отриманих результатів).*

12. Фоменко О. З., Шаульська О. Е., **У Сі**. Вплив кадмію на активність желатинази у плазмі щурів // Весняні біохімічні читання, присвячені пам'яті професора В.О.Березіна: матеріали семінару, 17 березня 2016 р., Дніпропетровськ, 2016. С. 58–59. *(Дисертант виміряв активність желатинази, прийняв участь в оформленні тез до друку).*

13. Костіна Т., Пономаренко О., Пиріна І., **У Сі**. Вплив довгострокового вживання низьких доз солей кобальту і кадмію на зміну рівня вмісту колагену в сполучних тканинах щурів // Молодь і поступ біології: матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, 19–21 квітня 2016 р. Львів, 2016. С. 41–42. *(Дисертант підготував зразки шкіри для дослідження, виміряв в них концентрацію колагену, прийняв участь в обговоренні результатів).*

14. Plotnykov A., Kharchenko T., **Wu Si**. Continuous effects of low concentrations of Cd^{2+} on DNA damage in bone marrow cells *in vitro* // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали XII Міжнародної конференції молодих науковців, 29 листопада – 1 грудня 2017 р., Харків, 2017. С. 18–19. *(Дисертант виділив клітини кісткового мозку, визначив ступінь пошкодження ДНК, спільно із співавторами підготував тези до друку).*

15. **У Си**, Харченко Т., Плотников А., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности и степени повреждения ДНК клеток костного мозга крыс при

продолжительном культивировании их в среде, содержащей малые дозы ионов кадмия // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: матеріали IV Міжнародної наукової конференції, 5–6 жовтня 2017 р., Дніпро, 2017. С. 45–46. *(Дисертант культивував клітини кісткового мозку, визначив їх життєздатність, прийняв участь у підготовці тез до друку).*

16. **У Сі**, Кот Ю., Кот К. Вплив тривалої дії малих концентрацій кадмію на показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки: матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених / Bioscience advances, 24–27 квітня 2018 р., Київ, 2018. С. 150–151. *(Дисертант виміряв показники білкового і ліпідного обміну в сироватці крові, прийняв участь у підготовці тез до друку).*

17. Kharchenko T., Plotnykov A., **Wu Si**, Kot K. The cytotoxicity of cadmium ions small doses in long-term culture of bone marrow cells // The Ukrainian Biochemical Journal, 2018. Vol. 90, N 3.: Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018. P. 117. *(Дисертант культивував клітини кісткового мозку, визначив кількість мікроядер в клітинних ядрах, прийняв участь в обговоренні результатів і підготовці тез до друку).*

18. **Wu Si**, Polonska A., Filonenko S., Lukan R., Yehemberdinov Ye., Nemyrovska Yu., Pyrina I. Accumulation of cadmium ions and their cytotoxicity effects in skin, lungs, kidneys, liver and bone marrow under low concentrations prolonged administration on rats // Біологія: від молекули до біосфери»: матеріали XIII Міжнародної конференції молодих науковців, 28–30 листопада 2018 р., Харків, 2018. С. 13. *(Дисертант виділив фібробласти і клітини кісткового мозку з органів, визначив в їх культурах показники цитотоксичності, прийняв участь у підготовці тез до друку).*

19. У Си, Харченко Т., Егембердинов Е., Кот Ю., Кот Е., Перский Е. Торможение остеогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток при употреблении питьевой воды, содержащей малые концентрации кадмия – одна из возможных причин развития остеопороза // Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії: матеріали Міжнародної науково-

практичної конференції, 11–12 квітня 2019 р., Харків, 2019. С. 75. (*Дисертант культивував клітини, прийняв участь в обговоренні результатів і підготовці тез до друку*).

20. Kot Yu., **Wu Si**, Persky Ye., Kot K., Kharchenko T., Lukan R. The effect of low concentration of cadmium on osteogenic differentiation of rats mesenchymal stromal cells *in vitro* // Proceedings of the 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, 18–21 June, 2019. Yaremche, 2019. P. 52. (*Дисертант культивував клітини, прийняв участь в обговоренні і оформленні результатів*).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика кадмію і його взаємодія з організмами (літературний огляд)	26
1.1 Фізико-хімічні властивості і вплив кадмію на організми.....	26
1.1.1 Характеристика і розповсюдженість кадмію.....	26
1.1.2 Використання кадмію	29
1.1.3 Джерела, шляхи надходження і розподілення кадмію по органам людини та тварин.....	31
1.1.4 Біологічні функції і токсичність кадмію	34
1.2. Біохімічні механізми дії кадмію на організм.....	36
1.2.1 Механізми впливу кадмію на структуру та метаболізм білків і вуглеводів.....	36
1.2.2 Механізми оксидативного стресу, викликаного кадмієм.....	38
1.2.3 Кадмій, ДНК, генна експресія і апоптоз.....	39
1.2.4 Основні захворювання, викликані кадмієм	42
Висновки до розділу 1	50
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	51
2.1 Експериментальні тварини і планування експерименту	51
2.1.1 Експериментальні тварини і досліджені органи.....	51
2.1.2 Введення тваринам Cd^{2+} , відбір біологічного матеріалу і культивування клітин з Cd^{2+}	52
2.1.3 Визначення концентрації Cd^{2+} в органах.....	54
2.2 Дослідження показників обміну у сироватці	55
2.2.1 Визначення показників білкового і ліпідного обміну та Ca^{2+}	55
2.2.2 Визначення гормонів щитоподібної залози.....	55
2.3 Дослідження показників оксидативного стресу у сироватці.....	56
2.3.1. Визначення вмісту 8-ізопростану.....	56

2.3.2	Визначення ступеня карбонілювання білків.....	57
2.3 3	Визначення активності супероксиддисмутази і каталази	58
2.4.	Вилучення з органів клітин і дослідження їх властивостей.....	59
2.4.1	Вилучення з органів і культивування фібробластів	59
2.4.2	Вилучення і культивування клітин кісткового мозку.....	60
2.4.3	Визначення адгезійної і міграційної здатності та апоптозу фібробластів.....	61
2.4.4	Визначення вмісту колагену і глікозаміногліканів в культурах фібробластів.....	63
2.4.5	Визначення адгезійної здатності і апоптозу клітин кісткового мозку.....	65
2.5	Дослідження порушень структури ДНК у клітинах кісткового мозку..	66
2.5.1	Визначення кількості мікроядер у клітинах.....	66
2.5.2	Визначення ступеню фрагментації ДНК у клітинах.....	68
2.5.3	Визначення концентрації одноланцюгової ДНК у клітинах.....	79
2.6.	Математична обробка експериментальних результатів.....	70
Висновки до розділу 2.....		71
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....		72
3.1	Вплив Cd^{2+} на масу тварин і масові коефіцієнти органів	72
3.2	Вплив Cd^{2+} на біохімічні показники крові	76
3.2.1	Показники білкового і ліпідного обміну.....	76
3.2.2	Вміст ТТГ і T_4	79
3.2.3	Вміст Ca^{2+}	81
3.2.4	Розподіл Cd^{2+} по органах тварин.....	82
3.3	Стан оксидативного стресу.....	84
3.3.1	Вміст 8-ізопростану і карбонільованих білків.....	85
3.3.2	Активності СОД і КАТ.....	87
3.4.	Вплив Cd^{2+} на показники життєздатності фібробластів і клітин кісткового мозку.....	90

3.4.1 Показники адгезійної та міграційної здатності і апоптозу фібробластів	91
3.4.2 Вміст колагену та ГАГ в культурі фібробластів	98
3.4.3 Показники адгезійної здатності та апоптозу клітин кісткового мозку	101
3.5 . Вплив Cd^{2+} на ДНК клітин кісткового мозку.....	109
3.5.1 Кількість мікроядер у клітинах кісткового мозку.....	109
3.5.2. Фрагментація ДНК і вмісту її одноланцюгової частки у клітинах кісткового мозку	111
Висновки до розділу 3.....	114
РОЗДІЛ 4. ЗАКЛЮЧЕННЯ.....	115
Висновки до розділу 4.....	120
ВИСНОВКИ	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	122
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	150
ДОДАТОК 2 Акти впровадження	155

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

CAT – каталаза

CDCA1 – кадмій-залежна карбоангідраза

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations – Продовольча та сільськогосподарська організація Об'єднаних Націй – ПСООН

GPx – глутатіонпероксидаза

HSP – білок теплового шоку

IARC – International Agency for Research on Cancer – Міжнародне Агентство по Вивченню Рака

JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Об'єднаний експертний комітет ПСООН/ВООЗ із харчових добавок

MDL – мінімальна летальна доза

МК – Масовий коефіцієнт – відсоткове співвідношення маси органу до маси тіла

MRL – minimal risk level – рівень мінімального ризику – щоденна доза споживання без ризику виникнення побічних ефектів протягом певного часу

MT – металотіонеїн

NOAEL – no-observed-adverse-effect level – найвища доза, що не викликає токсичний ефект

PTMI – provisional tolerable monthly intake – тимчасове допустиме місячне споживання

PTWI – provisional tolerable weekly intake – тимчасове допустиме тижнєве споживання

СОД (SOD) – супероксиддисмутаза

ssDNA – Single-Stranded DNA – одноланцюгова ДНК

T₄ – вільний тироксин

ТТГ (TSH) – тиреотропний гормон

WHO – World Health Organization – Всесвітня організація охорони здоров'я – ВООЗ

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. В останні десятиріччя антропогенні фактори, в першу чергу, поява нових областей і все ширші масштаби використання кадмію в промисловості, науці, медицині, привели до його значного накопичення в навколишньому середовищі. За класифікацією ВООЗ кадмій є одним з десяти найнебезпечніших хімічних речовин, і в даний час вже становить серйозну проблему для системи суспільної охорони здоров'я [1].

Довгострокові спостереження за людьми, які проживали в місцевостях, збагачених кадмієм, або тривалий час працювали на виробництвах в умовах його високої концентрації свідчать, що цей метал є токсичним і призводить до патологій всіх без винятку систем органів. Існують численні відомості про те, що спотворюючи структуру ДНК, викликаючи окислювальний стрес і втручаючись в процеси метаболізму, кадмій порушує діяльність серцево-судинної, кістково-м'язової, видільної, нервової, ендокринної систем, призводячи, в тому числі, й до онкологічних захворювань [2–6].

Ці результати підтверджені також багатьма дослідженнями, в яких лабораторних тварин піддавали впливу кадмію, концентрація якого істотно перевищувала його фоновий вміст у навколишньому середовищі [7–9].

Тому виникає корінне питання – чи існують абсолютно безпечні для людини кількості кадмію, що надходять в його організм на протязі життя? Адже до початку інтенсивного використання кадмію, еволюція людини проходила в середовищі, де завжди існував фоновий рівень цього металу. Можливо, людина вже адаптована до цього рівня? Однак досліджень, в цьому напрямку так замало і їх результати настільки неоднозначні [10–13], що відповіді на це питання поки що немає.

Мабуть, це одна з причин того, що в останні десятиріччя, особливо в умовах безперервної зміни екологічної ситуації, як окремі країни, так і міжнародні організації, перш за все, ВООЗ (WHO), ПСО ООН (FAO), ОЕКПСО ООН ХД /

BOO3 (Joint FAO / WHO), MABP (IARC) час від часу змінюють норми безпечного надходження кадмію в організм, які, в значній мірі, є умовними.

На даний час одними з загальноприйнятих безпечних норм для людини, які приймають також і для лабораторних щурів, є PTWI – тимчасове допустиме тижневе споживання кадмію, рівне 5,8 мкг/кг/добу та MRL – 0,5 мкг/кг/добу – рівень мінімального ризику – щоденна доза споживання без ризику виникнення побічних ефектів протягом до року [14, 15].

Але переконливих епідеміологічних або експериментальних доказів абсолютної справедливості цих норм в даний час практично немає. Крім того, існують свідчення про те, що кадмій у дозах, суттєво менших, ніж PTWI, або MRL, може впливати на метаболізм, зокрема, активувати синтез ДНК і втручатись у процеси малігнізації [10, 11].

Тому має сенс дослідити вплив концентрацій кадмію, близьких до PTWI, MRL і значно менших, а також тривалість їх дії на організм в цілому, на окремі клітинні і молекулярні показники його життєдіяльності. Таке дослідження є актуальним як в теоретичному, так і в практичному плані, оскільки отримані результати дозволять використати їх для уявлення про мінімальні величини зв'язків концентрація-термін дії кадмію у ймовірному розвитку патологічних процесів і, можливо, для пошуків підходів до корекції останніх.

Дослідженню деяких сторін цієї проблеми й присвячена дана робота.

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

Мета та завдання досліджень. Метою роботи було *in vivo* дослідити концентраційну і часову залежності впливу доз кадмію, близьких до PTWI, MRL і суттєво менших на зріст щурів, показники їх загального метаболізму, стан ендокринної та антиоксидантної систем, життєздатність та поведінку фібробластів і клітин кісткового мозку, а також характер і ступінь пошкодження ДНК в ядрах клітин останніх *in vitro*.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання: *In vivo*, на моделях щурів, які протягом 15 і 36 діб отримували Cd^{2+} у дозах 0,1 і 1 мкг/кг маси тіла у добу та *in vitro*, в культурах клітин кісткового мозку з вмістом Cd^{2+} 0,1 і 1,0 мкМ/л дослідити і виміряти:

1. Динаміку маси тіла і масових коефіцієнтів серця, печінки, нирок і насінників.
2. Розподілення концентрації Cd^{2+} по цих органах щурів.
3. Показники оксидативного стресу в сироватці щурів.
3. Біохімічні показники білкового і ліпідного обміну, а також вмісту Ca^{2+} в сироватці щурів.
4. Вміст ТТГ і T_4 в сироватці щурів.
5. Показники життєздатності: адгезії, міграції і апоптозу фібробластів.
6. Ці ж показники, а також характер і рівень пошкодження ДНК в культурах клітин кісткового мозку.

Об'єкт дослідження – зв'язок між дозо-часовими особливостями і зростом тварин, їх білковим та ліпідним обміном, станом щитоподібної залози, оксидативним стресом, порушеннями структури ДНК і апоптозом клітин.

Предмет дослідження – динаміка маси тіла щурів та масових коефіцієнтів внутрішніх органів і розподіл в них Cd^{2+} , стани прооксидантно-антиоксидантної системи (вміст 8-ізопростану, ступень карбоксилування білків, активності СОД і КАТ) та щитоподібної залози (концентрації ТТГ і T_4) в сироватці крові, показники білкового та ліпідного обміну (вміст загального білку, альбуміну, сечовини, креатиніну, холестерину, тригліцеридів, вміст Ca^{2+}) в сироватці крові, особливості життєздатності фібробластів і клітин кісткового мозку і рівень пошкодження ДНК в останніх.

Методи дослідження. Препаративні методи (отримання і культивування фібробластів і клітин кісткового мозку, вилучення ДНК) і аналітичні методи (визначення вмісту ДНК та її одноланцюгової частки, гормонів щитоподібної залози, білкового та ліпідного обмінів, активності ферментів антиоксидантного захисту, вимірювання вмісту колагену і глікозаміногліканів в органах щурів,

цитометрія, проточна цитофлуорометрія, імуноферментний та комет-аналізи, спектрофотометрія, флуоресцентна та фазово-контрастна мікроскопія), математичні методи аналізу та обробки результатів експериментів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано, що Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1 мкг/кг/добу, що у 5 і у 8,3 разів менші за MRL та PTWI відповідно, при щоденному надходженні в організм 3-місячних щурів протягом 5 тижнів, у перші 2 тижні зупиняє зростання тварин, яке поновлюється після 3 тижня експерименту. При цьому масові коефіцієнти досліджених органів – серця, печінки, нирків, насінників зростають на всьому протязі експерименту при обох дозах кадмію.

Доведено, що однією з причин зменшення маси тварин на перших етапах дії кадмію може бути стимуляція ним процесів деградації білків м'язової тканини на фоні незмінності, або, навіть, і зниження інтенсивності їх загального синтезу, а також порушення ліпідного обміну, пов'язаного з початковою стадією гіпотиреоїдного стану. Використані концентрації кадмію не впливають на обмін кальцію у тварин.

Вперше показано, що швидкість накопичення кадмію в усіх органах протягом експерименту підвищується, що є результатом зсуву проксидантно-антиоксидантного відношення у бік розвитку і зростання ступеню оксидативного стресу за рахунок недостатньої активності СОД і КАТ.

Вперше визначено, що за дією Cd^{2+} адгезійна та міграційна здатності фібробластів знижуються, а ступінь апоптозу зростає як при підвищенні дозової концентрації, так і при зростанні часу введення кадмію тваринам. Ступінь адгезії та міграції у клітин, виділених з різних органів, становить ряд: рогівка > шкіра > легені > нирки.

Аналогічним чином впливає кадмій і на клітини кісткового мозку.

Дослідження руйнуючої дії кадмію на клітини кісткового мозку виявило збільшення кількості в них мікроядер, рівня фрагментації ДНК та одноланцюгової ДНК.

Вперше показано, що вплив кадмію на порушення структури ДНК у клітинах *in vivo* суттєво ефективніший, ніж при їх культивуванні *in vitro*.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та відповідно до законів України.

Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів України.

Комісією з біоетики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 6 від 20 червня 2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Вибір теми дисертаційної роботи, постановка мети і задач, вибір об'єктів і методів дослідження, обговорення отриманих експериментальних результатів і формулювання висновків були проведені разом з науковим керівником – доктором біологічних наук, професором, завідувачем кафедри біохімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Перським Є. Е. Автор вдячний кандидату біологічних наук, доценту кафедри біохімії Коту Ю. Г. за допомогу, надану при виконанні експерименту.

Автор самостійно опрацював спеціальну літературу по темі дисертації, виконав експериментальні дослідження, провів математичну обробку отриманих результатів, взяв активну участь в написанні та підготовці до публікації всіх статей і тез за темою дисертаційної роботи.

У дисертації не використані ідеї або розробки, що належать співавторам опублікованих наукових робіт.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації доповідались на вітчизняних та міжнародних конференціях: IX, X, XII, XIII Міжнародні конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2014, 2015, 2017, 2018); XI Український біохімічний конгрес (Київ, 2014); III, IV

Міжнародні наукові конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015, 2017); Conference of Young Scientists (Київ, 2015); Семінар «Весняні біохімічні читання» (Дніпропетровськ, 2016); XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances/» (Київ, 2018); FEBS 3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, 2018); Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology (Київ, 2018); Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (Харків, 2019); 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. Session 2 (Yaremche, 2019).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 156 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків. Список використаних літературних джерел містить 253 найменування. Робота ілюстрована 11 малюнками і 22 таблицями.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати доповнюють уявлення про характері молекулярно-біохімічні механізми хронічного впливу малих доз кадмію на організм ссавців.

Результати дослідження впроваджено в науково-педагогічний процес Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України та Харківського національного медичного університету МОЗ України, що підтверджено відповідними актами впровадження.

Отримані результати можуть бути корисними при розробці нових критеріїв токсичності кадмію у клінічній практиці при перенесенні їх на людину.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КАДМІЮ І ЙОГО ВЗАЄМОДІЯ З ОРГАНІЗМАМИ (літературний огляд)

1.1. Фізико-хімічні властивості і вплив кадмію на організми

1.1.1 Характеристика і розповсюдженість кадмію

Метал кадмій (Cd) з атомним номером 48, розташований в 5-му періоді 12-ої групи періодичної системи елементів, тому й деякі його хімічні властивості такі ж, як у цинку та ртуті, що знаходяться в цьому ж періоді. Так, в більшості з'єднань його стан окислення так само, як і у цинку, становить +2. Але, наприклад, при його розчиненні в суміші хлоридів кадмію і алюмінію утворюється катіон Cd_2^{2+} із станом окислення +1, аналогічний катіону Hg_2^{2+} у хлориді ртуті.

На цей час відомий 51 ізотоп Cd. З них 43 – штучні і мають надзвичайно малий час напіврозпаду – від пс до місяців. Останні шість природних – з атомними вагами 106, 108, 110, 111, 112, 114 – стабільні і ще два – ^{113}Cd і ^{116}Cd мають слабку радіоактивність та великі періоди напіврозпаду $7,7 \times 10^{15}$ і $2,9 \times 10^{19}$ років відповідно. З урахуванням відносного вмісту кожного з цих ізотопів в природі, середньозважена стандартна величина атомної ваги Cd становить 112,41384 [16, 17].

Кадмій – рідкісний метал, розповсюджений в невеликих концентраціях у земній корі, воді і повітрі. Численні дослідження вмісту Cd в цих середовищах дають неоднозначні результати, що пов'язано, перш за все, з проведенням вимірів в різних географічних регіонах і в різні роки. При цьому кадмій безперервно переноситься між цими середовищами, об'єднуючи гідросферу, педосферу, атмосферу і біосферу в єдину систему, яка знаходиться в стані, близькому до стаціонарного. Тому з наявних даних можна виділити певні середні значення, що відображають, мабуть, картину, близьку до реальності.

Відповідно до найбільш репрезентативних даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO), Організації економічного співробітництва і розвитку (OECD), Міжнародної асоціації кадмію (ICdA) його вміст в земній корі становить, в середньому, 0,13 мг/кг. Однак географічно локальна концентрація Cd залежить від багатьох факторів і може бути і нижче, і вище. Так, у метаморфічних породах вона на порядок менше, тоді як в осадових – на півтора порядки більше середньої. Кадмій не утворює самостійних рудних родовищ, входячи до складу руд різних металів, переважно, цинку і, в меншій мірі, міді й свинцю. В цих рудних районах його концентрація може досягати 14 мг/кг і 1 мг/кг відповідно. Важливим природним постачальником кадмію до ґрунту є вулканічна діяльність. Тому великі області навколо і діючих, і погаслих вулканів збагачені кадмієм. Деяку частину кадмію приносять метеорити, в яких його вміст на порядок вище, ніж на Землі [18, 19].

За концентрацією Cd в ґрунтах їх поділяють на угіддя сільськогосподарські, несільськогосподарські та контрольовані звалища. У незабруднених сільськогосподарських угіддях концентрація Cd в ґрунті варіює в широких межах – від 0,01 до 0,7 мкг/г.

Забруднення сільськогосподарських ґрунтів може йти шляхом міграції розчинів кадмію з підлягаючих порід, а також атмосферних опадів. Але відбувається воно, в основному, антропогенним шляхом – в результаті використання мінеральних та органічних добрив, що містять кадмій, попадання в ґрунт каналізаційних і стічних вод металургійних підприємств. І якщо з антропогенною частиною надходження кадмію в ґрунт можна всілякими способами боротися, то при існуючих методах ведення сільського господарства уникнути постійного випадання природної частини кадмію з опадів неможливо.

Найбільшу роль у забрудненні несільськогосподарських земель кадмієм мають збагачувальні і плавильні металургійні комбінати, які працюють з рудами цинку, свинцю, міді, відвали вугільних шахт, виробництво цементу, що супроводжується величезним пилоутворенням, видобуток і виробництво

фосфатних добрив і багато інших галузей промисловості, де кадмій є побічним продуктом виробництва [20–23].

В промислово розвинених країнах середній вміст кадмію в ґрунті цих земель складає, в середньому, 0,5 мг/кг, варіюючи в різних регіонах в межах 0,2–1,0 мг/кг ґрунту. Існують, однак, і області з істотно більш високими концентраціями кадмію в ґрунті. Так, наприклад, в районі Болеславського шахтного і металургійного комплексу в Польщі вона досягає 51,91 мг/кг ґрунту. Близькі до цього значення концентрації кадмію виявлені і в Україні – в ґрунті великих гірничо-металургійних регіонів [24–26].

У воді кадмій може перебувати як в нерозчинному – будучи компонентом різних мінерально-органічних комплексів – так і в розчинному стані – у вигляді солей – сульфатів, нітратів і хлоридів. Вміст цих солей у воді залежить від рН і обернено пропорційний ступеню її лужності. В прісній воді у великих місцевостях Землі, в яких відсутні родовища кольорових металів і підприємства металургійної промисловості, концентрація кадмію не перевищує, зазвичай, 0,001 мг/л [27].

У промислово розвинених країнах вона, як правило, значно вище. Так, наприклад, в Україні, в різних місцевостях Південно-Західного, Південного, Центрального, Південно-Східного регіонів концентрація кадмію в прісній воді знаходиться в межах 0,008–0,18; 0,05–0,14; 0,08–0,09; 0,01–0,25 мг/л. Аналогічні значення характерні для усіх країн з рудовидобувною, металургійною, вугільною, хімічною та іншими видами важкої промисловості [28, 29].

Загальна маса кадмію у Світовому океані становить близько 68×10^6 т, а його вміст в морській воді різних географічних регіонів лежить в широких межах від 3 до 110 нг/л. Концентрація розчинного кадмію, який у морській воді, як і в прісній, знаходиться в вигляді солей сірчаної, соляної, азотної кислот, залежить від температури – у полярних водах вона менше, ніж у тропічних. Поблизу узбережжя, донних відкладень фосфатів і фосфоритів і родовищ руд кольорових металів, в областях зі зниженим вмістом кисню, концентрації кадмію в морській воді значно підвищені [30, 31].

Кадмій швидко окислюється на повітрі і знаходиться в ньому, переважно, у вигляді оксиду, входячи до складу найдрібніших частинок пилюки і аерозолів. Його середня концентрація в атмосфері не перевищує 5 нг/м^3 . Але оскільки маса атмосферного повітря лежить в межах $(5,1\text{--}5,3) \times 10^{18} \text{ кг}$, загальна кількість кадмію в атмосфері становить вражаюче число – $(25500\text{--}26500) \text{ т}$. Це на 20% більше, ніж середньорічне світове виробництво кадмію в останнє п'ятиріччя – коло 20000 т [32, 33].

При цьому атмосферний кадмій розподілений нерівномірно. В сільській місцевості його концентрація варіює в межах $(5\text{--}15) \text{ нг/м}^3$, в житлових міських районах промислово розвинених країн вона приблизно в 5 разів вище, а поблизу металургійних підприємств може досягати $(0,3\text{--}0,5) \text{ мкг/м}^3$ [34, 35].

1.1.2 Використання кадмію

Майже 100 років після офіційного відкриття кадмію в 1817 році, різні його сполуки, як і здавна, використовували, в основному, в якості пігментів для виробництва жовтих, помаранчевих, червоних фарб. У 30–40-х роках 20 століття були виявлені нові важливі властивості кадмію – його оксид виявився чудовим антикорозійним покриттям, а додавання цього металу до припоїв призводить до значного зниження температури їх плавлення.

Різкий сплеск його використання настав з винаходом нікель-кадмієвих батарей. Світове виробництво кадмію у 1930 році становило біля 2500 т, а у 1975 році – вже 17000 т. В останні роки основна маса кадмію (в 2000 році майже 85%), а також його сполуки – оксид, селенид, солі мінеральних кислот – використовувалася у виробництві батарей, до 12% – при виготовленні фарб, в якості добавок для забарвлення скла, антикорозійного покриття, стабілізаторів для пластмас і сплавів кольорових металів, в тому числі, і з дорогоцінними в ювелірній справі. Інша частина кадмію входила і входить до складу стержнів для поглинання нейтронів в атомних реакторах, конструкцій гелієво-кадмієвих

лазерів, флуоресцентних кадмій-селективних датчиків, квантових точок на дисплеях телевізорів високої чіткості та ін. [19, 36, 37].

Поступово, однак, накопичення відомостей про різноманітну токсичну дію кадмію призвело до стурбованості широкої громадськості. Так, у 2010 році компанія McDonald's вилучила з торгових мереж понад 12 мільйонів стаканів через те, що малюнки на них були виконані кадмієвими фарбами [39].

Поширення стурбованості вилилося в Директиву європейського парламенту та Ради Європи «Про обмеження використання деяких небезпечних речовин в електричному та електронному обладнанні» і Постанову Кабінету міністрів України «Про затвердження Технічного регламенту обмеження використання деяких небезпечних речовин в електричному та електронному обладнанні».

Згідно з цими обмеженнями, «максимально допустиме значення концентрації кадмію за масою в однорідних матеріалах, які використовуються в електричному та електронному обладнанні», повинно не перевищувати 0,01%, в той час як для свинцю і ртуті це обмеження дорівнює 0,1 %. Це свідчить, що у порівнянні з цими токсичними металами небезпека від кадмію на порядок вища.

Заборонено також в подальшому використовувати кадмій в ювелірних виробках [39, 40].

Занепокоєність викликає й те, що у зв'язку з ростом населення Землі, обсяг неорганічних фосфорних добрив постійно збільшується. Ці добрива містять рухливі в ґрунтовій воді солі кадмію, які легко включаються в харчові ланцюги.

Концентрація кадмію в фосфорних добривах, які використовуються в сільському господарстві, залежить від місця їх видобутку і знаходиться в межах від 1 до 92 мг/кг. При цьому накопичення кадмію у сільськогосподарських культурах збільшується пропорційно підвищенню його вмісту в цих добривах. В середньому, використовуються добрива, в яких концентрація кадмію відповідає середині цього діапазону. Але навіть 1 мг/кг – це вже забагато [41, 42].

У 2017 р. Європарламент декларував розробку проекту законодавства про поетапне введення норм граничного вмісту кадмію в фосфорних добривах, що використовуються в сільському господарстві ЄС. Відповідно до проекту,

протягом 3-х років, починаючи з 01.2018 р. можна використовувати тільки фосфорні добрива, в яких максимальна концентрація кадмію становить 60 мг/кг. З 2020 р. по 2030 р. вона повинна дорівнювати 40 мг/кг, а після 2030 р. – 20 мг/кг [43].

У промисловості зменшенню використання кадмію, яке повинно відбуватися, в значній мірі сприяє розробка нових технологій виробництва хімічних джерел електроенергії. Так, в останні декілька років нікель-кадмієві батареї скрізь витісняються нікель-металгідридними і літій-іонними.

Незважаючи на це, після припинення зростання в період 1990–2010 роки, в 2017 році світове виробництво кадмію досягло 23000 т. Важливу роль в цьому відіграють нові галузі використання кадмію, зокрема, в фотоелементах на основі телуриду і сульфїду кадмію – CdTe/CdS – які застосовуються в сонячних напівпровідникових панелях у сонячній енергетиці [44].

Що ж стосується законопроекту про добрива, то в даний час він знаходиться в стадії обговорення.

1.1.3 Джерела, шляхи надходження і розподїлення кадмію по органам людини та тварин

Кадмій повсюдно поширений в земній корі, гідросфері і атмосфері і тому є неодмінним і постійним елементом в будь-яких ланцюгах харчування. Первинні накопичувачі кадмію в цих ланцюгах – ґрунтові і водні одноклітинні, гриби і рослини. Вони поглинають кадмій, розчинений у воді, як у вигляді вільного іона Cd^{2+} , так і у вигляді солей неорганічних та органічних кислот. Кінцевий рівень накопичення і розподіл кадмію в органах рослини визначається його систематичною приналежністю. Вторинні і третинні накопичувачів – всі види рослиноїдних, всеїдних і хижих тварин відповідно [45, 46].

Тому природно, що *основну кількість кадмію людина отримує з їжею*. У значних кількостях кадмій міститься в продуктах переробки зернових культур, овочах, морепродуктах і продуктах тваринництва. В середньому, більшість

листових рослин і тваринні морепродукти містять більше кадмію, ніж отримані від наземних тварин. При цьому концентрація кадмію в одних й тих же видах їстівних продуктів варіює в надзвичайно широких межах, оскільки вона визначається багатьма причинами. Так, його вміст значно вищий у продуктах, які походять із забруднених кадмієм регіонів. Але навіть у незабруднених місцевостях поглинання кадмію рослинами і рівень його накопичення в них залежить від рН ґрунту, наявності у ньому в дуже різних концентраціях інших важких металів та біологічно активних речовин. Природно, результатом цього є й велика варіативність вмісту кадмію у продуктах тваринництва.

У якості приклада можна привести межі концентрації кадмію в мкг/кг у деяких найголовніших їстівних продуктах в центральному та південному регіонах України. Так, для хліба пшеничного та житнього вони складають 2,0 – 15,8 і 12,0–20,0; вареної картоплі – 12,0–23,3; свіжих моркви, столових буряків, огірків, помідорів, капусти – 10,1–17,5; 30,0–43,0; 10,5–15,0; 9,0–14,0; 13,0–27,9; яловичини – 22,3–90,0; варених ковбас та сосисок – 5,7–60,0; молока, кефіру, сметани – 1,0–2,4; 1,2–1,8; 1,1–2,4 відповідно [47].

В середньому, в країнах Євросоюзу вміст кадмію в харчових продуктах також відповідає цим межам [48].

Існує безліч причин, зокрема, особливості національних кухонь з використанням специфічних продуктів, а також з оригінальними питомими вмістами в їжі рослинних і тваринних складових, які визначають остаточний вміст кадмію в їжі. Так, в Південно-Східній Азії, зокрема, Малайзії, Таїланді її істотну частину складають морепродукти, концентрація кадмію в яких досить висока. Наприклад, широко використовуваний в їжу молюск *Tegillarca granosa* (кров'яний молюск) вміщує до 1,95 мг/кг кадмію. Середні і бідні верстви населення в Таїланді постійно вживають багато свинячих субпродуктів. При цьому рівень кадмію в печінці та нирках тварин з районів, навіть не дуже близьких до цинкових родовищ, знаходиться в межах (0,28–3,68) мг/кг і (0,38–10,82) мг/кг відповідно, а в деяких зразках нирок він досягає 40,14 мг/кг [49, 50].

Природно, що й середній загальний вміст кадмію в раціонах населення різних країн також відрізняється. Так, в Європі у сільських жителів він найменший в Іспанії – 5,78 мкг/добу, а найбільший – в Польщі – 41,2 мкг/добу. В Україні вміст кадмію в добовому раціоні знаходиться посередині цих величин і лежить в межах (14,2–21,0) мкг [47, 48].

Кадмій, що надходить з їжею в організм ссавців, абсорбується в шлунково-кишковому тракті лише частково. У людини ступінь абсорбції кадмію становить біля 5%, але може доходити й до 10%, причому у жінок він дещо вищий, ніж у чоловіків. У цих межах рівень абсорбції залежить від великого числа причин, серед яких – вік конкретної людини, стан здоров'я, інтенсивність загального метаболізму в організмі, а також вміст у ньому (і в складі їжі) інших металів і біологічно активних речовин, в першу чергу, цинку, міді, кальцію, вітаміну D та ін. [51–53].

Кадмій питної води абсорбується теж в шлунково-кишковому тракті і в тому ж ступені, що і кадмій їжі. Оскільки у цій воді в незабруднених місцевостях вміст кадмію нижчий за вміст в їжі на 2–3, а в регіонах важкої промисловості не менше як на 1,5 порядки, його внесок в загальну абсорбцію незначний [27, 54].

Металевий кадмій та його сполуки (CdO, CdCl₂, CdSO₄ та ін.) знаходяться в повітрі у вигляді твердих частинок пилу малого розміру, пари і надходять до організму з диханням.

Великі частинки з характерними розмірами від 1 до 10 мкм і більше абсорбуються у верхніх дихальних шляхах, а дрібні, з розмірами близько 0,1 мкм і менше – в альвеолах. Всього в дихальних шляхах і легенях абсорбується не менше, як 50% кадмію, що вдихається.

У людей, що не палять і тих, які не контактують із сполуками кадмію у процесі професійної діяльності, його надходження в організм з диханням становить лише відсотки в порівнянні з харчовим кадмієм. Але мешканці поблизу від промислових виробництв, де у технологічних процесах присутній кадмій, навіть у паркових зонах вдихають значно більше кадмію через його високий вміст у повітряному пилу.

Хронічне обструктивне захворювання легенів, що приводить до підвищеної смертності, – професійна хвороба працівників підприємств, де виробнича пил містить високі концентрації кадмію [55–57].

Однак основна і численна кількість людей у яких, незалежно від місця проживання і професійної діяльності, є проблеми з кадмієм – курці. У численних дослідженнях показано, що в тютюні сигарет великого числа різних виробників концентрація кадмію знаходиться в межах (1–3) мкг/г. При масі однієї сигарети 1 г., в ній міститься, в середньому, до 2 мкг кадмію. Людина, яка викурює 1 пачку сигарет в день, абсорбує за цей час в організмі 1 мкг кадмію [58, 59]. А багато хто палить й більше однієї пачці у день.

Ця кількість близька до нижньої межі вмісту кадмію в добовому раціоні європейців, так що куріння є вагомою добавкою в його надходженні до організму.

Кадмій, абсорбований в слизовій дихальних шляхів і альвеолах легких та у шлунково-кишковому тракті, розноситься альбуміном крові по всьому тілу, але, переважно, в печінку, де він зв'язується з металотеонеїнами і надходить в нирки.

Саме в цих органах накопичується з віком максимальна кількість кадмію, причому в нирках його концентрація вище, ніж в печінці. В районах, незабруднених кадмієм, у людей віком 50–60 років його вміст становить в цих органах, в середньому, 40–50 мкг/г і 1–2 мкг/г сирової ваги відповідно. У легенях, мозку, кістках, м'язах, крові вміст кадмію в 5–10 разів менший. Аналогічно розподіляється кадмій і по органам сільськогосподарських та лабораторних тварин.

Близько 85 % кадмію, що надійшов в організм і не пов'язався з ним, виводиться приблизно порівну з калом і сечею. Пов'язаний же в тканинах дуже повільно метаболізується. У перерахунку на іони металу період напіввиведення одиниці його маси, яка у зв'язаному стані міститься в тканині, лежить в межах 17–30 років. Тому кадмій є типовим кумулятивним токсикантом.

В середньому, в Європі у віці 50 років його загальний вміст у тілі людини може досягати 30–50 мг [60–64].

1.1.4 Біологічні функції і токсичність кадмію

Коли говорять про біологічну функції кадмію, мають на увазі дві його абсолютно різні функціональні ролі.

Перша – це участь в якості структурного компонента метаболічних процесів, які забезпечують нормальну життєдіяльність організму. Ця роль кадмію у вищих організмів і переважної більшості нижчих, в т.ч., одноклітинних – зараз невідома.

Друга роль кадмію полягає в тому, що проникаючи в сигнальні системи і метаболічні шляхи, він спотворює процеси життєдіяльності організму, приводячи до величезного числа різних патологій, які можуть закінчитися смертю.

Зі зрозумілих причин (етнічні, вікові, статеві відмінності, мале число випадків, що спостережені, етична сторона) мінімальна величина разової летальної дози (MDL) кадмію для людини остаточно не визначена. Проте, ВООЗ пропонує оцінку, що лежить в широких межах – від 0,35 до 3,5 г металу на кг маси тіла [65, 66].

Кадмій проявляє руйнуючі властивості в усіх без виключення клітинах, тканинах і органах кістково-м'язової, серцево-судинної, нервової, імунної, травної, видільної систем [67].

Тому природно, що в останні десятиліття національні, регіональні і міждержавні організації активують дослідження особливостей взаємодії кадмію з людиною і тваринами з метою встановити безпечні граничні норми його надходження в організм і накопичення в ньому. Показниками цієї норми обрані величини PTMI (provisional tolerable monthly intake – тимчасове допустиме місячне споживання) – доза кадмію, яка при одноразовому введенні 1 раз в 30 діб не викликає побічних ефектів) і PTWI (provisional tolerable weekly intake – тимчасове допустиме тижневе споживання).

Серед великої кількості цих оцінок, найбільш адекватними, принаймні, для жителів Європи і Північної Америки, є запропоновані JECFA (Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives - Об'єднаний експертний комітет продовольчої та сільськогосподарської організації ООН / ВООЗ із харчових добавок) величини.

Вони становлять 25 мкг/кг маси тіла для РТМІ і 5,8 мкг/кг маси тіла з урахуванням метаболізму кадмію відповідно [14].

Використовуються й інші оцінки, зокрема, MRL (minimal risk level – рівень мінімального ризику) доза кадмію, що дорівнює 0,5 мкг/кг маси тіла/добу і яка при введенні щоденно протягом 1 року не викликає побічних ефектів [15].

1.2. Біохімічні механізми дії кадмію на організм

1.2.1 Механізми впливу кадмію на структуру та метаболізм білків і вуглеводів

Принаймні велика частина, якщо не всі, токсичні ефекти, викликані кадмієм, визначаються тим, що він є, по суті, класичним міметиком – перш за все, атомів цинку, але також і міді, заліза, кальцію. Через близькість хімічних властивостей іони кадмію здатні імітувати інші двовалентні іони і, таким чином, втручатися в мережі передачі сигналів, побічно викликати генерацію реактивних форм кисню, впливати на гормональну ситуацію в організмі, пригнічувати або ж збільшувати активність ферментів, модулювати процеси нейротрансмісії і багато що інше [68].

Механізм такої дії кадмію двоїстий. По-перше, на початковому етапі, коли локальна концентрація кадмію в тканині стає більшою, ніж концентрація іона, який він імітує, кадмій конкурентним чином пов'язується з молекулою біологічно активної речовини. Надалі спотворення ділянки метаболізму, в якому беруть участь такі молекули, визначаються, по-перше, зміною, навіть якщо вона незначна, їх структурних і, відповідно, функціональних властивостей. А, по-друге, появою в цій ділянці метаболізму іонів витісненого і заміщеного металу або металоїду, яких там не повинно бути [69, 70].

Хоча природно, що всі ці ефекти повинні визначатися фізико-хімічними механізмами взаємодії іонів кадмію з молекулами біополімерів, робіт з вивчення цих механізмів надзвичайно мало. У разі білка прийнято вважати, що іони кадмію можуть або впроваджуватися в структуру молекули, утворюючи хімічні зв'язки з

функціональними атомними групами її бічних ланцюгів, або зміщувати в інше положення іон металу в молекулі металопротеїну, займаючи його місце.

Однак, мабуть, крім цього, є й інші, набагато складніші механізми. Так, в дослідях *in vitro* показано, що в денатурованому стані, за рахунок високої конформаційної рухливості поліпептидних ланцюгів і значно більшого, ніж в нативному білку, кількості вільних реакційно здатних груп, утворення комплексів цих груп з іонами кадмію йде інтенсивніше, в значно більшому обсязі і вони надзвичайно стабільні хімічно. Крім того, кадмій ініціює і бере участь у патологічній агрегації поліпептидних ланцюгів. Все це призводить до порушення нормального процесу ренатурації [71, 72].

Ці факти дозволяють вважати, що кадмій може втручатися у формування нативної тривимірної молекули білка в процесі фолдингу, а, можливо, ще й на етапі зростання поліпептидного ланцюга на полірибосомі.

Природно, що цей механізм повинен виробляти величезну кількість дефектних молекул білка, найбільша частина з яких взагалі не може брати участь у метаболізмі, а менша, з незначними структурними спотвореннями, порушує його.

Що ж стосується індивідуальних молекул вуглеводів, то дослідження фізико-хімічних механізмів їх взаємодії з кадмієм практично не проводилися. Можна вважати, що перші два механізми порушення їх структури такі ж, як і для білків. Третій же не може грати будь-яку роль, оскільки вуглеводи не синтезуються матричним шляхом.

Досліджень впливу кадмію на загальний синтез білків і вуглеводів в розрахунку на весь організм тварин або ж в їх окремих органах відносно мало. Крім того, ці дослідження проведені на окремих видах тварин різних систематичних груп з використанням дуже широких діапазонів доз і часу експозиції кадмію. Тому отримані результати неоднозначні, а іноді й суперечливі до того, що в аналогічних органах тварин різних видів виявлено як підвищення, так і зниження інтенсивності обміну і білків і вуглеводів [73–77].

Результати досліджень впливу кадмію на активність ферментів теж неоднозначні, хоча і меншою мірою. Показано, що кадмій пригнічує або ж повністю інгібує активність більшості ферментів, які беруть участь в інтегральній регуляції метаболічних процесів - обмінних, сигнальних, адаптивних і т. і. Існують, однак, і протилежні відомості [78–83].

Хоча молекулярні механізми різноманітних прояв токсичності кадмію остаточно ще не з'ясовані, природно, що ці прояви значною мірою пов'язані саме з його впливом на ферментативну активність.

1.2.2 Механізми оксидативного стресу, викликаного кадмієм

Кадмій не є окислювально-активним елементом. Тому він не може приймати участь в реакціях Фентона [84] – реакціях пероксиду водню з іонами заліза і міді і викликати оксидативний стрес безпосередньо, генеруючи реактивні форми кисню (АФК). Кадмій індукує оксидативний стрес опосередковано, заміщуючи конкурентним шляхом залізо та мідь у цитоплазматичних і мембранних білках, після чого вільні іони Fe^{2+} і Cu^{2+} можуть вступати у реакцію з пероксидом водню, відкриваючи ланцюг послідовних реакцій, в яких утворюється велика кількість вільнорадикальних сполук різної хімічної природи.

До них відносяться супероксидні аніони $\text{O}_2^{\bullet-}$, гідратовані електрони $e_{\text{водн}}$, водневі радикали $\text{H}^{\bullet}$, гідроксильні радикали $\text{OH}^{\bullet}$, радикальні продукти окислення і руйнування ліпідів та білків – алкіли $\text{L}^{\bullet}$, алкоксили $\text{LO}^{\bullet}$, діоксили $\text{LOO}^{\bullet}$ і ще багато інших вторинних і третинних радикалів.

Серед них водневі радикали $\text{H}^{\bullet}$ і гідратовані електрони $e_{\text{водн}}$ мають відновні властивості. Всі останні – окисники. Тому оксидативний стрес, індукований кадмієм, може приводити в клітині як до її окисненого пошкодження, так і до активації захисних реакцій, важливою частиною яких є антиоксидантна система.

До неї відносяться по-перше, низькомолекулярні ендogenous антиоксиданти – відновлені глутатіон (GSH) і убіхінон (кофермент QH_2), каротин (провітамін А), вітаміни Е і С, ліпоева і сечова кислоти, мелатонін, хелатні сполуки, в першу

чергу, розчинні білки крові – альбумін і деякі глобуліни, а також 4 ізоформи металотіонеїнів – низькомолекулярних білків, які пов'язують усі важкі метали.

А по-друге, антиоксидантні ферменти – цитоплазматична (СОД 1), мітохондріальна (СОД 2) і позаклітинна (матриксна – СОД 3) – супероксиддисмутази, лізосомальна каталаза, 8 ізоформ цитоплазматичних і позаклітинних глутатіонпероксидаз (GPxs) та група пероксіредоксинів (Prxs).

Таким чином, загальний окислювальний/антиоксидантний баланс, який залежить від того, як різні компоненти системи антиоксидантного захисту організму реагують на дозу і тривалість навантаження кадмієм, і визначає кінцевий патологічний результат [85, 86].

Не викликає ніякого сумніву, що оксидативний стрес є одною з важливих причин виникнення широкого кола патологій серцево-судинної, нервової, ендокринної, видільної систем, сполучної тканини і онкологічних захворювань [2, 96–98].

1.2.3 Кадмій, ДНК, генна експресія і апоптоз

Процес впливу кадмію на структуру і функціональну активність ДНК (генів) зводиться до трьох механізмів.

Перший – дія кадмію, який опосередковано призводить до взаємодії молекул ДНК з вільнорадикальними продуктами. Це перш за все, супероксидні аніони $O_2^{\cdot-}$ і водневі радикали $OH^{\cdot}$, які утворюються в реакціях Фентона за участю вільних Fe^{2+} і Cu^{2+} , витіснених кадмієм.

Показано, що $OH^{\cdot}$ може взаємодіяти з азотистими основами піримідинів по їх подвійним зв'язкам, заміщати протони в їх метильних групах і в С-Н зв'язках 2'-дезоксирибози піримідинового нуклеотиду. Радикали, що утворилися таким чином, можуть, в залежності від оточення, мати як окисні (С-6-ОН), так і відновні (С-5-ОН) властивості і модифікуватися в подальшому шляхом дегідрування, деамінування та ін., в тому числі, і багатоступеневим шляхом. Наприклад, С-5-ОН

може провзаємодіяти з $O_2^{\bullet-}$, перетворюючись у C5-ОН-6-пероксид-радикал, який, реагуючи з водою, перетворюється на гліколь.

ОН* реагує і з C-4, C-5, C-8 азотистих основ пуринів, при цьому C-4-ОН проявляє окисні, а C-5-ОН і C-8-ОН – відновні властивості. Подальше депротоноування C-5-ОН і C-8-ОН перетворює ці радикали на окиснювачі [99].

Таким чином, індукований кадмієм окислювальний стрес призводить до модифікації канонічних нуклеотидів і може значно підвищити мутабільність.

Для протидії цьому процесу в клітині існує потужна система репарації ДНК (mismatch repair). Вона складається з декількох груп ферментів – ДНК-N – глікозилаз, ДНК-лігаз, ДНК-полімераз, кінцевої дезоксинуклеотидил-трансфери TdT та ін. Вони розпізнають, видаляють і відновлюють помилкові нуклеотиди, відбудовують розриви подвійної спіралі, додавая в проміжки, що утворилися, правильні нуклеотиди [100–102].

Другий механізм впливу кадмію на ДНК – інгібування цих репараційних ферментів. Цей процес складається з прямої дії іонів кадмію на структуру молекул ферментів у процесі їх синтезу і постсинтетичного формування (розділ 1.2.1.), мутацій в генах, які їх кодують за рахунок окисдативного стресу в ДНК і, можливо, метаболічних змін складу середовища, в якому відбувається ферментативна реакція. Це інгібування виявлено для всіх груп репараційних ферментів [103–105].

Третій, найменш вивчений, але йовмірний механізм – це пряме хімічне зв'язування іонів кадмію з реакційноздатними групами нуклеотидів. Хоча, принципово, ця взаємодія і відбувається [106, 107], робіт, присвячених її вивченню, обмаль. Проте, методом моделювання молекулярної динаміки показано, що іони Cd^{2+} зв'язуються безпосередньо з тиміном у великій борозенці молекули ДНК. Це призводить до руйнування водневих зв'язків між аденином і тиміном, що викликає часткову денатурацію і порушення нормальної структури у відповідних ділянках ДНК [108].

Всі три механізми діють одночасно у всіх хромосомах всіх клітин організму і по всій довжині молекул ДНК, взаємно посилюючи дію кожного з них і сумуючи

загальну їх дію, що прискорює мутагенез і збільшує нестабільність геному. Кінцевий результат їх спільної дії, який являє собою спотворення нуклеотидного складу і, відповідно, активності генів, залежить від дози і часу впливу кадмію, а також органу і типу тканин в ньому.

Хоча очевидно, що оксидативний стрес є однією з основних причин амортизаційного апоптозу, конкретні молекулярні механізми цього процесу, крім окремих випадків, ще остаточно не досліджені.

В той же час відомі й інші механізми апоптозу, викликаного кадмієм, перш за все, – *мітохондріально-залежного*.

Так, на тканинах рогівки і сітківки очей та фібробластах шкіри миші визначено, що іони Cd^{2+} у концентраціях 0,4, 0,8 і 1,6 μM , проникаючи всередину мітохондрій, зв'язуються з тіоловими групами Ca^{2+} -залежних АТРаз. Це призводить до різкого збільшення концентрації вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+} , внаслідок чого змінюється мембранний потенціал мітохондрій, аж до його повної втрати. В результаті цієї зміни цитохром c з міжмембранного простору виходить в цитоплазму і активує каспазу-3. Підвищується також активність каспаз -2, -8 і -9. Таким чином, Cd^{2+} опосередковано викликає апоптичну загибель клітин каспазо-залежним шляхом [110, 111].

При цьому утворюються АФК, а також активуються каспази-2 і -9 і мітохондріальної матриці, що вносить свій вклад у каспазо-залежний шлях апоптичної загибелі клітин [112, 113].

У *мітохондріально-залежному* апоптозі ключову роль грають як проапоптичні, так і антиапоптотичні білки сімейства Bcl-2. Так, антиапоптотичний білок Bcl-XL, який знаходиться в мітохондріях, інгібує вивільнення цитохрому c при втраті ними мембранного потенціалу і захищає клітини від апоптозу.

Але дія кадмію багатofункціональна. На лімфоцитах хворих на хронічну лейкемію показано, що за великої концентрації іонів Cd^{2+} вони, зв'язуючись з фактором транскрипції NF- κB , не дозволяють йому зв'язатися з частиною ділянки ДНК, де знаходиться ген Bcl-XL, чому цей ген й не активується. Тому, шляхом

альтернативного сплайсингу замість Bcl-XL синтезується білок Bcl-XS, який є апоптогенним [114].

Для протидії апоптозу в клітині існує захисна білкова система. Її основні компоненти – металотіонеїни (MT), які нейтралізують іони Cd^{2+} , безпосередньо взаємодіючи з ними і стресові білки (білки теплового шоку – HSP), які діють опосередковано, захищаючи внутрішньоклітинні білки від кадмію, як шаперони.

Достовірно встановлено, що загальною реакцією на дію кадмію є активація генів в цих родинх білків у тварин всіх досліджених систематичних груп і людини [118–123].

Індукований кадмієм синтез і максимальний рівень MT та HSP має дозові, вікові, органні і клітинні особливості.

Ці дані свідчать про ієрархічну будову програми відповіді стресових білків на дію кадмію і про те, що вона вбудована в загальну програму ембріонального розвитку.

1.2.4 Основні захворювання, викликані кадмієм

Хвороба Itai-Itai – у перекладі з японської, буквально «ой-ой» – ендемічна хвороба, виявлена близько 1912 року у жителів басейну річки Чінзу, де обробляли близько 30 км² рисових полів. Віще за течією від цих полів є великі поклади свинцево-цинкових руд, які розробляються. Технічна вода, що скидалася з рудника в річку, жителі використовували для зрошення полів, побутових потреб і пиття приблизно з 1900 по 1960 рік. Відповідно, всі продукти харчування і, в першу чергу, основний з них – рис, як і вода, містили великі кількості кадмію, що призвело до його значного накопичення в організмі.

За оцінками проведеними в 1970–1980 роках, споживання кадмію жителями забрудненого регіону було втричі більшим, ніж в решті Японії. При цьому і середня концентрація кадмію у хворих Ітаї-Ітаї становила в печінці, підшлунковій

залозі, щитоподібній залозі та м'язах – (56, 44, 43, і 13) мкг/г сирої тканини, а у здорових людей – (11, 10, 10 і 2) мкг/г сирої тканини відповідно.

Синдром Ітаї-Ітаї – найважче хронічне кадмієве захворювання. Для нього характерні остеомалія і остеопороз зі схильністю до множинних переломів кісток, які можуть відбутися навіть від сильного кашлю. Деформація кісток призводить до сильних болів при фізичному навантаженні і, в кінцевому підсумку, до нерухомості. Костні порушення супроводжуються анемією і незворотною нирковою трубчастою дисфункцією. Саме важка нефропатія є основною причиною смерті хворих.

Ця унікальна хвороба вражає, в основному, літніх жінок в постменопаузі і, особливо, багатодітних. Так, серед 200 хворих, ідентифікованих до жовтня 2015 року, було 195 жінок і лише 5 чоловіків.

Мабуть, ця гендерна відмінність пов'язана з тим, що в обміні кальцію, який витісняється кадмієм, важливу роль у жінок відіграють естрогени, що істотно знижуються в їх організмі в постменопаузі.

Хоча після 1960 року уряд Японії прийняв надзвичайні і усебічні міри щодо зниження забрудненості басейну річки Чінзу, окремі випадки захворювання Ітаї-Ітаї зустрічаються в цьому регіоні і в даний час [7, 124, 125].

Розвиток діабету за впливом кадмію було визначено у численних епідеміологічних дослідженнях. Так, у 196 чоловіків-діабетиків у віці 31–60 років, що працювали на підприємствах з використанням кадмію, було виявлено, що його концентрація в крові і сечі значно вище, ніж у 238 здорових чоловіків того ж вікового інтервалу. Ці відмінності в обох групах не залежали від того, були досліджені курцями чи ні [126].

За даними третього національного огляду з питань охорони здоров'я та харчування (NHANES III), США, у 1207 громадян з діагнозом «діабет II типу», рівень кадмію у сечі підвищено. У 8722 громадян старше за 40 років, у яких діабет не було діагностовано, підвищений рівень сечового кадмія супроводжувався збільшенням рівня глюкози в крові натщесерце. У всіх цих людей кадмій накопичувався в організмі тільки за повсякденним життям [127].

Вельми показові результати дослідження зв'язку між діабетом і високим рівнем кадмію в організмі у 122 чоловіків і жінок у віці 18–85 років – мешканців островів Торресової протоки біля узбережжя Австралії. Ці люди вживають в їжу велику кількість морських молюсків, які становлять найбільшу частину їх раціону і містять дуже багато кадмію – більше, ніж 10 мг/кг. Саме у цій популяції рівень діабету II типу майже чи не найвищий у світі [128, 129].

На сьогодні немає сумніву, що, хоча у виникненні діабету поєднуються генетичні, життєві та екологічні фактори, роль кадмію серед останніх може бути особливо значною.

Хронічна хвороба нирок – діабетична нефропатія – є однією з найсерйозніших ускладнень діабету, яка розвивається у 30–40 % хворих діабетом II типу. Захворення характеризується альбумінурією, гломерулярною гіпертрофією, гломерулосклерозом, тубулоінтерстиціальним запаленням і фіброзом [130, 131]. Все це ускладнюється тим, що кадмій порушує функціонування нирок ще й безпосередньо, навіть у відсутності діабету.

В даний час вже стають зрозумілими, принаймні, деякі молекулярні основи цих порушень. Так, в експериментах *in vitro* на первинній культурі ендотеліальних клітин ниркових клубочків щурів показано, що кадмій, пропорційно його концентрації, порушує експресію білка ZO-1 (Zonula occludens 1). Оскільки цей білок цитоплазматичної пластинки шляхом щільних адгезійних контактів з'єднує клітини між собою, зниження його кількості порушує селективну проникність ендотеліального шару. Він стає проникним до великих молекул – імуноглобуліну G, альбуміну, тощо і це стає важливою причиною порушення функціонування нирок [9, 132].

Крім того, неабияку роль у розвитку діабету і порушенні структури та функціональних властивостей нирок мають вільнорадикальні продукти оксидативного стресу [97, 133].

Суперпозиція цих руйнуючих процесів найчастіше призводить до кінцевої стадії ниркової недостатності.

Вплив кадмію на серцево-судинну систему підтверджується, в основному, аналізом великої кількості епідеміологічних досліджень. Так, узагальнений аналіз двадцяти досліджень, проведених на більш ніж двох тисячах чоловіків і жінок у Європі і США виявив статистично достовірний зв'язок міжішемічною хворобою серця, інсультом, інфарктом міокарду, захворюванням периферичних артерій, атеросклерозом і вмістом кадмію у крові і сечі.

Крім того, значно підвищений вміст кадмію у біологічних рідинах хворих корелював зі змінами ліпідного профілю - більш високими рівнями загального холестерину і ЛПНЩ та нижчим рівнем ЛПВЩ, що могло привести до розвитку коронарних атеросклеротичних бляшок [2, 134]. Наприклад, у дослідженні 65 хворих чоловіків і жінок з діагнозом «захворювання периферичних артерій» у віці 50–70 років і 65 здорових людей тієї ж статі і того ж вікового інтервалу середні концентрації кадмію у крові становили $(0,938 \pm 0,72)$ мкг/л проти $(0,448 \pm 0,30)$ мкг/л відповідно [135].

Якісно аналогічні результати були отримані в експериментах на лабораторних щурах [8].

За результатами медичного огляду 733 чоловіків-пожежників виявлено статистично достовірний зв'язок між рівнем кадмію в крові і одним із запальних маркерів серцево-судинних захворювань – співвідношенням кількості моноцитів і ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) [136].

За думкою багатьох дослідників, окрім добре відомих коронарних факторів ризику серцево-судинних захворювань, кадмій являє собою новий фактор, який шляхом атерогенного впливу може активувати окислювальний стрес, запалення, ендотеліальну дисфункцію, посилений ліпідний синтез, підвищену регуляцію молекул адгезії, дисбаланс простаноїдів, а також зміни синтезу глікозаміногліканів [137].

Майже усі відомі порушення нервової системи, за свідченнями епідеміологічного аналізу, супроводжуються підвищеним вмістом кадмію в організмі [96].

Так, у період з 1977 по 2012 рік у США та країнах Європи було обстежено 952 дитини середнього та старшого шкільного віку які вели повсякденний спосіб життя. Концентрація кадмію в їх волоссі при нормі, в середньому, 0,25 мкг/г, була підвищена, теж, в середньому, в 1,5 рази. Неврологічні розлади у них виражалися в широкому діапазоні порушень.

Найчастіше це була неадаптивна поведінка в класі. У деяких – відстороненість, проблеми уваги, зниження візуально-моторних навичок, дислексія. Їхній I.Q. відповідав молодшому віку. У інших дітей – гіперактивність, агресія, проблеми з соціалізацією в колективі. І в результаті у всіх – порушення навчання.

У молодих людей, які мали в дитинстві ці порушення, поведінкові труднощі зберігаються і в дорослому віці.

У дорослих робітників, які протягом довгого часу зазнають професійного впливу кадмію, а концентрація кадмію в сечі підвищена, потерпають поліневропатією. Вона включає зниження уваги, пам'яті і психомоторної швидкості. У деяких виникає гіпосмія – зниження нюху, в інших аносмія – повна його відсутність. В середньому, 90% робітників страждають на головний біль, 42% – запамороченням, 21% – м'язовою слабкістю, 16% мають атрофію головного мозку. Вони скаржаться на проблему щодо рівноваги та концентрації уваги. Характерною проявою кадмієвої токсичності є периферична нейропатія [138, 139].

У старечому віці багатьох з цих людей очікує різноманітна органна недостатність, включаючи гострий паркінсонізм, хвороби Паркінсона, Альцгеймера та інші вікові нейропатії [4, 140].

Основа нейротоксичності кадмію на цей час не повністю зрозуміла. Але розглядаючи кадмій, як нейромедіатор, який може або стимулювати, або інгібувати окремі метаболічні шляхи, логічно припустити декілька механізмів.

До них відносяться індукований кадмієм апоптоз клітин нейронів, що опосередкується за дію АФК порушеннями мітохондріальної Ca^{2+} -сигналізації і Ca^{2+} -мембранних каналів. Накопичення кадмію в мозку, очевидно, змінює

експресію генів. Крім того, кадмій має естроген-подібний ефект, який може викликати порушення ендокринної системи, впливаючи на гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь в різних аспектах. Суперпозиція цих ефектів повинна приводити до порушення нейрогенезу і розвитку нефропатій [141, 142].

Остеопороз, вперше виявлений при дослідженні хвороби Ітаї-Ітаї, взагалі є характерною ознакою отруєння кадмієм, хоча і виявляється в залежності від тривалості та рівня накопичення кадмію в організмів різному ступені. На сьогодні молекулярні механізми цього порушень структури і властивостей кісток добре вивчені як в епідеміологічних дослідженнях, так і в експериментах з лабораторними тваринами.

Так, у більш, ніж 2000 жителів забруднених кадмієм регіонів поблизу металургійних заводів в Європі та Китаї були виявлені зниження щільності кісток з підвищеною частотою їх переломів, що корелювало з вищим за нормою рівнем кадмію в крові, нижчим – вітаміну D і кальцію, наявністю кадмію у сечі та гіперкальціурією [3, 143–145].

У 3-місячних щурів, яких протягом 3 місяців поїли водою з концентрацією Cd^{2+} 50 мг/л, в крові значно підвищились рівні фосфору і паратиреоїдного гормону при суттєвому зниженні рівнів вітаміну D і остеокальцину, а в кістках – лужної фосфатази. Крім того, кадмій стимулював активність остеокластів, руйнуючи колагеновий матрикс в кістках [146].

Ці результати свідчать, що кадмій викликає остеопороз шляхом двох процесів, які йдуть одночасно. По-перше, він руйнує кісткову тканину безпосередньо, витісняючи конкурентним чином кальцій і фосфор з основного компонента мінеральної складової кісток – гідроксиапатиту $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. А вдруге, втручаючись у метаболічні шляхи і спотворюючи їх, він нищить кістки, руйнуючи ще й органічний компонент.

У 2012 році Міжнародне Агентство по Вивченню Рака (IARC) офіційно класифікувала кадмій та його сполуки в якості канцерогенних речовин, які в різних органах людини мають обмежені або достатні докази участі у виникненні малігнізації [147].

Ця класифікація була запропонована на основі великої кількості епідеміологічних досліджень, згідно з якими підвищений рівень кадмію в організмі відіграє важливу роль у розвитку раку легень, передміхурової залози, нирок, печінки, сечового міхура та шлунку [6, 11, 148].

Існує декілька реальних, можливих і ймовірних механізмів виникнення канцерогенезу за дією кадмію.

Підвищений окислювальний стрес сприяє розвитку пухлин. Як було сказано у розділі 1.2.3. індукований кадмієм окислювальний стрес призводить до модифікації канонічних нуклеотидів і інгубує ферменти функціональної системи репарації ДНК, що підвищує рівень мутабільності. Накопичення клітин з пошкодженням ДНК і подальше поділення клітин з мутаціями сприяють розвитку раку.

Крім мутагенезу, втручання вільнорадикальних продуктів окислювального стресу в сигнальні шляхи клітинного циклу і інгібування апоптозу теж призводить до появи популяцій клітин, які можуть перероджуватися у ракові [98, 149].

Кадмій може активувати онкогени c-myc, c-jun, c-fos, які відповідають за проліферацію клітин, а також інгібувати або змінювати експресію генів білків p16, p53, p27, RASSF1 – супресорів різноманітних видів пухлин [12].

Одним з механізмів порушення нормальної експресії генів, що може привести до переродження клітин у ракові, є витіснення іонами Cd^{2+} іонів Zn^{2+} у молекулах, які містять цинкові мотиви пальців і регулюють експресію, зв'язуючись з відповідними доменами ДНК. Це призводить до змін конформації молекул і їхньої активності. Така заміна показана, наприклад, для рецепторів стероїдних гормонів, ферментів TET, які каталізують послідовні етапи деметилювання 5-метилцитозину ДНК, лізин деметилази пістону, що приймає участь у регуляції транскрипції, латентної ендонуклеази MutL α , яка активується у mismatch репарації ДНК та ін. [12, 81, 150].

В останні роки з'ясована і неабияка роль епігенетичних механізмів контролю експресії генів шляхом модифікаційного метилювання ДНК. Причому кадмій

може індукувати як її гіпометилування, інгібуючи ДНК-метилтрансферази за короткочасною експозицією, так і її гіперметилування, підвищуючи активацію ДНК-метилтрансфераз в умовах хронічної експозиції цим металом. Порушення рівня метилування ДНК має дуже негативні наслідки. Наприклад, гіперметилування промоторів генів-супресорів пухлин P16 і RASSF1A призводить до повної втрати їх експресії.

Зміна рівня метилування хроматину в будь-якому напрямку може ініціювати шляхи передачі і змінювати характер сигналів, відповідальних за багато процесів. Так, активація гіперметилуванням промотору казеїнкінази 1 α внутриклітинного сигнального шляху Wnt/ β -catenin, який, окрім інших функцій, регулює розвиток злоякісних клітин і збільшує різноманітність фенотипів злоякісної носоглоткової карциноми.

На цей час вже відомо багато ключових сигнальних шляхів, які пов'язані з раком і активуються за дією кадмію. Серед них HIF-1 α , у якому надекспресія транскрипційного фактора – білка HIF-1 – в значній мірі пов'язана зі зростанням багатьох злоякісних новоутворень і їх метастазів. Порушення регуляції ядерного фактора NF- κ B – універсального транскрипційного фактора, який контролює експресію генів апоптозу і клітинного циклу, призводить, крім запальних та аутоімунних захворювань, до виникнення раку. Постійна активація експресії генів сімейства RAS, які кодують малі G-білки (малі ГТФази) порушує передачу сигналу між клітинами і регуляцію їх ділення, що може привести до зростання пухлини і метастазування. У сигнальному шляху PI3K/АКТ, котрий регулює проліферацію, рост, виживання та апоптоз клітин, беруть участь негативні регулятори – фосфатази PTEN і PHLPP. Вони активують апоптоз и уповільнюють проліферацію клітин пухлин. У багатьох онкологічних захворюваннях активність цих ферментів відсутня, а сам шлях PI3K/АКТ надмірно активований, що сприяє виживанню і проліферації пухлинних клітин [12, 151, 152].

Хоча факти впливу кадмію на ці процеси, які призводять до малігнізації, достовірні і переконливі, їх молекулярні основи остаточно ще не з'ясовані.

Висновки до розділу 1

У розділі дано огляд літератури, яка відноситься до теми цієї дисертаційної роботи. Розглянуто і описано загальні фізико-хімічні властивості кадмію, його розповсюдження в різних регіонах Землі, використання в промисловості і в побуті. Детально представлені наукові дані про джерела походження і шляхи надходження кадмію до організму живих істот, а також його розподілення по органах людини та тварин. Особливу увагу приділено токсичності кадмію і молекулярним механізмам, які її визначають – вплив на структуру і метаболізм біополімерів, індукцію оксидативного стресу, порушення сигнальних шляхів, а також захворюванням, які на даний час можна пов'язати з його дією. Звернуто увагу на ряд ефектів взаємодії кадмію з організмами, які не мають на даний час остаточного пояснення.

Матеріали розділу наведено в таких публікаціях автора [62–64, 67, 73, 75, 82, 83, 92, 145, 146].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини і планування експерименту

2.1.1 Експериментальні тварини і досліджені органи

Експерименти були проведені на класичному модельному об'єкті – щурах Вістар [153]. Були використані самці 3-місячного віку з віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Тварини містилися в клітках, які щодня прибирали і дезінфікували (без тварин) УФ-опроміненням. Тварин годували стандартним раціоном віварію, збалансованим за складом і енергетично.

Було проведено 2 серії експериментів. У першій – *in vivo* – було вивчено вплив кадмію на біохімічні показники на рівні організму – загальні білковий і ліпідний обміни, стан щитоподібної залози, прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, а також розподілення кадмію в серці, печінці, лівих нирці та насіннику і особливості адгезії, міграції та апоптозу фіброblastів, вилучених із шкіри, рогівки, легені, нирки.

У другій серії – *in vitro* – було вивчено показники цитотоксичності кадмію у первинній культурі клітин кісткового мозку за визначенням особливостей їх адгезії, апоптозу і порушень структури ДНК.

В експериментах дотримувались рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно міжнародним принципам Європейської конвенції «Про захист позвоночних животнох, которые используются для экспериментов и других научных целей» [154] і норм біомедичної етики відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [155] зі змінами, внесеними згідно із Законом № 1759-VI [156].

2.1.2 Введення тваринам Cd^{2+} , відбір біологічного матеріалу і культивування клітин з Cd^{2+}

Доза і час дії токсиканту є визначальними параметрами в моделі його впливу на організм. У моделі, що використовується в роботі, ці параметри були обрані, виходячи з даних про середні концентрації кадмію у воді і повітрі звичайного середовища проживання – в сільській місцевості та в промислових містах. Ці концентрації кадмію істотно менше тих, які призводять до виражених патологій, в тому числі, й онкологічних, у людей і тих концентрацій, що використовувалися в більшості модельних експериментів (підрозділ 2.3).

Як було сказано в розділі I.1, в питній воді природних джерел концентрація кадмію зазвичай не перевищує 1 мкг/л, або 1 мкг Cd / 998,5 г води. А його концентрація у повітрі варіює, в середньому, у міських житлових районах поодаль і поблизу металургійних підприємств від 0,1 до 0,5 мкг/м³, що при масі 1 м³ повітря, рівній 1,29 кг, становить (0,08–0,39) мкг Cd / кг повітря.

У зв'язку з цим в першій серії експериментів були прийняті дві концентрації кадмію, що відрізняються в 10 разів і знаходяться на межах значень для води і повітря. Менша становить 0,1 мкг/кг маси/добу (доза I), більша – 1,0 мкг/кг маси/добу (доза II). Їх вводили тваринам внутрішньошлунково через зонд розчинами $\text{CdCl}_2 \times 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ з концентраціями $0,3025 \times 10^{-6}$ М/л і $3,025 \times 10^{-6}$ М/л відповідно [67, 92].

Ці дози близькі до величини MRL – 0,5 мкг Cd/кг/добу при надходженні в організм терміном до року.

Розчини солі і воду об'ємом 1 мл вводили через внутрішньошлунковий зонд щодня після зважування тварин в один і той же час. Оскільки маса тварин протягом експерименту змінювалась, кількість розчину, що вводився, кожного дня перераховували, щоб концентрація Cd^{2+} /кг маси лишалася незмінною. На 15-у і 36-у добу тварин відповідних груп виводили з експерименту й відбирали біологічний матеріал.

Кров поділяли на сироватку й еритроцитарну масу, які використовували не пізніше, ніж через добу після отримання (підрозділи 2.2.1–2.3.4, 2.4.1). Інші органи зважували і поміщали в рідкий азот, що дозволяє зберігати їх до 12 місяців без суттєвої втрати життєздатності [157] для подальших експериментів. В роботі користувалися судами Д'юара об'ємом 50 літрів.

На 15-у і 36-у добу розраховували масовий коефіцієнт (МК) для кожного органа за формулою: $МК = \text{Маса органу (г)} / \text{масу тіла (г)} \times 100\%$ [158].

У другій серії експериментів клітини кісткового мозку висівали в культуральні планшети Nunc з адгезивною поверхнею Nunclon Delta й культивували у середовищі Gibco® α -MEM, що містила 20% Gibco® FBS і розчин Gibco® Antibiotic-Antimycotic solution за умов 37°C, 96%RH, 5%CO₂. Культивування проводили до моменту досягнення клітинами стану моношару з щільністю 90–94 %, після чого проводили заміну культурального середовища на середовище, що містило Cd²⁺ у концентраціях 0,1 та 1,0 мкМ/л. Спостереження за клітинами та відбір матеріалу для дослідження проводили протягом 30 діб кожні 48 годин перед заміною середовища на нове [187].

У Табл. 2.1 надано дані про 60 тварин, використаних в роботі.

Таблиця 2.1

Розподілення тварин в серіях по групах

№ серії	1 серія	Доби введення H ₂ O або Cd ²⁺ тваринам					
		15			36		
		№ групи					
		1	2	3	4	5	6
		H ₂ O	Cd ²⁺ , мкг/кг маси		H ₂ O	Cd ²⁺ , мкг/кг маси	
			0,1	1,0		0,1	1,0
	2 серія	Відбір клітин кожні 48 годин протягом 30 діб					
		Культуральний розчин або концентрація в ньому Cd ²⁺					
		№ групи					
		7		8		9	
		Культуральний розчин	Cd ²⁺ , мкМ				
			0,1		1,0		

Тварини були поділені на 9 груп по 6 особин у кожній піддослідній групі та по 8 – в кожній контрольній групі.

2.1.3 Визначення концентрації Cd^{2+} в органах

Вимірювання концентрації Cd^{2+} проводили в заморожених (підрозділ 2.1.2) кістковому мозку, печінці, нирці, насіннику та шкірі спини з використанням тест-наборів реактивів Measure-iT™ Cadmium Assay Kit (Invitrogen, США) [159].

Підготовка зразків. 2 мл суспензії клітин кісткового мозку ($3,8\text{--}4,2 \times 10^7/\text{мл}$) та 3,5 мл гомогенату насінника розморожували при 37°C у сухому блоці термостату Eppendorf Thermo Stat Plus (Німеччина), а потім диспергували на ультразвуковому гомогенізаторі Fisher Scientific D100 (США) при 23 кГц протягом 2 хвилин.

Зразки нирок, легені, печінки та шкіри розморожували при 4°C , зважували, механічно подрібнювали, гомогенізували на гомогенізаторі Поттера-Ельвейєма у 3,5 мл деіонізованої води (HyClone) та диспергували ультразвуком (23кГц, 2 хвилин) безпосередньо в колбі гомогенізатору.

Гомогенати переносили до алюмінієвих тиглів з промивкою кріопробірок і колби гомогенізатору 500 мкл деіонізованої води (HyClone) та випаровували при 80°C у термостаті з конвекцією повітря до отримання сухого осаду.

Осади зважували на аналітичних вагах Mettler Toledo AT 201 (Швейцарія) з точністю до 0,0001 г.

Осади диспергували у 1 мл фосфатного буферу (PBS, pH7.4, Gibco), переносили до конічної пробірки об'ємом 2,5 мл з двократною промивкою тиглю 500 мкл PBS, диспергували на ультразвуковому гомогенізаторі (23кГц, 2 хвилини). До 2,5 мл суспензії додавали 500 мкл 1 % розчину трипсину (Gibco), залишали на 14 годин при постійному ротаційному перемішуванні на шейкері Invitrogen Hula Mixer (Invitrogen, США) при температурі 37°C .

Через 14 годин суспензії центрифугували при 20000g на центрифугі Ассі Spin Micro (Fisher Scientific, США). 1 мл супернатанту (екстракту) відбирали до

конічної пробірки об'ємом 1,5 мл та проводили вакуумне концентрування (до 150 мкл) при підігріві пробірок до 60 °С. Отриманий сконцентрований екстракт використовували для проведення вимірювання Cd^{2+} . Для вимірювання використовували 100 мкл розчину [64, 187].

Вимірювання кадмію. Підготовку реагентів, що входили до складу набору, до вимірювання проводили згідно з протоколом, викладеним в інструкції до набору.

Вимірювання проводили у 24-лункових планшетах класу «для флуорометричного аналізу» (GE Healthcare). Кожна лунка планшету містила 500 мкл розчину «Working solution», що містить Cd^{2+} -специфічний флуорохром, та 100 мкл розчину зразка. Вимірювання проводили на комп'ютеризованому мікропланшетному флуориметрі BioTek FL-600 (довжина хвилі збудження флуоресценції – 490 нм, довжина хвилі емісії – 520 нм).

Розрахунок вмісту показника проводили, враховуючи вимірювання з використанням ряду стандартних розчинів кадмію (0.00, 0.05, 0.1, 0.5, 5.0, 20.0, 50.0, 100.0 нМ) і розраховували в нМ/мл дослідного розчину з подальшим перерахунком у мкг іонів кадмію на кількість клітин (для кісткового мозку) і мкг іонів кадмію на кг вологої тканини (для печінки, легені, нирок, насінника та шкіри).

2.2. Дослідження показників обміну у сироватці

2.2.1 Визначення показників білкового і ліпідного обміну та Ca^{2+}

Загальні показники обміну визначали в сироватці крові, яку отримували стандартним методом після декапітації тварин під тіопенталовим наркозом [160].

Вміст загального білка, альбуміну, креатиніну, сечовини, холестерину, тригліцеридів і Ca^{2+} вимірювали на біохімічному аналізаторі STAT FAX 1904+ відповідними наборами реактивів фірми Дак-Спектромед (DAC-SpectroMed, Молдова) [75, 92, 161].

2.2.2 Визначення гормонів щитоподібної залози

Вміст тиреотропного гормону (ТТГ) та вільного тироксину (T_4) в сироватці крові визначали на імуноферментному аналізаторі STAT FAX 303+ наборами реактивів фірми Хема-Медика (Хема-Medica Co. Ltd, РФ) [162].

2.3. Дослідження показників оксидативного стресу у сироватці

2.3.1 Визначення вмісту 8-ізопростану

Вміст 8-ізопростану в сироватці крові визначали імуноферментним методом набором 8-isoprostane ELISA Kit (Abcam, USA) за інструкцією фірми-виробника [163].

Підготовка матеріалу для дослідження. До 200 мкл сироватки додавали 2,5 мкл оцтової кислоти та 200 мкл етилацетату. Інтенсивно перемішували на вортексі протягом 1 хвилини. Потім центрифугували при 2000 об/хв протягом 10 хвилин при 22⁰С на центрифугі Duraforce 3000 (Thermo Scientific). Збирали органічну фазу. Процес екстракції повторювали двічі і органічні фази об'єднували.

Екстракти висушували у вакуумі при центрифугуванні (центрифуга Fisher Scientific MicroV, 6000 об/хв) і розчиняли осад в 250 мкл 20 % КОН. Розчин інкубували 60 хвилин при 50⁰С. Потім додавали 325 мкл H₂O (HyClone, Molecular grade water). Доводили рН до 5,5 використовуючи 20% метанову кислоту (додаючи приблизно 15–17 мкл). Додавали етилацетат (1:1), перемішували на вортексі 5 с і центрифугували при 2000 об/хв протягом 10 хвилин при 22⁰С на центрифугі Duraforce 3000 (Thermo Scientific). Збирали верхню фазу, що містила ліпіди, висушували у вакуумі при центрифугуванні (центрифуга Fisher Scientific MicroV, 6000 об/хв). Розчиняли осад в 10 мкл етанолу, додавали 40 мкл «Sample Dilution Buffer» і перемішували на вортексі.

45 мкл отриманого розчину використовували для проведення імуноферментного аналізу (ELISA).

Імуноферментний аналіз проводили в 96-лунковому планшеті з іммобілізованими антитілами до 8-ізопростану і використанням HRP-кон'югату (horseradish peroxidase – пероксидаза хрону) згідно з протоколом, викладеним в інструкції до набору. Принцип методу – абсорбційний.

Вимірювання забарвлення проводили при довжині хвилі 450 нм на мікропланшетному спектрофотометрі BioTek FL-600.

Розрахунок вмісту показника проводили, враховуючи вимірювання з використанням ряду стандартних розчинів 8-ізопростану і висловлювали в пг/мл.

2.3.2 Визначення ступеня карбонілювання білків

Вміст карбонільованих білків в сироватці крові визначали флуориметричним методом набором Protein Carbonyl Content Assay Kit (Cayman Chemical, USA) [164].

Підготовка зразків до вимірювання. До 150 мкл сироватки додавали 150 мкл 20% трихлороцтової кислоти (4 °C). Інкубували 10 хвилин на льоду, а потім центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хвилин при 20 °C на центрифугі Biofuge Fresco (Thermo Scientific). Видаляли супернатант. Промивали осад білку додаванням 200 мкл 100 % ізопропанолу (4 °C) з перемішуванням. Центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хвилин при 2 °C і видаляли супернатант. Повторювали промивку тричі, висушуючи перед кожною осад білку (без видалення з пробірки) протягом 1 години при кімнатній температурі. Суспендували осад у 50 мкл 6М гуанідину та інкубували на сухій бані (Eppendorf ThermoMixer) при 50 °C протягом 1 години. Після інкубації охолоджували зразки до кімнатної температури та розчиняли у 350 мкл «Sample Dilution Buffer». Для вимірювання використовували 100 мкл розчину на кожен лунку планшету, згідно з протоколом, викладеним в інструкції до набору.

Розрахунок вмісту показника проводили, враховуючи вимірювання з використанням ряду стандартних розчинів і висловлювали в наномоль/мл.

$$[\text{Концентрація карбонільованих білків}] = (B \times DF \times sDF) / V,$$

де:

B – кількість карбонільованих білків у зразках згідно калібрувального графіку.

V – об'єм зразку у лунці.

DF – фактор розведення зразку при вимірюванні.

sDF – фактор розведення зразку при підготовці проби.

Вимірювання проводили в планшетах Perkin Elmer OptiPlate-96 для флуориметричного аналізу на комп'ютеризованому мікропланшетному флуориметрі BioTek FL-600 (довжина хвилі збудження флуоресценції – 485 нм, довжина хвилі емісії – 530 нм).

2.3.3 Визначення активності супероксиддисмутази і каталази

Активність супероксиддисмутази (СОД) в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом набором Superoxide Dismutase Activity Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, USA) за інструкцією фірми-виробника [165].

Визначення активності СОД проводили в 96- лункових планшетах Perkin Elmer OptiPlate-96 для колориметричного аналізу. У кожну лунку вносили 20 мкл охолодженої на льоду сироватки, 200 мкл «WST working solution» і 20 мкл «Enzyme working solution». У контрольні лунки замість сироватки вносили 20 мкл «Dilution Buffer». Перемішували суміш піпетуванням і інкубували 20 хвилин при 37 °C.

Колориметрію проводили при довжині хвилі 450 нм на планшетному спектрофотометрі BioTek FL-600. Вимірювання проводили двічі з затримкою між вимірами 15 хвилин. Перед другим виміром планшет струшували протягом 3 сек.

Вміст показника розраховували, виконуючи вимірювання з використанням стандартного розчину СОД і висловлювали спочатку в Му / мл досліджуваного розчину.

$$[\text{Активність SOD}] = (B/(T2-T1) \times V) \times D = \text{мкмоль/мл/хв},$$

де:

B – кількість SOD в нмоль згідно калібрувальних вимірів;

T1 – час першого вимірювання, хв.;

T2 – час другого вимірювання, хв.;

V – об'єм внесеного в лунку зразка, який вимірюється;

D – фактор розведення зразка, який вимірюється.

Активність каталази в сироватці визначали спектрофотометричним методом набором Catalase Assay Kit (Abcam, США) за вказівками фірми-виробника [166].

Вимірювання проводили в планшетах Perkin Elmer OptiPlate-96 для колориметричного аналізу. 20 мкл сироватки вносили в лунки і доводили об'єм до 50 мкл «Assay Buffer».

Проведення кольорової реакції. До досліджуваних проб додавали 12 мкл H₂O₂, перемішували і інкубували 30 хвилин при 25⁰С, а потім додавали 10 мкл «Stop Solution» для зупинки реакції. Потім в кожну лунку вносили 50 мкл розчину «Developer Mix», що містить 46 мкл «Assay Buffer», 2 мкл «OxiRed™ Probe» і 2 мкл «HRP solution». Інкубували суміш 10 хвилин при 25⁰С, після чого колориметрували при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометрі BioTek FL-600. Активність каталази розраховували за формулою:

$$[\text{Активність каталази}] = B / (30 \times V) \times D = \text{нмоль/мл/хв} = \text{Му/мл},$$

де: B – кількість (нмоль) H₂O₂, яка розкладена згідно зі стандартною кривою;

V – кількість досліджуваної проби, що вноситься в лунку, мл;

30 – час реакції, хв.;

D – фактор розведення дослідної проби.

2.4. Вилучення з органів клітин і вивчення їх властивостей

2.4.1 Вилучення з органів і культивування фібробластів

Клітини первинної культури фібробластів отримували з лімбальної області рогівки, шкіри спини, правої легені і лівої нирки. Для одержання клітин використовували біоптати цих органів, які отримували в асептичних умовах після присиплення тварин. Виділення клітин з біоптатів проводили з використанням стандартних протоколів [167–169].

10 мг подрібнених біоптатів кожного з органів у 2 мл безсироваткового поживного середовища Quantum 333 «для фібробластів» (РАА, Австрія), яке містило 0,4 мг колагенази І типу з *Clostridium histolyticum* (Sigma, США), 1 мМ CaCl_2 і 0,33 мМ MgCl_2 інкубували 30 хв при 37°C. Клітини, що вийшли із тканин, осаджували центрифугуванням на центрифугі Thermo Scientific Duraforce 200 при 500 об/хв.

Кількість виділених клітин та їх життєздатність визначали, використовуючи вітальний барвник трипановий синій [170, 171] на автоматичному лічильнику клітин Invitrogen Countess. В середньому в отриманому осаді вміст клітин, які використовуються для досліджень *in vitro*, становила $1,65 \times 10^6$ клітин/мл, а життєздатність 86 %.

З огляду на гетерогенність популяції клітин досліджуваних органів, було проведено імуномагнітну сепарацію клітин з використанням магнітних штативів Invitrogen Dyna Magnet і гранул Anti-Fibroblast Micro Beads для позитивної сепарації клітин [170, 172–174]. Виділені фібробласти були розділені на групи для наступних досліджень.

2.4.2 Вилучення і культивування клітин кісткового мозку

Клітини кісткового мозку отримували з губчатої речовини діафізів великої стегнової кістки лабораторних тварин за методикою [175] у модифікації [176].

Стегнові кістки очищали від сухожиль, зв'язок та м'язів; епіфізи видаляли. За допомогою голки шприця діяфізи промивали 3 мл розчину інактивованої FBS (Gibco®), що містив 25 мМ EDTA. Отриману суспензію фільтрували через нейлоновий фільтр з діаметром пор 70 мкм, центрифугували при 200 g протягом 5 хвилин на центрифугі Micro Centrifuge Micro V (Fisher Scientific). Супернатант видаляли й отриманий осад перерозчиняли у 3 мл розчину 25 мМ EDTA у FBS. Аналіз життєздатності клітин у первинній культурі проводили за допомогою автоматизованого лічильника клітин Invitrogen Countess після вітального фарбування трипановим синім [172, 177]. Життєздатність первинної культури складала 87 %.

2.4.3 Визначення адгезійної і міграційної здатності та апоптозу фібробластів

Для оцінки адгезійної здатності фібробластів первинної культури використовували Cyto Select™ Cell Adhesion Assay Kit [178].

Готували клітинну суспензію, що містить $0,5 \times 10^6$ клітин/мл, та додавали 150 мкл суспензії у кожну лунку 24-лункового планшету з покриттям із колагену I типу, що був попередньо витриманий 10 хв при кімнатній температурі в асептичних умовах. Планшет інкубували 60 хв у CO₂ інкубаторі. По завершенні інкубації обережно аспірували культуральне середовище та промивали кожну лунку 4–5 разів 250 мкл PBS. Після останнього промивання, аспірували PBS та додавали 200 мкл розчину клітинного барвника, інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Аспірували розчин барвника та промивали кожну лунку 4–5 разів 500 мкл деіонізованої води. Після останнього промивання давали планшетам висохнути. Проводили колориметричну оцінку кількості клітин, що прикріпилися, за допомогою мікропланшетного рідеру Bio-Tek FL600 (OD = 560 нм).

Оцінку міграційної здатності фібробластів проводили за допомогою трансвеллів із діаметром пор 8 мкм CytoSelect™ [179].

У стерильних умовах поміщали трансвелли до 24-лункового планшету та змочували полікарбонатну мембрану додаючи 300 мкл теплового культурального середовища, що не містить сироватки. Інкубували протягом 1 год, після чого рідину аспірували. Додавали 500 мкл середовища, що містить 10% сироватку, до нижньої камери. Готували клітинну суспензію, що містить $0,5 \times 10^6$ клітин/мл у середовищі без сироватки. Додавали 300 мкл суспензії клітин у верхню камеру трансвеллів та інкубували 48 годин у CO₂ інкубаторі. Аспірували середовище з верхньої камери, бавовняними паличками видаляли надлишок рідини та клітини з верхньої поверхні трансвеллів. Переносили вставні камери у чистий планшет з 400 мкл розчину фарбника та інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Акуратно промивали вставки у стаканчику з водою, після чого давали їм висохнути на повітрі. Переносили кожну вставну камеру до порожньої лунки у планшеті та додавали по 200 мкл розчину для екстракції, інкубували 10 хв на шейкері. Переносили 100 мкл кожного зразка до 96-лункового планшету та оцінювали кількість клітин, які мігрували, колориметрично за допомогою мікропланшетного рідеру Bio-Tek FL600 (OD = 560 нм) [63, 67].

Кількість нормальних фібробластів і фібробластів на ранніх та пізніх стадіях апоптозу визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням цитофлуориметра Millipore PCA із програмним забезпеченням Guava Millipore Software 6.0.2 за допомогою тест-наборів Guava Millipore Nexin [180].

Принцип методу заснований на взаємодії клітин з Ca²⁺-залежним білком, анексином V, який у наборі Guava Millipore Nexin кон'югований з флуорохромом фікоеритрином – PE, і барвником 7-аміно-актиноміцином D (7-AAD) [181].

Анексин V має високу спорідненість до фосфоліпідів, які зазвичай знаходяться у внутрішньому шарі плазматичної мембрани, а на ранніх стадіях апоптозу переміщуються на її зовнішню сторону, де зв'язуються з анексином V, що дозволяє визначити мертві клітини.

Флуорохром 7-AAD в нормі виводиться з живих клітин та клітин на ранніх етапах апоптозу. При порушенні мембран він залишається у клітині, взаємодіючи

з дволанцюговими молекулами ДНК в областях, збагачених GC-парами і, таким чином, є індикатором пізніх стадій апоптозу.

Для проведення аналізу до 100 мкл суспензії клітин додавали 100 мкл попередньо підігрітого до кімнатної температури стандартного розчину реагенту Guava Nexin Reagent. Зразки витримували у темряві протягом 20 хв для забарвлення, після чого проводили цитофлуориметричний аналіз та візуалізацію флуоресцентною мікроскопією. За допомогою аналізу можна визначити три популяції клітин, які знаходяться на різних стадіях апоптозу (Табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Взаємодія флуорохромів з клітиною на різних стадіях апоптозу

Стан клітин	Флуорохроми, які взаємодіють з клітиною	
	Анексин VPE	7-AAD
Норма	-	-
Ранні стадії апоптозу	+	-
Пізні стадії апоптозу	+	+

2.4.4 Визначення вмісту колагену і глікозаміногліканів в культурах фібробластів

Найважливішим показником життєздатності клітин є характер і рівень їх метаболічної активності. Специфічними для фібробластів є продукція структурних біополімерів, в першу чергу, колагенів та глікозаміногліканів (ГАГ). Тому саме загальний вміст кожного з типів цих макромолекул у культурах фібробластів, вилучених з шкіри, рогівки, легені, нирків і використали для оцінки впливу кадмію на метаболізм клітин.

Вміст загальних колагену та ГАГ визначали після культивування фібробластів протягом 96 год у поживному середовищі Quantum 333 у 6-лункових планшетах. Зміна середовища проводилася через 24 год після висіву після закріплення клітин на підложжі.

Для визначення вмісту загального колагену в культурі, фібробласти знімали з підложжя трипсинізацією, після чого інкубували підложжя із колагеназою I типу у розрахунку 2 мг на підложжя у середовищі 1X PBS Dulbecco, що містило 1 mM CaCl_2 , 0,33 mM MgCl_2 протягом 30 хв при 37°C. Після цього інкубаційну суміш об'єднували із суспензією клітин, та визначали вміст колагену.

Для цього аліквоти досліджуваної суміші поміщали у скляні ампули та додавали 9 н HCl у відношенні 1:1. Ампули запаювали та проводили гідроліз протягом 6 годин при 130°C. Отримані гідролізати нейтралізували розчином 1н NaOH, доводили до фінального об'єму та фільтрували. Отримані фільтрати використовували для визначення вмісту гідроксипроліну, за кількістю якого можна судити про вміст колагену у розчині.

Метод базується на утворенні червоного хромогену при конденсації продукту окислення гідроксипроліну хлораміном Б з дамінбензальдегідом (ДАБА).

У лунки 96-лункового планшету додавали 130 мкл досліджуваного розчину і 60 мкл розчину хлораміну Б, та витримували 20 хв при кімнатній температурі. У цей час додавали 30 мкл н-пропанолу. Після 20 хв витримування додавали 60 мкл розчину ДАБА. Отриману суміш нагрівали у повітряному термостаті 20 хв при 60°C.

Забарвлені проби охолоджували до кімнатної температури та проводили колориметричне визначення вмісту гідроксипроліну на мікропланшетному рідері Bio-Tek FL600 при $\lambda = 540$ нм.

Кількість колагену визначали по калібрувальному графіку розчинів L-гідроксипроліну, розраховували масу колагену, використовуючи коефіцієнт 7,86 і виражали у нг на 1 клітину [182].

Для визначення вмісту в культурі загальних ГАГ клітини осаджували центрифугуванням, трипсинізували, після чого інкубували підложжя із сумішшю гіалуронідази та хондроїтинази ABC – по 2,5 мкг (1:1) на підложжя у 1X PBS Dulbecco, протягом 30 хв при 37°C. Після цього інкубаційну суміш об'єднували із суспензією клітин, та у отриманій суміші визначали вміст ГАГ.

Про сумарну концентрацію у зразках компонентів ГАГ – гіалуронової кислоти та хондроїтинсульфатів – судили за вмістом D-глюкуронової кислоти за допомогою реакції із карбазолом.

У лунки 96-лункового планшету додавали 60 мкл досліджуваного розчину та 130 мкл охолодженої сірчаної кислоти, що містить 0,025 М кристалічного тетраборнокислого натрію. Після перемішування дно планшету нагрівали протягом 10 хв на киплячій водяній бані та охолоджували до кімнатної температури. Додавали 15 мкл 0,125 % розчину карбазолу у абсолютному етанолі, та знову нагрівали у киплячій водяній бані протягом 15 хв.

Планшет охолоджували та колориметрували на мікропланшетному рідері Біо-Тек FL 600 при $\lambda = 530$ нм. Сумарну концентрацію гіалуронової кислоти та хондроїтинсульфатів визначали калібрувальним графіком розчинів D-глюкуронлактону, розраховували із використанням коефіцієнту перерахунку 2,0, та виражали у нг на 1 клітину [183].

2.4.5 Визначення адгезійної здатності і апоптозу клітин кісткового мозку

Для оцінки адгезійної здатності клітини кісткового мозку, отримані, як указано у розділі 2.4.2, висівали в культуральні планшети Nunc з адгезивною поверхнею Nunclon Delta й культивували у середовищі Gibco® α -MEM, що містила 20 % Gibco® FBS і розчин Gibco® Antibiotic-Antimycotic solution за умов 37°C, 96 % RH, 5 % CO₂.

Культивування проводили до досягнення клітинами стану моношару з щільністю 90–94 %, після чого проводили заміну культурального середовища на інше, яке містило Cd²⁺ у концентраціях 0,1 та 1,0 мкМ/л. Спостереження за клітинами та відбір матеріалу для дослідження проводили протягом 30 діб кожні 48 годин перед заміною середовища на нове.

Оцінку ступеня адгезії клітин (розділі 2.4.3) і щільності культури проводили за допомогою фазово-контрастної мікроскопії на інвертованому мікроскопі Zeiss Telaval 31 [187].

Кількість нормальних клітин кісткового мозку і клітин на ранній та пізній стадіях апоптозу визначали методом проточної цитофлуориметрії, як викладено у підрозділі 2.4.3.

Підрахунок нормальних і апоптичних клітин проводився за допомогою The Guava Nexin Software Module автоматично.

2.5. Дослідження порушень структури ДНК у клітинах кісткового мозку

2.5.1 Визначення кількості мікроядер у клітинах

Мікроядра в еукаріотичній клітині є важливим показником апоптозу. Вони формуються з ділянок хромосом, які позбавились центромер в результаті структурних порушень. Мікроядра не включаються у клітинні ядра, оскільки містять лише розрізнені частини повного геному, в яких ДНК знаходиться в ушкодженному стані [184]. На Рис. 2.1 наведені фотографії позначених стрілками мікроядер, які знаходяться у клітинах кісткового мозку.

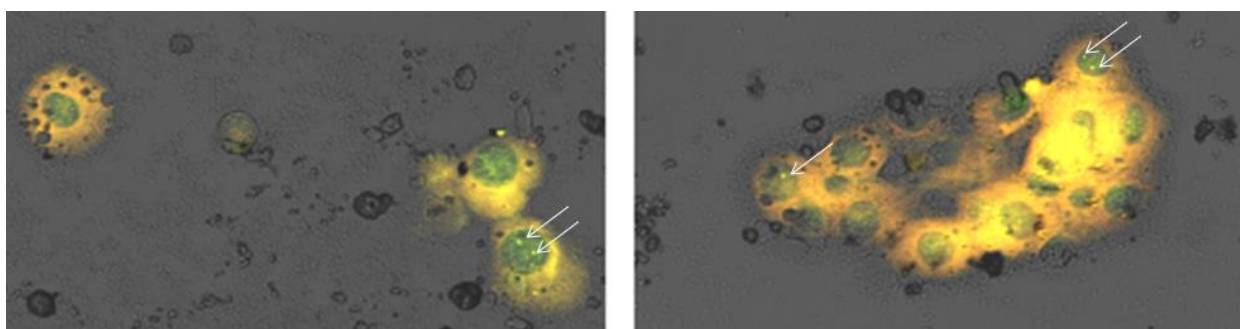


Рис. 2.1 Мікроядра в ядрах клітин кісткового мозку. Експеримент *in vitro*

Для виявлення мікроядер клітини фіксували на скляних слайдах і забарвлювали ДНК – специфічним фарбником акридиновим помаранчевим [185]. Клітини інкубували з 0,25 % розчином трипсин-EDTA протягом 10 хвилин при 37⁰С, після чого формували їх моношар на скляному слайді. Слайди занурювали у

100 % метанол на 15 хвилин, а потім – у фосфатний буфер, що містив акридиновий помаранчевий (0,66 % K_2HPO_4 та 0,32 % KH_2PO_4 , pH 6,4–6,5, 12 мг барвника/100 мл буферу) і витримували протягом 1 хвилини у темноті за кімнатної температури. Надлишок барвника видаляли витримкою слайдів у фосфатному буфері, що не містив барвника, протягом 15 хвилин. Краплі видаляли з поверхні слайду центрифугуванням у центрифугу Arrayit Microarray (3000 об/хв, 10 сек). Слайди зберігали в темному місці [232, 233].

Флуоресцентний барвник акридиновий помаранчевий (АП) проникає всередину клітини, де зв'язується з ДНК. В результаті зв'язування з подвійною спіраллю АП випромінює у зелено-жовтому спектрі, тоді як зв'язуючись з одноланцюговою ДНК, молекули АП взаємодіють між собою через стекінг-взаємодії. В результаті цього спектр зміщується в червону область, що і визначається мікроскопіюванням. Слайди аналізували на флуоресцентному мікроскопі Olympus IMT2 (Японія) за $\lambda E_x = 488$ нм та $\lambda E_m = 605$ нм.

Клітини з неушкодженою ДНК і з високим ступенем її пошкодження різко відрізняються забарвленням (Табл. 2.3, Рис. 2.2).

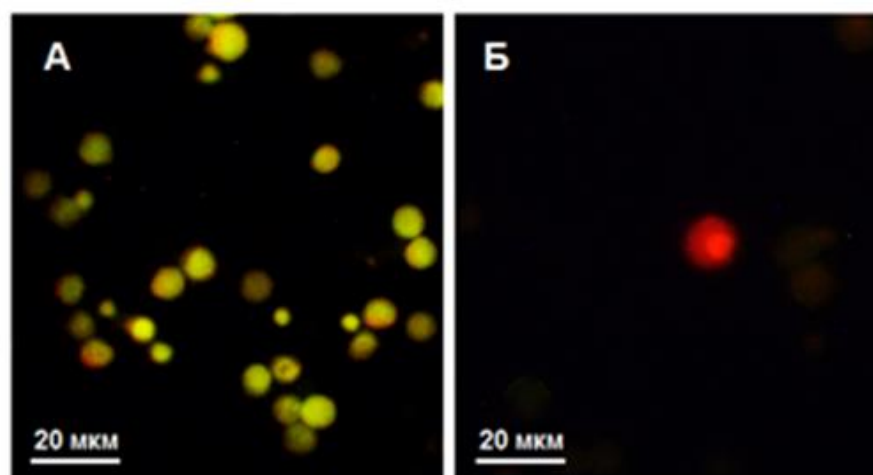


Рис. 2.2 Флуоресценція барвника акридинового оранжевого, пов'язаного з неушкодженою (А) і ушкодженою ДНК (Б) в ядрах клітин кісткового мозку з мікроядрами. Експеримент *in vivo*

Забарвлення клітин з неушкодженою і ушкодженою ДНК

ДНК	Колір клітин
Неушкоджена	Зелений та жовтий різних відтінків
Ушкоджена	Клітини з мікроядрами містять чітко оформлені, сферичні, яскраво-червоні включення у ядрі

Проводили фотодокументування та підрахунок по 2000 клітин у кожній дослідженій групі.

2.5.2 Визначення ступеню фрагментації ДНК у клітинах

Для оцінки ступеню фрагментації ДНК клітини були іммобілізовані в агарозному гелі на скляних слайдах Comet Slides™ з подальшим Комет-аналізом за протоколом [186, 187].

Скляні слайди Comet Slides™ занурювали у 85 % метанол і прокалювали в полум'ї горілки Integra Biosciences Eco (з фільтрацією газу через 0.45 мкм-пористий фільтр) для видалення можливих залишок пилу та органіки. Далі слайди занурювали робочою поверхнею в гарячу 1 % низькоплавку агарозу – LMPA (500 мг у 50 мл PBS з рН 7,4). З нижньої, неробочої сторони слайду, гель механічно видалявся, після чого слайди залишали на просушку при кімнатній температурі до використання.

Клітини інкубували з 0,25 % розчином трипсин-EDTA протягом 10 хвилин при 37 °С. Суспензія клітин з концентрацією 1×10^4 у 10 мкл середовища змішувалась з 75 мкл 0,5 % LMPA (500 мг у 50 мл PBS з рН 7,4) триразовим повільним піпетуванням. На слайд під покривне скельце обережно, запобігаючи утворенню бульбашок повітря, наносили отриману суміш клітин з LMPA і залишали при 4 °С у темному місці на 7 хвилин. Після полімерізації агарози покривне скельце обережно знімали і наносили третій шар агарози – 80 мкл LMPA з повторенням процедури охолодження для полімерізації.

Слайди поміщали в лізуючий розчин (2,5 М розчин NaCl, що містив 100 мМ EDTA, 10 мМ Trizma-base, рН 10,0), який за 2 години до використання нагрівали

до 37 °С і додавали 1 % Triton X-100 та 10 % DMSO. Після змішування компонентів лізуючий розчин охолоджували 4°С.

Далі слайди розташовували в боксі для горизонтального електрофорезу (Mupid-exU), заливали буфером для електрофорезу (розчин 10 н NaOH з додаванням 20 мМ EDTA, рН 13,2), після чого залишили на 20 хвилин. Електрофорез проводили при 300 мА протягом 30 хвилин.

В електричному полі уламки ДНК мігрують в бік аноду, утворюючи трек - розтягуючись у так званий «хвіст комети», тоді як великі молекули й інтактні хромосоми залишаються в «голові комети» – Рис. 2.3.

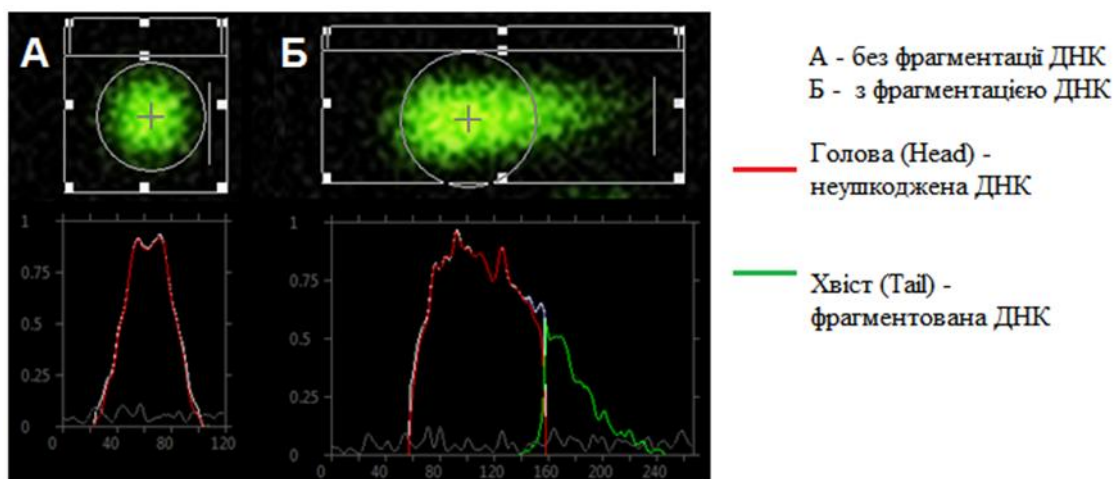


Рис. 2.3 Фотографії електрофоретичного розділення ядерної ДНК (зверху, А, Б) та її треків після програмної обробки (унизу)

Треки ДНК фарбували пропідій йодидом аналізували на флуоресцентному мікроскопі Olympus IMT2 ($\lambda E_x = 473$ нм, $\lambda E_m = 535$ нм), використовуючи програмне забезпечення CASP lab [188].

2.5.3 Визначення концентрації одноланцюгової ДНК у клітинах

Визначення концентрації одноланцюгової ДНК у клітинах проводили з використанням набору реагентів Qubit® ssDNA Assay Kit [189].

ДНК виділяли із суспензії клітин (1×10^4 у 10 мкл середовища) набором реактивів «Syntol® S-Сорб». До 100 мкл суспензії клітин додавали 300 мкл лізуючого розчину, перемішували на вортексі прогрівали за температури 65°C у сухому блоці термостату Eppendorf ThermoStat Plus протягом 5 хвилин.

В пробірки додавали 30 мкл ретельно перемішаної суспензії сорбенту, після чого перемішували на вортексі і залишали відстоюватися протягом 2 хвилин. Процедура повторювалася двічі. Далі суміш центрифугували за 5000 об/хв протягом 1 хвилини (Biofuge Fresco), надосадову рідину видаляли, до осаду додавали 300 мкл «відмиваючого розчину № 1». Процес центрифугування повторювався двічі, надосадову рідину видаляли.

До отриманого осаду приливали 500 мкл «відмиваючого розчину № 2», центрифугували за вищезазначених умов, процес відмивки «розчином № 2» повторювалися двічі.

Осад, що залишився, просушували у сухоповітряному термостаті за температури 65°C протягом 5 хвилин. Осад розчиняли в 300 мкл «розчину для елюції», перемішували на вортексі і прогрівали на сухій бані за температури 65°C протягом 5 хвилин. Розчин центрифугували за 13000 об/хв протягом 2 хвилин. Надосадову рідину, що містить ДНК, переносили у чисті пробірки, протестовані на наявність ДНК-аз.

10 мкл отриманого розчину ДНК змішували у 96-лунковому планшеті з 190 мкл «Qubit® working solution» – розчином флуоресцентного, специфічного до одноланцюгової ДНК реагенту «Qubit® Reagent» у буфері «Qubit® ssDNA» у співвідношенні 1:200. Суміш витримували у темряві протягом 2 хвилин. Вимірювання проводили на мікропланшетному флуориметрі Bio-Tek FL600 (Bio-Tek, USA) за $\lambda E_x = 465/20$ нм і $\lambda E_m = 530/25$ нм у 96-лункових планшетах «GE-Healthcare Imaging plate».

Концентрацію одноланцюгової ДНК розраховували, використавши стандарти одноланцюгової ДНК з набору і відображали у пг/мкл суспензії клітин.

2.6. Математична обробка експериментальних результатів

Статистичну обробку результатів вимірювань проводили за програмою Origin Pro 8. Перевірку нормальності – за Шапіро – Уїлкі. Використовували парний Т-тест. Вірогідними вважали результати з $p \leq 0,05$ [190].

Лінії змінного середнього на графіках розраховували в Excel по [191].

Висновки до розділу 2

В розділі описано моделі і експериментальні методи, які були використані в дисертаційній роботі. У першій моделі – *in vivo* – вивчали вплив Cd^{2+} на організм щурів, їх органи, фібробласти і клітини кісткового мозку, у другій – *in vitro* – цей вплив на клітини кісткового мозку в процесі їх культивування. Для отримання експериментальних даних використовували наступні методи: центрифугування, цитометрію, проточну цитофлуориметрію, імуноферментний та комет-аналізи, спектрофотометрію, ультрафіолетову, флуоресцентну та фазово-контрастну інвертовану мікроскопію. Для вимірювання біохімічних показників використовували набори фірм реактивів Measure-iT™ Cadmium Assay Kit (Invitrogen, США), Дак-Спектрмед (DAC-SpectroMed, Молдова), Хема-Медика (Xema-Medica Co. Ltd, РФ), 8-isoprostane ELISA Kit (Abcam, USA), Protein Carbonyl Content Assay Kit (Cayman Chemical, USA), Superoxide Dismutase Activity Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, USA), Catalase Assay Kit (Abcam, США), CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit, Qubit® ssDNA Assay Kit, Syntol® S-Сopб та ін. Проведено математичну обробку отриманих результатів загальноприйнятими методами.

Ці методи відображені в публікаціях автора [64, 67, 75, 92, 170, 187].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив Cd^{2+} на масу тварин і масові коефіцієнти органів

На Рис. 3.1 відображені динаміки мас щурів, які протягом 15 та 36 діб отримували використані дози Cd^{2+} у порівнянні з контролем. Експериментальні значення, наведені на малюнку, у період з 1-ої по 15-у добу є середнім по групах 2, 3, 5 і 6, а у період з 15-ої по 36-у - по групах 5 і 6. По цим значенням побудовані і лінії змінного середнього. Контролем у період з 1-ої по 15-у добу середні значення мас груп 1 і 4, а контролем у період з 15-ої по 36-у добу – маси групи 4.

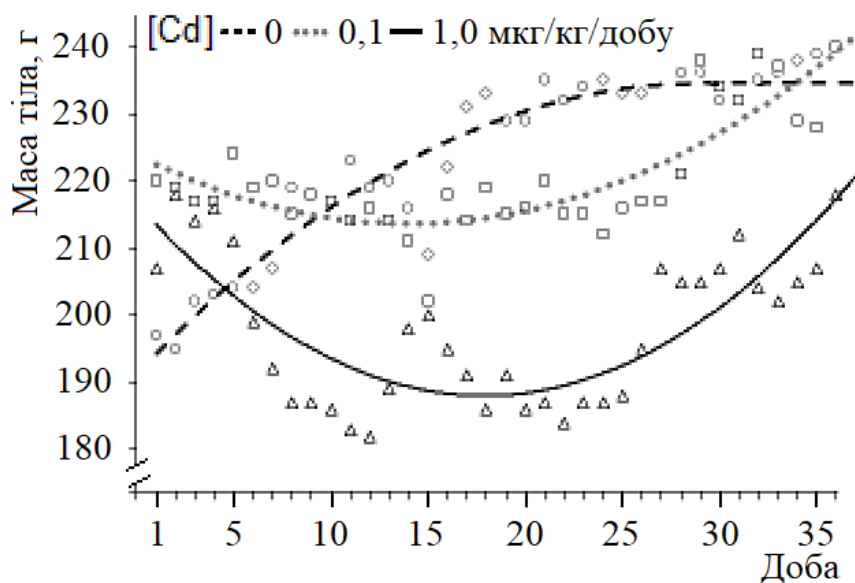


Рис. 3.1. Динаміки мас щурів, які щоденно протягом 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг /кг маси тіла.

Відповідно до найбільш поширеної періодизації постнатального онтогенезу щурів лінії Вістар, у молодих 3-місячних тварин, що знаходяться в репродуктивному періоді, середній щоденний приріст маси тіла становить, в середньому, 0,15–1,5 % [192]. В Табл. 3.1 наведені розраховані за кривими Рис. 3.1 прирости маси у досліджених тварин протягом експерименту. Як видно, у

контрольних щурів він відбувався безперервно і до 36 доби склав 11 %, що становить 0,3 % на добу і вкладається у стандартні межі.

Таблиця 3.1

Маса тіла (г) та її приріст (%) у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доба	Доза					
	0		0,1		1	
	Маса	Приріст маси між добами	Маса	Приріст маси між добами	Маса	Приріст маси між добами
1	197±3		220±7		207±2	
15	208±4*	1→15: +6	202±5*	1→15: - 8	200±3*	1→15: - 3
36	218±5***	1→36: +11	240±5***	1→36: +9	218±8***	1→36: +5

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою

Введення Cd^{2+} різко змінює динаміку маси тварин. Спочатку, при дії обох доз, їх маса не збільшується, а зменшується, і тільки після досягнення мінімуму починає підвищуватися. В обох випадках приріст маси до 36 доби експерименту у цих тварин нижчий, ніж у контрольних. При цьому виявляється меншим і приріст маси у тварин, які отримували 1 мкг Cd^{2+} /кг маси у порівнянні з тими, які отримували 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси, що вказує на виразну дозову залежність ступеня впливу кадмію на ріст тварин.

В Табл. 3.2 наведено дані про вплив використаних доз Cd^{2+} на маси і масові коефіцієнти печінки, серця та лівих нирки і насінника на 15 і 36 добу експерименту в тих же групах тварин, у яких вимірювали динаміку всієї маси тіла.

Таблиця 3.2

Маса органів (г) та їх масові коефіцієнти (%) у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd²⁺ у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Орган	Доба	Доза					
		0		0,1		1	
		Маса	Масовий коефіцієнт	Маса	Масовий коефіцієнт	Маса	Масовий коефіцієнт
Печінка	1	7,52±0,31	3,82	8,04±0,33	3,65	7,72±0,38	3,73
	15	9,47±0,42*	4,55	9,08±0,40*	4,50	8,52±0,43*	4,26
	36	11,79±0,56*,**	5,41	10,45±0,50***	4,55	9,92±0,41***	4,35
Права нирка	1	1,58±0,09	0,80	1,36±0,11	0,62	1,36±0,08	0,66
	15	1,67±0,12	0,80	1,57±0,10*	0,78	1,50±0,08*	0,75
	36	2,11±0,16*,**	0,97	1,88±0,13***	0,78	1,72±0,12***	0,79
Ліва нирка	1	1,38±0,08	0,70	1,42±0,11	0,64	1,26±0,09	0,61
	15	1,59±0,07*	0,76	1,58±0,09	0,78	1,46±0,11	0,73
	36	2,08±0,12***	0,95	1,83±0,10***	0,76	1,79±0,10***	0,82
Серце	1	1,21±0,07	0,61	1,29±0,06	0,59	1,16±0,07	0,56
	15	1,47±0,10*	0,71	1,49±0,10*	0,74	1,37±0,09*	0,68
	36	1,71±0,12***	0,78	1,73±0,14***	0,72	1,54±0,09***	0,71
Насінник	1	1,90±0,15	0,96	1,58±0,10	0,72	1,47±0,08	0,71
	15	2,29±0,13*	1,10	1,78±0,11*	0,88	1,59±0,09	0,79
	36	2,51±0,15***	1,15	1,94±0,13***	0,81	1,82±0,12***	0,83

Примітка: * – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з 15-ю добою.

Як видно, на відміну від загальної маси тіла, маси всіх досліджених органів зростають на всьому протязі експерименту при обох дозах кадмію. Природно, що в наслідок цього масові коефіцієнти органів за дією кадмію також збільшуються.

Але кадмій все ж впливає і на зріст органів. Збільшення як їх маси за його дією, так і, відповідно, масових коефіцієнтів, відбувається суттєво повільніше, ніж у контролі.

Так, протягом 15 і 36 діб доза 0,1 мкг/кг Cd^{2+} у порівнянні з контролем затримує зростання маси печінки на 13 % і 26,7 %, а доза 1 мкг/кг Cd^{2+} – на 15,5 % і 28,2 % відповідно. Якісно аналогічним чином діє кадмій і на інші досліджені органи – Табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Приріст маси органів (%) у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доза	Доба	Орган				
		Печінка	Права нирка	Ліва нирка	Серце	Насінник
0	15	25,9±3,65	5,7±2,13	15,2±4,11	21,5±3,60	20,5±3,90
	36	56,7±6,35*	33,5±3,08*	50,7±5,68*	41,3±5,19*	32,1±3,74*
0,1	15	12,9±3,32	15,9±3,45	12,7±2,89	15,5±2,72	12,6±3,23
	36	30,0±4,18*	38,2±4,61*	28,9±3,57*	34,1±4,26*	22,8±2,90
1	15	10,4±2,25	10,3±2,12* [#]	15,9±3,20	18,1±2,98	8,2±3,56 [#]
	36	28,5±3,17*	26,5±2,74* [#]	42,0±5,16* [#]	32,7±4,56*	23,8±3,74*

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Отримані результати [75, 92] свідчать про суттєву різницю впливу кадмію на динаміки загальної маси тварин і маси їх паренхіматозних органів. Дійсно, у період до 15-ї доби експерименту їх загальна маса знижується, а маса досліджених органів продовжує зростати, хоча й повільніше, ніж у контролі. Ця розбіжність може бути, мабуть, тільки результатом того, що зниження загальної маси відбувається за рахунок зниження синтезу і/або підвищення розпаду м'язової тканини, в основному, її білків.

Природно, що виявлений ефект пригнічення загального росту тварині затримки росту паренхіматозних органів є, очевидно, інтегральним наслідком втручання кадмію в метаболічні процеси у різних системах органів. Для визначення метаболічних порушень, які виникають за цим втручанням, у крові щурів були вивчені особливості біохімічних показників, що характеризують різноманітні складові загального метаболізму.

3.2. Вплив Cd^{2+} на біохімічні показники метаболізму в крові

3.2.1. Показники білкового і ліпідного обмінів

Результати вимірювання впливу обох використаних доз Cd^{2+} на показники білкового обміну щурів у сироватці крові наведено в Табл. 3.4.

В цих експериментах використовували ті ж самі групи тварин, що і при вимірюванні їх мас, але контролем для груп 2 і 3 була сироватка групи 1, а для груп 5 і 6 – групи 4.

Згідно отриманим даним, вміст загального білка у сироватці знижується до 15-ї доби експерименту на 16 % і 9,5 % за дією 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тварин відповідно. Далі, до 36-ї доби він декілька підвищується і, таким чином, динаміка вмісту загального білка у сироватці тварин якісно співпадає з динамікою їхньої маси. Зменшення вмісту білка у сироватці вказує на зміну його обміну в організмі, що може статися або при зниженні його загального синтезу, або при інтенсифікації розпаду.

З Табл. 3.4 видно, що протягом експерименту динаміка у сироватці креатиніну повністю протилежна динамікам як маси тварин, так і вмісту загального білка в їх сироватці. Так, під впливом дози 0,1 мкг/кг маси тварин вміст креатиніну в сироватці підвищився за 15 діб на 6 %, а до 36-ї доби знизився майже до контрольних значень. За дією дози 1 мкг/кг маси вміст креатиніну у сироватці тварин змінюється аналогічно.

Таблиця 3.4

Вміст загального білка (г/л), альбуміну (г/л), креатиніну (мМ/л) і сечовини (мМ/л) у сироватці крові щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доба	Доза	Показник				
		Загальний білок	Альбумін	<u>Альбумін</u> Заг. білок	Креатинін	Сечовина
15	0	64,8±3,64	36,7±4,47	0,57	90,2±1,94	9,02±0,25
	0,1	54,5±1,41*	28,7±0,42*	0,52	95,7±1,91*	9,30±0,20
	1,0	58,7±2,23* [#]	30,3±1,38* [#]	0,52	86,6±2,80* [#]	8,80±0,20
36	0	62,60±3,93	37,0±2,83	0,59	88,3±3,59	8,58±0,29
	0,1	55,7±2,43*	28,3±0,95*	0,51	90,7±3,59	9,30±0,50*
	1,0	65,4±3,64** [#]	36,7±4,47**	0,50	81,8±2,65*** [#]	8,60±0,30 [#]

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Серед різних причин, які призводять до підвищення рівня креатиніну в крові, дві – це ниркова недостатність і масивне руйнування м'язової тканини, що супроводжується виходом креатиніну з клітин (краш синдром) [193, 194].

Таким чином, принаймні однією з причин зменшення маси тварин на перших етапах дії кадмію може бути стимуляція ним процесів деградації білків м'язової тканини на фоні незмінності, або, навіть, і зниження інтенсивності їх загального синтезу.

На тлі цих змін вміст сечовини, яка є кінцевим продуктом розпаду білків, не змінюється вірогідно при $p < 0,05$ в сироватці протягом всього експерименту, хоча тенденція до її підвищення при дозі 0,1 мкг/кг маси тварин помітна досить чітко. Поряд з підвищеним рівнем креатиніну це може бути ще одним підтвердженням порушення роботи нирок, а саме – клубочкової фільтрації в них [195].

Важливими є знайдені зміни вмісту у загальному білку найбільшої його фракції – альбуміну. За дією дози 0,1 мкг /кг маси тварин протягом усього часу експерименту його концентрація зменшується – і на 36-у добу вона становить

72 % від контролю. Доза 1 мкг/кг маси тварин на 15-у добу зменшує початковий рівень альбуміну на 17 %, а на 36-у добу його концентрація при цій дозі відновлюється до значення контрольної величини. Все це свідчить, що кадмій індукує зміну фракційного складу сироваткових білків.

Виявлені під впливом кадмію зрушення показників білкового обміну в сироватці – гіпопротеїнемія – зсув складу сироваткових білків, підвищений рівень креатиніну, тенденція до підвищення сечовини вказують на перші стадії порушень функцій нирок, а, крім того, ще й печінки [196, 197].

В Табл. 3.5 наведено результати вимірювань концентрації загального холестерину і тригліцеридів у сироватках досліджених тварин. Згідно з ними доза 0,1 мкг Cd^{2+} /кг не впливає на їх вміст за дією кадмію ні протягом 15-и, ні протягом 36-и діб.

Таблиця 3.5

Вміст загального холестерину (мм/л) і тригліцеридів (мм/л) у сироватці крові щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг /кг маси тіла

Доба	Доза	Показник	
		Загальний холестерин	Тригліцериди
15	0	1,13±0,04	0,85±0,06
	0,1	1,15±0,05	0,74±0,08
	1,0	1,15±0,04	0,87±0,14
36	0	1,08±0,03	0,84±0,09
	0,1	1,12±0,04	0,77±0,03
	1,0	1,66±0,03***,#	1,06±0,08***,#

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Але доза 1 мкг Cd^{2+} /кг маси, не впливаючи на ці показники протягом 15 діб, у тварин, які отримували її протягом 36 діб, привела до збільшення вмісту загального холестерину і тригліцеридів у сироватці в 1,5 і 1,3 рази відповідно.

Підвищення цих показників ліпідного обміну – одні з найважливіших чинників хронічних захворювань нирок, причому у хворих підвищена і смертність від серцево-судинних захворювань. І це не кажучи про прямий ризик розвитку атеросклерозу і захворювань коронарних артерій.

Таким чином, порушення ліпідного обміну у тварин, які на протязі 36-и діб отримували 1 мкг Cd^{2+} /кг маси, накладаються на кількісні і якісні зміни у них білкового обміну і підсилюють ризик розвитку ниркових патологій.

Цікаво, що раніше у морських свинок було виявлено аналогічні зміни білкового та ліпідного обміну при дії значно більших доз Cd^{2+} – 2 мг/кг маси протягом 30 діб [198]. Таким чином, накопичення в організмі щурів Cd^{2+} у кількості, у 2000 разів меншій, ніж 2 мг/кг маси і у 5 разів меншій, ніж MRL, призводить до якісно подібних спотворень у них показників загального обміну.

3.2.2. Вміст ТТГ і T_4

Гормони щитоподібної залози регулюють енергетичний баланс організму, впливаючи на всі основні метаболічні шляхи і, в тому числі, на метаболізм ліпідів. Цей вплив охоплює всі стадії обміну ліпідів – використання їх субстратів, синтез і деградацію, а також мобілізацію тригліцеридів жирової тканини. При цьому доведено, що метаболізм тиреоїдних гормонів тісно пов'язаний з функціонуванням нирок і різні його порушення – як гіпо-, так і гіпертиреоз призводять до виникнення численних захворювань [199].

Оскільки у попередніх вимірюваннях виявилось, що кадмій зрушує показники ліпідного обміну в сироватці крові піддослідних тварин, було вивчено в ній вміст цих гормонів в умовах дії Cd^{2+} (Табл. 3.6).

Як видно, доза 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла на 15-у добу не впливає на вміст тиреотропного гормону у сироватці контрольних тварин. Проте, на 36-у добу вона призводить до підвищення вмісту ТТГ у сироватці вдвічі. В той же час доза 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла збільшує концентрацію цього гормону і на 15-у добу – на 82 %, і після цього, за час до 36-ї доби – ще на 38 %.

Що ж йдеться за T_4 , то, у порівнянні до контролю, дози 0,1 і 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин протягом 15-ти діб призводять до зниження концентрації T_4 у сироватці на 22 % і 39 % відповідно. При цьому за дією обох доз тенденція подальшого зниження вмісту T_4 зберігається до 36-ї доби.

Таблиця 3.6

Вміст ТТГ (мОд/мл) і вільного T_4 (пг/л) у сироватці крові щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доба	Доза	Показник	
		ТТГ	T_4
15	0	$0,49 \pm 0,04$	$20,22 \pm 1,30$
	0,1	$0,47 \pm 0,04$	$16,60 \pm 0,30^*$
	1,0	$0,89 \pm 0,27^{***}$	$14,50 \pm 2,10^{***}$
36	0	$0,43 \pm 0,06$	$18,44 \pm 1,11$
	0,1	$0,86 \pm 0,06^{***, \#}$	$17,20 \pm 0,70$
	1,0	$0,70 \pm 0,17^{*, \#}$	$16,10 \pm 1,90$

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Таким чином, від впливом кадмію у піддослідних тварин виникає гіпотиреоїдний стан, при якому, як було показано [200], зменшується кровотік і швидкість клубочкової фільтрації у нирках. Але при цьому, навіть при зсуві абсолютних значень концентрації ТТГ і вільного T_4 , між вмістом цих гормонів у крові зберігається стандартна обернено пропорційна залежність.

Узагальнююча якісна картина спрямованості дії 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла щурів протягом 36-и діб на вивчені показники їх обміну приведена в Табл. 3.7.

Таблиця 3.7

**Спрямованість змін маси та показників обміну у сироватці крові щурів,
які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила
 Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг /кг маси тіла**

Доза	Час між добами	Маса	Заг. білок	Альбумін	Креатинін	Сечовина	Заг. холестерин	Тригліцери ди	TSH	T ₄
0,1	1-15	↓	↓	↓	↑	↑	—	↓	—	↓
	15-36	↑	↑	↓	—	—	↑	↓	↑	↓

Примітка: ↑ – показник зростає; ↓ – показник зменшується; — – показник не змінюється.

3.2.3. Вміст Ca^{2+}

Кальцій є універсальним сигнальним іоном [201] і тому, по суті, неможливо знайти процеси на клітинному рівні, на які не впливав би кадмій, втручаючись у кальцієву сигнальну систему та зв'язуючись з різними кальцій-залежними білковими структурами.

Наприклад, блокуючи кальцієві канали сенсорних нейронів, іони кадмію змінюють сигнали, які по ним проходять, що призводить, зокрема, і до порушення рівня больової чутливості організму [202, 203].

При цьому, незалежно від органу, процесу, сигнального шляху іони кадмію – класичного міметика, через близькість хімічних властивостей здатні імітувати інші двовалентні іони, зокрема, кальцій.

Найбільша кількість кальцію у хребетних – близько 99 % – міститься в гідроксиапатиті кісток [204].

Тому, у високих концентраціях – починаючи від рівня 5–20 мг/кг маси – при тривалому впливі на людину та лабораторних щурів, іони кадмію спроможні витіснити конкурентним чином кальцій з цього біомінералу, являючись важливою причиною розвитку остеопорозу. Цей процес супроводжується і нижчим за нормою рівнем кальцію в крові [144, 205].

Але дослідження на щурах, які протягом 15 і 36 діб щоденно отримували 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} / кг маси тіла, не виявило вірогідних відмінностей концентрації Ca^{2+} в сироватці піддослідних тварин у порівнянні з контрольними, хоча тенденція до її зниження і проглядається – Табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Вміст Ca^{2+} (мМ/л) у сироватці крові щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} / кг маси тіла

Показник	Доба	Доза, мкг Cd^{2+} / кг маси тіла		
		0	0,1	1,0
Ca^{2+} , мМ/л	15	2,17±0,24	2,26±0,13	2,14±0,21
	36	1,98±0,18	1,84±0,41	1,93±0,24

Примітка: відмінності невірогідні ($p > 0,05$) у порівнянні з контролем, між 15-ю і 36-ю добами та між дозами 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Це може свідчити про те, що використані дози Cd^{2+} недостатні, чи ж знаходяться на межі можливості конкурентного витіснення кальцію з мінералізованих надмолекулярних утворень та їх руйнування.

3.2.4. Розподіл Cd^{2+} по органах тварин

В Табл. 3.9 надано результати вимірювання концентрації Cd^{2+} , який накопився в досліджених органах у періоди 1–15 і 15–36 діб його щоденного споживання.

Зрозуміло, що особливості накопичення кадмію в різних органах теж різняться. Отримані результати свідчать, що ця різниця досить суттєва.

По-перше, у найбільшій концентрації кадмій за дією обох доз увесь час експерименту знаходиться у нирках. Важливою причиною цього, можливо, може бути те, що, постійно надходячи в нирки, кадмій поступово порушує клубочкову фільтрацію, знижує ефективність і уповільнює швидкість його виведення. В

результаті цього він накопичується в нирках у більшому ступені, ніж в інших органах і з часом його концентрація зростає теж у більшому ступені. В інших досліджених органах вміст кадмію менший. Можна сказати, що ці органи є «транзитними» шляхами – кадмій, який надійшов і не пов'язався в них, виявляється, в кінцевому підсумку, в нирках.

По-друге, існує чітка дозова залежність вмісту кадмію - в усіх досліджених органах його концентрація в 2,5–3 рази вища за дозою 1,0 мкг/кг маси тіла, ніж за дозою 0,1 мкг/кг маси тіла тварин.

По-третє, виявляється дуже важливий ефект – підвищення в усіх органах протягом експерименту швидкості накопичення кадмію, яку можна оцінити у мкг/кг сирової ваги тканини в добу.

Як видно із Табл. 3.9, у період 15-а – 36-а доба експерименту швидкість накопичення Cd^{2+} за дією 1,0 мкг/кг маси тіла збільшується у порівнянні з 1-ю – 15-ю добою в 6,0; 3,6; 3,2 рази в насіннику, нирках в середньому і печінці відповідно. За дією 0,1 мкг/кг маси тіла виразність ефекту менша – ця швидкість зростає між 15-ю і 36-ю добою в нирках у середньому всього в 1,2; а в печінці – в 2,6 рази. У насіннику ефект і зовсім відсутній.

Знайдений ефект вимагає пояснення.

Іони Cd^{2+} індукують оксидативний стрес, а у клітинах існує ферментна система протидії йому шляхом знешкодження активності цих іонів. Прискорення накопичення кадмію протягом експерименту в усіх досліджених органах якісно подібне. Тому, для з'ясування механізму цього ефекту, у сироватці крові щурів були виміряні загальні показники оксидативного стресу і активності антиоксидантних ферментів, які відображають стан оксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі в цілому.

Таблиця 3.9

Концентрація Cd²⁺ (мкг/кг сирієї ваги тканини) і швидкість його накопичення (мкг/кг сирієї ваги тканини в добу) в органах щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd²⁺ у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Орган	Час між добами	Доза, мкг /кг маси тіла					
		0		0,1		1,0	
		Концентрація мкг/кг тканини	Швидкість накопичення	Концентрація мкг/кг тканини	Швидкість накопичення	Концентрація мкг/кг тканини	Швидкість накопичення
Печінка	1	<0,01	-	<0,01	0,011	<0,01	0,025
	1-15	<0,01		0,16±0,04*		0,38±0,09*,#	
	15-36	<0,01		0,77±0,15***		1,91±0,87***,#	
Права нирка	1	<0,01	-	<0,01	0,029	<0,01	0,045
	1-15	<0,01		0,43±0,12*		0,67±0,29*	
	15-36	<0,01		1,22±0,47***		4,01±1,19***,#	
Ліва нирка	1	<0,01	-	<0,01	0,027	<0,01	0,041
	1-15	<0,01		0,40±0,14*		0,61±0,28*	
	15-36	<0,01		1,01±0,53***		3,87±1,23***,#	
Лівий наслідник	1	<0,01	-	<0,01	0,016	<0,01	0,011
	1-15	<0,01		0,24±0,07*		0,17±0,05*	
	15-36	<0,01		0,61±0,33***		1,55±0,78***,#	

Примітка: * – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd²⁺/кг маси.

3.3. Стан оксидативного стресу

Як виходить з літературного огляду детальні молекулярні механізми оксидативного стресу, який викликає кадмій, остаточно ще не з'ясовані. Однак добре відомі, принаймні, чотири процеси, які мають до цього відношення.

Перший - це конкурентне витіснення кадмієм металів, в першу чергу, іонів кальцію, котрий, в порівнянні з іншими металами, міститься в організмі в

найбільшій кількості, що і приводить до розгортання ланцюгових вільнорадикальних реакцій і зміщення окисно-відновної рівноваги.

Як показано у розділі 3.2.3, використані в даному дослідженні концентрації Cd^{2+} недостатні для витіснення кальцію. Тому цей процес навряд чи відіграє значну роль у зміні проксидантно-антиоксидантної рівноваги.

3.3.1. Вміст 8-ізопростану і карбонільованих білків

Другий механізм впливу кадмію на прооксидантно - антиоксидантну рівновагу – виснаження окислювально-відновних поглиначів – низькомолекулярних ендогенних антиоксидантів, теж зазначених вище, в умовах постійного накопичення кадмію в органах.

Зокрема, показано, що у щурів під дією високих концентрацій кадмію - від 100 до 500 мкМ, як *in vivo* – у печінці, так і при інкубації клітин печінки з кадмієм, вже через 4 години вміст вітаміну С, каротину, відновленого і окисленого глутатіону, загальних тіолів в клітинах істотно знижується [78, 87, 88].

Вільнорадикальні продукти, які при цьому накопичуються, зокрема, супероксидні аніони O_2^* та гідроксильні радикали $^*\text{OH}$ можуть безпосередньо вступати у хімічні реакції окиснювання з вільними амінокислотними залишками білків, або з алифатичними ланцюгами жирних кислот, що входять до складу ліпідів.

Показниками цього процесу були обрані 8-ізопростан і карбонільовані білки.

8-ізопростан, який характеризує ступінь окиснення ліпідів, є простагландиноподібною сполукою – класичним маркером оксидативного стресу, який найчастіше використовується [206]. В клітинах організму ця сполука утворюється шляхом вільнорадикальної пероксидації незамінних жирних кислот, в першу чергу, арахідонової кислоти без участі ферменту циклооксигенази [207].

Карбонільовання білка – це модифікація його амінокислотних залишків шляхом приєднання до їх бічних ланцюгів карбонільної групи $>\text{C}=\text{O}$. За дією

кадмію ця реакція відбувається шляхом взаємодії різних АФК із залишками Ліз, Тре, Про, Глі, Асп і Арг. Можлива також кон'югація залишків Цис, Гіс, Ліз з продуктами перекисного окислення ліпідів, в першу чергу, з гідроксіноненалем (4-ГНЕ) [208].

Будучи найбільш поширеною модифікацією амінокислотних залишків, карбонілювання досить добре відображає внесок окиснювання білків у загальний розвиток оксидативного стресу.

Результати вимірювання обох показників оксидативного стресу у піддослідних тварин за дією кадмію наведені у Табл. 3.10.

Згідно з ними вміст 8-ізопростану у досліджених сироватках при дозі 0,1 мкг/кг маси тварин підвищується незначно до 15 доби і далі, до 36 доби залишається незмінним.

Доза ж 1 мкг/кг маси на 15-у добу підвищує вміст 8-ізопростану у сироватці в півтори рази, а на 36-у – майже втрічі.

Хоча зростання карбонілювання білків у сироватці протягом експерименту відбувається не так значно, як підвищення в ній вмісту 8-ізопростану, все ж на 36-у добу ступінь цього процесу за дозою 0,1 мкг/кг маси підвищується на 42 %, а за дозою 1 мкг/кг маси – 58 %.

Узяті сумісно, ці результати свідчать, що, незважаючи на малі використані дози кадмію, при його регулярному надходженні до організму щурів, оксидантно-антиоксидантне відношення безперервно зсувається у бік розвитку і зростання ступеню оксидативного стресу.

Таблиця 3.10

Вміст 8-ізопростану (пг/мл), карбонільованих білків (нМ/мл) і їх прирости (%) у сироватці крові щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доза, мкг/ кг маси тіла	Показник						
	8-ізопростан				Карбонільовані білки		
	Доба	Вміст, пг/мл	Приріст між добами, %		Доба	Вміст, нМ/мл	Приріст між добами, %
0	15	3,72±0,48	1-15	115	15	13,81±0,66	1-15
0,1		7,01±0,19*				14,37±0,68	
1,0		8,98±0,48***,#				15,67±0,71*	
0	36	3,91±0,65	1-36	104	36	12,07±0,48	1-36
0,1		7,98±0,33***				17,10±1,05***	
1,0		14,49±0,64***,#				19,06±0,90***,#	
				271			58

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

3.3.2. Активності СОД і КАТ

Третій механізм – це пригнічення активності антиоксидантних ферментів кадмієм у широкому діапазоні його концентрацій.

Майже основними ферментами антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза (СОД), яка каталізує перетворення супероксидних аніонів $\text{O}_2^{\cdot-}$ в молекулярний кисень O_2 і пероксид водню H_2O_2 [209] і лізосомальна каталаза (КАТ), яка розкладає пероксид водню, що утворився, на воду і молекулярний кисень [210].

Зниження активності цих ферментів виявлене у великій кількості епідеміологічних і експериментальних досліджень. Наприклад, у працівників скляного і плиткового виробництв, які піддавалося впливу пилу, що містить

металевий кадмій і його оксиди, виявлено підвищена в порівнянні з нормою концентрація кадмію в крові (в середньому, $8,9 \pm 2,8$ мкг/л) і значно знижений рівень загальної активності СОД і GPxs [89].

У Табл. 3.11 наведено результати вимірювання активностей супероксиддисмутази і каталази в умовах 36-добового впливу на організм двох доз іонів кадмію.

Таблиця 3.11

Активності СОД (од/мл/мін) і КАТ (мкМ H_2O_2 /мл/мін) і їх прирости (%) у сироватці крові щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг /кг маси тіла

Доза	Показник							
	СОД					КАТ		
	Доба	Актив-ність	Доби	Приріст між добами	Доба	Актив-ність	Доби	Приріст між добами
0	15	$1,01 \pm 0,24$	1-15	-14	15	$2,71 \pm 0,35$	1-15	61
0,1		$0,87 \pm 0,01$				$4,36 \pm 0,66$		
1,0		$1,17 \pm 0,24^{\#}$		16		$2,81 \pm 0,08^*$		4
0	36	$0,87 \pm 0,05$	1-36	10	36	$3,80 \pm 0,75$	1-36	30
0,1		$0,96 \pm 0,01^*$				$5,11 \pm 0,38^*$		
1,0		$1,04 \pm 0,02^{*,\#}$		20		$3,21 \pm 0,09^{*,\#}$		-16

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Як видно, до 15-ї доби активність СОД за дією 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин зовсім не збільшилася, а за дією 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла незначно підвищилась. У відповідь на дію цих доз на 36-у добу активність цього ферменту підвисилась лише на 10 % і 20 %.

Що ж йдеться до каталази, то тут ситуація ще гірша. Під впливом дози 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин активність КАТ збільшується на 15-у добу на 60 %, потім починає зменшуватися і до 36-ї доби приріст активності падає удвічі.. А за дією дози 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла активність КАТ на 15-у добу практично не змінюється, а на 36-у навіть зменшується – на 16 % у порівнянні з контролем.

Все це свідчить, що важливою причиною наростаючого розвитку оксидативного стресу у тварин при постійній дії іонів кадмію є недостатня активність СОД і КАТ, особливо за дозою 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. Ці результати, як було сказано у розділі 1.2.2 «Огляд літератури» підтверджуються виявленими ефектами пригнічення активності не тільки СОД і КАТ, але й інших антиоксидантних ферментів [79, 80, 89].

Аналогічні результати отримані і в експериментах на лабораторних щурах. Так, введення тваринам кадмію у концентрації 0,4 мг/кг протягом до 45 днів інгібувало активність GPxs та КАТ у печінці, нирках, насінниках та різних регіонах мозку, причому ступінь інгібування збільшувалась з часом експозиції. Як одноразова гостра, так і хронічна дія кадмію у такій же концентрації істотно знижувала активність СОД, КАТ, GPxs в яєчниках самок щурів. На прикладі нервових клітин показано, що кадмій гальмує активність супероксиддисмутази Cu, Zn-СОД, змінюючи вторинну структуру ферменту [80, 90–93].

Механізм впливу кадмію на активність цих ферментів відомий і полягає в прямому зв'язуванні іонів кадмію з молекулою ферменту, що призводить до зміни його вторинної структури й інгібування активності [90, 91].

Таким чином, одна з важливих причин підвищення швидкості накопичення кадмію в органах з часом при його постійному надходженні кадмію в організм (Табл. 3.8), визначається механізмом негативного зворотного зв'язку між концентрацією іонів кадмію і кількістю «працездатних» молекул ферменту з неспотвореною структурою.

Четвертий процес полягає в інгібуванні мітохондріального ланцюга перенесення електронів, який є однією з основних клітинних мішеней кадмію. Саме це інгібування може бути способом генерації АФК. В експериментах *in vitro*

кадмій в широкому діапазоні концентрацій пригнічує комплекси I, III і IV на 20 %, 77 % і 30 % відповідно в мітохондріях печінки, мозку і серця самців морських свинок лінії Данкін–Хартлі. Пов'язуючись з залізовмісними білками цих комплексів і витісняючи з них залізо, кадмій порушує перенесення електронів через комплекси. Це призводить до накопичення нестабільних семіубіхінонів, які переносять електрон на молекулярний кисень, утворюючи супероксидні аніони O_2^{*-} [94, 95]. Останні ж, як було сказано вище, можуть, безпосередньо взаємодіючи з амінокислотними радикалами та аліфатичними ланцюгами жирних кислот, що входять до складу білків і ліпідів, окислювати їх.

3.4. Вплив Cd^{2+} на показники життєздатності фібробластів і клітин кісткового мозку

Міграція, контактне інгібування – зупинка руху та клітинного циклу при зустрічі з іншою клітиною і регуляція чисельності – найважливіші властивості клітин, що визначають процеси ембріогенезу, постнатального розвитку, стійкості організму до захворювань і загоєння ран. З іншого боку, будь-які порушення цих фундаментальних клітинних властивостей лежать в основі величезної кількості самих різноманітних патологій, в тому числі, й онкологічних захворювань.

Особливості поведінки клітин *in vivo* в значній мірі зберігаються і при їх культивуванні *in vitro*. І в тканинах організму, і при культивуванні на підложжі клітини переміщаються за допомогою псевдоподій, які вони висувують в напрямку руху. Підготовчим же етапом, необхідним для початку руху, є прикріплення (адгезія) клітини до субстрату – тканинному в організмі, підложжі *in vitro*. Якщо в організмі контактне інгібування клітин призводить до формування зачатків органів, то в культуральному судині – це утворення моношару клітин, обмеженого його стінками [211–213].

Згідно зі сказаним, першим з впливів кадмію на обидва типи досліджених клітин – фібробласти і клітини кісткового мозку – було оцінювання особливостей їхньої адгезії [63, 67, 73].

3.4.1. Показники адгезійної та міграційної здатності і апоптозу фібробластів

В Табл. 3.12 наведені результати вимірювань у культуральному розчині адгезії фібробластів, вилучених із 4-х органів тварин 1-ї серії, яким вводили кадмій з водою протягом 15 і 36 діб .

Таблиця 3.12

Адгезивні властивості фібробластів шкіри, рогівки, легенів і нирок у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доза	Доба	Кількість фібробластів, що прикріпилися через 24 год після висіву, %			
		шкіра	рогівка	легені	нирки
0	15	79 ± 2	82 ± 4	93 ± 5	74 ± 3
	36	82 ± 2	84 ± 2	90 ± 5	72 ± 4
0,1	15	77 ± 5	84 ± 4	$63 \pm 3^*$	-
	36	$72 \pm 2^{*,\#}$	80 ± 5	$45 \pm 4^{*,**,\#}$	-
1,0	15	$67 \pm 4^{*,**,\#}$	$72 \pm 3^{*,**,\#}$	$60 \pm 2^{***}$	$46 \pm 4^{*,**,\#}$
	36	$59 \pm 2^{*,**,\#}$	$65 \pm 3^{*,**,\#}$	$35 \pm 2^{*,**,\#}$	$31 \pm 3^{*,**,\#}$

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

За даними цієї таблиці видно, що дія кадмію на адгезію фібробластів призводить до двох ефектів. По-перше, як і у випадку з клітинами кісткового мозку, ступінь адгезії фібробластів у порівнянні з контролем зменшується і із зростанням дозової концентрації, і з часом введення кадмію тваринам. Найбільш виразно це виявляється при дозі 1,0 мкг Cd^{2+} / кг маси тіла. Так, на 15 добу експерименту ступінь адгезії фібробластів із шкіри, рогівки, легенів і нирок зменшується відносно контролю у 1,12; 1,14; 1,55; 1,61; а на 36 добу – вже у 1,39; 1,29; 2,57 і 2,32 рази відповідно.

Однак і доза 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла знижує ступінь адгезії фібробластів легенів до підложжя. Таким чином, при постійному тривалому впливі на організм навіть концентрації Cd^{2+} , які близькі і навіть менші за MRL, порушують нормальне функціонування фібробластів.

Другий ефект дії кадмію на адгезію фібробластів полягає в тому, що її ступінь у клітин, виділених з різних органів, також відрізняється. При цьому, якщо у контролі за весь час спостереження ступінь зменшення адгезії становить ряд: легені > рогівка > шкіра > нирки, то за дією дози 1 мкг Cd^{2+} / кг маси цей ряд набуває вигляду: рогівка > шкіра > легені > нирки.

Результати вимірювання міграційної здатності фібробластів, отриманих в тих же умовах, що й у попередньому експерименті, через 2 доби після висіву, наведені в Табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Міграційна здатність фібробластів шкіри, рогівки, легенів і нирок у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла

Доза	Доба	Кількість фібробластів, що мігрували через 48 год після висіву, % від загальної кількості клітин			
		шкіра	рогівка	легені	нирки
0	15	70 ± 4	75 ± 2	81 ± 5	88 ± 5
	36	72 ± 4	73 ± 3	83 ± 3	85 ± 2
0,1	15	68 ± 2	72 ± 4	56 ± 3 *	46 ± 4 *
	36	62 ± 3***	74 ± 5	58 ± 1 *	52 ± 4 *
1,0	15	53 ± 2 ***,#	60 ± 3 *,#	52 ± 5 *	39 ± 6 *,#
	36	47 ± 3 ***,#	58 ± 3 *,#	41 ± 4 ***,#	21 ± 3 ***,#

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Згідно з ними, як і у випадку з адгезією, маємо два ефекти – різну спроможність фібробластів із шкіри, рогівки, легенів і нирків до міграції і зменшення кількості мігруючих клітин із тривалістю введення тваринам кадмію

та зростанням його дози. Але зменшення кількості мігруючих клітин за дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла протягом 15 діб спостерігається лише у фібробластів легенів і нирків, а протягом 36 діб, крім них, ще й у фібробластів шкіри.

Найбільш виражену дію кадмій надає дозою 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. На 15 добу кількість мігруючих фібробластів із шкіри, рогівки, легенів і нирків зменшується відносно контролю у 1,32; 1,25; 1,56; 2,26; а на 36 добу – у 1,53; 1,29; 2,02 і 4,05 рази відповідно. При цьому величини зменшення кількості мігруючих фібробластів, які в контролі утворюють ряд: нирки > легені > рогівка > шкіра, перетворюється на ту ж послідовність, що виникає у зменшенні ступеня адгезії за впливом дози 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла: рогівка > шкіра > легені > нирки.

Збіг послідовності органів за зменшенням ступенів адгезії та міграції фібробластів за дією кадмію з великою ймовірністю свідчить про тісний молекулярний зв'язок цих двох процесів.

Виявлені явища вимагають пояснень.

В останні роки з'являється все більше відомостей про те, що фібробласти – це гетерогенна множина клітин. Вона складається з великої кількості підмножин з різними фенотипами, які відрізняються морфологією, розмірами, експресією поверхневих маркерів, білків цитоскелету, типів колагену і мають, крім загальних властивостей, ще й функціональні розбіжності, пов'язані з функціями той чи іншої тканини, того, чи іншого органу. Самі ці розбіжності в значній мірі визначаються модуляцією фенотипу фібробластів їх тканинним оточенням – структурою позаклітинного матриксу і регуляторними матричними макромолекулами конкретної тканини [215–218].

Тому знайдені розбіжності у рівнях адгезії і міграції фібробластів шкіри, рогівки, легенів та нирків визначаються різницею у функціональних потребах цих органів.

Механізми впливу кадмію на рухливість фібробластів остаточно ще не з'ясовані. Але в даний час є досить відомостей як про молекулярні структури, які забезпечують рух клітин, так і про особливості взаємодії кадмію з молекулами

білків і ДНК. Це дозволяє зробити досить переконливі припущення про механізми втручання кадмію в клітинний рух.

Як було сказано вище, переміщення клітини відбувається в результаті того, що випущені нею вирости зовнішньої мембрани (псевдоподії) прикріплюються до субстрату, стискаються і підтягують всю клітину в напрямку руху. У цьому процесі узгоджено бере участь велика кількість білкових систем. Дуже коротко їх можна охарактеризувати наступним чином.

Адгезію псевдоподій здійснюють «липкі» молекули поверхневих білків, зокрема, вінкулін і білок Thy-1. Стиснення псевдоподії відбувається в результаті скорочення динамічних білкових ниток цитоскелету, які знаходяться в її цитоплазмі. Вони являють собою систему, побудовану з трьох основних комплексів. Це т.зв. мікрофіламенти, що складаються з різних ізомолекул актину, мікротрубочки - з тубуліну і проміжні філаменти – в фібробластах – з віментину. Саме цей білок здійснює механічний зв'язок скорочувальних елементів цитоскелету з зовнішньою мембраною клітини (і псевдоподією) [211, 218].

Як було показано в розділах 1.2.1–1.2.3 «Огляду літератури», існує безліч прямих і опосередкованих шляхів токсичної дії кадмію на організм. Це і оксидативний стрес, і спотворення сигнальних шляхів, і порушення синтезу білків, їх ферментативної активності і т. і. Всі ці шляхи, в кінцевому підсумку, зводяться до різних механізмів порушення структури біологічних молекул. При цьому навіть найпростіший з них – безпосередня взаємодія (зв'язування) кадмію лише з одним із будь-яких білків, що беруть участь у клітинному русі, вже буде впливати на роботу рушійного апарату. Досить, наприклад, іонам Cd^{2+} зв'язатися з яким-небудь одним з адгезивних білків, щоб порушити адгезію і усі подальші етапи міграції клітин.

Більш конкретно можливі взаємодії іонів кадмію з молекулами білка, що входять до складу рушійних надмолекулярних утворень і призводить до зміни їх структури і, відповідно, функціональних властивостей, було досліджено в роботах [219, 220].

Так, Cd^{2+} може індукувати полімеризацію актину, витісняючи Ca^{2+} і заміщаючи його на ділянках мономерів G-актину, які визначають формування F-актину мікрофіламентів. Але заміщуючи Ca^{2+} у кальцій-залежних білках – гельзоліні, СаМКІІ, Cd^{2+} може, навпаки, пригнічувати полімеризацію G-актину. В будь-якому разі на рівні клітини це порушує функції фокальних контактів.

Так само, витісняючи і заміщаючи Ca^{2+} , іони кадмію впливають на процеси збирання і розбирання мікротрубочок і змінюють їх кінцеву структуру, що, природно, не є позитивним для формування цих контактів і руху клітини.

Коли клітини знаходяться в оточенні іонів Cd^{2+} – у тканині, або в культуральному розчині – ці іони, перш, ніж проникнути всередину клітини, повинні зустрітися з її поверхневими білками, в тому числі й адгезивними. А вже потім, послідовно проникаючи все глибше в цитоплазму, вони повинні починати взаємодіяти і з рушійними системами цитоскелету. Тому найбільш ймовірно, що важливою причиною інгібування руху клітин є дезактивація поверхневих білків і білків рушійної системи цитоскелету шляхом безпосереднього зв'язування з іонами Cd^{2+} .

У Табл. 3.14 наведені дані про абсолютну та відносну кількість нормальних непошкоджених фібробластів та фібробластів з ознаками ранньої і пізньої стадій апоптозу, що були вилучені з 4-х органів тварин 1-ї серії, яким вводили кадмій з водою у дозах 0,1 і 1,0 мкг /кг маси тіла протягом 15 і 36 діб.

Як видно, апоптоз відбувається і у нормальних фібробластів, виділених з усіх досліджених органів інтактних тварин, оскільки він, будучи одним з механізмів підтримання гомеостазу тканин, є стандартним процесом розвитку клітинних популяцій.

Так само, як і у випадках адгезії і міграції, в нормі фібробласти, що не піддавалися впливу кадмію, виявляють виражені органи відмінності в рівні апоптозу. За ступенем стійкості до нього відповідний ряд має вигляд: клітини легенів > рогівки > нирок > шкіри і на 15, і на 36 добу експерименту.

Таблиця 3.14

Абсолютна (кількість клітин $\times 10^3$ /мл) та відносна (% від загальної кількості клітин) кількість нормальних та апоптичних фібробластів шкіри, рогівки, легенів і нирок у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла щурів

Орган	Доза	0		0,1 мкг Cd^{2+} /кг/добу		1,0 мкг Cd^{2+} /кг/добу	
	Доба	15	36	15	36	15	36
	Стан клітин	Кількість клітин					
Шкіра	Нормальні	122,22 $\pm 2,44$ 83%	126,22 $\pm 2,52$ 84%	121,96 $\pm 2,44$ 82%	119,29 $\pm 2,38^*$ 80%	122,22 $\pm 2,44$ 81%	105,50 $\pm 2,11^{***\#}$ 72%
	Рання стадія апоптозу	14,73 $\pm 0,29$ 10%	12,02 $\pm 0,24^{**}$ 8%	17,85 $\pm 0,36^*$ 12%	16,40 $\pm 0,33^{***}$ 11%	16,60 $\pm 0,33^{*\#}$ 11%	23,44 $\pm 0,47^{***\#}$ 16%
	Пізня стадія апоптозу	10,36 $\pm 0,21$ 7%	12,02 $\pm 0,24^{**}$ 8%	8,92 $\pm 0,18^*$ 6%	13,42 $\pm 0,27^{***}$ 9%	12,07 $\pm 0,24^{*\#}$ 8%	17,58 $\pm 0,35^{***\#}$ 12%
Рогівка	Нормальні	133,37 $\pm 2,67$ 89%	130,68 $\pm 2,61$ 90%	129,65 $\pm 2,59$ 87%	129,16 $\pm$ 2,58 85%	116,63 $\pm$ 2,33 $^{*\#}$ 79%	115,22 $\pm 2,30^{*\#}$ 77%
	Рання стадія апоптозу	14,98 $\pm 0,30$ 10%	13,07 $\pm 0,26^{**}$ 9%	16,39 $\pm 0,33^*$ 11%	21,27 $\pm 0,42^{***}$ 14%	22,15 $\pm 0,44^{*\#}$ 15%	25,44 $\pm 0,51^{***\#}$ 17%
	Пізня стадія апоптозу	1,50 $\pm 0,03$ 1%	1,45 $\pm 0,03$ 1%	2,98 $\pm 0,06^*$ 2%	1,52 $\pm 0,03^*$ 1%	8,88 $\pm 0,18^{*\#}$ 6%	8,98 $\pm 0,18^{*\#}$ 6%
Легені	Нормальні	134,95 $\pm 2,70$ 89%	142,68 $\pm 2,85^{**}$ 92%	111,59 $\pm 2,23^*$ 74%	110,68 $\pm 2,21^*$ 72%	111,81 $\pm 2,24^{*\#}$ 74%	109,73 $\pm 2,19^*$ 72%
	Рання стадія апоптозу	13,65 $\pm 0,27$ 9%	7,75 $\pm 0,16^{**}$ 5%	24,1 $3 \pm 0,48^*$ 16%	27,67 $\pm 0,55^{***}$ 18%	21,15 $\pm 0,42^{*\#}$ 14%	16,76 $\pm 0,34^{***\#}$ 11%
	Пізня стадія апоптозу	3,03 $\pm 0,06$ 2%	4,65 $\pm 0,9^{**}$ 3%	15,08 $\pm 0,30^*$ 10%	15,37 $\pm 0,31^*$ 10%	18,13 $\pm 0,36^{***\#}$ 12%	25,91 $\pm 0,52^{***\#}$ 17%

Нирки	Нормальні	129,53 ±2,59 90%	129,08 ±2,58 88%	125,96 ±2,52 85%	126,41 ±2,53 87%	107,39 ±2,15***# 73%	96,39 ±1,93***# 65%
	Рання стадія апоптозу	10,08 ±0,20 7%	11,74 ±0,23** 8%	16,30 ±0,33* 11%	14,53 ±0,29*** 10%	14,71 ±0,29*# 10%	20,76 ±0,42***# 14%
	Пізня стадія апоптозу	4,32 ±0,09 3%	5,80 ±0,12** 4%	5,93 ±0,12* 4%	4,36 ±0,09*** 3%	25,01 ±0,50***# 17%	31,14 ±0,62***# 21%

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Ці органи особливості частково зберігаються, а частково змінюються при введенні тваринам кадмію, коли збільшується кількість клітин, які знаходяться на різних стадіях апоптозу. Так, загальним для фібробластів шкіри та рогівки при обох використаних дозах та для фібробластів нирок і легенів за дозою 0,1 мкг/кг маси є те, що кількість клітин на пізніх стадіях апоптозу, в середньому, суттєво менше, ніж на його початкових стадіях. Фібробласти цих органів взагалі виявились найбільш чутливими до дії кадмію за цією дозою.

Але за дозою 1,0 мкг/кг маси відношення кількості клітин на пізніх і ранніх стадіях апоптозу у легенях та нирках стає протилежним. Особливо це відбувається у нирках. На 15 і 36 добу відношення пізніх апоптичних фібробластів до ранніх становить в цих органах 0,9 і 1,7 та 1,7 і 1,5 відповідно.

Очевидно, це є слідством того, що нирки, порівняно з іншими органами, накопичують найбільшу кількість кадмію (Табл. 3.9), і апоптична загибель фібробластів починається в них раніше та проходить найбільш інтенсивно.

А найменш апоптично чутливими до дії обох доз кадмію виявились фібробласти шкіри.

Вплив часу на апоптоз фібробластів виражений не так чітко, як для адгезії та міграції і проявляється, особливо на пізніх стадіях, лише при впливі на тварин дози 1,0 мкг/кг маси. Так, у фібробластів шкіри, рогівки, легенів, нирків у період

від 15 до 36 доби експерименту рівень пізніх стадій апоптозу зростає в 1,46; 1,01; 1,52 1,24 рази відповідно.

3.4.2. Вміст колагену та ГАГ в культурі фібробластів

Головною функцією фібробластів є продукція структурних біополімерів, зокрема, колагену та глікозаміногліканів (ГАГ), які формують основні структурні та механічні властивості міжклітинного матриксу сполучної тканини. При цьому фібробласти, крім колагену типу I, який присутній в усіх органах, в кожному з них продукують ще й специфічні саме для цього органу інші типи колагену. Аналогічно, органу специфічність має і компонентний склад ГАГ.

Але оскільки загальні властивості матриксу будь-якого органу є інтегральною складовою його компонентів, для дослідження характеру впливу кадмію на продукцію цих біополімерів можна було, в першому наближенні, виміряти їх загальні концентрації [221, 222].

В Табл. 3.15 надано результати вимірювання цих концентрацій колагену та (ГАГ) – у культурах фібробластів, вилучених з чотирьох органів щурів, які *in vivo*, протягом 15 і 36 діб щоденно, отримували 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} / кг маси тіла.

Згідно з ними, найбільша концентрація колагену в обидва терміни і за дією обох доз Cd^{2+} спостерігається у культурах фібробластів шкірі і легенів, а ГАГ – фібробластів рогівці, що пов'язано з функціональною роллю цих органів – механічною та оптичною – відповідно [223–226].

При цьому дія обох доз протягом як 15, так і 36 діб призводить до зниження накопичення і колагену і ГАГ у культурах фібробластів з усіх досліджених органів. Найбільш виражений цей ефект за дозою 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин. Так, до 36 доби експерименту, у порівнянні з контролем, в культурах фібробластів шкіри, рогівки, легенів, нирок концентрація колагену зменшується на 24 %, 15 %, 31 %, 44 %, а ГАГ – на 18 %, 29 %, 41 %, 45 % відповідно.

Таблиця 3.15

**Вміст колагену та ГАГ, пг/клітину, в культурі фібробластів шкіри,
рогівки, легенів та нирок щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd²⁺ / кг маси
тіла**

Доза, мкг Cd ²⁺ /кг маси тіла				0		0,1		1,0	
Доба				15	36	15	36	15	36
Орган	Шкіра	Показник	Колаген	65,8 ±2,4	68,4 ±3,1	62,7 ±2,2	66,4 ±2,0	61,7 ±1,8	52,2 ±2,5
			%	100%	100%	95,3%	97,1%	93,7%	76,30%
			ГАГ	94,3 ±7,4	98,5 ±10,5	95,7 ±8,0	92,6 ±6,4	93,7 ±7,5	81,5 ±7,1
			%	100%	100%	101,5%	94,0%	99,4%	82,7%
	Рогівка		Колаген	47,2 ±2,1	45,1 ±3,3	45,6 ±2,5	43,8 ±2,1	40,4 ±2,0	38,5 ±2,4
			%	100%	100%	96,7%	97,1%	85,6%	85,4%
			ГАГ	112, ±12,3	109,2 ±8,2	115,5 ±11,5	108,4 ±7,4	96,3 ±6,5	92,0 ±10,2
			%	100%	100%	102,8%	83,9%	85,7%	71,2%
	Легені		Колаген	61,1 ±3,1	65,3 ±2,2	52,5 ±2,0	47,7 ±2,3	48,1 ±2,1*	45,2 ±3,2*
			%	100%	100%	85,9%	73,0%	78,7%	69,2%
			ГАГ	108,4 ±7,0	111,7 ±5,2	93,2 ±6,3	91,0 ±5,5	67,2 ±7,1*	65,9 ±6,5*
			%	100	100	86,0	81,5	62,0	59,0
	Нирки		Колаген	35,8 ±2,7	39,5 ±2,5	48,2 ±2,2*	53,6 ±2,0*	27,1 ±2,4*	22,4 ±2,2*
			%	100%	100%	134,6%	135,7%	75,7%	56,7%
			ГАГ	56,3 ±4,5	58,1 ±4,2	53,5 ±5,1*	58,5 ±6,7*	42,7 ±5,8*	32,5 ±5,0*
			%	100%	100%	95,0%	100,7%	75,8%	55,9%

Примітка: * – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd²⁺/кг маси.

Це свідчить про зниження загального обміну обох типів досліджених біополімерів, яке може бути слідством або зниження їхнього синтезу, або підвищення розпаду, або суперпозицією обох процесів.

В той же час відношення концентрацій колагену і ГАГ в цей термін залишається незмінним у порівнянні з контролем у культурах фібробластів з усіх органів, окрім легенів, де воно вірогідно збільшується на 19 % – Табл. 3.16.

Таблиця 3.16

Відношення концентрації колагену до концентрації ГАГ в культурі фібробластів шкіри, рогівки, легенів та нирок щурів на 36 добу дії 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла

Орган	Шкіра		Рогівка		Легені		Нирки	
Доза, мкг Cd^{2+} /кг маси тіла	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0
Колаген/ГАГ	0,69±	0,64±	0,41±	0,42±	0,58±	0,69±	0,68±	0,70±
	0,07	0,04	0,03	0,03	0,04	0,05*	0,05	0,08

Примітка: * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем.

Виходячи з того, що цей експеримент модулює вплив кадмію саме на продукцію структурних біополімерів фібробластами, можна укласти наступне. Зростання відношення колаген/ГАГ свідчить про превалювання питомої частки колагену в надмолекулярних утвореннях матриксу, де колаген визначає механічну міцність, а ГАГ – його грузлі властивості. Тому використані умови впливу Cd^{2+} на фібробласти в складі сполучної тканини легенів повинні призводити, в кінцевому рахунку, до підвищення жорсткості і зменшення ступеня розтяжності цього органу. Дійсно, відомо, що підвищення концентрації колагену у різновидах сполучної тканини призводить саме до такого ефекту [223, 224]. Судячи ж з того, що в культурах фібробластів з інших досліджених органів, відношення концентрацій колагену і ГАГ залишається постійним, основні риси

структури матриксу в цих органах за дією використаних концентрацій кадмію не змінюються.

3.4.3. Показники адгезійної здатності та апоптозу клітин кісткового мозку

На Рис. 3.2 надані фотографії утворення моношару клітин кісткового мозку контрольних тварин 2-ої серії експерименту на першу, другу і п'яту добу культивування у культуральному розчині без додавання іонів Cd^{2+} .

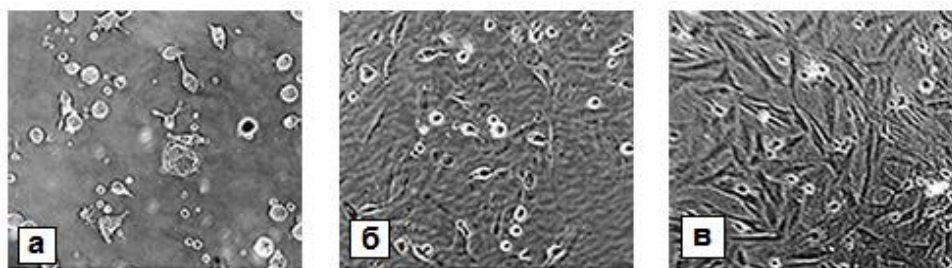


Рис. 3.2 Адгезія на підложжі (а) і утворення моношару (б, в) клітин кісткового мозку на 24, 48 і 120 годину культивування у культуральному розчині без додавання іонів Cd^{2+}

Як видно, після посіву клітин кісткового мозку на підложжя, вони починають прикріплюватися до нього вже на першу добу. На другу добу починається процес розпластування клітин на підложжі і вони набувають типову фібробластоподібну форму. Одночасно з адгезією і распластуванням клітин на підложжі, утворення моношару починається вже на другій добі, а на п'ятій, після того, як усі клітини, що розмножилися, розійшлися по всьому підложжю і увійшли в контакти одне з одним, утворився суцільний клітинний моношар щільність якого становить 90-94 %.

Вплив іонів Cd^{2+} проводили через 48 годин після першої заміни культурального середовища на середовище, з кадмієм. Визначали часову залежність кількості клітин, які прикріпилися до підложжя.

На Рис. 3.3 відображено ці часові залежності ступеня адгезії клітин, виділених з кісткового мозку тварин 2-ої серії і поміщених в культуральні розчини, що містять різні концентрації іонів кадмію

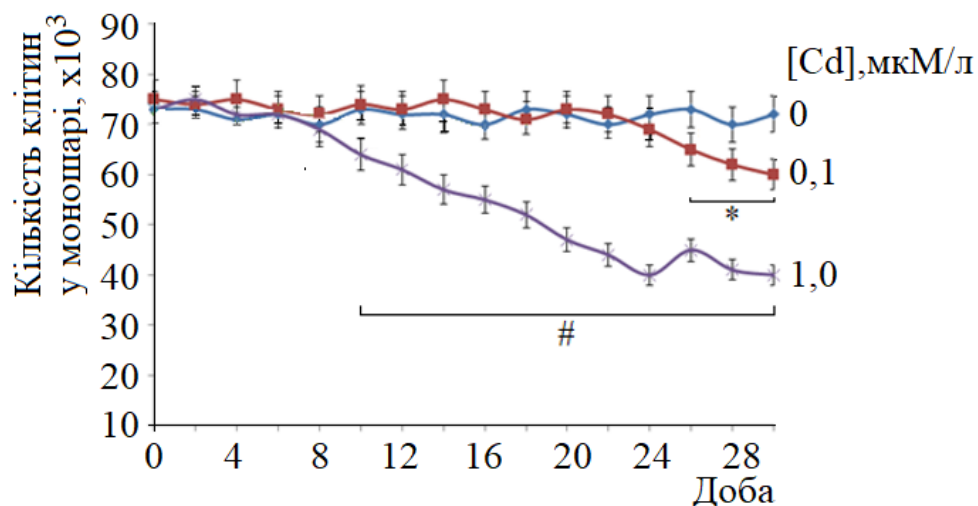


Рис. 3.3 Залежності динамік ступеня адгезії клітин кісткового мозку на підложжі від концентрації Cd^{2+} у культуральному розчині

Відповідно до нього, адгезія клітин при концентраціях кадмію в розчині, рівних 0,1 і 1,0 мкМ/л інгібується, у порівнянні з контролем, починаючи з 22-ої і 6-ої години дії Cd^{2+} відповідно. При цих концентраціях через 30 годин ступінь адгезії клітин в оточенні Cd^{2+} стає меншою за контроль у 1,21 і 1,70 рази.

Ці результати якісно співпадають з отриманими на фібробластах, які були піддані дії кадмію у складі органів. Як видно, в обох випадках навіть у сукупності клітин, які не піддавалися дії кадмію, деяка їх частина не прикріплюється до підложжя. Що ж до порівняння дії іонів Cd^{2+} на фібробласти *in vivo* і на клітини кісткового мозку *in vitro*, то в постійних умовах експерименту рівень зменшення їхньої адгезії якісно подібний і лежить в одних й тих же межах [73, 187].

Таким чином, навіть у малих концентраціях Cd^{2+} може знижувати кількість центрів фокальної адгезії в клітинах. Це походить за рахунок перебудови F-актинового цитоскелету внаслідок зв'язування актину з гелъзолином та Ca^{2+} -кальмодулін - залежною протеїнкіназою II, яка, в свою чергу, активується шляхом фосфорилювання Ca^{2+} -кальмодуліном. Цей процес, при якому кількість

G-актину не змінюється, також є Cd^{2+} -залежним. Під впливом Cd^{2+} не відбувається також фосфорилування Tyr^{397} ФАК. Вся ця низка подій призводить до розпаду комплексів вінкуліна і ФАК у фокальних контактах і клітини втрачають здатність до адгезії на підложжі.

Як було сказано вище, центри фокальної адгезії не тільки прикріплюють білки цитоскелету до позаклітинного матриксу та приймають участь у проліферації і міграції клітин, але відіграють важливу роль у процесах апоптозу.

На Рис. 3.4 надано результати відносних значень ступеня апоптозу клітин, виділених з кісткового мозку тварин 2-ої серії, які протягом 30 діб культивували в середовищах, що містили 0,1 і 1,0 мкМ Cd^{2+} /л.

Як видно, у відсутності іонів кадмію в культуральному розчині відносна кількість «фізіологічного» – нормального апоптозу клітин коливається в межах 1%–5%, що є стандартним при використаному методі культивування.

Збільшення ж кількості апоптичних клітин в культуральному розчині залежить від концентрації в ньому іонів кадмію і часу впливу. Так, при концентрації 0,1 мкМ/л Cd^{2+} інтенсивність апоптозу починає зростати, починаючи з 24 доби і на 30 добу експерименту він досягає 11 % від загальної кількості клітин. При цьому серед апоптичних клітин превалюють ті, що знаходяться на ранній стадії апоптозу і не мають суттєвих дефектів плазматичної мембрани, у першу чергу, порушень її цілісності.

За дією концентрації Cd^{2+} рівній 1,0 мкМ/л активація апоптозу починається значно раніше – вже на 10 добу культивування, і при цьому збільшується відносна кількість клітин на пізніх стадіях апоптозу з порушеною мембраною. На кінець експерименту вони становлять вже 21 % загальної кількості клітин.

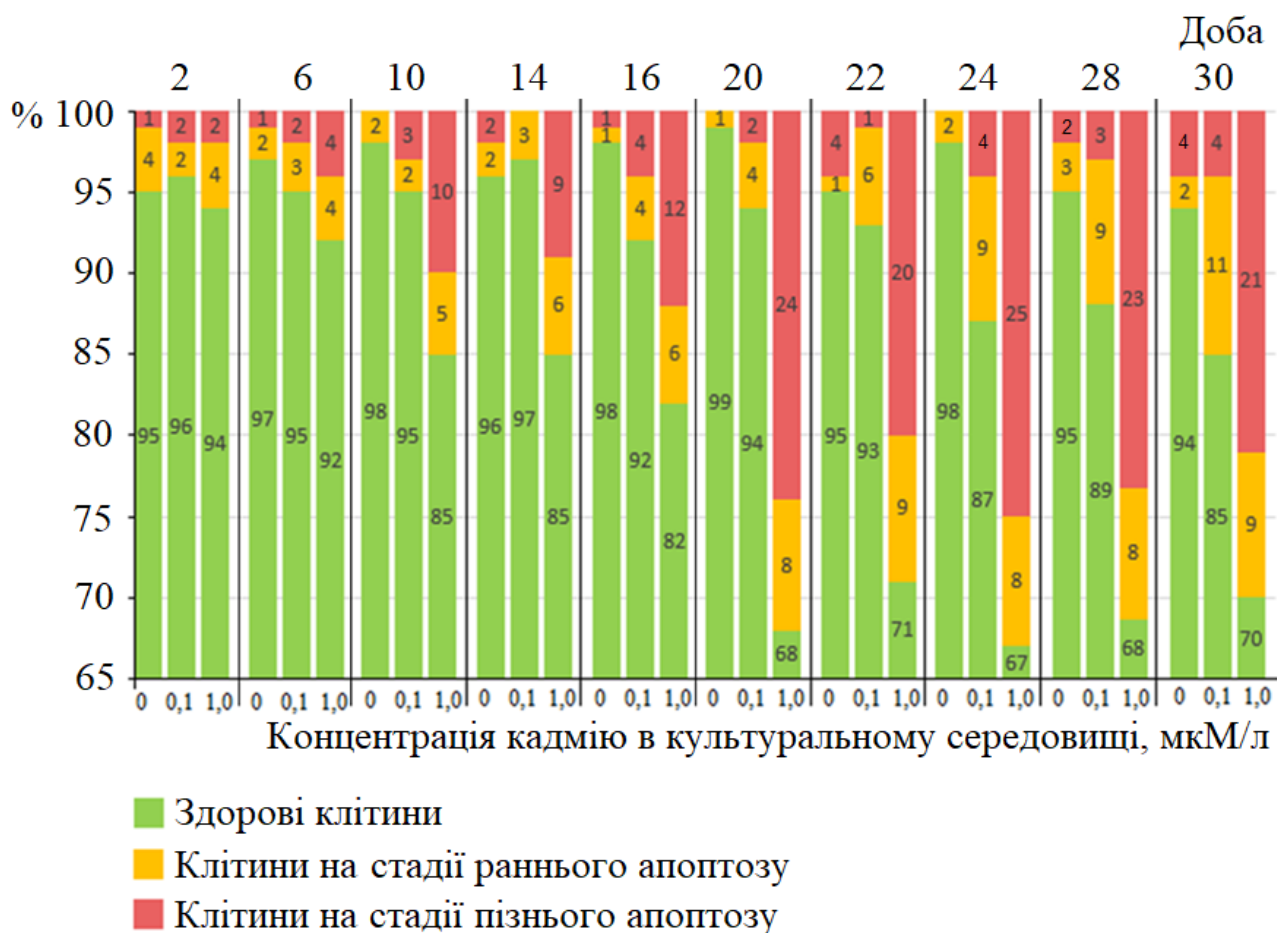


Рис. 3.4 Динаміка відносної кількості (% від загальної кількості) нормальних та апоптотичних клітин кісткового мозку, які протягом 30 діб знаходились в культуральному розчині, що містив Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1,0 мкМ/л

Отримані результати підтверджуються даними роботи [109]. Так, показано, що у першому наближенні, в середньому, субмікромолярні концентрації (від 0,1 до кількох одиниць мкМ Cd^{2+} /л) у клітинних культурах лабораторних тварин призводять до проліферації клітин або їх сповільненого апоптозу, проміжні концентрації (коло 10 мкМ Cd^{2+} /л і декілька вищі) викликають різні типи апоптотичної загибелі клітин, а дія дуже високих концентрацій (> 50 мкМ Cd^{2+} /л) закінчується некрозом. Автори вважають, що це узагальнення слушно й *in vivo*.

Концентрація кадмію має найважливіше значення при реалізації того чи іншого механізму апоптозу. Так, великі концентрації кадмію інактивують тіолтрансферази та інші білки, які містять тіольні групи, що посилює розвиток апоптозу [78]. В епітеліальних клітинах легенів концентрації кадмію в межах 1–10

мкМ/л викликали значне збільшення синтезу проапоптотичних білків p53 і Вах, але не збільшували продукцію АФК. Концентрація ж 100 мкМ/л, крім активації p53 і Вах, приводила до зростання АФК на 30 % при зниженні активності антиоксидантних ферментів КАТ і СОД [115].

Але підвищення вмісту p53 за дією кадмію може відбуватися й іншим шляхом. В [116] знайдено, що в присутності іонів Cd^{2+} середньої концентрації в епітеліальних клітинах ниркових каналців мишей експресія членів сімейства убіквітин-кон'югованих ферментів Ube2d – Ube2d1, Ube2d2, Ube2d3 та Ube2d4 значно пригнічувалась, а рівень білка p53 різко збільшувався без стимуляції експресії гена p53 і без інгібування активності протеасоми. Крім того, кадмій індукував фосфорилування p53 і викликав апоптоз клітин *in vivo* і *in vitro*. Ці результати свідчать про те, що кадмій-залежний апоптоз може бути слідством накопичення p53 не за рахунок активації його синтезу, а інгібуванням його деградації через пониження експресії генів сімейства Ube2d.

Існують й інші механізми розвитку кадмій-залежного апоптозу. Наприклад, в епітеліальних клітинах легенів людини високі концентрації Cd^{2+} (20 або 30 мкМ) стимулюють експресію білка p65, фактора транскрипції NF- κ B, який регулює активність генів, що контролюють зокрема, загибель клітин і проапоптотичного білка ініціатора транскрипції – еукаріотичного фактора 5A1 (eIF5A1). Експресія останнього зростає, оскільки його ген містить у промоторі чутливий до p65 елемент. За думкою авторів, ці результати вказують на те, що при певних концентраціях Cd^{2+} рівень проапоптотичного білка eIF5A1 можливо модулювати білком NF- κ B [117].

Ці приклади лише мала частина того, як велика кількість про- та антиапоптотичних білків, складна мережа метаболічних шляхів, в яких вони беруть участь і особливості клітинних популяцій в різних органах, призводять до множинності способів регуляції активності цих білків і розвитку апоптозу.

Але морфологічні зміни клітин під впливом кадмію не обмежуються порушеннями цілісності мембрани. Слід зазначити, що культури клітин кісткового мозгу, як первинні, так і ті, що пройшли кілька етапів культивування *in*

vitro, являють собою гетерогенну за фенотипом, функціональними властивостями і, природно, морфологією, систему [227, 228].

Однією з важливих морфологічних ознак є характерні розміри клітин. Для їх вимірювання клітини кісткового мозку з утвореного ними моношару переводили у культуральний розчин, де вони, перебуваючи у вигляді суспензії, набували сферичну форму.

На Рис. 3.5 зображені результати вимірювання розподілів клітин кісткового мозку за діаметрами при їх культивуванні у відсутності Cd^{2+} та його присутності в концентрації 1,0 мкМ/л у культуральному розчині на 30 добу експерименту.

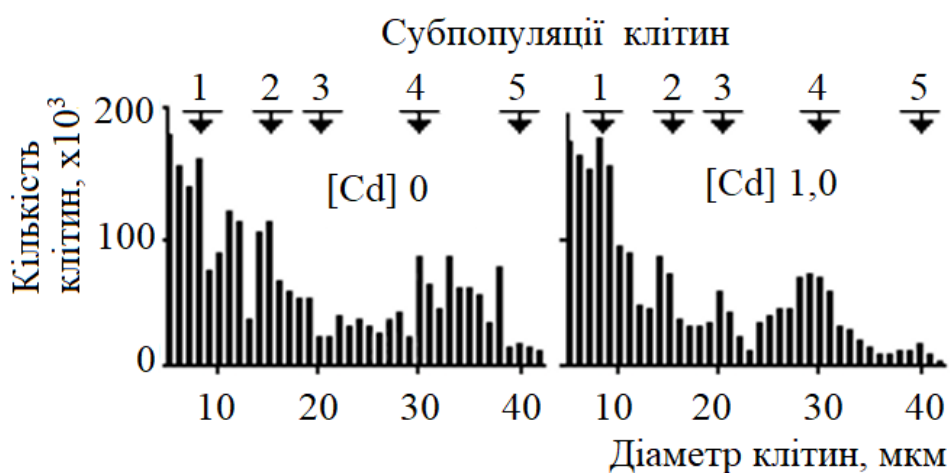


Рис. 3.5 Розподіл клітин кісткового мозку за їх діаметрами на субпопуляції під впливом 1,0 мкМ Cd^{2+} /л культурального розчину на 30 добу культивування

Як видно, криві розподілу мають явно виражені максимуми і мінімуми, що підтверджує гетерогенність досліджуваної популяції клітин. Згідно з наявністю цих особливостей кривих, навіть не кажучи про функціональні властивості різних типів клітин, в популяції можна надійно виділити найменше 5 субпопуляцій, середні діаметри клітин в яких (медіани максимумів) складають 8, 15, 20, 30 і 40 мкм. Вплив Cd^{2+} призводить до перерозподілу кількостей клітин з більшими і меншими діаметрами і зсуву максимумів кривої розподілення до початку координат.

Під дією концентрації кадмію 0,1 мкМ/л в культуральному розчині відзначається, хоч і явна, але лише тенденція до прояву цих ефектів. Концентрація ж 1,0 мкМ Cd^{2+} /л призводить до виразної і чисельно статистично вірогідної вираженості цього явища (Табл. 3.17).

Зсув максимумів кривої розподілення діаметрів клітин до початку координат, тобто зменшення середнього діаметра клітин по всій популяції в середньому, є, природно, результатом їх масового апоптозу. При апоптозі порушується цілісність плазматичної мембрани, виникає дегідратація клітини, вихід назовні апоптичних тілець і іонів, відбувається її стиснення і, відповідно, зменшення діаметру [229].

Таблиця 3.17

Вплив Cd^{2+} у концентрації 1,0 мкМ/л на розподіл загальної (кількість клітин $\times 10^3$ /мл) та відносної (%) від загальної кількості клітин кісткового мозку по їх субпопуляціях на 30 добу експерименту

Субпопуляція			1	2	3	4	5
Кількість клітин $\times 10^3$	Cd^{2+} , мМ/л	0	1003 $\pm$ 20,1 (41,8 $\pm$ 0,8)%	379 $\pm$ 7,6 (15,8 $\pm$ 0,3)%	636 $\pm$ 12,7 (9,3 $\pm$ 0,2)%	215 $\pm$ 4,3 (26,5 $\pm$ 0,5)%	54 $\pm$ 1,1 (6,6 $\pm$ 0,1)%
		1,0	1006 $\pm$ 20,1 (53,3 $\pm$ 1,1)%*	231 $\pm$ 4,6* (12,2 $\pm$ 0,3)%*	166 $\pm$ 3,32* (8,8 $\pm$ 0,2)%*	459 $\pm$ 9,2* (24,2 $\pm$ 0,5)%*	27 $\pm$ 0,5* (1,4 $\pm$ 0,1)%*

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем.

Це й відображено в Табл. 3.17 – відносні частки клітин в усіх субпопуляціях знижуються, а підвищується тільки відносний об'єм субпопуляції з клітинами найменшого діаметру.

Але аналіз абсолютної кількості клітин у кожній субпопуляції дозволяє визначити більш глибокі і важливі риси впливу на них кадмію. Так, перш за все, зміни діаметрів клітин в різних субпопуляціях відбуваються також по-різному. Після 30-добової дії кадмію кількість клітин в субпопуляціях 2, 3 і 5 знижується у 1,6; 3,8 і 2 рази відповідно, в субпопуляції 4 підвищується в 2,1 рази, а у субпопуляції 1 зовсім не змінюється. Очевидно, що під впливом Cd^{2+} в субпопуляціях 2, 3 і 5 рівень апоптозу перевищує рівень проліферації клітин, в

субпопуляції 1 інтенсивність цих двох процесів однакова, а в субпопуляції 4 проліферація значно випереджає апоптоз.

Зменшення кількості клітин в культуральному розчині йде за рахунок апоптозу. Тому слід визнати, що клітини різних субпопуляцій мають різну життєздатність по відношенню до токсичних властивостей кадмію. Таким чином, ступінь життєздатності клітин кісткового мозку у вивчених субпопуляціях по відношенню до цитотоксичності Cd^{2+} утворює ряд: субпопуляція 4 > субпопуляції 1 > субпопуляції 2 > субпопуляції 5 > субпопуляції 3.

Оскільки різні субпопуляції складаються з клітин з різними функціями, це означає, що інтегральний, кінцевий процес функціонування кісткового мозку, як єдиної системи, змінюється під дією кадмію.

Важливим є ще один наслідок розвитку апоптичних процесів у досліджених культурах кісткового мозку. Через зменшення розмірів частини клітин в моношарі його щільність протягом 30 діб культивування за дією 0,1 мкМ Cd^{2+} /л знизилась на 20 %, а за дією 1 мкМ Cd^{2+} /л – на 48 % (Рис. 3.6).

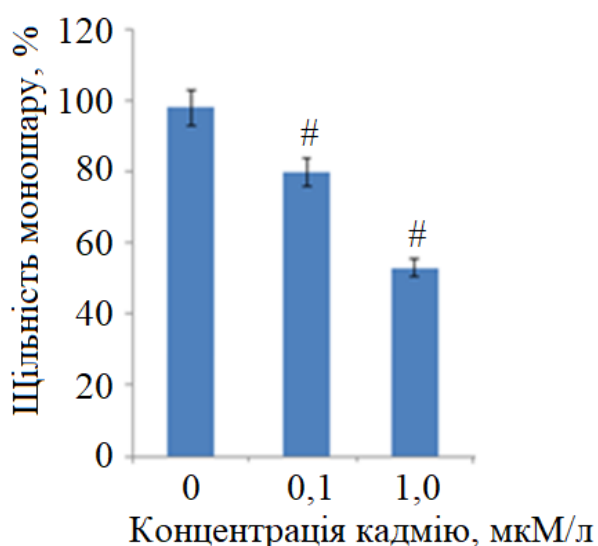


Рис. 3.6 Залежність щільності моношару клітин кісткового мозку на 30 добу культивування від концентрації Cd^{2+} у культуральному розчині. # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) відносно контролю та між собою

А це зниження щільності змінює розташування клітин і тягне за собою зменшення і порушення кількості контактів між ними, що призводить і до порушення мережі міжклітинної сигналізації в моношарі.

По суті, цей результат, який отримано на двомірній моделі *in vitro*, ілюструє події, що відбуваються *in vivo*, – у тривимірному просторі кісткового мозку при його отруєнні іонами Cd^{2+} .

Клітини кісткового мозку розташовані в досить впорядкованій тканинній структурі, в якій вони пов'язані складною просторовою сигналізацією [230]. Апоптична загибель частини клітин, яка призводить до розрідження цієї тривимірної впорядкованості, супроводжується руйнуванням сигнальних шляхів з далекосяжними патологічними наслідками, описаними в «Огляді літератури».

3.5 . Вплив Cd^{2+} на ДНК клітин кісткового мозку

3.5.1 Кількість мікроядер у клітинах кісткового мозку

Дослідження руйнівного впливу кадмію на ядерну ДНК проводили на клітинах кісткового мозку і у першій – *in vivo*, і у другій – *in vitro* серіях експерименту. Порівняння результатів двох досліджень було проведено для того, щоб більш глибоко зрозуміти особливості цитотоксичності цього металу *in vivo*. В якості показників, які порівнювались, були обрані кількість мікроядер у клітинах – мікроядерний тест (МЯ – тест) та ступінь фрагментації ДНК.

Як було сказано в підрозділі 2.5.1 в еукаріотичній клітині мікроядра – це фрагменти ядра, в яких містяться лише частини повного геному, внаслідок чого така клітина є нежиттєздатною. Серед інших причин мікроядра утворюються в результаті розпаду ядра у процесі апоптозу.

В останні роки МЯ – тест постійно використовується для оцінки мутагенної дії факторів зовнішнього середовища, в тому числі, й забруднюючих хімічних речовин [231].

В Табл. 3.18 наведено результати вимірювання кількості клітин кісткового мозку з мікроядрами, які були вилучені у щурів після 15- та 36-добового впливу розчину $\text{CdCl}_2 \times 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ з концентрацією Cd^{2+} , рівній 1,0 мкг /кг маси тіла тварин. Кількість проаналізованих клітин в усіх вимірюваннях становила 2000 [232–234].

А на Рис. 3.7 відображено відносну кількість клітин кісткового мозку з мікроядрами, після 30-добового культивування у розчинах без іонів Cd^{2+} та в їх присутності у концентраціях 0,1 і 1,0 мкМ/л.

Як видно, в обох дослідженнях за відсутності дії Cd^{2+} кількість клітин з мікроядрами становить одну й ту ж величину – близько 2,5 %.

Таблиця 3.18

Абсолютна (кількість клітин в 2000) та відносна (% від 2000) кількість клітин кісткового мозку з мікроядрами у щурів, які щоденно протягом 15 і 36 діб отримували чисту воду і воду, що містила Cd^{2+} у концентрації 1,0 мкг/кг маси тіла

Доба	1	15	36
Кількість клітин з мікроядрами	53,00±8,79 2,6 %	151,33±12,25* 7,6 %	192,33±18,47*** 10,4 %

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою.

Це той базовий рівень, який постійно існує в нормальній клітинній популяції і є, зокрема, частиною рівня «фізіологічного» апоптозу, величина якого знаходиться в межах 2 % – 5 % (Рис. 3.4).

В обох же дослідженнях кількість клітин з мікроядрами за дією кадмію підвищується. Але, судячи за кількісними результатами, вплив кадмію на формування мікроядер *in vivo* ефективніший, ніж *in vitro*.

Дійсно, концентрації 0,1 і 1,0 мкМ/л Cd^{2+} в культуральному розчині експерименту *in vitro* у перерахунку на мкг Cd^{2+} /кг дорівнюють 10,79 і 107,9 мкг Cd^{2+} /кг розчину відповідно.

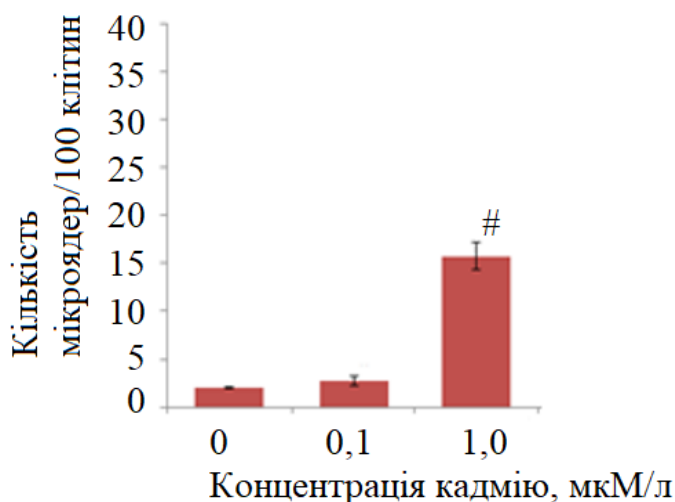


Рис. 3.7 Залежність кількості мікроядер у клітинах кісткового мозку від концентрації Cd^{2+} в культуральному розчині на 30 добу культивування *in vitro*. # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем та з концентрацією 0,1 мкМ Cd^{2+} /л

При цьому кількість клітин кісткового мозку з мікроядрами вірогідно підвищується на 30-у добу експерименту тільки за концентрацією кадмію 107,9 мкг/кг (Рис. 3.7). І це на 3 порядки вище, ніж концентрація кадмію – 1,0 мкг/кг (Табл. 3.18), яка *in vivo* збільшує кількість клітин з мікроядрами у 3 і 4 рази на 15-у і 36-у добу експерименту.

3.5.2. Фрагментація ДНК і вмісту її одноланцюгової частки у клітинах кісткового мозку

Механізм дії кадмію на другий обраний показник – фрагментацію ДНК – може бути результатом активації внутрішньомітохондріальних апоптогенних білків – ендонуклеази g і апоптоз-індукуючого фактору AIF. Так, показано, що Cd^{2+} , проникаючи всередину мітохондрій, витісняє вільні іони Ca^{2+} у внутрішньоклітинний простір, в результаті чого втрачається мембранний потенціал мітохондрій. При цьому обидва внутрішньомітохондріальні апоптогенні білки отримують можливість теж залишити мітохондрії і проникнути у клітинне ядро, де вони і порушують ДНК [110, 111].

В Табл. 3.19 представлено порівняльні результати вимірювання ступеня фрагментації ДНК у клітинах кісткового мозку, отримані за допомогою Comet-аналізу на 100 ядрах в експерименті *in vitro* і на 70 ядрах в експерименті *in vivo*.

Таблиця 3.19

Ступінь фрагментації ДНК у клітинах кісткового мозку (%) в експериментах *in vivo*, концентрація Cd^{2+} – 1,0 мкг/кг і *in vitro*, концентрація Cd^{2+} – 0; 0,1 і 1,0 мкМ/л

Умови експерименту	In vivo	Стан ДНК	Доба	1	15	36
			Фрагментована	3,0±0,09	8,0±0,1*	11,0±0,24**
			Нефрагментована	97,0±1,98	92,0±1,87*	88,0±1,75**
	In vitro		Cd ²⁺ , мкМ/л	0	0,1	1,0
			Фрагментована	1,0±0,04	2,0±0,07	13,0±0,33**
			Нефрагментована	99,0±2,01	98,0±1,96	87,0±1,72**

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою; # – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з концентрацією 0,1 мкМ/л.

З отриманих результатів йдеться, що вплив іонів кадмію у концентраціях і 1,0 мкг/кг протягом 36 діб і 1,0 мкМ/л (107,9 мкг/кг) протягом 30 діб призводять практично до однакового рівня фрагментації ДНК – 11 % та 13 % відповідно.

Така різка різниця впливу кадмію на формування мікроядер і фрагментації ДНК полягає, очевидно, в наступному. На відміну від простого модельного середовища *in vitro*, *in vivo*, крім прямої дії Cd^{2+} , клітини піддаються і впливу амортизаційних чинників, які є наслідком його загальної цитотоксичності, зокрема, продуктів оксидативного стресу. Тому отруйна дія кадмію набагато небезпечніша при попаданні в організм, ніж його дія на окремі органи, тканини і клітини в модельних дослідах. І переносити результати таких експериментів безпосередньо на тварин і, тим більш, на людину, потрібно з обережністю.

Ще один показник руйнування ДНК за дією кадмію – кількість одноланцюгових фрагментів ДНК в клітинах [233, 234].

В нормі одноланцюгові ДНК (ssDNA), які утворюються при розкручуванні ділянок подвійної спіралі ДНК, постійно присутні в клітинних геномах тварин і людини і виконують в клітинах багато різноманітних функцій. Вони, зокрема, беруть участь в процесах реплікації, рекомбінації, синтезі кінцевих ділянок хромосом, репарації і т. і., а об'єднуючись із специфічними SSBs – білками, стабілізують структуру хромосом [235, 236].

Природно, що у процесі апоптозу, як фізіологічного, так і виникаючого за патологічних умов, кількість ділянок одноланцюгової ДНК, які вирізаються з подвійної спіралі після розриву її внутрішніх водневих зв'язків, повинна змінитися. Можна припустити, що ступінь цієї зміни виявиться специфічним і чутливим показником апоптозу за дією кадмію.

На Рис. 3.8 зображено кількісний вміст одноланцюгової ДНК в ядрах клітин кісткового мозку після 30 діб їх культивування у присутності використаних концентрацій Cd^{2+} .

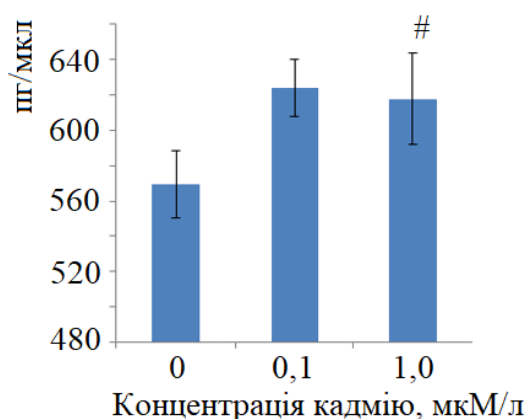


Рис. 3.8. Залежність вмісту одноланцюгової ДНК у клітинах кісткового мозку від концентрації Cd^{2+} в культуральному розчині на 30 добу культивування *in vitro*, # – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем.

Як видно, за цей час вміст одноланцюгової ДНК під впливом 0,1 мкМ/л підвисився на 9 %. Але за той же самий термін на порядок більша концентрація кадмію не змінила кількості одноланцюгової ДНК.

Це може свідчити про те, що розрив водневих зв'язків і вирізування однієї ділянки у подвійній спіралі ДНК за дією Cd^{2+} відбувається тільки у тих її областях, які не взаємодіють з білками хроматину, а саме там, куди ці іони можуть проникнути та увійти у безпосередній контакт з нуклеотидами.

Сама ж поява при апоптозі незапрограмованих одноланцюгових ДНК, за всією їх потенційною мутагенною небезпекою, навряд чи може принести додаткові неприємності клітині, яка і так вже гине.

Висновки до розділу 3

В розділі надано результати експериментального дослідження *in vivo* хронічного впливу малих концентрацій кадмію на масу 3-місячних щурів, масові коефіцієнти їх органів, білковий та ліпідний обміни, стан щитоподібної залози та прооксидантно-оксидантної рівноваги, показники життєздатності та особливості апоптозу фібробластів різних органів і клітин кісткового мозку. В експериментах *in vitro* визначені концентрації кадмію, які призводять у клітинах кісткового мозку до тих же ефектів, що й *in vivo*, а також досліджено характер руйнування ДНК в цих клітинах за показниками кількості мікроядер, ступеню фрагментації ДНК та вмісту її одноланцюгової частки.

Результати досліджень, надані в цьому розділі, відображені в публікаціях здобувача [63, 67, 73, 75, 92, 187, 221, 222, 232–234].

РОЗДІЛ 4

ЗАКЛЮЧЕННЯ

З тексту огляду і частини результатів власних досліджень може скластися враження, що кадмій принципово шкідливий для життя, є абсолютним токсикантом і безпечних для організму кількостей цього металу не існує. При цьому його дія на різні структурні рівні організму часто подібна до дії інших біологічно активних сполук [237, 238]. Недарма навіть встановлені міжнародними організаціями норми споживання кадмію людьми враховують сумарний час його безпечного надходження в організм.

Суттєво, що, як показано у даній роботі, дози кадмію, нижчі за MRL на пів порядки, лише на початковому етапі споживання призводять до значного порушення загального обміну і гальмування росту піддослідних тварин. А через деякий час і обмін, і зростання тварин відновлюються. При цьому на протязі всього терміну вживання кадмію структура ДНК клітин залишається частково пошкодженою, а життєздатність вивчених клітин кісткового мозку і фібробластів дещо знижена. А ось витіснення кальцію – класична дія кадмію – при цій дозі не відбувається.

Таким чином, дія кадмію при малих, можна сказати – прикордонних дозах – вочевидь неоднозначна. З одного боку, на молекулярному рівні, він діє, як токсикант, а з іншого – на рівні організму, принаймні зовні, ця токсичність не проявляється.

Тому й виникає питання – яка ж дійсна роль кадмію у процесах життєдіяльності організмів?

Кадмій був присутній у первинній газово-пиловій хмарі, з якого сформувалася і наша планета, перебував в складі Землі весь час її існування і виникнення життя і перебуває на ній зараз [239].

Тому всі без винятку форми організмів виникали, розвивалися і існували – в залежності від їх географічного місцезнаходження – у присутності більшої або меншої кількості кадмію у водному середовищі, ґрунті і атмосфері.

Унікальність кадмію в тому, що по відношенню до самих різних типів біологічних молекул він є універсальним партнером, який може, вступаючи з ними в контакт, надавати їм особливі властивості.

Якщо говорити про виникнення ферментів, а також інших білків, що містять метали, яке йшло шляхом їх взаємодії, то коли, де і як воно відбувалося, нам невідомо. Але принципово у цій взаємодії повинен був задіяний, так само, як Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, також і Cd, який може заміщувати ці метали в активних центрах наявних ферментів. Однак ферменти, які містять кадмій, у багатоклітинних не виявлені. Ймовірно, це пов'язано з тим, що при формуванні первинних ферментів концентрація рідкого, розсіяного в навколишньому середовищі кадмію була значно меншою, ніж концентрації, а, отже, і доступність інших металів.

Але якщо у процесі, або після формування груп ферментів, які об'єднувались у складні каскадні внутрішньо – та міжклітинні метаболічні системи, кадмій потрапляв в яку-небудь з них, він порушував її функціонування. І це порушення не обов'язково пов'язано з тим, що кадмій, заміщаючи будь-якої метал в активному центрі ферменту, знищує його активність. Цілком можливо, що в інших умовах така заміна не позбавила б молекулу білка ферментативної активності, а лише змінила б тип реакції, яку вона каталізує. Але навіть в такому випадку, коли в сформованому ланцюзі послідовних ферментативних реакцій виявляється сторонній фермент, її функціонування переривається і вплив кадмію виявляється токсичним.

Тому організми набули системи захисту від токсичної дії кадмію, зокрема, сукупність антиоксидантних ферментів, білків, що зв'язують його і низькомолекулярних антиоксидантів різної хімічної природи. І ці системи, очевидно, є універсальними для багатоклітинних істот усіх досліджених систематичних груп хребетних і безхребетних [74, 76, 77, 79, 118].

Ось деякі приклади.

У відділенні травлення і в нирках черевоноги *Achatina fulica*, обробленої розчинами CdCl_2 і ZnSO_4 з концентраціями 0,5 мг/л і 1 мг/л, як вміст антиоксидантних ферментів – СОД, КАТ і GPx – так і неферментативних антиоксидантів – глутатіону та вітаміну С – були зменшені у порівнянні з контрольними тваринами [240].

На прикладі тихоокеанської устриці *Crassostrea gigas* виявлено, що в різних органах тварин (зябровій і травній залозах) експресія мРНК як МТ, так і HSP-90 виникає паралельно під впливом Cd^{2+} , що свідчить про суперпозицію відповідей обох білкових родин на дію токсиканта [241].

Так, у коропів (*Cyprinus carpio*), яких утримували в воді з поступовим підвищенням концентрації CdCl_2 до 7,5 мг/л, вміст МТ у м'язах і печінці досягав 130 нг/г тканини, а при подальшому підвищенні концентрації до 12,5 мг/л, вміст МТ в цих органах знизився до 50 нг/г тканини. Це свідчить про виснаження захисних можливостей МТ за дією високих доз Cd^{2+} через обмеженість синтетичних можливостей цієї системи, принаймні, у цього виду [242].

Дослідження захисної ролі HSP від дії кадмію, проведені на класичних модельних об'єктах токсикології та ембріології – некусучій мошці *Chironomus riparius* і пурпурному морському їжаку *Paracentrotus lividus* відповідно, свідчать, що в межах сімейства HSP його ізомолекули проявляють функціональну різноманітність.

У личинці мошки після введення Cd^{2+} спочатку, через 2 години, відбувається синтез і накопичення HSP-17, через 6 – HSP-21 і HSP-22, а до 24-ї години активуються гени і накопичуються HSP-23, HSP-24, HSP-27 і HSP-34 при зниженні вмісту HSP-22 і незмінності HSP-17 і HSP-21 [243].

В ембріонах морського їжака гени МТ4 і МТ6 активуються при концентраціях CdCl_2 в межах від 1 до 10 мкМ. Гени МТ7 і МТ8 значно збільшують експресію тільки в ембріонах, які отримували найвищу нелетальну дозу – 100 мкМ. За дією летальної дози кадмію – 1 мМ встигають ще більше зрости тільки рівні експресії МТ5 і МТ6 [244].

Більш того, аналогічні механізми дії антиоксидантної ферментативної системи за присутності кадмію виявлені й у рослин.

У листках саджанців сахарної тростини (*Saccharum officinarum* L. cv. Copersucar SP80-3280), які вирощували в поживному розчині з концентрацією CdCl_2 0,2; 2; і 5 мМ протягом 4 діб, при практично незначному зниженні активності СОД, активність КАТ різко зменшувалась зі зростанням концентрації кадмію [245].

В роботі [246] саджанці пшениці (*Triticum aestivum* L. cv. Sonalika) вирощували в поживному розчині з концентрацією CdCl_2 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 мкМ протягом 6 діб. У коріннях активність СОД не виявлялась зовсім навіть при найнижчій концентрації кадмію, тоді як у пагонах вона різко знижувалася з підвищенням його рівня. Активність КАТ знижувалась в обох тканинах і більшою мірою в коріннях. В той же час активність GPx збільшувалася як у коріннях, так і у пагонах.

Аналогічні результати отримані і на інших видах рослин. Це свідчить, безсумнівно, про універсальність взаємодії антиоксидантних захисних механізмів з кадмієм у всіх багатоклітинних істот.

І все ж існує група організмів – діатомові водорості, розповсюджені в прибережних водах в Атлантичному і Тихому океанах, а також в річках і озерах в Європі, Азії, Південній і Північній Америці. Для цих організмів кадмій – не токсикант, а необхідний для життя метал.

Найбільш повно серед них вивчено *Thalassiosira weissflogii* – одноклітинну мікроводорість, що живе в регіонах з надзвичайно низькими вмістами цинку і CO_2 в морській воді і може для підвищення ефективності фотосинтезу використовувати С4-шлях утилізації вуглецю.

Ці водорості виробляють карбоангідразу (CDCA1), що містить в каталітичному центрі іон Cd^{2+} . Цей специфічний фермент, аналогічно звичайним цинковим карбоангідразам, каталізує процес оборотної гідратації CO_2 , забезпечуючи, таким чином, необхідне для фотосинтезу поглинання неорганічного вуглецю [247, 248].

Чи є ці організми реліктом часу формування ферментів, які використовують метали в якості кофакторів, або ж поява у них кадмієвих карбоангідраз пізніше придбання, що виникло в результаті мутацій в специфічному середовищі з малим вмістом інших металів, в даний час невідомо.

Крім цього переконливого факту біологічної важливості кадмію, існують ще, справді, нечисленні дослідження, в яких виявлені не токсичні, а стимулюючі властивості цього металу у вищих організмів за дією надмалих концентрацій.

Так, наприклад, показано, що концентрації кадмію в культуральному середовищі, нижчі за 100 пМ, значно збільшують синтез ДНК в культурах міобластів лінії L6J1 і хондроцитів щурів, лінії LLC-PK1 епітеліальних клітин нирки свині і стимулюють їх проліферацію і швидкість росту [10].

В роботі [11] клітини передміхурової залози людини лінії RWPE-1 протягом 20 тижнів витримували в середовищах з концентраціями кадмію (10^{-36} - 10^{-18}) М, а потім на 8 тижнів переводилися в середу з концентрацією 10^{-5} М, яка проявляла по відношенню до цих клітин потужну канцерогенну дію [12]. Однак після попередньої обробки наднизькими концентраціями кадмію як ступінь, так і швидкість ракового переродження цих клітин істотно знизилася, що корелювало з підвищенням вмісту в них мРНК MT-1G і, відповідно, різким збільшенням синтезу металотіонеїнів. Автори вважають, що виявлений ефект являє собою класичний «захисний гормезис» [13].

Ці та ряд інших фактів такого роду дозволяють вважати, що кадмій можна віднести до умовно-есенціальних мікроелементів [249, 250].

Важливо, що штучне підвищення концентрації іонів цинку і селену в тканинах печінки та інших органів частково знімає токсичні ефекти при введенні високих доз кадмію [251, 252]. Штучне підвищення в крові низькомолекулярних полісахаридів і ендогенних антиоксидантів – вітамінів С і Є знижує інгібуючу дію кадмію на ферментативну антиоксидантну систему і рівень окислення ліпідів в еритроцитах [253].

Тому сама основа токсичності кадмію – конкурентні відносини з іншими металами за взаємодію з одними і тими ж хімічними групами біомолекул, а також

використання сполук, які зв'язують продукти його оксидативної дії – визначає і можливість її нейтралізації.

Висновки до розділу 4

В розділі на основі отриманих в роботі результатів, порівняння їх з даними літературних джерел і узагальнення, пропонується розглядати токсичність кадмію не як абсолют, а як результат еволюційного розвитку багатоклітинних тварин, які обрали для здійснення біохімічних процесів інші метали, подібні за властивостями з кадмієм. Про це переконливо свідчить група одноклітинних організмів - мікроводорості *Thalassiosira weissflogii*, для яких кадмій є есенціальним елементом.

Показано також, що загальноприйнята міжнародна величина безпечного надходження кадмію в організм протягом року - MRL, є, по суті, умовною, тому що у п'ять разів менша концентрація кадмію призводять спочатку до зупинки росту лабораторних щурів і навіть зниження їх маси. Ці процеси відновлюються через 3 тижні, що свідчить про наявність метаболічних компенсаційних механізмів, спрямованих проти дії кадмію на рівні організму.

В той же самий час на клітинному рівні зберігається токсична дія кадмію, що полягає в порушенні структури ядерної ДНК і зниження життєздатності частини фібробластів і клітин кісткового мозку.

Все це свідчить про те, що величина MRL є не абсолютно безпечною, а прикордонною за рівнем токсичності, принаймні, для лабораторних щурів.

В цьому розділі використані публікації здобувача [237, 238].

ВИСНОВКИ

In vivo та *in vitro* досліджено вплив хронічної дії низьких концентрацій кадмію на щурів на рівні цілісного організму, його окремих органів та клітинному. Визначені і порівняні концентрації кадмію, які на клітинному рівні призводять до одних й тих же ефектів *in vivo* та *in vitro*.

1. Вперше показано, що Cd^{2+} у концентраціях 0,1 і 1 мкг/кг/добу, які у 5 і у 8,3 разів менші за MRL та PTWI відповідно, при щоденному надходженні в організм щурів протягом 5 тижнів, у перші 3 тижні зупиняє зростання тварин, яке поновлюється після 3 тижня експерименту. При цьому масові коефіцієнти внутрішніх органів – серця, печінки, нирок, легень, насінників - збільшуються протягом всього експерименту, хоча ступінь збільшення менша, ніж у контролі.

2. Доведено, що ці ефекти є результатом впливу кадмію на білковий обмін, внаслідок чого відбувається здебільшого масивне руйнування м'язової тканини, на фоні незмінності, а на перших етапах дії Cd^{2+} і зниження інтенсивності їх загального синтезу.

3. Вперше показано, що за впливом низьких концентрацій кадмію у піддослідних тварин виникає гіпотиреоїдний стан, ступінь розвитку якого корелює з порушеннями ліпідного обміну.

4. Виявлено зсув прооксидативно-антиоксидативної рівноваги в організмі щурів у бік розвитку оксидативного стресу, причиною чого є недостатня активність СОД і КАТ за дії кадмію

5. Вперше показано, що рівень адгезії клітин кісткового мозку і фібробластів усіх досліджених органів, а також міграційної здатності фібробластів зменшується, а рівень апоптозу збільшується із зростанням концентрації та терміну дії Cd^{2+} .

6. Вперше доведено, що показники порушення структури ДНК за дією кадмію – кількість мікроядер, ступінь фрагментація ДНК і її одноланцюгова частка - збільшуються із зростанням концентрації та терміну дії Cd^{2+} .

7. В експериментах *in vivo* кількісні величини показників впливу кадмію вищі за концентрації Cd^{2+} 0,1, ніж 1,0 мкМ/л. Одні й ті ж кількісні значення показників впливу кадмію на клітини *in vitro* досягаються при суттєво більших концентраціях Cd^{2+} , ніж *in vivo*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ten chemical sof major public health concern. Cadmium. WHO Technical Report Series. 2018. URL: http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/cadmium/en/ (дата звернення: 05.08.2017).
2. Tellez-Plaza M., Guallar E., Howard B. V., Umans J. G., Francesconi K. A., Goessler W., Silbergeld E. K., Devereux R. B., Navas-Acien A. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease // *Epidemiology*. 2013. Vol. 24 (3). P. 421–429.
3. James K. A., Meliker J. R. Environmental cadmium exposure and osteoporosis: A review // *Intern. J. Public Health*. 2013. Vol. 58 (5). P. 737–745.
4. Peng Q., Bakulski K. M., Nan B., Park S. K. Cadmium and Alzheimer's disease mortality in U.S. adults: Updated evidence with a urinary biomarker and extended follow-up time // *Environ. Res*. 2017. Vol. 157. P. 44–51.
5. Jiménez-Ortega V., Cano B. P., Fernández-Mateos P., Cardinali D. P., Esquifino A. Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin // *Free Radic. Biol. Med*. 2012. Vol. 53 (12). P. 2287–2297.
6. Luevano J., Damodaran C. A. Review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis // *J. Environ. Pathol. Toxic. Oncol*. 2014. Vol. 33 (3). P. 183–194.
7. Aoshima K. Itai-itai disease: Renal tubular osteomalacia induced by environmental exposure to cadmium – historical review and perspectives // *Soil Sci. Plant Nutr*. 2016. Vol. 62 (4). P. 319–326.
8. Ozturk I. M., Buyukakilli B., Balli E., Cimen B., Gunes S., Erdogan S. Determination of acute and chronic effects of cadmium on the cardiovascular system of rats // *Toxic. Mech. Methods*. 2009. Vol. 19 (4). P. 308–317.
9. Tripathi S., Srivastav A. K. Cytoarchitectural alterations in kidney of Wistar rat after oral exposure to cadmium chloride // *Tissue Cell*. 2011. Vol. 43 (2). P. 131–136.
10. von Zglinicki T., Edwall C., Östlund E., Lind B., Nordberg M., Ringertz N. R., Wroblewski J. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth // *J. Cell Science*. 1992. Vol. 103. P. 1073–1081.

- 11.** Huff J., Lunn R.M., Waalkes M. P., Tomatis L., Infante P. F. Cadmium-induced cancers in animals and in humans // *Int. J. Occup. Environ. Health*. 2007. Vol. 13 (2). P. 202–212.
- 12.** Chen Q. Y., Des Marais T., Costa M. Annual review of pharmacology and toxicology. metals and mechanisms of carcinogenesis // *Rev. Pharm. Toxic.* 2019. Vol. 59. P. 537–554.
- 13.** Calabrese E. J., Baldwin L. A. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology // *Toxic. Sci.* 2003. Vol. 71 (2). P. 246–250.
- 14.** Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives // *WHO Technical Report Series*. 2011. N 960. P. 149–162.
- 15.** Toxicological profile for cadmium. 2012. 2.3. Minimal Risk Levels (MRLs). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158837/#S20> (дата звернення: 08.09.2017).
- 16.** Pritzkowa W., Wunderlib S., Vogla J., Fortunatoc G. The isotope abundances and the atomic weight of cadmium by a metrological approach // *Int. J. Mass Spectrometry*. 2007. Vol. 261 (1). P. 74–85.
- 17.** Meija J., Coplen T. B., Berglund M., Brand W. A., De Bièvre P., Gröning M., Holden N. E., Irrgeher J., Loss R. D., Walczyk T., Prohaska T. Atomic weights of the elements (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 2016. Vol. 88 (3). P. 265–291.
- 18.** All the information on Cadmium – Level of cadmium in the environment. URL: www.cadmium.org/environment/level-of-cadmium-in-the-environment (дата звернення: 10.09.2017).
- 19.** Cadmium (Cd). URL: <https://www.mbari.org/wp-content/static/chemsensor/cd/cadmium.html> (дата звернення: 10.09.2017).
- 20.** Жовинський Э. Я., Кураева И. В. Геохимия тяжелых металлов в почвах Украины. К.: Наук. думка, 2002. 214 с.

21. Level of cadmium in the environment. 3.3. Cadmium in Soil. URL: <https://www.cadmium.org/environment/level-of-cadmium-in-the-environment> (дата звернення: 10.09.2017).

22. Zhang X., Chen D., Zhong T. Zhang X., Cheng M., Li X. Assessment of cadmium (Cd) concentration in arable soil in China // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015. Vol. 22 (7). P. 4932–4941.

23. Tótha G., Hermann T., Da Silvac M.R., Montanarella L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety // *Environ. Int.* 2016. Vol. 88. P. 299–309.

24. Макаренко Н. А., Козий І. С. Определение кадмия в почве урбанизированных территорий и его влияние на здоровье человека // *Вісник КрНУ імені Михайла Остроградського*. 2012. Вип. 5 (76). С. 123–125.

25. Яковенко О.В., Кураєва І. В., Філатов В. Ф., Д'яченко Н. О., Дуброва Н. О., Павлюк С. Д. Моделювання забруднення ґрунтів кадмієм у зоні впливу Горлівського хімічного заводу // *Зб. наук. праць «Теоретичні та прикладні аспекти геоінформатики»*. 2014. С. 149–177.

26. Савосько В. Тяжелые металлы в почвах Кривбасса. Кривой Рог: Дионат, 2016. 241 с.

27. Cadmium in Drinking-water. World Health Organization. 2011. 3. Environmental levels and human exposure. 3.2. Water. P. 2. URL: www.who.int/water_sanitation_health/dwq/.../cadmium.pdf (дата звернення: 21.09.2017).

28. Білецька Е. М., Штепа О. П., Онул Н. М., Шокол І. Д., Черняєв С. А. Вміст важких металів у питній воді промислового міста. URL: http://www.rusnauka.com/26_NII_2011/Ecologia/6_92402.doc.htm (дата звернення: 21.09.2017).

29. Тарасенко Л. О., Наконечна Т. В., Селіна В. О. Особливості накопичення важких металів у воді різних регіонів та зон півдня України // *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2012. Т.2, ч.1. Вип. 4. С. 154–158.

30. Janssen D. J., Conway T. M., Seth G. J., Christian J. R., Kramer D. I., Pedersen T. F., Cullen J. T. Undocumented water column sink for cadmium in open ocean oxygen-deficient zones // PNAS. 2014. Vol. 111 (19). P. 6888–6893.

31. Baars O., Abouchami W., Galer S. J. G., Boye M., Croo tP. L. Dissolved cadmium in the Southern Ocean: Distribution, speciation, and relation to phosphate // Limnology and Oceanography. 2014. Vol. 59 (2). P. 385–399.

32. Trenberth K. E., Smith L. The mass of the atmosphere: a constraint on global analyses // J. Climate. 2005. Vol. 18. P. 864–875.

33. Production of cadmium 2017. Statistic. URL: <https://www.statista.com/statistics/264983/production-of-cadmium/> (дата звернення 18.10.2017).

34. Level of cadmium in the environment. 3.1. Cadmium in Air. URL: <https://www.cadmium.org/environment/level-of-cadmium-in-the-environment>: (дата звернення: 18.10.2017).

35. Cheng K., Tian H. Z., Zhao D., Lu L., Wang Y., Chen J., Liu X. G., Jia W. X., Huang Z. Atmospheric emission inventory of cadmium from anthropogenic sources // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2014. Vol. 11 (3). P. 605–616.

36. Cadmium Review. 2003. Report N 1. Issue N 04. CRL.EHN. 25 p. URL: http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf (дата звернення: 28.10.2017).

37. Сплавы драгоценных металлов: <http://www.uwelir.ru/metal/metal4.html> (дата звернення: 30.10.2017).

38. McDonald's отзываєт 12 млн стаканов из-за примесей кадмия. URL: <http://www.interfax.ru/russia/139820> (дата звернення: 30.10.2017).

39. Директива 2011/65/ЄС Європейського парламенту та Ради «Про обмеження використання деяких небезпечних речовин в електричному та електронному обладнанні» від 08.06.2011 р. Додаток II. «Заборонені речовини, зазначені в частині 1 статті 4 та значення максимальної концентрації, яка допускається, виражена в масовій частці в однорідних матеріалах» // Офіційний

Вісник Європейського Союзу. 01.07.2011. UA.L 174-188. URL: old.minjust.gov.ua/file/32573.docx (дата звернення: 01.11.2017).

40. Постанова кабінету міністрів України від 10 03.2017 р. № 139 «Про затвердження Технічного регламенту обмеження використання деяких небезпечних речовин в електричному та електронному обладнанні»із змінами, згідно з Постановами КМ № 143 від 28.02.2018 і № 383 від 16.05.2018. // Додаток 2 до Технічного регламенту. «Обмеження використання деяких небезпечних речовин в електричному та електронному обладнанні, та максимально допустимі значення їх концентрації за масою в однорідних матеріалах». Київ. 22.05.2018. URL: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/139-2017-%D0%BF> (дата звернення: 01.11.2017).

41. Ризики нераціонального застосування добрив – Пропозиція. 2017. URL: <https://propozitsiya.com/.../riziki-neracionalnogo-zastosuvan...> (дата звернення: 01.11.2017).

42. Bošković-Rakočević L., Pavlović R., Đurić M. Effect of phosphorus fertilizers on yield and cadmium content of potato tubers // *Acta Agricult. Serbica*. 2017. Vol. XXII (43). P. 37–46.

43. Удобрения без одобрения. URL: <https://life.ru/t/%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0/919286/> (дата звернення: 18.11.2017).

44. Фотоэлементы с использованием теллурида кадмия CdTe Calyxo CX3 85. URL: https://voltline.ua/catalog/solnechnaya_energetika/sol_paneli/tonkoplenochnye_fotoelementy/fotoelementy_s_ispolzovaniya_tellurida_kadmiya_cdte_calyxo_cx3_85.html (дата звернення: 23.11.2017).

45. Oskarsson A., Widell A., Olsson I. M., Grawé K. P. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups // *Biometals*. 2004. Vol. 17 (5). P. 531–534.

46. Alves L. R., dos Reis A. R., Gratão P. L. Heavy metals in agricultural soils: from plants to our daily life (a review) // *Científica Jaboticabal*. 2016. Vol. 44 (3). P. 346–361.

- 47.** Смоляр В. І., Петрашенко Г. І. Вміст кадмію в харчових продуктах і раціонах та його токсичність // Проблеми харчування. 2010. С. 1–2. С. 28–31.
- 48.** European Food Safety Authority. Cadmium dietary exposure in the European population // EFSA J. 2012. Vol. 10 (1). P. 2551–2588.
- 49.** Yatmark P., Nakthong C., Trakranrungsie N. Comparative evaluation of cadmium contents in livestock's kidney from Measot district, Tak province and the SW vicinity of Bangkok // Thailand J. Toxic. 2010. Vol. 25 (2). P. 81–89.
- 50.** Chunhabundit R. Cadmium exposure and potential health risk from foods in contaminated area // Thailand Toxic. Res. 2016. Vol. 32 (1). P. 65–72.
- 51.** Cadmium in food – scientific opinion of the panel of contaminants in the food chain // EFSA J. 2009. Vol. 7 (3). P. 1–139.
- 52.** Сульдина Т. И. Содержание тяжёлых металлов в продуктах питания и их влияние на организм // Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. 2016. № 1. С. 136–140.
- 53.** Chunhabundit R., Srianujata S., Bunyaratvej A., Kongkachuichai R., Satayavivad J., Kaojarern S. Cadmium bioavailability from vegetable and animal-based foods assessed with in vitro digestion/caco-2 cell model // J. Med. Assoc. Thailand, Chotmaiher Thangphaet. 2011. Vol. 94 (2). P. 164–171.
- 54.** Cadmium Absorption. Corrosion-Doctors. URL: <https://corrosion-doctors.org/Elements-Toxic/Cadmium-absorption.htm> (дата звернення: 26.11.2017).
- 55.** Xiufeng H., Xinwei L., Qinggeletu, Yongfu W. Health risks and contamination levels of heavy metals in dusts from parks and squares of an industrial city in semi-arid area of China // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2017. Vol. 14 (8). P. 886–897.
- 56.** Васильева О. С. Хроническая обструктивная болезнь легких и профессиональные факторы // Пульмонология. 2007. № 6. С. 1–12.
- 57.** Rokadia H. K., Agarwal S. Serum heavy metals and obstructive lung disease: results from the national health and nutrition examination survey // CHEST J. 2013. Vol. 143 (2). P. 388–397.

58. Ashraf M. W. Concentrations of cadmium and lead in different cigarette brands and human exposure to these metals via smoking // *Int. Ref. Res. J.* 2011. Vol. 2 (2). P. 140–147.

59. Piadéa J.-J., Jaccard G., Dolkaa C., Belushkina M., Wajrockb S. Differences in cadmium transfer from tobacco to cigarette smoke, compared to arsenic or lead // *Toxic. Reports.* 2015. Vol. 2. P. 12–26.

60. Марушко Ю. В., Таринська О. Л., Олефір Т. І., Фус С. В., Асонов А. О. Кадмій: накопичення та вплив на організм дитини // *Науковий вісник національного медичного університету ім. О.О.Богомольця.* 2010. № 3. С. 62–66.

61. Thévenod F. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs // In: *Cadmium: from toxicity to essentiality.* Eds.: Sigel A., Sigel H., Sigel R. K. O. Springer. 2013. Vol. 11. 560 p. Chapter 14. P. 415–490.

62. Kovalchuk Y. P., Prischepa I. V., Si U., Nedzvetsky V. S., Kot Y. G., Persky E. E., Ushakova G. A. Distribution of glial fibrillary acidic protein in different parts of the rat brain under cadmium exposure // *Ukr. Biochem. J.* 2015. Vol. 87. N 3. P. 117–123.

63. Wu Si, Sapozhnikova V., Pyrina I., Kot Yu. [et al]. The features of cytotoxicity of cadmium ions ultra-low doses prolonged administration on rats skin, lungs, kidneys and cornea fibroblasts // *Матеріали X Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери».* Харків, 2015. С. 23–24.

64. Wu Si, Polonska A., Filonenko S., Lukan R., Yehemberdinov Ye., Nemyrovska Yu., Pyrina I. Accumulation of cadmium ions and their cytotoxicity effects in skin, lungs, kidneys, liver and bone marrow under low concentrations prolonged administration on rats // *Матеріали XIII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери».* Харків, 2018. С. 13.

65. Влияние кадмия на здоровье человека. URL: <http://crass.on.ru/teida/cadmium.html> (дата звернення: 03.12.2017).

66. Cadmium (II) chloride – Acute Tox. URL: [http://www.acutetox.eu/pdf_human_short/21-Cadmium%20\(II\)%20chloride%20revised.pdf](http://www.acutetox.eu/pdf_human_short/21-Cadmium%20(II)%20chloride%20revised.pdf) (дата звернення: 05.12.2017).

67. У Си, Пырина И. С., Кот Ю. Г., Кот Е. В., Перский Е. Э. Особенности цитотоксичности длительного введения ультрамалых доз ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы крыс // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2015. Вип. 25. С. 332–340.

68. Chmielowska-Bąk J., Izbiańska K., Deckert J. The toxic Doppelganger: on the ionic and molecular mimicry of cadmium // Acta Biochim. Pol. 2013. Vol. 60 (3). P. 369–374.

69. Bertin G., Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) // Biochimie. 2006. Vol. 88 (11). P. 1549–1559.

70. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B. B., Beeregowda K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals // Interdiscip. Toxic. 2014. Vol. 7 (2). P. 60–72.

71. Sharma S. K., Goloubinoff P., Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding // Res. Commun. 2008. Vol. 372 (2). P. 341–345.

72. Tamás M. J., Sharma S. K., Ibstedt S., Jacobson T., Christen P. Heavy metals and metalloids. as a cause for protein misfolding and aggregation // Biomolecules. 2014. Vol. 4 (1). P. 252–267.

73. Kharchenko T., Plotnykov A., Wu Si, Kot K. The cytotoxicity of cadmium ions small doses in long-term culture of bone marrow cells // Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology. Ukr. Biochem. J. 2018. Vol. 90. N 3. P. 117.

74. Xuan R., Wang L., Sun M., Ren G., Jiang M. Effects of cadmium on carbohydrate and protein metabolisms in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxic. Pharm. 2011. Vol. 154 (3). P. 268–274.

75. У Сі, Кот Ю., Кот К., Морс Р., Доран О., Амжад Х., Перський Є. Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd^{2+} // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2017. Вип. 29. С. 182–187.

76. Лапирова Т. Б. Реакция показателей белкового и углеводного обмена рыб на воздействие кадмия (обзор) // Труды института биологии внутренних вод РАН. 2017. № 77 (80). С. 77–91.

77. Yallappa S., Nuzhat F. B. A. Toxic effect of carbohydrate metabolism changes on carp (*Cyprinus carpio*) exposed to cadmium // Chloride Intern. J. Fisher. Aquatic Stud. 2018. Vol. 6 (2). P. 364–371.

78. Chrestensen C. A., Starke D. W., Mieyal J. J. Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (Glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275 (34). P. 26556–26565.

79. Effron D., de la Horra A. M., Defrieri R. L., Fontanive V., Palma R. M. Effect of cadmium, copper, and lead on different enzyme activities in a native forest soil // Commun. Soil Scie. Plant Analysis. 2004. Vol. 35 (9–10). P. 1309–1321.

80. Huang Y. H., Shih C. M., Huang C. J., Lin C. M., Chou C. M., Tsai M. L., Liu T. P., Chiu J. F., Chen C. T. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells // J. Cell Biochem. 2006. Vol. 98 (3). P. 577–589.

81. Sherrer S. M., Penland E., Modrich P. The mutagen and carcinogen cadmium is a high-affinity inhibitor of the zinc-dependent MutL α endonuclease // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2018. Vol. 115 (28). P. 7314–7319.

82. Фоменко О. З., Шаульська О. Е., У Сі, Шевцова А. І., Ушакова Г. О. Вплив кадмію на активність протеолітичних ензимів у мозку та серці щурів // Ukr. Biochem. J. 2014. Vol. 86, N 5 (Suppl. 2). P. 144.

83. Фоменко О. З., Шаульська О.Е., У Сі Вплив кадмію на активність желатиназ у плазмі щурів // Весняні біохімічні читання, присвячені пам'яті професора Березіна В. О. Дніпропетровськ, 2016. С. 58–59.

84. Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron // J. Chem. Soc., Trans. 1894. Vol. 65 (65). P. 899–911.

85. Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A. R., Munters E., Artois T. J., Nawrot T., Vangronsveld J.,

Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge // *Biometals*. 2010. Vol. 23 (5). P. 927–940.

86. Nair A. R., DeGheselle O., Smeets K., Van Kerkhove E., Cuypers A. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 6116–6143.

87. Ikediobi C. O., Badisa V. L., Ayuk-Takem L. T., Latinwo L. M., West J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in crl-1439 normal rat liver cells // *Int. J. Mol. Med.* 2004. Vol. 14 (1). P. 87–92.

88. Kara H., Karata F., Canatan H. Effect of single dose cadmium chloride administration on oxidative stress in male and female rats // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2005. Vol. 29. P. 37–42.

89. Hormozi M., Mirzaei R., Nakhaee A., Izadi S., Haghighi J. D. The biochemical effects of occupational exposure to lead and cadmium on markers of oxidative stress and antioxidant enzymes activity in the blood of glazers in tile industry // *Toxic. Industr. Health*. 2018. Vol. 34 (7). P. 459–467.

90. Tribowo J. A., Arizal M. H., Nashrullah M., Aditama A. R., Utama D. G. Oxidative stress of cadmium-induced ovarian rat toxicity // *Int. J. Chem. Engineer. Appl.* 2014. Vol. 5 (3). P. 254–258.

91. Ogunrinola O. O., Wusu D. A., Fajana O. O., Olaitan S. N. Smith Z. O., Bolaji A.-R. I. Effect of low level cadmium exposure on superoxide dismutase activity in rat // *Tropic. J. Pharm. Res.* 2016. Vol. 15 (1). P. 115–119.

92. У Сі, Кот Ю., Кот К. Вплив тривалої дії малих концентрацій кадмію на показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів // *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances: XVI міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених*. Київ, 2018. С. 150–151.

93. Shukla G. S., Hussain T., Srivastava R. S., Chandra S. V. Glutathione peroxidase and catalase in liver, kidney, testis and brain regions of rats following cadmium exposure and subsequent withdrawa // *Industrial Health*. 1989. Vol. 27. P. 59–69.

- 94.** Cannino G., Ferruggia E., Luparello C., Rinaldi A. M. Cadmium and mitochondria // *Mitochondrion*. 2009. Vol. 9 (6). P. 377–384.
- 95.** Wang Y., Fang J., Leonard S. S., Rao K. M. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 36 (11). P. 1434–1443.
- 96.** Wang B., Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects // *Oxid. Med. Cel. Longev.* 2013. Article ID 898034. 12 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/898034> (дата звернення: 15.12.2017).
- 97.** Jacquet A., Ounnas F., Lénon M., Arnaud J., Demeilliers C., Moulis J. M. Chronic exposure to low-level cadmium in diabetes: role of oxidative stress and comparison with polychlorinated biphenyls // *Curr. Drug. Targets.* 2016. Vol. 17 (12). P. 1385–1413.
- 98.** Liu J., Qu W., Kadiiska M. B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis // *Toxic. Appl. Pharm.* 2009. Vol. 238 (3). P. 209–214.
- 99.** Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease // *FASEB J.* 2003. Vol. 17 (10). P. 1195–1214.
- 100.** Bohr V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 32. P. 804–812.
- 101.** Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kaçmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. Vol. 73. P. 39–85.
- 102.** Жарков Д. О. ДНК-гликозилазы – основные элементы системы репарации ДНК // *Вестник Российской академии наук*. 2013. Т. 83 (2). С. 112–119.
- 103.** Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review // *Environ. Health Perspect.* 1994. Vol. 102 (3). P. 45–50.
- 104.** Banerjee S., Flores-Rozas H. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33 (4). P. 1410–1419.

- 105.** Candeias S., Pons B., Viau M., Caillat S., Sauvaigo S. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: Analysis on dedicated biochips // *Mutation Res.* 2010. Vol. 694 (1–2). P. 53–59.
- 106.** Hossain Z., Huq F. Studies on the interaction between Cd^{2+} ions and nucleobases and nucleotides // *J. Inorg. Biochem.* 2002. Vol. 90. P. 97–105.
- 107.** Zhou W., Saran R., Liu J. Metal sensing by DNA // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117. P. 8272–8325. 3.5.4. Cadmium. P. 8290–8291.
- 108.** Gao H., Zhu Z., Jiang X., Guo J., Song B., Zhang F. Denaturation of dsDNA induced by specific major groove binding of cadmium ion to thymine // *ACS Omega.* 2017. Vol. 2 (11). P. 8490–8494.
- 109.** Templeton D. M., Liu Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival // *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 188 (2). P. 267–275.
- 110.** Risso-de Faverney C., Orsini N., de Sousa G., Rahmani R. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress // *Aquat. Toxic.* 2004. Vol. 69 (3). P. 247–258.
- 111.** Takahashi A., Masuda A., Sun M., Centonze V. E., Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m) // *Brain Res. Bull.* 2004. Vol. 62 (6). P. 497–504.
- 112.** Zhang F., Ren T., Wu J. TGF- β 1 induces apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of mitochondrial reactive oxygen species production // *Exp. Ther. Med.* 2015. Vol. 10 (3). P. 1224–1228.
- 113.** Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxic. Pathol.* 2007. Vol. 35 (4). P. 495–516.
- 114.** Willimott S., Merriam T., Wagner S. D. Apoptosis induces Bcl-XS and cleaved Bcl-XL in chronic lymphocytic leukaemia // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 405 (3). P. 480–485.
- 115.** Lag M., Westly S., Lerstad T., Bjornsrud C., Refsnes M., Schwarze P. E. Cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells: involvement of Bax and p53, but not oxidative stress // *Cell Biol. Toxic.* 2002. Vol. 18 (1). P. 29–42.

116. Tokumoto M., Fujiwara Y., Shimada A., Hasegawa T., Seko Y., Nagase H., Satoh M. Cadmium toxicity is caused by accumulation of p53 through the down-regulation of Ube2d family genes in vitro and in vivo // J. Toxic. Sci. 2011. Vol. 36 (2). P. 191–200.

117. Chen D. J., Xu Y. M., Du J. Y., Huang D. Y., Lau A. T. Cadmium induces cytotoxicity in human bronchial epithelial cells through upregulation of eIF5A1 and NF-kappa B // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. Vol. 445 (1). P. 95–99.

118. Ivanina A. V., Cherkasov A. S., Sokolova I. M. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin // J. Exp. Biol. 2008. Vol. 211. P. 577–586.

119. Klaassen C. D., Liu J., Diwan B. A. Metallothionein protection of cadmium toxicity // Toxic. Appl. Pharm. 2009. Vol. 238 (3). P. 215–220.

120. Selim M. E., Rashed H. A., Aleisa N. A., Daghestani M. H. The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats // Bioinformation. 2012. Vol. 8 (1). P. 58–64.

121. Lee J.-Y., Tokumoto M., Hwang G.-W., Satoh M. Effect of heat shock protein gene expression on cadmium toxicity in human proximal tubular cells // Fundamental Toxic. Sci. 2018. Vol. 5 (3). P. 93–97.

122. Wang H., Yu Y., Li J., Wu H., Sun J., Zhang Z. Cadmium stimulates mouse skin fibroblast apoptosis by affecting intracellular homeostasis // Drug Chem. Toxic. 2017. Vol. 40 (1). P. 74–84.

123. Sone T., Koizumi S., Kimura M. Cadmium-induced synthesis of metallothioneins in human lymphocytes and monocytes // Chem. Biol. Interact. 1988. Vol. 66 (1–2). P. 61–70.

124. Kobayashi E., Suwazono Y., Dochi M., Honda R., Kido T. Influence of consumption of cadmium-polluted rice or Jinzu River water on occurrence of renal tubular dysfunction and/or Itai-itai disease // Biol. Trace Elem. Res. 2009. Vol. 127 (3). P. 257–268.

125. Hamilton J. W. // Access Science. Answers from our experts to important scientific questions. Nov. 13. 2013. What is ouch-ouch or itai-itai disease? URL:

<http://www.accessscience.com/studycenter.aspx?main=9&questionID=4978> (дата звернення: 10.01.2018).

126. Afridi H. I., Kazi T. G., Kazi N., Jamali M. K., Arain M. B., Jalbani N., Baig J. A., Sarfraz R. A. Evaluation of status of toxic metals in biological samples of diabetes mellitus patients // *Diabet. Res. Clin. Pract.* 2008. Vol. 80 (2). P. 280–288.

127. Schwartz G. G., Il'yasova D., Ivanova A. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III // *Diabet. Care.* 2003. Vol. 26 (2). P. 468–470.

128. McConchie D. M., Lawrance L. M. The origin of high cadmium loads in some bivalve molluscs from Shark Bay, Western Australia: a new mechanism for cadmium uptake by filter feeding organisms // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1991. Vol. 21 (2). P. 303–310.

129. Haswell-Elkins M., Satarug S., O'Rourke P., Moore M., Ng J., McGrath V., Walmbay M. Striking association between urinary cadmium level and albuminuria among Torres Strait Islander people with diabetes // *Environ. Res.* 2008. Vol. 106 (3). P. 379–383.

130. Edwards J. R., Prozialeck W. C. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease // *Toxic. Appl. Pharm.* 2009. Vol. 238 (3). P. 289–293.

131. Alicic R. Z., Rooney M. T., Tuttle K. R. Diabetic kidney disease. challenges, progress, and possibilities // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2017. Vol. 12 (12). P. 2032–2045.

132. Li Z., Jiang L., Tao T., Su W., Guo Y., Yu H., Qin J. Assessment of cadmium-induced nephrotoxicity using a kidney-on-a-chip device // *Toxic. Res. (Camb.)*. 2017. Vol. 6 (3). P. 372–380.

133. Gobe G., Crane D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney // *Toxic. Lett.* 2010. Vol. 198 (1). P. 49–55.

134. Tinkov A. A., Ajsuvakova T. F., Skalnaya M. G., Aaseth J., Bjørklund G., Gatiatulina E. R., Popova E. V., Nemereshina O. N., Huang P.-T., Vinceti M., Skalny A. V. Cadmium and atherosclerosis: a review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies // *Environ. Res.* 2018. Vol. 162. P. 240–260.

135. Asgary S., Movahedian A., Keshvari M., Taleghani M., Sahebkar A., Sarrafzadegan N. Serum levels of lead, mercury and cadmium in relation to coronary artery disease in the elderly: a cross-sectional study // *Chemosphere*. 2017. Vol. 180. P. 540–544.

136. Baek K., Chung I. Cadmium exposure is associated with monocyte count and monocyte to HDL ratio, a marker of inflammation and future cardiovascular disease in the male population // *J. Korean. Med. Sci*. 2017. Vol. 32 (9). P. 1415–1422.

137. Messner B., Bernhard D. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance // *Biometals*. 2010. Vol. 23 (5). P. 811–822.

138. Viaene M. K., Masschelein R., Leenders J., De Groof M., Swerts L. J., Roels H. A. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study // *Occup. Environ. Med*. 2000. Vol. 57 (1). P. 19–27.

139. Branca J. J. V., Morucci G., Pacini A. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado // *Neural. Regen. Res*. 2018. Vol. 13 (11). P. 1879–1882.

140. Okuda B., Iwamoto Y., Tachibana H., Sugita M. Parkinsonism after acute cadmium poisoning // *Clin. Neurol. Neurosurg*. 1997. Vol. 99 (4). P. 263–265.

141. Henson M. C., Chedrese P. J. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2004. Vol. 229 (5). P. 383–392.

142. Takiguchi M., Yoshihara S. New aspects of cadmium as endocrine disruptor // *Environ. Sci*. 2006. Vol. 13 (2). P. 107–116.

143. Lv Y., Wang P., Huang R., Liang X., Wang P., Tan J., Chen Z., Dun Z., Wang J., Jiang Q., Wu S., Ling H., Li Z., Yang X. Cadmium exposure and osteoporosis: a population-based study and benchmark dose estimation in Southern China // *J. Bone Miner. Res*. 2017. Vol. 32 (10). P. 1990–2000.

144. Eom S.-Y., Yim D.-H., Hong S.-M., Kim Y.-D., Kim H., Choi B.-S., Park J.-D., Park C.-H., Kim G.-B., Yu S.-D. Changes in blood and urinary cadmium levels and bone mineral density according to osteoporosis medication in individuals with an increased cadmium body burden // *Human Exp. Toxic*. 2018. Vol. 37 (4). P. 350–357.

145. У Си, Харченко Т., Егембердинов Е., Кот Ю., Кот Е., Перский Е. Торможение остеогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток при употреблении питьевой воды, содержащей малые концентрации кадмия – одна из возможных причин развития остеопороза // Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Харків, 2019. С. 75.

146. Kot Yu., Wu Si, Persky Ye., Kot K., Kharchenko T., Lukan R. The effect of low concentration of cadmium on osteogenic differentiation of rats mesenchymal stromal cells in vitro // 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. Session 2: Cell response on stress. Yaremche, 2019. P. 52.

147. Agents Classified by the IARC Monographs. Volumes 1–120. 26 January 2018. URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (дата звернення: 25.12.2017).

148. Hartwig A. Cadmium and cancer // *Met. Ions Life Sci.* 2013. Vol. 11. P. 491–507.

149. Filipič M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability // *Mutat. Res.* 2012. Vol. 733 (1–2). P. 69–77.

150. Janardhan A., Kathera C., Darsi A., Ali W., He L., Yang Y., Luo L., Guo Z. Prominent role of histone lysine demethylases in cancer epigenetics and therapy // *Oncotarget.* 2018. Vol. 9 (76). P. 34429–34448.

151. Peng L., Huang Y. T., Zhang F., Chen J. Y., Huo X. Chronic cadmium exposure aggravates malignant phenotypes of nasopharyngeal carcinoma by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway via hypermethylation of the casein kinase 1 α promoter // *Cancer Manag. Res.* 2018. Vol. 11. P. 81–93.

152. Chen P., Duan X., Li M., Huang C., Li J., Chu R., Ying H., Song H., Jia X., Ba Q., Wang H. Systematic network assessment of the carcinogenic activities of cadmium // *Toxic. Appl. Pharm.* 2016. Vol. 310. P. 150–158.

153. Krinke G. J. History, strains and models. the laboratory rat. Handbook of experimental animals. Ed. Bullock G. R. Academic Press, 2000. P. 3–16.

154. Европейская конвенция «Про защиту позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей». Страсбург, 1998. URL : <http://www.echr-base.ru/CED170.jsp> (дата звернення: 06.03.2017).

155. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV від 21.02.2006 // ВВР. 2006. № 27. Ст. 230.

156. Зміни, внесені до Закону № 3447-IV згідно із Законом № 1759-VI від 15.12.2009. // ВВР. 2010. № 9. Ст. 76.

157. Asghar W., Assal R. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine // Biotechnol. J. 2014. Vol. 9 (7). P. 895–903.

158. Авдеева О. И., Ходько С. В., Рыбакова А. В., Ковалева М. А. Биометрические показатели. Массовые коэффициенты органов. С. 16–19 // В кн. Доклинические исследования. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: Изд-во «ЛЕНА», 2013. 116 с.

159. Комплект реагентов Measure-iT™ Cadmium Assay Kit (Invitrogen, USA), URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp36353.pdf> (дата звернення: 16.03.2017).

160. Greene S. A. Veterinary anesthesia and pain management secrets. Henlay & Belfuc Inc., 2002. P. 266.

161. Наборы производства DAC-SPECTROMED, 2015. URL: http://www.micromed.ua/product-category/produkcija_dlya_laboratoriy/serologicheskie_lateks_testi__agglutinacionnie_testi_proizvodstva_dac_spectromed_moldova/ (дата звернення: 16.03.2017).

162. Комплекты реагентов Xema-Medica. 2015. URL: <http://xemamedica.com/html/reagents/xema/> (дата звернення: 16.03.2017).

163. 8 isoprostane ELISA Kit - Abcam. URL: [http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20protocol%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20protocol%20(website).pdf) (дата звернення: 26.03.2017).

- 164.** Protein Carbonyl Fluorometric Assay Kit - Interchim. URL: <http://www.interchim.fr/ft/G/GV7160.pdf> (дата звернення: 26.03.2017).
- 165.** Superoxide Dismutase Assay Kit - Cayman Chemical. URL : <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf> (дата звернення: 26.03.2017).
- 166.** Catalase Assay Kit - Cayman Chemical. URL: <https://www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf> (дата звернення: 26.03.2017).
- 167.** Rittié L., Fisher G. J. Isolation and culture of skin fibroblasts // Meth. Mol. Med. 2005. Vol. 117. P. 83–98.
- 168.** Bueno E. Isolation of corneal stromal fibroblasts with collagenase. Eds. Atala A., Lanza R. Academic press, 2000. P. 927–941.
- 169.** Baglole C. J., Reddy S. Y., Pollock S. J. Isolation and phenotypic characterization of lung fibroblasts // Meth. Mol. Med. 2005. Vol. 117. P. 115–119.
- 170.** Gritsenko M., Kot Yu., Kot K., Wu Si. Growth dynamics of primary fibroblast culture from rats of different ages // International Conference of Young Scientists. Киев, 2015. С. 165.
- 171.** Gheisari Y., Soleimani M., Zeinali S., Arefian E., Atashi A., Zarif M. N. Isolation of stem cells from adult rat kidneys // Biocell. 2009. Vol. 33 (1). P. 33–38.
- 172.** Cadena-Herreraa D., Esparza-De Lara J. E. Validation of three viable-cell counting methods: manual, semi-automated, and automated // Biotech. Reports. 2015. Vol. 7. P. 9–16.
- 173.** Invitrogen Countess™ automated cell counter. Catalog N C10227. User manual. 2009. P. 28.
- 174.** Positive cell isolation. Thermo Fisher. 2015. URL: <http://www.thermofisher.com/ua/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation.html> (дата звернення: 05.02.2018).
- 175.** Benton C. Bone marrow isolation, crushing technique. Millipore Bone Marrow Harvesting and Hematopoietic Cell Isolation Kit protocol. URL: <https://media.bcm.edu/documents/2015/ec/isolation-of-bone-marrow-by-bone-crushing-2009.pdf> (дата звернення: 15.02.2018).

- 176.** Кругляков П. В., Полинцев Д. Г., Вийде С. К., Кислякова Т. В. Способ получения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга млекопитающих и популяция мезенхимальных стволовых клеток, полученных таким способом. 2007. Описание изобретения к патенту № RU2303632C1. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2303632C1/ru> (дата звернения: 15.02.2018).
- 177.** Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability // Curr. Protoc. Immunol. 2015. Vol. 111. P. A.3 B.1–3.
- 178.** Cyto Select TM 24-well cell adhesion assay (collagen I-coated, colorimetric format) // Cell Biolabs Inc. 2015. P. 5.
- 179.** Cyto Select TM 24-well cell migration and invasion assay (8 μ m, colorimetric format) // Cell Biolabs Inc. 2015. P. 10.
- 180.** Guava® Millipore Nexin Protocol. URL: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Guava-ViaCount-Reagent-for-Flow-Cytometry-100-tests,MM_NF-4000-004 (дата звернения: 25.02.2018).
- 181.** Annexin V-EGFP Apoptosis Staining. Detection Kit (ab 14153). Abcam®. URL: <http://www.abcam.com/annexin-v-egfp-apoptosis-staining--detection-kit-ab14153.html> (дата звернения: 25.02.2018).
- 182.** Утевская Л. А., Перский Е. Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн Харьк ун-та. 1982. № 226. С. 18–20.
- 183.** De Rosa C. S., Rotta J., Barreto P. L. M., Beirão L. H. Extraction, quantification and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest // Alim. Nutr. 2007. Vol. 18 (3). P. 237–240.
- 184.** Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T., Surralles J., Crott J. W., Parry J., Norppa H., Eastmond D. A., Tucker J. D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells // Mutagenesis. 2011. Vol. 26 (1). P. 125–132.
- 185.** Oliveira-Martins C. R., Grisolia C. K. Determination of micronucleus frequency by Acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide // Gen. Mol. Res. 2007. Vol. 6 (3). P. 566–574.

186. Alok D. Protocol for the Single Gel Electrophoresis / Comet Assay for Rapid Genotoxicity Assessement. URL: <http://www.cometassayindia.org/protocol%20for%20comet%20assay.pdf> (дата звернення: 21.01.2018).

187. У Си, Харченко Т., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс *in vitro* // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2017. Вип. 30. С. 68–76.

188. Програмне забезпечення CaspLab. CaspLab – cross-platform image analysis software to measure level of DNA damage in Single Cell Gel Electrophoresis. Free Software. URL: <http://casplab.com/download> (дата звернення: 21.01.2018).

189. Набір реагентів для визначення концентрації одноланцюгової ДНК. Інструкція користувача. Qubit® ssDNA Assay Kit (Molecular Probes). URL: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/Qubit_ssDNA_Assay_UG.pdf (дата звернення: 23.03.2018).

190. Glantz S. A. Primer of Biostatistics. 4th Edition. McGraw-Hill, 2007. 298 p.

191. How to add a trend or moving average line to excel chart. URL: <http://www.pryor.com/blog/how-to-add-average-line-to-excel-chart/> (дата звернення: 18.04.2018).

192. Авдеева О. И., Ходько С. В., Рыбакова А. В., Ковалева М. А. Биометрические показатели. Динамика веса экспериментальных животных в онтогенезе // В кн.: Доклинические исследования. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. С. 12–16.

193. Swedko P. J., Clark H. D., Paramsothy K., Akbari A. Serum creatinine is an in adequate screening test for renal failure in elderly patients // Arch. Intern. Med. 2003. Vol. 163 (3). P. 356–360.

194. Yokota J. Crush syndrome in disaster // JMAJ. 2005. Vol. 48 (7). P. 341–352.

195. Макаров В. Г., Абрашова Т. В., Соколова А. П., Ковалева М. А. Биохимические показатели. Методы оценки биохимических показателей крови // В кн. Доклинические исследования. Физиологические, биохимические и

биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. С. 44–45, 51–59, 62, 64, 68.

196. Pandya V., Rao A., Chaudhary K. Lipid abnormalities in kidney disease and management strategies // *World J. Nephrol.* 2015. Vol. 4 (1). P. 83–91.

197. Hristev H., Penkov D., Hallak K., Baykov B., Bliznakov A. Serum protein changes in rabbits after chronic administration of lead and cadmium // *J. Centr. Europ. Agriculture.* 2008. Vol. 9 (1). P. 141–145.

198. Bulbula M. C., Dagelb T., Afsarc B. Ulusud N. N., Kuwabarae M., Covicf A. Kanbayb M. Disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease // *Blood Purif.* 2018. Vol. 46. P. 144–152.

199. Pucci E., Chiovato L., Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000. Vol. 2. P. 109–112.

200. Basu G., Mohapatra A. Interactions between thyroid disorders and kidney disease // *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2012. Vol. 16 (2). P. 204–213.

201. Clapham D. E. Calcium signaling. Review // *Cell.* 2007. Vol. 131 (6). P. 1047–1058.

202. Swandulla D., Armstrong C. M. Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neurons. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. Vol. 86 (5). P. 1736–1740.

203. Шилина В. В., Хусаинов Д. Р., Коренюк И. И., Черетаев И. В. Влияние интоксикации кадмием на болевую чувствительность крыс до и после блокирования D2-, 5HT3- и AT1- рецепторов // *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2014. № 4 (28). С. 169–179.

204. Все, что вы должны знать о кальции | Фонд Луи Бондюэля. URL: www.fondation-louisbonduelle.org › nutrient › кальций (дата звернения: 18.03.2018).

205. Chmielowska-Bąk J., Lefèvre I., Lutts S., Deckert J. Short term signaling responses in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress // *J. Plant Physiol.* 2013. Vol. 170 (18). P. 1585–1594.

206. Герасимчук Н. Н. 8-изопростан как основной маркер оксидативного стресса // *Запорожский медицинский журнал.* 2018. Т.20. № 6 (111). С. 853–859.

- 207.** Morrow J. D., Hill K. E., Burk R. F., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts L. J. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. P. 9383–9387.
- 208.** Milic I., Fedorova M., Teuber K., Schiller J., Hoffmann R. Characterization of oxidation products from 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycerophosphatidylcholine in aqueous solutions and their reactions with cysteine, histidine and lysine residues // *Chem. Phys. Lipids*. 2012. Vol. 165. P. 186–196.
- 209.** Zelko I. N., Mariani T. J., Folz R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression // *Free. Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33 (3). P. 337–349.
- 210.** Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. Diversity of structures and properties among catalases // *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. Vol. 61 (2). P. 192–208.
- 211.** Trepatt X., Chen Z., Jacobson K. Cell migration // *Comp. Physiol.* 2012. Vol. 2 (4). P. 2369–2392.
- 212.** Khalili A. A., Ahmad M. R.A. Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16 (8). P. 18149–18184.
- 213.** Puliafito A., Hufnagel L., Neveu P., Streichan S., Sigal A., Fyngenson D. K., Shraiman B. I. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition // *PNAS*. 2012. Vol. 109 (3). P. 739–744.
- 214.** Wang H., Yu Y., Li J., Wu H., Sun J., Zhang Z. Cadmium stimulates mouse skin fibroblast apoptosis by affecting intracellular homeostasis // *Drug and Chem. Toxic.* 2017. Vol. 40 (1). P. 74–84.
- 215.** Lekic P. C., Pender N., McCulloch C. A. G. Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases, and treatments of periodontal tissues? // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1997. Vol. 8 (3). P. 253–268.

216. Srirama G., Bigliardi P. L., Bigliardi-Qia M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro // *Europ. J. Cell Biol.* 2015. Vol. 94 (11). P. 483–512.

217. Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., Pelon F., Bouracho B., Cardon M., Sirven P., Magagna I., Fuhrmann L., Bernard C., Bonneau C., Kondratova M., Kuperstein I., Zinovyev A., Givel A.-M., Parrini M.-C., Soumelis V., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer // *Cancer Cell.* 2018. Vol. 33 (3). P. 463–479. e10.

218. Васильев Ю. М. Клетка, как архитектурное чудо // *Соросовский образовательный журнал.* 1996. № 4. С. 4–10.

219. Templeton D. M., Liu Y. Effects of cadmium on the actin cytoskeleton in renal mesangial cells // *Can. J. Physiol. Pharm.* 2013. Vol. 91 (1). P. 1–7.

220. Choong G., Liu Y., Templeton D.M. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity // *Chem. Biol. Interact.* 2014. Vol. 211 (1). P. 54–65.

221. Gritcenko M., U Si, Olijnichenko Y. Dependence of the dynamics collagen and glycosaminoglycans in fibroblast culture on the number of their divisions // *Матеріали IX Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери».* Харків, 2014. С. 21.

222. Костіна Т., Пономаренко О., Пиріна І., У Сі. Вплив довгострокового вживання низьких доз солей кобальту і кадмію на зміну рівня вмісту колагену в сполучних тканинах щурів // *Молодь і поступ біології.* Львів, 2016. С. 41–42.

223. Delalleau A., Josse G., Lagarde J.-M., Zahouani H., Bergheau J.-M. Characterization of the mechanical properties of skin by inverse analysis combined with the indentation test // *J. Biomechanics.* 2006. Vol. 39 (9). P. 1603–1610.

224. Suki B., Stamenovic D., Hubmayr R. Lung parenchymal mechanics // *Comp. Physiol.* 2011. Vol. 1 (3). P. 1317–1351.

225. Hayes S., Lewis P., Islam M. M., Douth J., Sorensen T., White T., Griffith M., Meek K. M. The structural and optical properties of type III human collagen biosynthetic corneal substitutes // *Acta Biomaterialia*. 2015. Vol. 25. P. 121–130.

226. Pacella E., Pacella F., De Paolis G., Parisella F. R., Turchetti P., Anello G., Cavallotti C. Glycosaminoglycans in the human cornea: age-related changes // *Ophthalmol. Eye Dis.* 2015. Vol. 7. P. 1–5.

227. Elsafadi M., Manikandan M., Atteya M., Hashmi J. A., Iqbal Z., Aldahmash A., Alfayez M., Kassem M., Mahmood A. Characterization of cellular and molecular heterogeneity of bone marrow stromal cells // *Stem Cells Int.* 2016. Vol. 2016. Article ID 9378081. 18 pages.

228. Birbrair A., Frenette P. S. Niche heterogeneity in the bone marrow // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016. Vol. 1370 (1). P. 82–96.

229. Model M. A. Possible causes of apoptotic volume decrease: an attempt at quantitative review // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014. Vol. 306 (5). P. C417–C424.

230. Takaku T., Malide D., Chen J., Calado R. T., Kajigaya S., Youn N. S. Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy // *Blood*. 2010. Vol. 116 (15). P. e41–e55.

231. Hayashi M. The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test // *Genes Environ.* 2016. Vol. 38. P. 18–23.

232. У Сі, Плотніков А., Кот К., Кот Ю., Перський Є. Дослідження ступеня ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при довготривалому вживанні ними малих доз кадмію // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016. Вип. 73. С. 109–113.

233. Plotnykov A., Kharchenko T., Wu Si. Continuous effects of low concentrations of Cd^{2+} on DNA damage in bone marrow cells *in vitro* // *Матеріали XII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*. Харків, 2017. С. 18–19.

234. У Си, Харченко Т., Плотников А., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности и степени повреждения ДНК клеток костного мозга крыс при продолжительном культивировании их в среде, содержащей малые дозы ионов

кадмія // IV міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології». Дніпро, 2017. С. 45–46.

235. Booth C., Griffith E., Brady G., Lydall D. Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that *cdc13-1* mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29 (21). P. 4414–442.

236. Marceau A. H. Functions of single-strand DNA-binding proteins in DNA replication, recombination, and repair // *Meth. Mol Biol.* 2012. Vol. 922. P. 1–21.

237. У Си, Корниенко Е. М., Плотников А. Д., Пырина И. С., Кот Е. В., Кот Ю. Г., Перский Е. Э. Влияние длительного воздействия *in vivo* низких доз Co^{2+} на гемолиз эритроцитов // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2016. Вип. 27. С. 163–166.

238. Wu Si, Saposhnikova V., Kot Yu., Kot K., Barannik T., Persky E. Influence of hemin on exposition of CD29, CD90 and parameters of secretory activity of rat lung fibroblasts *in vitro* // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології. Дніпропетровськ, 2015. С. 104.

239. Wombacher F., Rehkämper M., Mezger K., Bischoff A., Münker C. Cadmium stable isotope cosmochemistry // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2008. Vol. 72 (2). P. 646–667.

240. Sivakumara A.A., Mohandassb S., Aruchamia M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxic. Pharm.* 2005. Vol. 140 (3–4). P. 422–426.

241. Choi Y. K., Jo P. G., Choi C. Y. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Toxic. Pharm.* 2008. Vol. 147 (3). P. 286–292.

242. Kovarova J., Kizek R., Adam V., Harustiakova D., Celechovska O., Svobodova Z. Effect of cadmium chloride on metallothionein levels in carp // *Sensors (Basel).* 2009. Vol. 9 (6). P. 4789–4803.

243. Martín-Folgar R., Martínez-Guitarte J. L. Cadmium alters the expression of small heat shock protein genes in the aquatic midge *Chironomus riparius* // *Chemosphere.* 2017. Vol. 169. P. 485–492.

244. Ragusa M. A., Costa S., Gianguzza M., Roccheri M. C., Gianguzza F. Effects of cadmium exposure on sea urchin development assessed by SSH and RT-qPCR: metallothionein genes and their differential induction // *Mol. Biol. Reports*. 2013. Vol. 40. P. 2157–2167.

245. Fornazier R. F., Ferreira R. R., Vitória A. P., Molina S. M. G., Lea P. J., Azevedo R. A. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane // *Biol. Plant*. 2002. Vol. 45 (1). P. 91–97.

246. Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D. L., Polle A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pineroots // *Plant Physiol*. 2001. Vol. 127 (3). P. 887–898.

247. Roberts K., Granum E., Leegood R. C., Raven J. A. C3 and C4 pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control // *Plant Physiol*. 2007. Vol. 145 (1). P. 230–235.

248. Alterio V., Langella E., De Simone G., Monti S.M. Cadmium-containing carbonic anhydrase CDCA1 in marine diatom *Thalassiosira weissflogii* // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13 (4). P. 1688–1697.

249. Кадмий: убийца иммунитета или стимулятор роста? URL: <http://www.pharmacognosy.com.ua/index.php/makro-i-mikro-chudesa/kadmiy-ubijtsa-immuniteta-ili-stimulator-rosta> (дата звернення: 07.12.2017).

250. Бгатов А. В. Биогенная классификация химических элементов // *Философия науки*. 1999. № 2 (6). URL: <https://www.philosophy.nsc.ru/sites/default/files/journals-old/journals.html> (дата звернення: 08.12.2017).

251. Staneviciene I., Ivanoviene L., Smalinskiene A., Sadauskiene I., Kasauskas A., Ivanov L. The protective effect of zinc ions against cadmium-induced activation of translational machinery in mouse liver // *Trace Element. Electrolyt*. 2009. Vol. 26 (4). P. 161–166.

252. Ognjanović B. I., Marković S. D., Pavlović S. Z., Zikić R. V., Stajn A. S., Saicić Z. S. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some

tissues of rats: protective effect of selenium // *Physiol. Res.* 2008. Vol. 57 (3). P. 403–411.

253. Chen S.-K., Hsu C.-H., Tsai M.-L., Chen R.-H., Drummen G. P. C. Inhibition of oxidative stress by low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups in skin fibroblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14 (10). P. 19399–19415.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у наукових фахових виданнях України:

3. **У Си**, Пырина И. С., Кот Ю. Г., Кот Е. В., Перский Е.Э. Особенности цитотоксичности длительного введения ультрамалых доз ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы крыс // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2015. Вип. 25. С. 332–340. *(Дисертант провів експеримент, здійснив аналіз літератури та отриманих результатів).*

4. **У Сі**, Плотников А., Кот К., Кот Ю., Перський Є. Дослідження ступеня ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при довготривалому вживанні ними малих доз кадмію // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Вип. 73. С. 109–113. *(Дисертант визначив ступінь пошкодження ДНК, спільно із співавторами підготував матеріали до друку).*

3. **У Си**, Корниенко Е. М., Плотников А. Д., Пырина И. С., Кот Е. В., Кот Ю. Г., Перский Е. Э. Влияние длительного воздействия *in vivo* низких доз Co^{2+} на гемолиз эритроцитов // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2016. Вип. 27. С. 163–166. *(Дисертант спланував експеримент, опрацював дані літератури, узагальнив результати експерименту, підготував статтю до друку).*

4. **У Сі**, Кот Ю., Кот К., Морс Р., Доран О., Амжад Х., Перський Є. Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd^{2+} // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2017. Вип. 29. С. 182–187. *(Дисертант визначив показники оксидативного стресу, провів узагальнення результатів, прийняв участь в оформленні і підготовці статті до друку).*

5. **У Си**, Харченко Т., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс *in vitro* // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія

«Біологія». 2018. Вип. 30. С. 68–76. *(Дисертант прийняв участь у плануванні експерименту, виміряв рівень токсичності Cd^{2+} , підготував статтю до друку).*

Наукові праці у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз:

6. Kovalchuk Y. P., Prischepa I. V., **U Si**, Nedzvetsky V. S., Kot Y. G., Persky E. E., Ushakova G. A. Distribution of glial fibrillary acidic protein in different parts of rat brain under cadmium exposure // The Ukrainian Biochemical Journal. 2015. Vol. 87, N 3. P. 117–123. (Scopus). *(Дисертант проаналізував літературу, спільно із співавторами підготував матеріали до друку).*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

7. Gritcenko M., **U Si**, Olijnichenko Y. Dependence of the dynamics collagen and glycosaminoglycans in fibroblast culture on the number of their divisions // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали IX Міжнародної конференції молодих науковців, 18–20 листопада 2014 р., Харків, 2014. С. 21. *(Дисертант виділив та культивував фібробласти, прийняв участь в оформленні тез до друку).*

8. Фоменко О. З., Шаульська О. Е., **У Сі**, Шевцова А. І., Ушакова Г. О. Вплив кадмію на активність протеолітичних ензимів у мозку та серці щурів // The Ukrainian Biochemical Journal, Vol. 86, N 5 (Suppl. 2): матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 2014 р., Київ, Р. 144. *(Дисертант виміряв активність ферментів в гомогенатах органів).*

9. **Wu Si**, Saposhnikova V., Kot Yu., Kot K., Barannik T., Persky E. Influence of hemin on exposition of CD29, CD90 and parameters of secretory activity of rat lung fibroblasts in vitro // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: матеріали III Міжнародної наукової конференції, 24–25 вересня 2015 р., Дніпропетровськ, 2015. С. 104. *(Дисертант виділив фібробласти з легенів, визначив концентрації CD29 і CD90, прийняв участь в оформленні тез до друку).*

10. **Wu Si**, Sapozhnikova V., Pyrina I., Kot K., Kot Yu. The features of cytotoxicity of cadmium ions ultra-low doses prolonged administration on rats skin, lungs, kidneys and cornea fibroblasts // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали X Міжнародної конференції молодих науковців, 2–4 грудня, 2015 р., Харків, 2015. С. 23–24. *(Дисертант виділив фібробласти із органів, прийняв участь у дослідженні та оцінці рівня цитотоксичності кадмію).*

11. Gritsenko M., Kot Yu., Kot K., **Wu Si**. Growth dynamics of primary fibroblast culture from rats of different ages // Proceedings of International Conference of Young Scientists, 21–25 Sept. 2015., Київ, 2015. С. 165. *(Дисертант виділив фібробласти із шкіри та легенів, провів їх культивування, прийняв участь в узагальненні отриманих результатів).*

12. Фоменко О. З., Шаульська О. Е., **У Сі**. Вплив кадмію на активність желатиназ у плазмі щурів // Весняні біохімічні читання, присвячені пам'яті професора В.О.Березіна: матеріали семінару, 17 березня 2016 р., Дніпропетровськ, 2016. С. 58–59. *(Дисертант виміряв активність желатинази, прийняв участь в оформленні тез до друку).*

13. Костіна Т., Пономаренко О., Пиріна І., **У Сі**. Вплив довгострокового вживання низьких доз солей кобальту і кадмію на зміну рівня вмісту колагену в сполучних тканинах щурів // Молодь і поступ біології: матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, 19–21 квітня 2016 р. Львів, 2016. С. 41–42. *(Дисертант підготував зразки шкіри для дослідження, виміряв в них концентрацію колагену, прийняв участь в обговоренні результатів).*

14. Plotnykov A., Kharchenko T., **Wu Si**. Continuous effects of low concentrations of Cd^{2+} on DNA damage in bone marrow cells *in vitro* // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали XII Міжнародної конференції молодих науковців, 29 листопада – 1 грудня 2017 р., Харків, 2017. С. 18–19. *(Дисертант виділив клітини кісткового мозку, визначив ступінь пошкодження ДНК, спільно із співавторами підготував тези до друку).*

15. **У Си**, Харченко Т., Плотников А., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности и степени повреждения ДНК клеток костного мозга крыс при

продолжительном культивировании их в среде, содержащей малые дозы ионов кадмия // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: матеріали IV Міжнародної наукової конференції, 5–6 жовтня 2017 р., Дніпро, 2017. С. 45–46. *(Дисертант культивував клітини кісткового мозку, визначив їх життєздатність, прийняв участь у підготовці тез до друку).*

16. **У Сі**, Кот Ю., Кот К. Вплив тривалої дії малих концентрацій кадмію на показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки: матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених / Bioscience advances, 24–27 квітня 2018 р., Київ, 2018. С. 150–151. *(Дисертант виміряв показники білкового і ліпідного обміну в сироватці крові, прийняв участь у підготовці тез до друку).*

17. Kharchenko T., Plotnykov A., **Wu Si**, Kot K. The cytotoxicity of cadmium ions small doses in long-term culture of bone marrow cells // The Ukrainian Biochemical Journal, 2018. Vol. 90, N 3.: Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018. P. 117. *(Дисертант культивував клітини кісткового мозку, визначив кількість мікроядер в клітинних ядрах, прийняв участь в обговоренні результатів і підготовці тез до друку).*

18. **Wu Si**, Polonska A., Filonenko S., Lukan R., Yehemberdinov Ye., Nemyrovska Yu., Pyrina I. Accumulation of cadmium ions and their cytotoxicity effects in skin, lungs, kidneys, liver and bone marrow under low concentrations prolonged administration on rats // Біологія: від молекули до біосфери»: матеріали XIII Міжнародної конференції молодих науковців, 28–30 листопада 2018 р., Харків, 2018. С. 13. *(Дисертант виділив фібробласти і клітини кісткового мозку з органів, визначив в їх культурах показники цитотоксичності, прийняв участь у підготовці тез до друку).*

19. У Си, Харченко Т., Егембердинов Е., Кот Ю., Кот Е., Перский Е. Торможение остеогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток при употреблении питьевой воды, содержащей малые концентрации кадмия – одна из возможных причин развития остеопороза // Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії: матеріали Міжнародної науково-

практичної конференції, 11–12 квітня 2019 р., Харків, 2019. С. 75. (*Дисертант культивував клітини, прийняв участь в обговоренні результатів і підготовці тез до друку*).

20. Kot Yu., **Wu Si**, Persky Ye., Kot K., Kharchenko T., Lukan R. The effect of low concentration of cadmium on osteogenic differentiation of rats mesenchymal stromal cells *in vitro* // Proceedings of the 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, 18–21 June, 2019. Yaremche, 2019. P. 52. (*Дисертант культивував клітини, прийняв участь в обговоренні і оформленні результатів*).

ДОДАТОК 2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна

проф. В. О. Катрич

« 2019 року

АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи У СІ
«Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на
організм щурів» у навчальні курси на біологічному факультеті
Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна

Комісія у складі: завідувача кафедри біохімії, професора, доктора біологічних наук Перського Є.Є., заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Волкової Н.Є., заступника декана з методичної роботи, голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертаційної роботи У СІ «Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм щурів», а саме: методи дослідження показників білкового та ліпідного обміну та активності ферментів антиоксидантного захисту, уявлення про характер молекулярно-біохімічних механізмів хронічного впливу малих доз кадмію на організм ссавців, впроваджені у навчальний процес на біологічному факультеті при розробці лабораторних робіт до спецпрактикумів «Методи дослідження білків і амінокислот» та «Методи досліджень в ензимології» для студентів кафедри біохімії, які навчаються за освітньо-професійною програмою підготовки першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності «091 – Біологія» спеціалізації «Біохімія», а також при розробці програм нормативних дисциплін «Функціональна біохімія» та «Молекулярні механізми міжклітинної комунікації» для студентів кафедри біохімії, які навчаються за освітньо-професійною програмою підготовки другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності «091 – Біологія» спеціалізації «Біохімія».

Завідувач кафедри біохімії,
професор, д-р. біол. н.

Перський Є. Е.

Заступник декана з навчальної роботи,
канд. біол. н., доц.

Волкова Н. Є.

Заступник декана з методичної роботи,
голова методичної комісії біологічного факультету,
канд. біол. н., доц.

Мартиненко В. В.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Назва пропозицій для впровадження. Біохімічні механізми довготривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм шурів.

2. Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків, майдан Свободи, 4. Здобувач наукового ступеня – У Сі.

3. Джерела інформації:

1. У Сі, Пырина И. С., Кот Ю. Г., Кот Е. В., Перский Е. Э. Особенности цитотоксичности длительного введения ультрамалых доз ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы крыс // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2015. Вип. 25. С. 332-340.

2. Kovalchuk Y. P., Prischepa I. V., U Si, Nedzvetsky V. S., Kot Y. G., Persky E. E., Ushakova G. A. Distribution of glial fibrillary acidic protein in different parts of the rat brain under cadmium exposure// The Ukrainian Biochemical Journal. 2015. Vol. 87, N 3 P. 117-123. (Scopus)

3. У Сі, Кот Ю., Кот К., Морс Р., Доран О., Амжад Х., Перський Є. Показники загального обміну і окислативного стресу у шурів при тривалій дії малих концентрацій Cd^{2+} // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2017. Вип.29. С.182-187.

4. У Сі, Харченко Т., Кот Е., Кот Ю., Перский Е. Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс *in vitro* // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. 2017. Вип. 30. С. 68-76.

Впроваджено: на кафедрі біологічної хімії Харківського національного медичного університету, м. Харків, пр. Науки, 4.

Включено: в лекційний курс і практичні заняття з навчальної дисципліни «Біологічна хімія». **Результати впровадження:** у лекції та практичні заняття по темі «Обмін білків», «Обмін вуглеводів» для студентів II курсу медичних та стоматологічних факультетів впроваджено дані щодо результатів дослідження *in vivo* тривалого впливу малих концентрацій кадмію на основні біохімічні показники метаболічних порушень різних органів 3-місячних шурів породи Вістар.

Термін впровадження: 2019 рік.

Базова установа, яка здійснює впровадження: Харківський національний медичний університет.

8. Зауваження і пропозиції: не вносились.

Відповідальний за впровадження
завідувач кафедри біологічної хімії
Харківського національного медичного університету
д. мед. н., професор

О. А. Наконечна