

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА

У СІ

УДК 615.916:577.121.9.12.24

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

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Перський Євген Ефроїмович,
Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна МОН України,
завідувач кафедри біохімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
доктор медичних наук, професор
Жуков Віктор Іванович,
Харківський національний медичний
університет МОЗ України,
професор кафедри біологічної хімії

доктор біологічних наук, професор
Петров Сергій Анатолійович,
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова МОН України,
завідувач кафедри біохімії

Захист відбудеться 28 грудня 2019 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-26

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України за адресою: 61022, м. Харків майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий 28 листопада 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. 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 (WHO. Cadmium, 2018).

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 (Tellez-Plaza M. et al., 2013; Luevano J. et al., 2014; Peng Q. et al., 2017).

Ці результати підтверджені також багатьма дослідженнями, в яких лабораторних тварин піддавали впливу кадмію, концентрація якого істотно перевищувала його фоновий вміст у навколишньому середовищі (Tripathi S. et al., 2011, Aoshima K. et al., 2016).

Тому виникає ключове питання – чи існують абсолютно безпечні для людини кількості кадмію, що надходять в його організм протягом 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 (Huff J. et al., 2007; Chen Q. Y. et al., 2019), що відповіді на це питання поки що немає.

Мабуть, це одна з причин того, що в останні десятиліття, 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 / ВООЗ (Joint FAO / WHO), МАВР (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 тварин, перш за все, щурів, є PTWI – тимчасове допустиме тижневе споживання кадмію, що дорівнює 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 (WHO Technical Report Series. 2011; Toxicological profile for cadmium. 2012).

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 (Hartwig A., 2013; Peng L. et al., 2018).

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 та 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. Дисертаційна 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, стани щитоподібної залози та антиоксидантної системи, життєздатність та поведінку фібробластів і клітин кісткового мозку, а *in vitro* – також характер і ступінь пошкодження ДНК в ядрах клітин останніх.

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 на добу та *in vitro*, в первинних 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, а також їх метаболічної активності.
6. Показники адгезії і апоптозу, а також характер і рівень пошкодження ДНК в клітинах первинних культур кісткового мозку.

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

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

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

Наукова новизна одержаних 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, нирок, насінників зростають протягом всього 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 прооксидантно-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 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 кадмій впливає і на клітини кісткового мозку.

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

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

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати доповнюють уявлення про характер і 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 та Харківського 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.

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 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 20.06.2019 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).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 20 наукових праць, серед них 6 статей (5 статей у виданнях, які входять до Переліку фахових видань України, і 1 стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus) та 14 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

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, висновків. Список використаних літературних джерел містить 253 найменування. Робота ілюстрована 11 малюнками і 22 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** викладено актуальність дисертаційного дослідження. Сформульовані мета, завдання та методи дослідження. Визначені наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення. Представлені відомості про публікації, особистий внесок здобувача та апробацію результатів дисертації.

В **огляді літератури** розглянуто і описано загальні фізико-хімічні властивості кадмію, його розповсюдження в різних регіонах Землі, використання в сільському господарстві, промисловості, медицині та в побуті. Представлені наукові дані про джерела походження та шляхи надходження кадмію до організму живих істот, а також його розподілення по органах людини та тварин. Особливу увагу приділено токсичності кадмію та молекулярним механізмам, які її визначають – впливу на структуру і метаболізм біополімерів, індукції оксидативного стресу, порушенню сигнальних шляхів, а також захворюванням, які на даний час можна пов'язати з його дією. Звернуто увагу на ряд фактів взаємодії кадмію з організмами, які не мають на даний час остаточного пояснення.

Матеріали та методи дослідження. Експерименти виконані на 60 щурах-самцях лінії Вістар 3-місячного віку, яких утримували в стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Тварини були поділені на 9 груп по 6 особин у кожній піддослідній групі та по 8 тварин в кожній контрольній групі. Було проведено 2 серії експериментів. У першій – *in vivo* – щоденно, протягом 15 і 36 діб тварини контрольних груп отримували внутрішньошлунково через зонд чисту воду, а по 2 групи піддослідних тварин у ті ж терміни - розчини $\text{CdCl}_2 \times 2,5 \text{H}_2\text{O}$ з вмістом Cd^{2+} 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла відповідно.

Було досліджено вплив кадмію на масу тварин, масу та масові коефіцієнти їх внутрішніх органів, а також на біохімічні показники у сироватці крові. Білковий і ліпідний обміни визначали за вмістом загального білка, креатиніну, сечовини, холестерину, тригліцеридів і Ca^{2+} на біохімічному аналізаторі STAT FAX 1904+ відповідними наборами реактивів фірми Дак-Спектромед (DAC-SpectroMed, Молдова). Стан щитоподібної залози - за вмістом ТТГ та T_4 на імуноферментному аналізаторі STAT FAX 303+ наборами реактивів фірми Хема-Медика (Хема-MedicaCo. Ltd, РФ). Стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги – за вмістом 8-ізопростану і карбонільованих білків імунофлуорометричним методом наборами 8-isoprostane ELISA Kit (Abcam, USA) та Protein Carbonyl Content Assay Kit (Cayman Chemical, USA) відповідно, а також за активностями СОД і КАТ в 96-лункових планшетах PerkinElmer OptiPlate-96 спектрофотометрично наборами Superoxide Dismutase Activity Colorimetric Assay Kit (CaymanChemical, USA) та Catalase Assay Kit (Abcam, USA) відповідно.

Розподілення Cd^{2+} в серці, печінці, нирках, насінниках та шкірі спини вимірювали тест-наборами реактивів Measure-iT™ Cadmium Assay Kit (Invitrogen, USA).

Фібробласти, вилучені із лімбальної області рогівки, шкіри спини, правої легені, лівих нирки та насінника, мали життєздатність 86%. Особливості адгезії фібробластів визначали з використанням Cyto Select Cell Adhesion Assay Kit

(Cayman Chemical, USA), міграційної здатності – за допомогою трансвелів із діаметром пор 8 мкм Cyto Select TM.

Метаболічну активність фібробластів в органах оцінювали за вмістом загальних колагену та глікозаміногліканів (ГАГ), які визначали за гідроксипроліном (Утевська Л. А., Перський Є.Е., 1982) і гіалуроновою кислотою (DeRosa C.S. et al., 2007) відповідно.

У другій серії – *in vitro* – первинні культури клітин кісткового мозку культивували у середовищі Gibco® α -MEM, що містило 20% Gibco® FBS і розчин Gibco® Antibiotic-Antimycotic solution за умов 37°C, 96% RH, 5% CO₂. Після досягнення клітинами стану моношару з щільністю 90-94%, культуральне середовище змінювали на середовище, що містило Cd²⁺ у концентраціях 0,1 та 1,0 мкМ/л.

Особливості адгезії та апоптозу клітин, порушень структури їх ДНК – фрагментацію, кількість її одноланцюгової частки, накопичення в клітинах мікроядер визначали протягом 30 діб кожні 48 годин перед заміною середовища на нове. Ступінь адгезії клітин і щільність культури оцінювали фазово-контрастною мікроскопією на інвертованому мікроскопі Zeiss Telaval 31.

Кількість фібробластів і клітин кісткового мозку на ранніх та пізніх стадіях апоптозу визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням цитофлуориметра Millipore PCA із програмним забезпеченням Guava Millipore Software 6.0.2 тест-наборами Guava Millipore Nexin.

В клітинах кісткового мозку фрагментацію ДНК визначали комет-аналізом після іммобілізації клітин в агарозному гелі на скляних слайдах Comet Slides™. Визначення концентрації одноланцюгової ДНК у клітинах проводили набором реагентів Qubit® ssDNA Assay Kit. Мікроядра в клітинах виявляли забарвленням ДНК флуоресцентним барвником акридиноним помаранчевим.

В експериментах дотримувались рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно міжнародним принципам Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) і норм біомедичної етики відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV від 21.02.2006 зі змінами, внесеними згідно із Законом України № 1759-VI від 15.12.2009.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перша частина роботи присвячена дослідженню загального характеру тривалого впливу малих концентрацій кадмію на організм 3-місячних щурів в цілому.

Вплив Cd²⁺ на маси тварин, внутрішніх органів і їх масові коефіцієнти. На рис. 1 відображено вплив концентрацій 0,1 і 1 мкг/кг/добу Cd²⁺ протягом 15 і 36 діб на масу та органи щурів.

На рис. 1А зображена динаміка маси тіла контрольних щурів, які протягом 36 діб отримували чисту воду, і піддослідних щурів, які отримували воду, що містила 0,1 і 1,0 мкг Cd²⁺/кг маси тіла.

Як видно, маса контрольних тварин збільшується протягом всього часу експерименту.

Під дією ж концентрацій Cd^{2+} 0,1 і 1,0 мкг/кг маси тіла в перші 2 тижні маса тварин знижується - на 3% і 11% відповідно. Більша доза Cd^{2+} надає і більший вплив. І тільки на 36 добу, після закінчення експерименту, маса тварин повертається до початкових значень.

Використовувані концентрації Cd^{2+} в 5 і в 8,3 рази менше, ніж MRL і PTWI відповідно. І при цьому все ж чітко виявляються токсичні властивості цього металу.

Вимірювання мас внутрішніх органів – серця, печінки, нирок, сім'яників, виявило, що протягом експерименту їх зміна протилежна зниженню маси тіла в період від 1 до 15 діб.

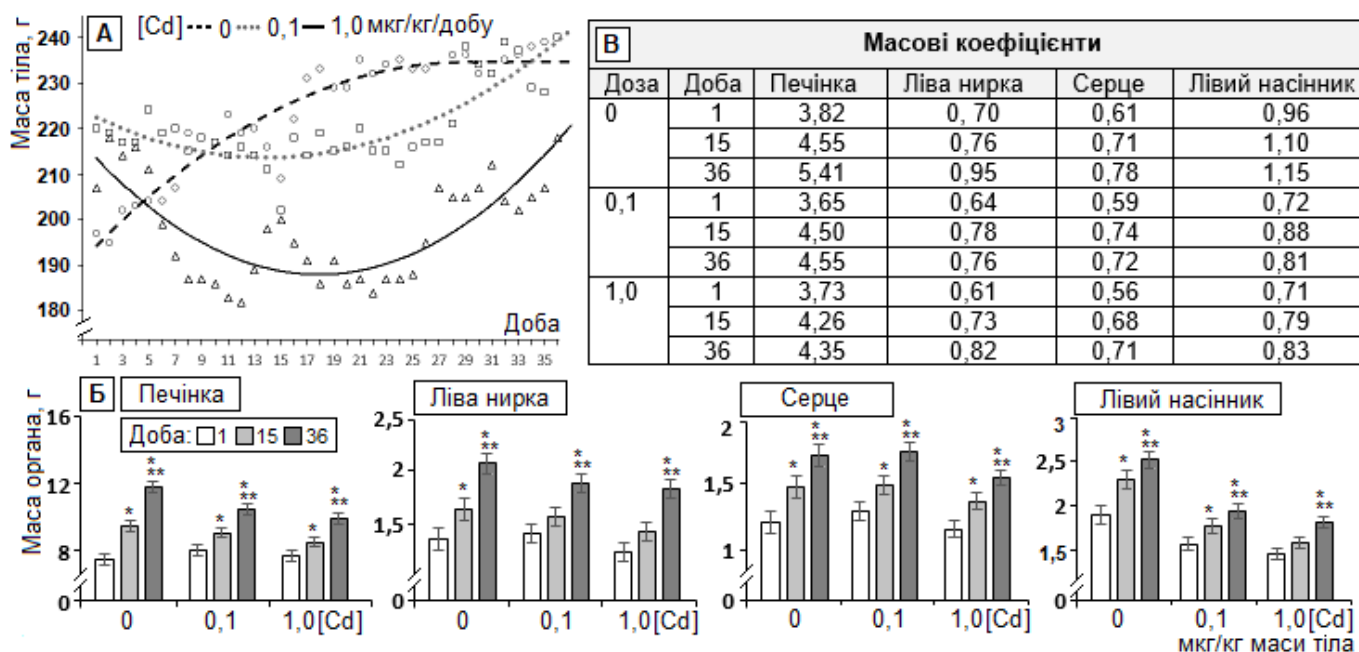


Рис. 1 Динаміка маси (А), внутрішніх органів (Б) та їх масових коефіцієнтів (В) за дією 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин протягом 15 і 36 діб. * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою

У цей проміжок часу маси органів збільшуються і продовжують зростати до закінчення експерименту під дією обох доз кадмію (рис. 1Б). Природно, що так само змінюються і масові коефіцієнти цих органів (відсоткове відношення їх мас до маси тіла) – рис. 1В.

Вплив Cd^{2+} на показники білкового і ліпідного обміну в сироватці крові тварин. Втрата тваринами частини маси тіла повинна бути пов'язана з порушеннями метаболізму, і в першу чергу, білкового та жирового. Результати вимірювання показників цих обмінів в сироватці крові тварин за дією обох використаних доз Cd^{2+} наведені на рис. 2.

Відповідно до рис. 2Б, при впливі обох доз кадмію динаміка вмісту загального білка в сироватці така ж, як і динаміка маси тварин – знижується до 15 діб, після чого підвищується до 36 діб.

Динаміки в сироватці креатиніну (рис. 2К) і сечовини (рис. 2С) під дією обох концентрацій кадмію повністю протилежні динамікам як маси тварин, так і вмісту загального білка в сироватці.

Підвищення рівня креатиніну в крові може відбуватися або через масивне руйнування м'язової тканини, що супроводжується виходом креатиніну з клітин, т.зв. «краш-синдром», або через ниркову недостатність. Підвищення ж в крові рівня сечовини – пряме свідчення ниркової недостатності (Swedko P. J. et al., 2003; Yokota J., 2005; Макаров В. Г. и др., 2013).

Взяті разом, всі ці результати вказують, що, зокрема, однією з причин зниження маси тварин є деградація білків скелетної м'язової тканини, яка ініціюється дією кадмію.

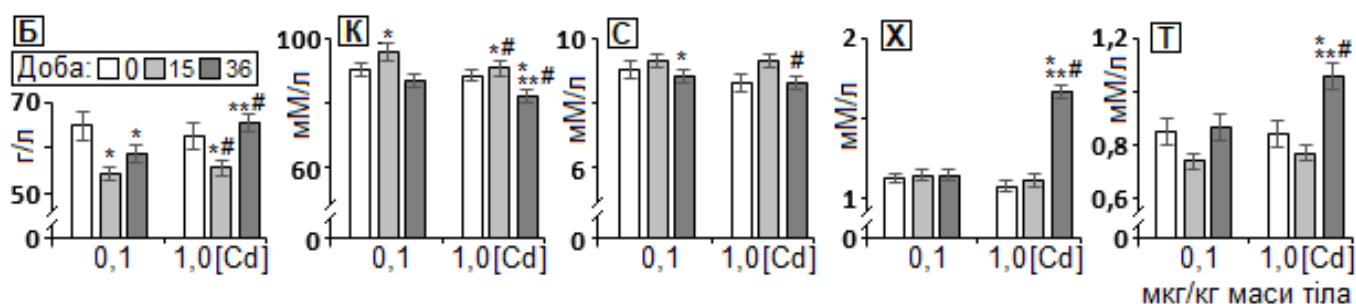


Рис. 2 Показники білкового і ліпідного обміну в сироватці крові щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. Б – загальний білок, К – креатинін, С – сечовина, Х – загальний холестерин, Т – тригліцериди. * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності 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

Підтвердженням цього є те, що на маси досліджених паренхіматозних органів, в яких скелетні м'язи відсутні, кадмій таким чином не діє (рис. 1Б).

Істотно, що після початкового зниження мас тварин, через деякий час їх зростання відновлюється, і маса починає збільшуватися навіть при тривалій дії кадмію (рис. 1А). Це свідчить про наявність у тварин компенсаційної системи, кінцевим механізмом якої, починаючи з проміжку між 2 і 3 тижнями, є зростання виробництва білків скелетної м'язової тканини. На це прямо вказує підвищення обміну білку з 15 до 36 доби за дозами 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла на 2,2% і 11,4% та зниження в цей час вмісту креатиніну в сироватці в середньому на 5,6% за дією обох доз Cd^{2+} (рис. 2Б, К).

Що ж до ліпідного обміну, то тільки доза 1 мкг Cd^{2+} /кг маси, яку тварини отримували протягом 36 діб, привела до збільшення вмісту загального холестерину у сироватці в 1,5 рази. Динаміка вмісту в сироватці тригліцеридів така ж, як і динаміка загальної маси тварин і білкового обміну. Оскільки більшість

тригліцеридів міститься в жировій тканині, збіг цих динамік підтверджує, що виявлені особливості обміну ліпідів є ще однією з причин як зниження, так і відновлення маси тварин протягом експерименту.

Вплив Cd^{2+} на вміст ТТГ і T_4 в сироватці крові тварин. Оскільки гормони щитоподібної залози регулюють енергетичний баланс організму, впливаючи, зокрема, на метаболізм ліпідів (Руссі Е. et al., 2003; Basu G. et al., 2012), а у попередніх вимірюваннях виявилось, що кадмій зрушує показники ліпідного обміну, було вивчено вміст цих гормонів в умовах дії Cd^{2+} в сироватці крові піддослідних тварин – табл. 1.

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%.

Таблиця 1

Вміст ТТГ (мОд/мл) і вільного T_4 (пг/л) у сироватці крові щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла

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

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

Щодо 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.

Все це може свідчити, що під впливом кадмію у піддослідних тварин виникає гіпотиреоїдний 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 обернена пропорційна залежність.

Вплив Cd^{2+} на вміст Ca^{2+} в сироватці крові тварин. Кадмій є класичним міметиком, іони котрого через близькість хімічних властивостей здатні імітувати інші двовалентні іони, зокрема кальцій. 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 гідроксиапатиту кісток, являючись важливою причиною розвитку остеопорозу.

Цей процес супроводжується і нижчим за нормою рівнем кальцію в крові (Chmielowska-Baґ J., 2013; Liv Y. et al., 2017; Eom S.-Y. et al., 2018).

Але дослідження на щурах, які протягом 15 і 36 діб щоденно отримували 0,1 і 1,0 мкг Cd²⁺/кг маси тіла, не виявило вірогідних відмінностей концентрації Ca²⁺ в сироватці піддослідних тварин у порівнянні з контрольними, хоча тенденція до її зниження і проглядається (табл. 2).

Це може свідчити про те, що використані дози Cd²⁺ недостатні чи ж знаходяться на межі можливості конкурентного витіснення кальцію з мінералізованих надмолекулярних утворень та їх руйнування.

Таблиця 2

Вміст Ca²⁺ (мМ/л) у сироватці крові щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd²⁺/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

Розподілення і швидкість накопичення Cd²⁺ в органах тварин. Характер накопичення і розподілу кадмію в організмі визначає і характер його впливу на процеси життєдіяльності. Особливо важливо те, як відбуваються ці процеси в первинних органах-накопичувачах, які концентрують і зберігають кадмій – печінці, нирках, сім'яниках. Результати відповідних вимірювань наведені на рис. 3А.

Як видно, концентрація кадмію у всіх досліджених органах при введенні в організм дози 0,1 мкг/кг маси тіла навіть протягом 36 діб не перевищує 0,5 мкг/кг, що трохи нижче, ніж MRL. А доза 1 мкг/кг маси в цих органах створює на 36 добу концентрації від 1,5 до 4 мкг/кг тканини, що від 4-х до півтора разів менше, ніж PTWI. Таким чином, кадмій впливає на деякі властивості органів при концентраціях, що лежать в межах від MRL до PTWI.

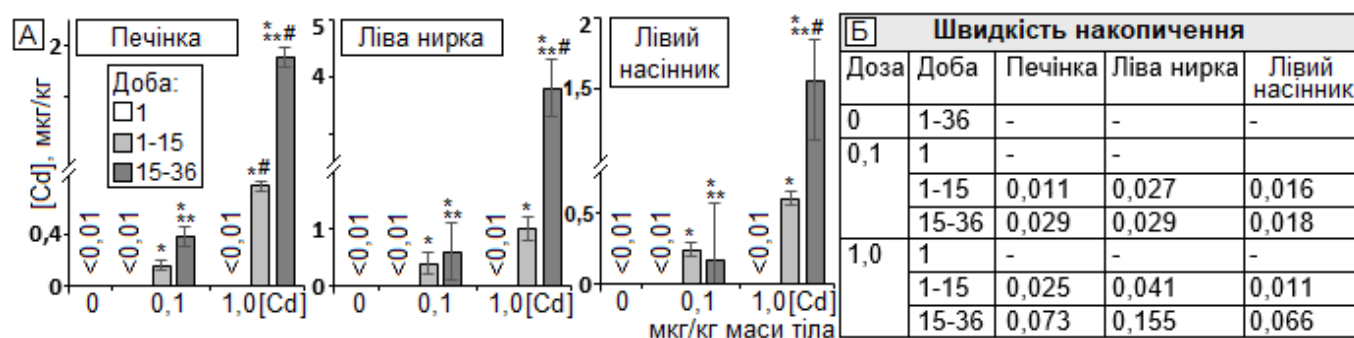


Рис. 3 Концентрація (А) і швидкість (Б) накопичення кадмію в органах щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd²⁺/кг маси тіла. * – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з 15-ю добою; # – відмінності вірогідні (p<0,05) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd²⁺/кг маси

Однак, є цікава особливість накопичення кадмію в органах – швидкість цього процесу підвищується в ході експерименту (рис. 3Б). При обох дозах в період від 15 до 36 діб швидкість накопичення кадмію збільшується, в порівнянні з періодом 1–15 діб, в середньому, втричі.

Це може свідчити про виснаження систем захисту від кадмію в ході експерименту.

Вплив Cd^{2+} на показники рівня оксидативного стресу. Показником кількості кадмію, яка не нейтралізована такою захисною системою, як, наприклад, металотіонеїнова, можуть бути показники оксидативного стресу. На Рис. 4 наведені значення змін таких стандартних показників – вміст 8-ізопростану, карбонільованих білків і активностей супероксиддисмутази і каталази в процесі проведення експерименту.

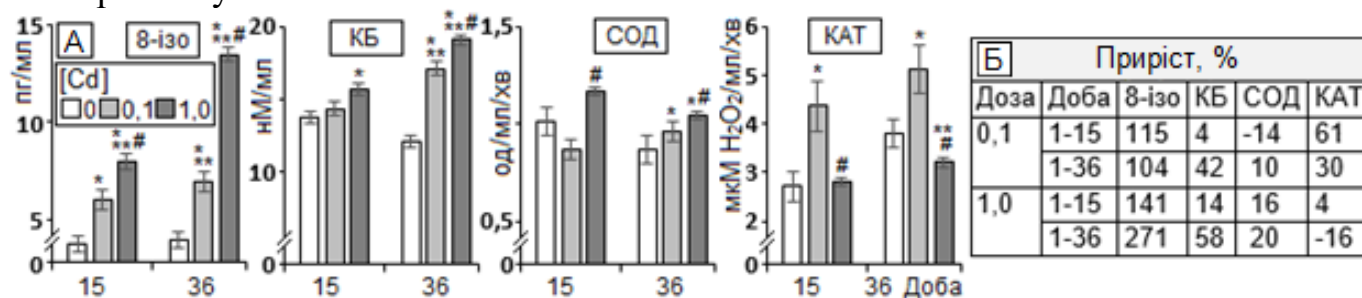


Рис. 4 Вміст 8-ізопростану, ступінь карбонілювання білків і активності СОД і КАТ (А) та їх прирости (Б) у сироватці крові щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. 8-ізо – ізопростан, КБ – карбонільовані білки. * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – 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 з рис. 4А при дії 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла тварин вміст 8-ізопростану, який характеризує ступінь окиснення ліпідів, підвищується в період до 15 діб експерименту, практично не змінюючись в подальшому. Проте ступінь карбонілювання білків істотно підвищується саме в період від 15 до 36 діб.

При цьому в період від 1 до 36 діб активність СОД підвищується незначно, а КАТ і зовсім знижується.

При дії 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла у період від 1 до 36 діб вміст і 8-ізопростану, і карбонільованих білків підвищується досить істотно; активність СОД майже не змінюється, а КАТ – різко знижена (рис. 4Б).

Все це вказує на зростання рівня оксидативного стресу під дією обох доз кадмію.

Таким чином, прискорення накопичення кадмію в органах протягом експерименту є наслідком виснаження захисних систем в часі, можливо, за рахунок безпосереднього зв'язування Cd^{2+} з молекулами захисних білків і ферментів. Відомо, що таке зв'язування призводить до зміни їх вторинної структури і пригнічення активності (Sharma S. K. et al., 2008; Tamás M. J. et al, 2014).

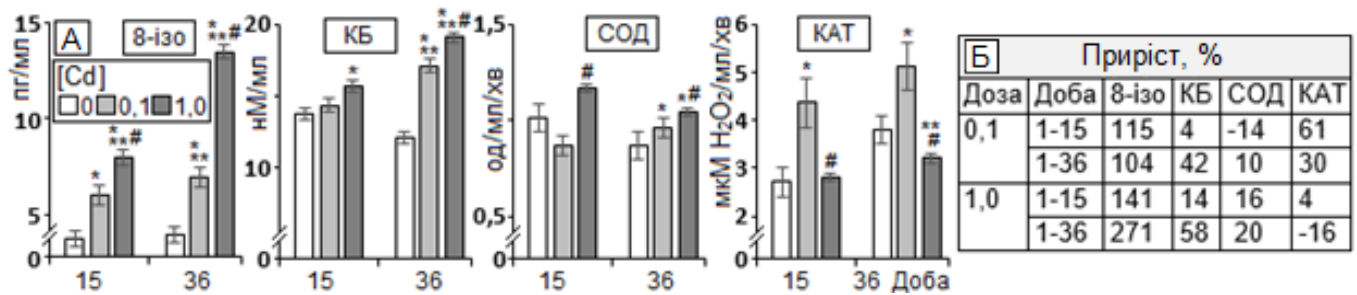


Рис. 4 Вміст 8-ізопростану, ступінь карбонілювання білків і активності СОД і КАТ (А) та їх прирости (Б) у сироватці крові щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. 8-ізо – ізопростан, КБ – карбонільовані білки.* – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – 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

Друга частина роботи була присвячена особливостям дії малих доз кадмію на клітини – фібробласти і клітини кісткового мозку. Крім того, були досліджені відмінності концентрацій, які призводять до одних і тих самих ефектів дії кадмію на клітини *in vivo* і *in vitro*.

Вплив Cd^{2+} на показники життєздатності фібробластів. Прикріплення клітин до субстрату (адгезія), необхідна для переміщення, сама міграція, фізіологічна загибель (апоптоз) – це найважливіші властивості клітин, які визначають процеси ембріогенезу, постнатального розвитку, стійкості організму до захворювань і загоєння ран (Puliafito A. et al., 2012; Trepal X. et al., 2012; Khalili A. A. et al., 2015).

На рис. 5 наведені результати вимірювання адгезії, міграції та апоптозу фібробластів, отриманих з чотирьох органів щурів, які протягом 15 і 36 діб отримували 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла.

Як видно, дія кадмію на адгезію фібробластів призводить до двох ефектів (Рис. 5А). По-перше, ступінь адгезії клітин з різних органів також різна. По-друге, щодо контролю, вона зменшується за збільшенням, як дози, так і тривалості введення кадмію тваринам. Найвиразніше це проявляється при дозі 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. Так, на 15 добу експерименту ступінь адгезії фібробластів із шкіри рогівки, легень і нирок менше контролю в 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.

Вплив кадмію на міграцію фібробластів (Рис. 5Б), як і в випадку адгезії, призводить до двох ефектів. Це різна здатність до міграції клітин різних органів і зменшення кількості мігруючих клітин з тривалістю введення кадмію тваринам та зі збільшенням його дози. Як і при адгезії, вплив кадмію найбільш виражений при дозі 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла.

При дослідженні впливу кадмію на рівень апоптозу, диференціювали клітини, які перебували на ранніх і пізніх стадіях апоптозу.

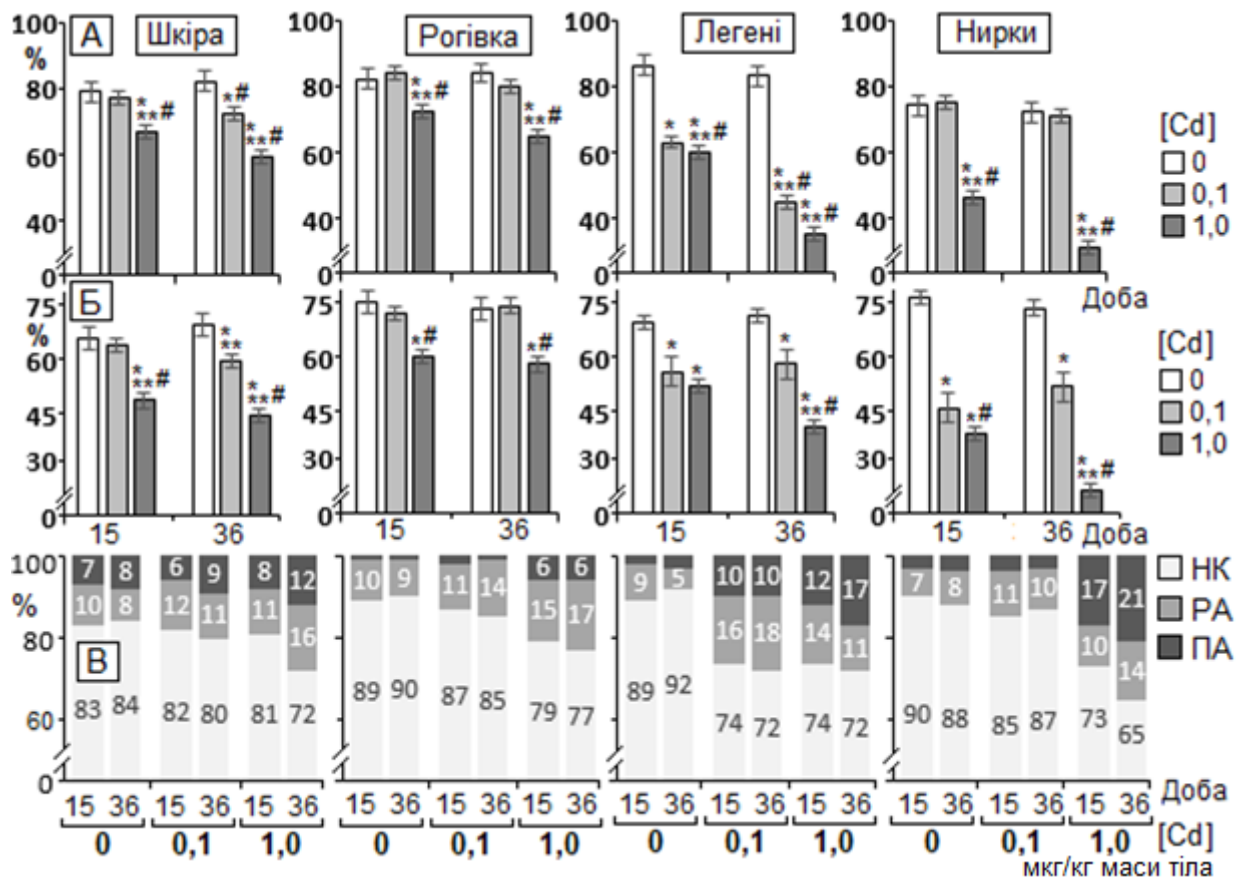


Рис. 5 Рівень адгезії (А), міграції (Б) і апоптозу (В) фібробластів шкіри, рогівки, легень і нирок щурів на 15 і 36 добу дії 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла. НК – нормальні клітини, РА і ПА – клітини на ранніх і пізніх стадіях апоптозу. * – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – 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

Відповідно до результатів, наведених на рис. 5В, так само, як і ступінь адгезії і міграції, в контролі фібробласти виявляють виразні органічні відмінності в рівні апоптозу. За відсутності іонів кадмію відносна частка «фізіологічного» – нормального апоптозу клітин коливається в межах 20–30% в залежності від органу і часу експерименту. Введення тваринам кадмію різко збільшує цю частку і її органічні особливості.

Так, при дозі 0,1 мкг/кг маси кількість фібробластів, які перебувають на пізніх стадіях апоптозу, в середньому, істотно менше, ніж на його ранніх стадіях в усіх досліджених органах.

Але при дозі 1,0 мкг/кг маси відношення кількості клітин на пізніх і ранніх стадіях апоптозу в легенях і, особливо, в нирках – протилежне. І становить 1,7 і 1,5 відповідно.

Мабуть, в нирках, які накопичують найбільшу концентрацію кадмію, апоптична загибель клітин починається раніше, ніж в інших органах.

Головною функцією фібробластів є продукція біополімерів, які формують міжклітинний матрикс сполучної тканини всіх органів. У табл. 3 надано результати

вимірювання загальної концентрації двох головних біополімерів матриксу – колагену та глікозаміногліканів (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 Cd²⁺/кг маси тіла.

Згідно з ними, найбільша концентрація колагену в обидва терміни і за дією обох доз Cd²⁺ спостерігається у культурах фібробластів шкіри, а ГАГ – фібробластів рогівки, що пов'язано з функціональною роллю цих органів – механічною та оптичною – відповідно (Egbert M. et al., 2014; Zhou H.-Y. et al., 2017).

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 Cd²⁺/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

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***#
			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
	Рогівка	Показник	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*#
			ГАГ	112,4 ±12,3	109,2 ±8,2	115,5 ±11,5	108,4 ±7,4*	96,3 ±6,5*#	92,0 ±10,2*
	Легені	Показник	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*
			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*#
	Нирки	Показник	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***#
			ГАГ	56,3 ±4,5	58,1 ±4,2	63,5 ±5,1*	68,5 ±6,7*	42,7 ±5,8*#	32,5 ±5,0*#

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

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. 4).

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 в'язкі властивості. Тому використані умови впливу Cd^{2+} на фібробласти в складі сполучної тканини легенів повинні призводити, в кінцевому рахунку, до підвищення жорсткості та зменшення ступеня розтяжності цього органу.

Таблиця 4

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± 0,07	0,64± 0,04	0,41± 0,03	0,42± 0,03	0,58± 0,04	0,69± 0,05*	0,68± 0,05	0,70± 0,08

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

Дійсно, відомо, що підвищення концентрації колагену у різновидах сполучної тканини призводить саме до такого ефекту (Suki B. et al., 2011; Andrikakou P. et al., 2016). Судячи ж з того, що в культурах фібробластів з інших досліджених органів, відношення концентрацій колагену і ГАГ залишається постійним, структура матриксу при цьому не змінюється.

Вплив Cd^{2+} на показники життєздатності клітин кісткового мозку. На рис. 6 представлено вплив Cd^{2+} в концентрації 0,1 і 1,0 мкМ/л на динаміку адгезії і ступінь апоптозу в первинній культурі клітин кісткового мозку протягом 30 діб культивування. Ці концентрації Cd^{2+} в перерахунку рівні 10,79 і 107,9 мкг Cd^{2+} /кг культурального розчину відповідно. Вони на 1–3 порядки вищі, ніж концентрації кадмію, які *in vivo* знижують ступінь адгезії і підвищують рівень апоптозу фібробластів. Ці концентрації кадмію були підібрані експериментально, з таким розрахунком, щоб *in vitro* вони приводили до ефектів того ж порядку, що і *in vivo*.

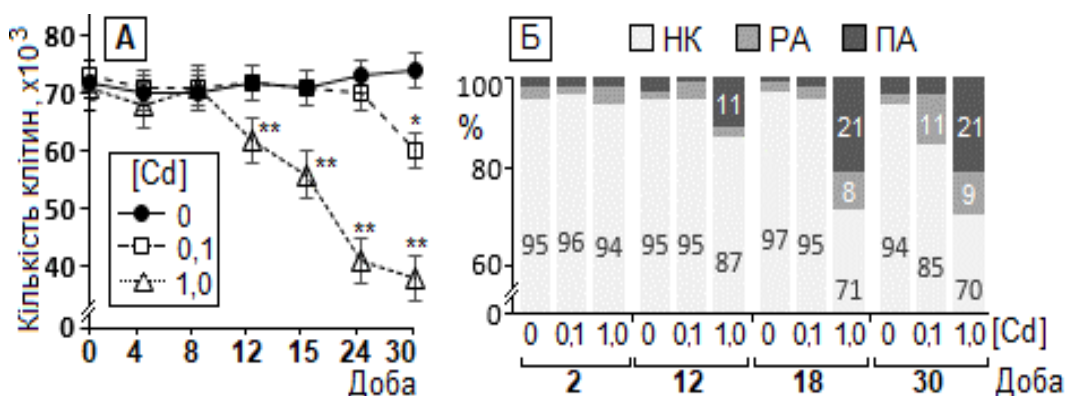


Рис. 6 Рівень адгезії (А) і апоптозу (Б) в первинній культурі клітин кісткового мозку за дії 0,1 і 1,0 мкМ Cd^{2+} /л протягом 30 діб. НК – нормальні клітини, РА і ПА – клітини на ранніх і пізніх стадіях апоптозу.* – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – відмінності вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою

Відповідно з Рис. 6А, адгезія клітин при концентраціях Cd^{2+} в розчині, рівних 0,1 і 1,0 мкМ/л зменшується, в порівнянні з контролем, починаючи з 22-х і 6-х діб його дії. Лише починаючи з цього часу, ступінь адгезії стає менше, ніж контроль в 1,21 і 1,70 разів.

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. 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.

Збільшення ж кількості апоптичних клітин залежить від концентрації іонів кадмію. Так, при концентраціях 0,1 і 1,0 мкМ Cd^{2+} /л інтенсивність апоптозу починає зростати, починаючи з 24 і 10 доби, досягаючи на 30 добу експерименту 11% і 21% від загальної кількості клітин відповідно (рис. 6Б).

Культури клітин кісткового мозку являють собою систему, гетерогенну за фенотипом, функціональними властивостями, морфологією, що відбивається і на розмірах цих клітин (Ananthakrishnan R. et al., 2007; Elsafadi M. et al., 2016). Тому, на клітинах, які були переведені у стан суспензії і набули сферичну форму, було проведено вимірювання їх розподілу за діаметрами при культивуванні у відсутності Cd^{2+} та його присутності в концентрації 1,0 мкМ/л у культуральному розчині на 30 добу експерименту.

Як видно, криві розподілу мають явно виражені максимуми і мінімуми, що підтверджує гетерогенність досліджуваної популяції клітин. Згідно з наявністю цих особливостей кривих, 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.

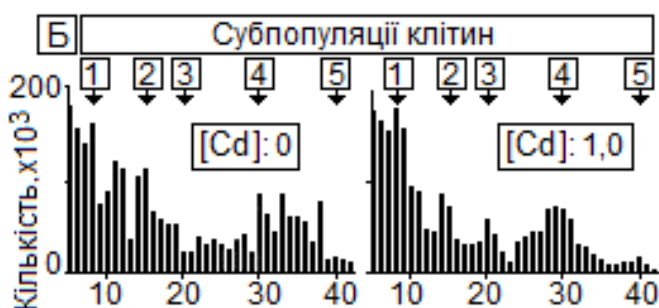


Рис. 7 Розподіл клітин кісткового мозку за їх діаметрами на субпопуляції під впливом 1,0 мкМ Cd^{2+} /л у культуральному розчині на 30 добу культивування

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 статистично вірогідної вираженості цього явища (табл. 5).

Зсув максимумів кривої розподілення, частково, є результатом апоптозу клітин, при якому відбувається їх стиснення і, відповідно, зменшення діаметру (Model M.A., 2014). Але відносні частки клітин знижуються в усіх субпопуляціях,

крім субпопуляції з клітинами найменшого діаметру, де їх питома частка підвищується. А це свідчить, що клітини різних субпопуляцій мають й різну життєздатність по відношенню до Cd^{2+} , утворюючи за їх питомими величинами, ряд протидії його токсичності: $1 > 4 > 2 > 3 > 5$.

Таблиця 5

Вплив Cd^{2+} у концентрації 1,0 мкМ/л на розподіл загальної (10^3 /мл) та відносної (%) 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	1003,0 \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	1006,0 \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

Апоптоз і зменшення за дією кадмію розмірів клітин у зростаючій культурі призводить до розрідження моношару, що формується (табл. 6). Таке зниження щільності супроводжується зміною розташування клітин, порушенням контактів між ними і всієї мережі міжклітинної сигналізації в моношарі.

Таблиця 6

Щільність моношару і кількість клітин кісткового мозку із неушкодженою мембраною, % на 30 добу культивування за дією 0,1 і 1,0 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла у культуральному розчині

Показник	Cd^{2+} , мМ/л		
	0	0,1	1,0
Щільність моношару, %	98,9 \pm 5,2	79,4 \pm 4,6*	52,2 \pm 3,5* · **
Кількість неушкоджених клітин, %	86,4 \pm 4,3	83,0 \pm 3,5	59,4 \pm 2,1* · **

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем ($Cd^{2+} = 0$); ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з $Cd^{2+} = 0,1$ мкМ/л

Переносячи цей результат з двовимірної моделі *in vitro* на кістковий мозок *in vivo*, де клітини розташовані в досить впорядкованій тривимірній тканинній структурі та пов'язані складною просторовою сигналізацією (Такаку Т. et al., 2010), можна зрозуміти, чому дія кадмію призводить до спотворення сигнальних шляхів, з далекосяжними патологічними наслідками.

Вплив Cd^{2+} на структуру ДНК клітин кісткового мозку. На рис. 8 наведені результати вимірювань впливу кадмію на структуру ДНК клітин кісткового мозку *in vivo* і *in vitro*.

Як показники цього впливу використовували кількість мікроядер в клітинах, відсотковий вміст фрагментованої ДНК і кількість в ній одноланцюгової форми.

Як видно з рис. 8А, Б – і *in vivo*, і *in vitro* кількість клітин з мікроядрами під дією кадмію підвищується. Але, судячи за кількісними результатами, його вплив на формування мікроядер *in vivo* ефективніший, ніж *in vitro*. Так, *in vivo*, при

концентрації Cd^{2+} , що дорівнює 1,0 мкг/кг маси, на 36 добу частка клітин з мікроядрами становить 10%.

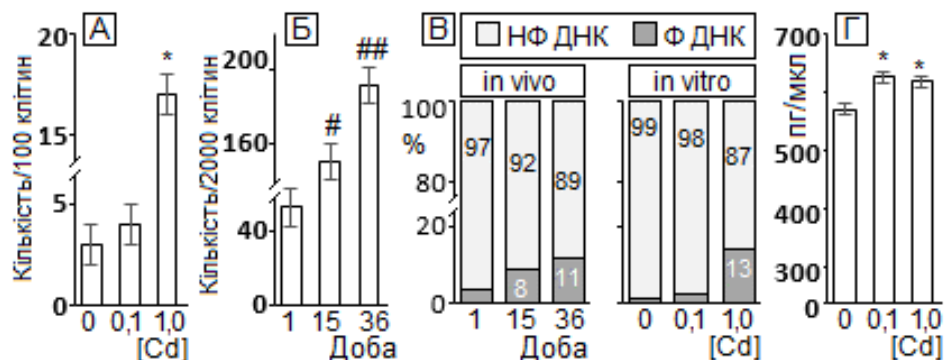


Рис. 8 Вплив Cd^{2+} *in vivo* і *in vitro* на ДНК клітин кісткового мозку. А та Б – мікроядра в клітинах на 30 добу дії 0,1 і 1 мкМ Cd^{2+} /л *in vitro* і на 1, 15, 36 добу дії 1 мкг Cd^{2+} /кг маси тіла *in vivo*. В – вміст одностандової частини в зруйнованій ДНК

А *in vitro*, при в 100 разів більшої концентрації (1,0 мкМ/л Cd^{2+} = 107,9 мкг Cd^{2+} /кг в культуральному розчині) на 30 добу частка клітин з мікроядрами становить тільки 18%.

На рис. 8В представлені порівняльні результати вимірювання ступеня фрагментації ДНК в клітинах кісткового мозку. Як видно, цей показник руйнування молекул ДНК практично не відрізняється в експериментах *in vivo* і *in vitro*.

Специфічним і надзвичайно чутливим показником апоптозу, як фізіологічного, так і того, що виникає в патологічних умовах, є наявність у клітині ділянок одностандової ДНК, що вирізаються з подвійної спіралі після розриву її внутрішніх водневих зв'язків.

На рис. 8Г представлено кількісний вміст ділянок одностандової ДНК в ядрах клітин кісткового мозку після 30 діб їх культивування в присутності використаних концентрацій Cd^{2+} .

Як видно, за цей час вміст одностандової ДНК під впливом 0,1 мкМ/л підвищився на 9%. Однак за той самий термін на порядок більша концентрація кадмію не змінила кількість цієї форми ДНК.

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

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 та порівняні концентрації кадмію, які на клітинному рівні призводять до одних і тих самих ефектів *in vivo* та *in vitro*.

1. Вперше показано, що Cd^{2+} в концентраціях 0,1 і 1 мкг/кг/добу, які у 5,5 та у 8,3 рази менше, ніж MRL і PTWI відповідно, при щоденному надходженні в організм щурів протягом 5 тижнів, в перші 2 тижні зупиняють ріст тварин, який поновлюється після 3 тижня експерименту. При цьому масові коефіцієнти внутрішніх органів – серця, печінки, нирок, легенів, сім'яників, збільшуються протягом усього експерименту.

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

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

4. Виявлено зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у тварин вбік розвитку оксидативного стресу, причиною чого є недостатня активність СОД та КАТ під дією кадмію.

5. Вперше показано, що рівень адгезії клітин кісткового мозку фібробластів всіх досліджених органів, а також міграційної здатності фібробластів зменшуються, а рівень апоптозу збільшується з ростом концентрації і тривалістю дії Cd^{2+} .

6. Вперше встановлено, що показники руйнування ДНК в клітинах кісткового мозку за дією кадмію – кількість мікроядер, ступінь фрагментації ДНК і її одноланцюгова частина – збільшуються з ростом концентрації і часом дії Cd^{2+} .

7. В експериментах *in vivo* кількісні величини показників впливу кадмію вище при концентраціях Cd^{2+} 1,0, ніж 0,1 мкг/кг маси. Одні й ті самі кількісні значення показників впливу кадмію на клітини *in vitro* досягаються при значно більших концентраціях Cd^{2+} , ніж *in vivo*.

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., Перський 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 ІХ 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 ХІ 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 ІІІ 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.Березина: 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.

Р. 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).

АНОТАЦІЯ

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

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

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

Встановлено, що Cd^{2+} в концентраціях 0,1 и 1 мкг/кг/добу, які у 5,5 та у 8,3 рази менше, ніж MRL і PTWI відповідно, при щоденному надходженні в організм щурів протягом 5 тижнів, в перші 2 тижні зупиняють ріст тварин, який поновлюється після 3 тижня експерименту. При цьому масові коефіцієнти внутрішніх органів – серця, печінки, нирок, легенів, сім'яників, збільшуються протягом усього експерименту.

Під впливом кадмію динаміка вмісту загального білка у сироватці тварин якісно співпадає з динамікою їхньої маси, а динаміки у сироватці креатиніну, сечовини, загального холестерину та тригліцеридів повністю протилежні динамікам маси тварин і вмісту загального білка в їх сироватці. У піддослідних тварин виникає також гіпотиреоїдний стан. Загалом, все це свідчить, що важливою причиною

втрати частки маси піддослідних тварин є деградація білків скелетної м'язової тканини і зниження кількості жирової тканини, які ініціюються дією кадмію. Починаючи з 3 тижня, незважаючи на продовження його дії, компенсаторні системи відновлюють зростання тварин.

Але на клітинному і молекулярному рівні показники впливу кадмію на тварин безперервно і односпрямовано змінюються протягом всього терміну експерименту. Так, окисдантно-антиоксидантне відношення безперервно зсувається у бік розвитку і зростання ступеню оксидативного стресу. Рівень адгезії клітин кісткового мозку фібробластів всіх досліджених органів, а також міграційної здатності фібробластів зменшуються, а рівень апоптозу обох типів клітин збільшується з ростом концентрації і тривалістю дії Cd^{2+} .

Показники руйнування ДНК в клітинах кісткового мозку за дією кадмію – кількість мікроядер, ступінь фрагментації ДНК і її одноланцюгова частина – збільшуються з ростом концентрації і часом дії Cd^{2+} .

Ключові слова: Кадмій, білковий та ліпідний обмін, 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 (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

In the thesis, *in vivo* and *in vitro* 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, the cells and molecular.

Cd^{2+} was found to be at concentrations of 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, which are 5.5 and 8.3 times less than MRL and PTWI, respectively, with daily intake of rats for 5 weeks during the first 2 weeks stop the growth of animals, which resumes after 3 weeks of the 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.

Under the influence of cadmium, the dynamics of the total protein content in the serum coincides qualitatively with the dynamics of their mass, and the dynamics in the serum of creatinine, urea, total cholesterol and triglycerides are completely opposite to the dynamics of the mass of animals and the content of total protein in their serum. In

experimental animals, there is also a hypothyroid condition. In general, all this indicates that an important cause of weight loss in experimental animals is the degradation of skeletal muscle protein and the reduction of adipose tissue triggered by cadmium. From 3 weeks, despite its continuation, the compensatory systems restore the growth of animals.

Measurement of oxidative stress indicators showed that only a dose of 1 μg of Cd^{2+} /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 μg /kg of weight is 42 %, and at a dose of 1 μg /kg of weight – 58 %. Measurement of the activity of superoxidodismutase (SOD) under conditions showed that SOD activity at the action of 0.1 μg Cd^{2+} / kg of body weight of animals did not increase by 15 days, and by action of 1 μg Cd^{2+} / kg slightly increased. On the 36th day after the action of these doses, the activity of this enzyme increased only by 10 % and 20 %. catalase (CAT) activity at a dose of 0.1 μg Cd^{2+} / kg of weight increases by 15 days by 60%, and by the 36th day the activity increase drops twice. 1 μg 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 μg 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. The level of fibroblasts adhesion of all organs studied, as well as the migration ability of fibroblasts decrease, and the level of apoptosis of both cell types increases with increasing concentration and duration of Cd^{2+} . The cells 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 $\mu\text{M}/\text{l}$. 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. Indicators of DNA destruction in cells by the action of cadmium – the number of micronuclei, the degree of DNA fragmentation and its single-stranded DNA part – increase with increasing concentration and time of action of Cd^{2+} .

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