

## **ВІДГУК**

**офіційного опонента, академіка НАМН України, доктора медичних наук, професора Яворовського Олександра Петровича на дисертаційну роботу Мельник Наталії Андріївни «Токсиколого-гігієнічна характеристика хронічного впливу наночастинок сульфідів свинцю на непошкоджену шкіру та критерії оцінки їх небезпеки (експериментальне дослідження)», подану до захисту у спеціалізовану вчену раду Д 26.554.01 ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМНУ» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.02.01 – гігієна та професійна патологія**

### **Актуальність теми**

Проблема впливу свинцю на здоров'я населення набула сьогодні глобального значення й торкається не тільки виробничої діяльності людини, але й усіх сфер її життєдіяльності та довкілля. Внаслідок природного, а також техногенного надходження сполуки свинцю серед важких металів є найбільш поширеними у навколишньому середовищі. Особливу небезпеку становлять сполуки свинцю, які перебувають у наноформі. Вони характеризуються високою токсичністю і підвищеною здатністю до кумуляції як в екосистемах, так і в організмі людини, а також тварин, що зумовлює небезпечність їх дії навіть у невеликих кількостях. Джерелом надходження у повітря ультрадисперсних (близьких до 100 нм) та наночастинок (НЧ) свинцю (розміром 100 нм і менше) можуть слугувати виробництва, де є умови для утворення аерозолу конденсації, зокрема, при виплавці свинцю, зварюванні і різанні конструкцій, рекуперації свинцевих акумуляторів тощо. Небезпечність свинцю у вигляді НЧ обумовлена їх особливими фізико-хімічними властивостями (малим розміром та великою питомою поверхнею та ін.), які притаманні нанорозмірному діапазону і які значно підвищують реакційну здатність та біологічну активність наночастинок металів.

Детальне вивчення впливу наночастинок свинцю на функціонування внутрішніх органів і систем є важливою токсиколого-гігієнічною проблемою. Вирішення цих завдань можливе лише на підставі нових фундаментальних знань щодо закономірностей та особливостей шляхів надходження НЧ в живий орга-

нізм, їх розподілення в органах, (тканинах, клітинах), депонування, механізму ушкоджуючої дії і шляхів виведення з організму.

До теперішнього часу практично не вивчена трансдермальна проникність НЧ свинцю (через шкіру), хоча добре відомо, що у виробничих умовах, особливо при ручних операціях, вони можуть забруднювати як шкірний покрив, так і спецодяг працівників. Зокрема, залишаються не вивченими проблеми, пов'язані з визначенням механізмів пошкодження бар'єрних функцій шкіри при дії на її поверхню НЧ свинцю та визначення особливостей їх резорбції через епідерміс і дерму.

У зв'язку з зазначеним, дослідження Н.А. Мельник щодо особливостей токсичної дії НЧ свинцю при їх нанесенні на непошкоджену шкіру є актуальним, оскільки дає можливість поглибити розуміння механізмів дермальної токсичності нанометалів та оцінити небезпеку їх впливу у виробничих умовах та на цій підставі науково обґрунтувати адекватні профілактичні засоби.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України» і є фрагментом фундаментальних НДР «Морфо-функціональна оцінка органотропності та тканинного розподілу наночастинок металів у залежності від їх дисперсності та шляхів надходження в організм» (№ ДР 0114U002409) та «Експериментальні морфо-функціональні дослідження змін бар'єрних функцій шкіри при дії наночастинок важких металів та механізмів їх резорбції крізь непошкоджену шкіру» (№ ДР 0114U000663) в яких автор був співвиконавцем.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Основна ідея дисертаційного дослідження Н.А. Мельник полягає в обґрунтуванні критеріїв оцінки небезпеки НЧ свинцю на підставі досліджень характеру хронічної дії наночастинок свинцю на непошкоджену шкіру щурів залежно від фізико-хімічних характеристик. Для цього пошукувачем розроблено комплексну програму експериментальних досліджень, яка включала гігієнічні дослідження з оцінки емісії НЧ у повітря при

відтворенні в експерименті моделі технологічного процесу рекуперації свинцю та експериментальні токсикологічні дослідження на лабораторних щурах, на яких відтворювалась модель хронічної дії частинок тригідрату ацетату свинцю (ТГ АС) розміром 700нм і НЧ сульфиду свинцю (PbS) розміром 12,5 нм і 100 нм на непошкоджену шкіру. Для вирішення поставлених завдань дисертантом були використані сучасні методи дослідження - біохімічні, хіміко-аналітичні, фізичні, електронно-мікроскопічні та морфологічні. Отримані результати опрацьовували статистичними методами після їх перевірки щодо нормального розподілу вибірки шляхом оцінки показників асиметрії та ексцесу, а також шляхом побудови гістограм розподілу частот. Обробку результатів, які не відповідали нормальному закону розподілення, проводили методами непараметричної статистики. Для перевірки статистичних гіпотез використовували критерій Уїлсона-Манна-Уїтні ( $U$ ) – при рівні значимості  $\alpha=0,05$ .

Таким чином, не викликає сумніву як високий ступінь обґрунтованості основних наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації Н.А.Мельник, так і відповідність її дисертаційної роботи «Токсиколого-гігієнічна характеристика хронічного впливу наночастинок сульфиду свинцю на непошкоджену шкіру та критерії оцінки їх небезпеки» паспорту спеціальності 14.02.01 – гігієна та професійна патологія.

**Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що Н.А.Мельник** - вперше в експерименті на моделі технологічного процесу рекуперації свинцю встановила закономірності та особливості емісії завислих у повітрі частинок, серед яких 88,2–95,1% припадає на НЧ сульфиду свинцю (PbS) із максимумом розподілення у фракціях 5–30 нм, що значною мірою збільшує ризик небезпеки їхнього впливу в реальних виробничих умовах.

Експериментально доведено, що різні за розміром НЧ PbS здатні до проникнення через шкіру при їх хронічному (3 міс.) нанесенні на непошкоджену шкіру щурів із подальшим їх розподілом, кумуляцією в органах-мішенях і наступним розвитком токсичних ефектів.

Встановлено, що токсичні ефекти за умов хронічної дії на шкіру НЧ PbS проявляються збільшенням активності процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і пригніченням антиоксидантного захисту організму (АОЗ), метаболічними перебудовами у системі мікроелементного гомеостазу, а також структурними перебудовами в органах-мішенях, які характеризують розвиток дистрофічних та адаптаційно-компенсаторних змін.

Показано, що хронічний вплив на непошкоджену шкіру щурів НЧ PbS розміром 12,5 нм і 100 нм супроводжується морфологічними змінами, які розвиваються в епідермісі, дермі та придатках шкіри і характеризуються атрофією епідермісу, порушенням процесів його кератинізації; диференціацією кератиноцитів, підвищенням проникливості базальних мембран і порушенням структури колагенових волокон.

**Практична цінність** дисертаційної роботи Мельник Н.А. полягає в тому, що за результатами проведених нею комплексних експериментальних досліджень розроблено та впроваджено для наукових цілей лабораторну модель технологічного процесу рекуперації свинцю.

Науково обґрунтовано методологію щодо інтегральної оцінки резорбції НЧ сполук свинцю при їх експериментальному впливі на непошкоджену шкіру за допомогою неінвазивного методу СКВІД-магнітометрії.

Розроблено морфофункціональні критерії для оцінки ефектів шкідливої дії НЧ свинцю при їх аплікаціях на непошкоджену шкіру (інформаційний лист № 14. 2017 р), які впроваджено у практику наукових досліджень ДУ «ІМП імені Ю.І. Кундієва НАМН України, навчальний процес ВНЗ МОЗ України, що підтверджено відповідними документами.

**Структура та основний зміст дисертації.** Дисертаційна робота побудована за класичним принципом і викладена на 229 сторінках друкованого тексту. Робота складається з титульного аркушу, змісту, переліку умовних позначень, анотації, викладеної українською та англійською мовами, вступу, аналітичного огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку вико-

ристаної літератури та додатків. Робота проілюстрована 13 таблицями і 66 рисунками. Список літератури складається з 222 джерел, з яких 112 викладені кирилицею, а 110 – латиницею.

**У вступі** розкрито актуальність теми дисертаційного дослідження та показано зв'язок роботи із науковими програмами, темами і планами. Визначено мету, об'єкт, предмет і методи наукового дослідження; представлено наукову новизну, теоретичне і практичне значення; наведено інформацію про впровадження результатів дослідження; відображено особистий внесок автора у виконання роботи; представлено інформацію щодо апробації результатів та публікацій за результатами дослідження.

**В аналітичному огляді літератури** на основі проведеного аналізу літературних джерел викладено сучасний стан досліджуваної проблеми, надано характеристику фізико-хімічним властивостям наночастинок металів, описано способи отримання та сфери застосування наночастинок свинцю, особливості токсичної дії свинцю, шляхи надходження наночастинок в організм, у тому числі крізь шкіру. Підсумовуючи викладені дані літератури, дисертантка робить висновок, що характер накопичення і розподілу свинцю у наноформі в організмі людини і тварин вивчений недостатньо, зокрема залишаються нез'ясованими механізми проникнення наночастинок свинцю крізь шкіру та особливості їх токсичної дії. Саме цим невирішеним питанням Мельник Н.А. присвятила своє дисертаційне дослідження.

**У розділі 2** («Методика, об'єкти та методи дослідження») обґрунтовано вибір об'єкту та методів експериментального дослідження, описана методика та дизайн експерименту. Створені умови експерименту, які забезпечили надійність і достовірність отриманих результатів та їх репрезентативність. Дисертанткою застосовано комплекс методів, які виконувались на сучасному обладнанні. Так, для визначення фізико-хімічних властивостей використаних в токсикологічному експерименті мікро- і НЧ неорганічних сполук свинцю були використані методи динамічного розсіювання світла, растрової електронної мікроскопії, а також енерго-дисперсійного мікροаналізу. Для визначення вмісту свинцю

та деяких макро- і мікроелементів (Fe, Zn, Cu, Ca і Mg) у внутрішніх органах щурів застосовували метод атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (АЕС-ІЗП). Для інтегральної оцінки резорбції різних за розміром наночастинок свинцю використовували метод СКВІД (*Superconducting Quantum Interference Device Superconducting Quantum Interference Device*). Проведено визначення біохімічних показників (ТБК-активних продуктів, активності ферментів каталаза (КА) та супероксиддисмутаза (СОД). Для визначення морфофункціональних змін шкіри застосовували гістологічні, гістохімічні та електронно-мікроскопічні дослідження. Обробку результатів, які не відповідали нормальному закону розподілення, проводили методами непараметричної статистики. Для перевірки статистичних гіпотез використовували критерій Уїлконсона-Манна-Уїтні ( $U$ ) – при рівні значимості  $\alpha=0,05$ .

**У розділі 3** викладені роботи дослідження емісії наночастинок у повітря при відтворенні в експерименті моделі технологічного процесу рекуперації свинцю. Автором доведено, що основні операції, пов'язані із розігрівом, розплавленням, виплавою та розливом свинцю у форми, супроводжуються емісією завислих у повітрі частинок у концентраціях, що перевищують фон у 2,6–6,4 рази. Із них 88,2–95,1% усіх частинок представлені НЧ PbS із максимумом розподілення у фракціях 5-30 нм.

При вивченні емісії наночастинок у повітря автором також було визначено основні фізико-хімічних характеристики частинок із проб повітря за допомогою методу растрової електронної мікроскопії та енерго-дисперсійного мікроаналізу. Це дозволило встановити особливості форми та розміру наночастинок, що набуває важливого значення при проведенні оцінки їх токсичних властивостей.

Хіміко-аналітичні дослідження, які проведені з метою вивчення хімічного складу завислих у повітрі НЧ, виявили їх багатокомпонентний склад. Хімічний склад НЧ, що утворюються та надходять у повітря на етапах розігріву, розплавлення та виплавки свинцю, характеризується наявністю в них не лише свинцю

(Pb), але й інших важких металів, серед яких провідного значення для гігієнічної оцінки умов праці та професійного ризику набувають олово (Sn), сурма (Sb), кадмій (Cd), цинк (Zn), мідь (Cu), а також кремній (Si).

**Четвертий розділ роботи** присвячений оцінці резорбції різних за розміром НЧ PbS через шкіру щурів за даними аналізу вмісту Pb та окремих макро- і мікроелементів в органах-мішенях тварин (міокард, печінка, нирки). За результатами цих досліджень пошукувачем було виявлено зміни з боку мікроелементного гомеостазу організму, що проявлялися збільшенням вмісту Pb у печінці та нирках щурів, зменшенням вмісту Zn та збільшення вмісту Fe у міокарді, печінці та нирках щурів.

Позитивним є той факт, що дисертантом застосовано новий неінвазивний метод інтегральної оцінки небезпеки НЧ (метод реєстрації та аналізу надслабких магнітних полів – метод СКВІД магнітометрії, про який вже згадувалось), за допомогою зазначеного методу було встановлено, що НЧ PbS з розміром 12,5 нм та 100 нм у порівнянні з тригідратом ацетату свинцю (ТГАС) з розміром 700 нм здатні до резорбції через шкіру, а метод СКВІД-магнітометрії печінки є простим у використанні і достатньо інформативний для інтегральної оцінки небезпеки впливу НЧ сполук Pb на організм.

**У п'ятому розділі** наведена порівняльна оцінка ефектів хронічної дії при аплікації на шкіру щурів НЧ PbS розміром 12,5 нм і 100 нм за даними змін біохімічних показників перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту організму (АОЗ), які визначали у крові та гомогенатах органів-мішеней щурів (печінка та нирки), а також за результатами гістологічних, гістохімічних і електронно-мікроскопічних досліджень печінки, нирок і міокарду тварин.

Дисертантом встановлено, що ефекти хронічної дії на шкіру НЧ PbS різного розміру проявляються статистично значимим у порівнянні з контролем ( $p_u < 0,05$ ) збільшенням показника ПОЛ (ТБК-активних продуктів) і пригніченням показників АОЗ (каталази і супероксиддисмутази) у крові та органах мішенях (печінка і нирки), які корелюють із морфологічними змінами в органах, що

розвиваються на субклітинному, клітинному та тканинному рівнях і характеризують розвиток дистрофічних та адаптаційно-компенсаторних змін.

**У розділі 6** представлені результати комплексних морфо-функціональних досліджень шкіри щурів, які зазнавали хронічної дії НЧ PbS розміром 12,5 нм і 100 нм у порівнянні з тригідратом ацетату свинцю розміром 700 нм.

За результатами морфологічних досліджень епідермісу, епідермально-дермальних сполучень, дерми та гіподерми, а також придатків шкіри визначено основні закономірності та особливості резорбції НЧ PbS через шкіру, а також визначено і сформульовано основні морфо-функціональні критерії оцінки небезпеки НЧ при їх впливі на непошкоджену шкіру у хронічному токсикологічному експерименті: 1) вогнищеві зміни цитоплазми корнеоцитів у вигляді зменшення кількості кератогіалінових волокон з накопиченням щільних гранулярних включень НЧ PbS; 2) атрофія рогового шару епідермісу із значним розширенням просторів між корнеоцитами рогового шару; 3) вогнищева деструкція коркового та мозкового шару волосяного стрижня в області волосяної воронки; 4) вогнищевий гіперкератоз із порушенням структури ліпідного конверту корнеоцитів рогового шару; 5) дистрофічні зміни базальних кератиноцитів, зменшення кількості фігур мітозу, що визначає порушення процесу проліферації та диференціювання клітин і складає основу порушень процесів кератинізації; 6) порушення структури епідермально-дермальних з'єднань у вигляді вогнищєвого порушення цілісності базальної мембрани, вогнищєвого набряку субепідермального шару сітчастого шару дерми, розшарування волокон колагену I типу разом із компенсаторною гіперплазією волокон колагену III типу; 7) дистрофічні зміни ендотелію кровоносних капілярів із розвитком вогнищ периваскулярного набряку де відбувається накопичення НЧ PbS (ідентифіковано методом РЕМ із системою ЕДМ), які взаємодіють з білками позаклітинного матриксу, ретикуліновими та колагеновими волокнами; 8) наявність дрібних щільних включень НЧ PbS у складі секреторних гранул епітелію голокринових залоз.



**У розділі 7** дисертант узагальнює отримані ним результати та зіставляє їх з опублікованими даними. На підставі цього пошукувач розробляє та складає схему, що узагальнює основні дані про шляхи проникнення НЧ PbS через шкіру та основні морфо-функціональні зміни шкіри при хронічному впливі НЧ PbS.

**Висновки** у дисертації є цілком обґрунтованими, вони логічно витікають із результатів проведених досліджень, їх число (7) відповідає кількості поставлених у дослідженні завдань.

**Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових і фахових виданнях.** За матеріалами дисертації Н.А. Мельник опубліковано 10 наукових робіт, із них 5 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України (із них 3 одноосібно); 1 стаття – у міжнародному виданні, що індексується в базах РИНЦ; 1 стаття – в інших наукових виданнях; 2 тез - у матеріалах наукових конференцій. За матеріалами дослідження видано інформаційний лист «Морфофункціональні критерії оцінки токсичної дії наночастинок свинцю при їх нанесенні на непошкоджену шкіру».

В публікаціях повною мірою відображені результати та основні положення дисертаційного дослідження. Автореферат дисертації Н.А. Мельник оформлений згідно з вимогами МОН України. Його зміст є ідентичним основним положенням дисертаційної роботи і дає чітке уявлення про проведені автором дослідження, отримані результати, наукові висновки та їх практичне впровадження.

Під час рецензування роботи Мельник Н.А. у нас виникли наступні запитання та побажання:

1. Чим, на думку автора, можна пояснити різний характер ушкоджуючої дії НЧ PbS з розміром 12,5 нм і 100 нм на клітини органів мішеней піддослідних шурів (моноцелюлярний некроз гепатоцитів за дії НЧ PbS 12,5 нм і дистрофія та апоптоз гепатоцитів при дії НЧ PbS 100 нм)?

2. На нашу думку дисертанту слід було б висловити своє ставлення до даного питання. Наскільки метод СКВІД-магнітометрії є доступним у

практичному використанні як в лабораторно-експериментальному, так і в клінічному аспектах?

3. В тексті дисертації і автореферату трапляються граматичні і синтаксичні помилки та невдалі терміни, такі, наприклад, як «зважені наночастинки», «уміст наночастинок», «волосяна воронка» тощо.

Проте хочу зазначити, що наші зауваження не мають принципового значення і жодним чином не впливають на наукову і практичну цінність рецензованої дисертаційної роботи.

### Висновок.

Дисертаційна робота Мельник Н.А. на тему: «Токсиколого-гігієнічна характеристика хронічного впливу наночастинок сульфідів свинцю на непошкоджену шкіру та критерії оцінки їх небезпеки (експериментальне дослідження)», є самостійною, завершеною науковою працею, яка виконана на сучасному методичному рівні, має наукове, теоретичне і практичне значення та відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.554.01. За актуальністю, методичним рівнем проведення досліджень, науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів, повнотою викладу матеріалів в опублікованих роботах та рівнем їх впровадження дисертація Мельник Н.А. повністю відповідає вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук (пункти 9 та 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затв. Постановою КМ України № 567 від 24 липня 2013 р.), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.02.01 - гігієна та професійна патологія.



Завідувач кафедри гігієни і екології № 2

НМУ імені О.О. Богомольця МОЗ України,

академік НАМН України, д.мед.н., професор

ЗАСВІДЧУЮ  
ВІД ІМЕНІ СЕКРЕТАРЯ УНІВЕРСИТЕТУ  
Зицький Д.В.  
05.08. 2018 р.

Яворовський О.П.