

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Лебідь Катерина Миколаївна

УДК 577.24.:577.352.38

ДИСЕРТАЦІЯ
«ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНОЇ ВІДПОВІДІ МОЛОДИХ І СТАРИХ
ТВАРИН НА ГЕПАТОТОКСИЧНУ ДІЮ СІРЧАНОКИСЛОЇ МІДІ ТА
ВПЛИВ БІОЛОГІЧНИХ АНТИДОТІВ»

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

_____ К. М. Лебідь

Науковий керівник: Нікітченко Юрій Вікторович, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник.

Харків – 2017

АНОТАЦІЯ

Лебідь К. М. Дослідження біохімічної відповіді молодих і старих тварин на гепатотоксичну дію сірчаноокислої міді та вплив біологічних антидотів. – 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, 2017.

Одним з підходів до вивчення механізмів старіння є дослідження вік-залежних відповідей на екзогенні токсичні впливи. Відомо, що ризик розвитку ушкодження печінки при дії ксенобіотиків на організм збільшується на пізніх етапах онтогенезу, однак механізм цього явища до кінця не вивчений. Сірчаноокисла мідь, що є поширеним промисловим ксенобіотиком, за умов хронічного отруєння може мати гепатотоксичну дію, обумовлену, зокрема, активацією процесів ліпопероксидації. Сучасна парадигма геронтології стверджує, що тривалість життя залежить від здатності організму до адаптації. Оскільки в процесі онтогенезу здатність до адаптації знижуються – збільшується ймовірність виникнення патологій і настання смерті. Зі збільшенням віку відповідні реакції організму на однотипні впливи відрізняються від таких у молодих організмів, однак це не завжди слід розглядати як зниження адаптаційного потенціалу. Найімовірніше, з віком змінюються стратегії адаптації, а не здатність організму до неї.

Широкий спектр досліджень демонструє багатогранність патогенетичних ланок у розвитку пошкоджень печінки. Активацію процесів перекисного окислення ліпідів і порушення стану антиоксидантного балансу розглядають у якості важливих чи навіть провідних ланок патогенезу захворювань печінки. Серед теорій тривалості онтогенезу розглядають мітохондріальну вільнорадикальну теорію старіння яка ключовою подією, що супроводжує процес старіння у людей і тварин

називає накопиченням пошкоджень у мітохондріях і мітохондріальній ДНК, яке значною мірою залежить від швидкості генерації активних форм кисню у мітохондріях та ступіню ненасиченості жирних кислот у тканинних мембранах, та модифікації вільнорадикальної теорії: теорію епігенетичного окислювально-відновного зсуву, що об'єднує вільнорадикальну теорію та вплив на процес старіння інсулінової передачі сигналу, і теорію метаболічної стабільності, яка постулює, що клітини мають здатність регулювати внутрішню концентрацію активних форм кисню і ця здатність є головним визначальним фактором тривалості життя. Одним з важливих захисних регуляторних механізмів є генерація GSH та NADPH ферментними системами у клітині, що є необхідним для забезпечення антиоксидантної функції на усіх етапах онтогенезу. Тригерним механізмом інтенсифікації активації процесів перекисного окиснення ліпідів та порушень рівноваги у системі прооксиданти / антиоксиданти і, як наслідок - явища окисного стресу, може бути вплив на організм ксенобіотиків, зокрема іонів важких металів у кількостях, що перевищують фізіологічні. У відповідь формується ряд захисних реакцій, спрямованих на гальмування вільно-радикального окислення та підтримання про-антиоксидантного балансу організму, та ці адаптивні відповіді не завжди приводять до нівелювання згубного ефекту та мають відмінності на різних етапах онтогенезу. Наразі залишається нез'ясованим як змінюється реакція ряду показників про-антиоксидантного потенціалу на інтоксикацію сірчаноокислою міддю з віком; чи можливе ефективне корегування даного стану та як відрізняється реакція на застосування різних засобів корегування прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у тварин різного віку. Оскільки дані щодо змін метаболічних шляхів, патерну експресії генів, стану про-антиоксидантного балансу при старінні дають можливість припустити наявність різної здатності до адаптації організмів молодого та старого віку.

В якості антидотів при дії на організм ксенобіотиків можна використовувати різні природні джерела антиоксидантних сполук, у тому числі компоненти молозива, грибів і мікроводоростей.

Так, у даній роботі було актуальним дослідити вікові особливості дії сублетальних доз сірчанокиислої міді на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та деяких глутатіон та NADP-залежних активність антиоксидантних ферментів у печінці та крові щурів молодого та старого віку, а також оцінити можливість та ефективність корекції наявних змін за допомогою зміни режиму харчування, використання комплексу «Мікс-фактор» та комплексу низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива (НКМ), що мають антирадикальні та антитоксичні властивості.

На першому етапі дослідження індукували пошкодження печінки триразовим введенням сублетальних доз сірчанокиислої міді з інтервалом 48 годин і здійснювали визначення показників прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці та крові щурів через 24 години після інтоксикації для визначення ролі змін прооксидантно-антиоксидантного балансу в механізмах Cu-індукованого ушкодження печінки. Також здійснювали вимірювання цих показників через один та два місяці, для з'ясування можливості нівелювання даного впливу з часом. На другому етапі перевіряли здатність циклічного режиму годування, який включав 2 цикли 30 % втрати і відновлення маси тіла піддослідними тваринами модулювати зміни про-антиоксидантного балансу при Cu-індукованому ушкодженні печінки. На третьому етапі перевіряли протекторні властивості біологічної субстанції низькомолекулярних речовин з грибів *Pleurotus ostreatus* і *Sacharomyces cerevisiae* «Мікс-фактор» і субстанції низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива щодо порушень про-антиоксидантного балансу, які супроводжують Cu-індуковане пошкодження печінки. Встановлено, що триразове введення експериментальним тваринам $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та CCl_4 в LD_{33} з інтервалом 48 годин супроводжується розвитком ураження печінки, формування якого відбувається на фоні

окисного стресу, що включає інтенсифікацію вільнорадикального окислення, зниження активності ряду глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів та NADP-дегідрогеназ. Для молодих і старих тварин зареєстровано однотипні зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу через 24 години після інтоксикації. Відмінності у метаболічних реакціях виявлені у період корегування організмом патологічних змін (як тих, що відбуваються у організмі в нормі через 1 та 2 місяців після інтоксикації, так і при застосуванні протекторних засобів). Також однотипні зміни показників про-антиоксидантного потенціалу у молодих та старих тварин було зареєстровано після першого циклу втрати маси тіла при ЦРГ, тоді як у другому циклі експерименту у тварин різного віку за рядом показників реакція відрізнялася. Переведення тварин з Cu-індукованим пошкодженням печінки на циклічний режим годування після проходження двох циклів ЦРГ нормалізує більшість вивчених показників про-антиоксидантного потенціалу у старих тварин, а у молодих індукує зрушення балансу у бік антиоксидантного потенціалу за показником глутатіонпероксидазної активності у мітохондріях, цитоплазмі клітин печінки і сироватці крові та ізоциторадегідрогеназної активності у мітохондріях клітин печінки. Встановлено, що комплекс «Мікс-фактор» здатний знижувати інтенсифікацію ПОЛ та інгібування активності вивчених антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді у тварин обох вікових груп. Комплекс низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива здатний до корегування патологічних змін про-антиоксидантного балансу у мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки як 3- так і 20-місячних щурів, викликаючи зрушення балансу у бік антиоксидантного потенціалу у групі молодих щурів. Встановлено, що триразове введення сублетальних доз сірчанокислої міді призводить до порушення про-антиоксидантного балансу, подібного змінам при CCl_4 -інтоксикації і ця модель може розглядатися як приклад вільнорадикальної патології і використовуватися для відбору речовин і субстанцій з потенційною

антиокисною активністю. Комплекс низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива та «Мікс-фактор» є перспективними комплексами для вивчення і розробки природних систем регуляції про-антиоксидантного балансу у печінці при патологічних змінах, спричинених інтоксикацією сульфатом міді у тварин різного віку.

Ключові слова: прооксидантно-антиоксидантний баланс, вік, сірчаноокисла мідь, гепатотоксичність, циклічний режим годування, Мікс-фактор, молозиво.

ABSTRACT

Lebid K. M. Investigation of the biochemical response of young and old animals to the hepatotoxic action of copper sulfate and the effect of biological antidotes. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Speciality 03.00.04 – Biochemistry (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2017.

One of the approaches for studying aging mechanisms is the study of age-dependent responses to exogenous toxic effects. It is known that the likelihood of the development of liver damage with the action of xenobiotics on the body increases in the sloping and aging age, although the mechanism of this phenomenon is not fully understood. Copper sulphate, which is a widespread industrial xenobiotic in chronic poisoning, may have a hepatotoxic effect due to the activation of lipoperoxidation processes. The modern paradigm of gerontology states that life expectancy depends on the adaptive capacity of the organism. Since in the process of ontogenesis the ability to adapt is reduced - the probability of occurrence of pathologies and death is increased. Indeed, with increasing age, the body's responses to the same effects differ from those in young organisms, but this should not always be interpreted as reducing the adaptive potential. Most likely, the adaptation strategy changes over time, but not the body's ability to adapt. A wide range of studies demonstrates the multiplicity of pathogenetic links in the development of liver damage. Activation of peroxidation of lipids and disorders in

the system of antioxidant protection are considered as important or even leading links in the pathogenesis of liver disease. This is confirmed by the fact that a number of papers show the effectiveness of the use of antioxidants as a means of correcting the pathological states of the liver in the event of a violation of the prooxidant-antioxidant balance in the direction of the prooxidants at the different stages of ontogenesis. Among the theories of the duration of ontogenesis, is considered the mitochondrial free radical theory of aging, which is the key event that accompanies the aging process in humans and animals, which is called the accumulation of damage in mitochondria and mitochondrial DNA, which largely depends on the rate of formation of active forms of oxygen in mitochondria and the degree of unsaturation of fatty acids of tissue membranes. It is also considered modifications of a freely radical theory: the theory of an epigenetic oxidation-reduction shift, combining a free radical theory and the influence on the process of the old insulin signaling, and the theory of metabolic stability, which postulates that cells have the ability to regulate the internal concentration of active forms of oxygen and this ability is the main determinant of life expectancy. One of the important protective regulatory mechanisms is the generation of GSH and NADPH by enzyme systems in the cell, which is essential for antioxidant function in all stages of ontogenesis. The trigger mechanism for intensifying the activation of lipid peroxidation processes and equilibrium in the system of prooxidants / antioxidants and, as a consequence, the phenomena of oxidative stress, is often the entry of xenobiotics into the body, in particular heavy metal in quantities exceeding physiological processes. In response, a number of protective reactions are formed to inhibit free radical oxidation and maintain the prooxidant-antioxidant balance of the body, but these adaptive responses do not always lead to a leveling of harmful effects and have differences in the various stages of ontogenesis. It remains unclear how the reaction of a number of parameters of the prooxidant-antioxidant potential to intoxication with heavy metals, in particular copper, changes with age. Is an effective correction of this condition possible and how different is the reaction to the use of various means of correcting the prooxidant-

antioxidant potential in young and old animals? Since data on changes in metabolic pathways, patterns of gene expression, and the pro-oxidant-antioxidant balance in aging make it possible to assume that young and old organisms have different adaptive capacity. As factors of regulation, including indicators of antioxidant balance, it is possible to use various natural sources of antioxidant compounds, including components of colostrum, fungi and microalgae. In connection with the above-mentioned, it was relevant to study the age-specific features of the action of sublethal doses of sulfur dioxide copper on the intensity of lipid peroxidation processes and some of the GSH and NADP-dependent activity of antioxidant enzymes in the liver and blood of young and old rats, and to evaluate the possibility and the effectiveness of correcting existing changes by changing the diet or using the Fungidol complex and the complex of low molecular weight components of cow colostrum (NKM) with antiradical and antioxidant properties. In the first stage of the experiment, liver damage was induced by three times the administration of sublethal doses of sulfuric acid copper at 48 hours intervals, after which determination of the prooxidant-antioxidant balance values was made 24 hours after intoxication to determine the role of the prooxidant-antioxidant balance in mechanisms of Cu-induced liver damage. Also, the measurements of these indicators were taken in 1 and 2 months, to find out the possibility of leveling this effect over time. At the second stage, the ability of the cyclic feeding regimen, which included 2 cycles of 30 %, and the loss and recovery of the body weight of the experimental animals, were checked to adjust the changes of the prooxidant-antioxidant balance in Cu-induced liver damage. At the third stage, the protective properties of the biological substances of low molecular weight substances from the fungi *Pleurotus ostreatus* and *Sacharomyces cerevisiae* "Mix factor" and the substance of low molecular weight substances from cow colostrum were tested for anti-oxidant balance violations that accompany Cu-induced damage to the liver. It has been established that the introduction of three times the experimental animals of CuSO_4 and CCl_4 in LD_{33} with an interval of 48 hours is accompanied by the development of liver damage, the formation of which occurs in the background of

oxidative stress, which includes the intensification of free radical oxidation, a decrease in the activity of the number of GSH and NADPH - dependent antioxidant enzymes. For young and old animals, the same changes in the prooxidant-antioxidant balance are recorded 24 hours after intoxication. Differences in metabolic reactions are detected during the period of the body's correction of pathological changes (as those occurring in the body in the normal course of 1 and 2 months after intoxication and with the application of protective agents). Similar changes in the parameters of the prooxidant-antioxidant balance in young and old animals were also recorded during the first cycle of dietary restriction in CFR, whereas in the second cycle of the experiment in animals of different ages, a different reaction was observed. The transfer of animals from Cu-induced liver damage to the cyclic feeding regime after two cycles of the CFR normalizes most of the studied prooxidant antioxidant potentials in older animals, while in young it induces a shift in the balance towards antioxidant potential in terms of glutathione peroxidase activity in mitochondria, cytoplasm, blood serum and isother dehydrogenase activity in mitochondria of liver cells. It was found that the complex "Fungidol" is able to reduce the intensification of LPO and inhibition of the activity of the antioxidant enzymes studied in CuSO_4 intoxication in animals of both age groups. The complex of low molecular weight substances from cow colostrum is capable of correcting pathological changes in the prooxidant-antioxidant balance in mitochondria and cytosol of liver cells in both 3 and 20-month rats, causing a shift in the balance towards antioxidant potential in a group of young rats. It was found that three-fold administration of sublethal doses of CuSO_4 leads to a disturbance of the prooxidant-antioxidant balance, similar to changes in CCl_4 induced damage, and this model can be considered as an example of free radical pathology and used for the selection of substances and substances with potential antioxidant activity. The complex of low molecular weight components of cow colostrum and "Mix factor" are promising complexes for studying and developing natural systems of regulation of prooxidant-antioxidant

balance in the liver in pathological changes caused by CuSO_4 intoxication in animals of different age groups.

Key words: prooxidant-antioxidant balance, age, copper sulfate, hepatotoxicity, cyclic feeding regime, Mix factor, colostrum.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:

1. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., **Lebid K. M.**, Ivanov E. G., Kurguzova N. I., Gayevoy S. S., Sharko M. O., Alsardia Mohammad M. A, Al Begai Mohammad A. Y. Low molecular weight components from various sources eliminate oxidative stress and restore physiological characteristic of animals at early stages of Cu- induced liver fibrosis development // Translational Biomedicine. 2017. Vol. 8, N 2. P. 1–9. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”*.
2. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Klimova E. M., Linkevych O. S., **Lebid K. M.**, Al-Bahadli A. M. M., Alsardia M. M. A. Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis //Advances in Gerontology. 2017. Vol. 7, N 1. P. 41–50. (SCOPUS, PubMed). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, вимірювання фізіологічних показників, вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”*.
3. Bozhkov Anatoliy I., Klimova Olena M., Nikitchenko Yuriy. V., Kurguzova Natalya I., Linkevych Olena S., **Lebid Katherine M.**, Protsenko Olena S., Remneva Natalya A., Al-Bahadly Ali M. M., Al-Begai Mohammad A. Y. Ontogenetic approach to the study of mechanisms of copper-induced liver fibrosis // Advances in Aging Research. 2017. N 6. P. 39–54. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання,*

вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.

4. Bozhkov Anatoly I., Nikitchenko Yuriy V., **Lebed Katerina N.**, Linkevych Olena S., Kurguzova Natalia I., Klimova Olena M., Al Begai Mohammad A.Y., Al - Bahadly Ali M. M., Alsardia Mohammad M. A. The Cyclic Feeding Regime Induces Decaying Age-Dependent Oxidative Stress and Regulates the Cell Chain of the Immunity // *Advances in Aging Research*. 2016. N 5. P. 151–165. “Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експерименту (вимірюванні фізіологічних показників, вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази та глутатіонпероксидази), участь у обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті”.
5. Bozhkov A. I., Kurguzova N. I., Krivoruchko T. V., **Lebed’ E. N.**, Mikhailets A. O., Danladi S. D., Bozhkov A. A., Girich M. S. A Cyclic Feeding Regime: A New Model in Experimental Gerontology // *Advances in Gerontology*. 2014. Vol. 4, N 4. P. 252–259. (SCOPUS, PubMed). “Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, вимірювання фізіологічних та біохімічних показників, моніторинг виживаності тварин, участь у обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті”.

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

6. **Лебедь Е. Н.**, Афанасьева А. В. Влияние комплекса «Фунгидол» на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса у животных с избыточным питанием в раннем периоде постнатального онтогенеза // *Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів XI міжнародної конференції молодих вчених, 29 листопада–2 грудня 2016 р. Харків, 2016. С. 11. “Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового*

діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, написання тез”.

7. Кургузова Н. И., Бондарь В. В., **Лебедь Е. Н.**, Аль Бегаи М. А. Ю., Алсардиа М. М. А. Возрастзависимый характер проявления оксидативного стресса при циклическом режиме кормления // Здоров'я, харчування, довголіття: збірник матеріалів науково-практичної конференції, 16–17 травня 2016 р. Київ, 2016. С. 345. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів”.*
8. **Лебедь Е. Н.**, Афанасьева А. В., Гаевой С. С. Низкомолекулярные компоненты молозива регулируют активность показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса крови крыс // Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів міжнародної конференції молодих вчених, 2–4 грудня 2015 р. Харків, 2015. С. 15–16. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, написання тез”.*
9. Никитченко И., Боцула И., **Лебедь Е.**, Никитченко Ю. Изменение активности глутаредоксинов и глутатионпероксидаз в митохондриях печени крыс в процессе постнатального онтогенеза // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: збірник тез міжнародної наукової конференції, 24–25 вересня 2015 р. Дніпропетровськ, 2015. С 134–135. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання активності глутатіонпероксидази та глутаредоксину, обговоренні та інтерпретації результатів”.*
10. **Lebid K.** The influence of a cyclic feeding regime on the prooxidant-antioxidant balance in liver mitochondria of rats of various ages// Biology: from

molecules to the biosphere: IX international conference of young scientists, 18–21 november 2014. Kharkiv, 2014. P. 22.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ЗМІНИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСУ У ПЕЧІНЦІ ТА КРОВІ ТВАРИН ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ КСЕНОБІОТИКАМИ ТА ВІК-ЗАЛЕЖНИХ ДИСФУНКЦІЯХ (літературний огляд)	23
1. 1 Вік-залежні зміни прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у печінці та крові тварин.....	23
1. 2 Зміни прооксидантно-антиоксидантної системи при токсичному ураженні печінки	31
1. 3 Вплив аліментарних чинників на стан про-антиоксидантного балансу у печінці та аналіз існуючих способів корегування порушень про- антиоксидантного балансу у печінці за допомогою змін режиму харчування	37
1. 4 Способи корегування порушень про-антиоксидантного балансу у печінці за допомогою екзогенних антидотів та гепатопротекторів	42
Висновки до розділу 1	45
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	47
2. 1 Вибір об'єктів дослідження	47
2. 1. 1 Моделювання інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном	47
2. 1. 2 Циклічний режим годування.....	48
2. 1. 3 Застосування комплексу «Мікс-фактор»	50
2. 1. 4 Застосування комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива.....	52
2. 2 Препаративні методи дослідження.....	53
2. 3 Аналітичні методи дослідження.....	53

2. 4 Статистичні методи дослідження	55
2. 5 Характеристика використаних реактивів	56
Висновки до розділу 2	56
РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	57
3. 1 Вік-залежні зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці та крові щурів при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном	57
3. 1. 1 Динаміка змін інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді (через 24 години, 1 місяць, 2 місяці після введення розчину сірчаноокислої міді) у молодих та старих тварин	57
3. 1. 2 Порівняльний аналіз відповіді показників про-антиоксидантного балансу на моделях гепатоінтоксикації іонами сірчаноокислої міді та тетрахлорметану у молодих та старих тварин	68
3. 2 Вік-залежний вплив циклічного режиму харчування на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді	72
3. 2. 1 Вплив циклічного режиму харчування на показники про-антиоксидантного балансу у молодих та старих тварин	72
3. 2. 2 Вплив циклічного режиму харчування на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу при Cu-індукованому ураженні печінки у молодих та старих щурів	90
3. 3 Вік-залежний вплив комплексу «Мікс-фактор» та комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді	103
3. 3. 1 Вплив застосування комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді	103
3. 3. 1. 1 Вплив комплексу «Мікс-фактор» на показники	

прооксидантно-антиоксидантного балансу у молодих і старих щурів	104
3. 3. 1. 2 Вплив тривалого (12 місяців) застосування комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу печінки і крові щурів, що старіють	107
3. 3. 1. 3 Вплив комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих щурів	112
3. 3. 2 Вплив комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих тварин	120
3. 3. 2. 1 Вплив комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у молодих та старих тварин	120
3. 3. 2. 2 Вплив комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих щурів	122
Висновки до розділу 3	125
ВИСНОВКИ	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	131
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації	158
ДОДАТОК 2	162

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОС — антиоксидантна система

АОФ — антиоксидантні ферменти

КФ — класифікація ферментів (код фермента)

МДА — малоновий діальдегід

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ТБК — тіобарбітурова кислота

трис — трис(оксиметил)амінометан

СОД/ SOD — супероксиддисмутаза

МС/мс — мікросоми

МХ/мх—мітохондрії

ЦТ/цт — цитозольна фракція

сир. — сироватка крові

ЦРГ/CFR—циклічний режим годування (Ciclic Feeding Regime)

АФК/ ROS — активні форми кисню (Reactive Oxigine Species)

IF — Interminant Fasting

GP/ГП — глутатіонпероксидаза

GR/ГР— глутатіонредуктаза

Grx — глутаредоксин

Асо — аконітатгідратаза

СР — церулоплазмін

ALT—аланінамінотрансфераза

AST — аспартатамінотрансфераза

GSH — глутатіон відновлений

GSSG — глутатіон окиснений

NADP+ — нікотинамідадениндинуклеотидфосфат окиснений

NADPH — нікотинамідадениндинуклеотидфосфат відновлений

НКМ / НКМ – комплекс низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. За даними фахівців, в останні роки спостерігається збільшення середньої тривалості життя людей в економічно розвинених країнах. Поряд з цією позитивною тенденцією проявився новий феномен збільшення числа вікзалежних патологій. Тому одним з актуальних завдань сучасної геронтології та геріатрії є дослідження механізмів цих патологій і розробка способів їх усунення. Розв'язання цього завдання сприятиме розумінню самих механізмів старіння, маючи не лише практичне, але й фундаментальне значення. В ряді таких вік-залежних патологій як паркінсонізм, хвороба Альцгеймера, серцево-судинні та онкопатології, патології печінки займають досить велику частку, посилюючи також протікання інших захворювань [1–7]. Як правило, ураження печінки, які виникають на пізніх етапах онтогенезу можуть індукуватися вірусними інфекціями, лікарськими препаратами, токсичними сполуками, що містяться в продуктах харчування та воді [7–14]. Одним з найбільш поширених токсичних чинників довкілля є іони міді. Показано, що інтоксикація організму іонами міді супроводжується розвитком фіброзу печінки [12]. Відомо, що ураження печінки різноманітними ксенобіотиками проявляються здебільшого у дорослих і старих організмів [10, 15]. Тому дослідження біохімічних механізмів розвитку уражень печінки іонами сірчаноокислої міді у молодих і старих тварин може бути вдалим експериментальним підходом у вирішенні проблем виникнення вік-залежних патологій і механізмів старіння.

Відомо, що однією з «первинних» відповідей на токсичну дію ксенобіотиків є зміна рівноваги у прооксидантно-антиоксидантній системі [14–30]. Крім того, велика кількість експериментальних досліджень показує, що розвиток патологій печінки, пов'язаний з проявом оксидативного стресу [1, 6]. Однією з найбільш верифікованих гіпотез геронтології залишається вільнорадикальна гіпотеза старіння [16]. У зв'язку з цим, дослідження показників про-антиоксидантної системи при вік-залежних ураженнях

печінки іонами сірчаноокислої міді дозволяє вирішувати кілька важливих питань: встановлення механізмів розвитку вікзалежних патологій, ролі окисного стресу в цих процесах і його ролі в механізмах старіння.

В якості експериментальних доказів ролі окисного стресу в цих процесах можуть служити дані щодо впливу антидотів, які забезпечують відновлення порушених функцій печінки та стану про-антиоксидантної системи [31-39].

Розробка та вивчення антидотів - представляє великий інтерес як для перевірки ролі окисного стресу у розвитку патологій печінки, так і механізмів старіння. У якості можливих антидотів використовували низькомолекулярні компоненти з грибів видів *Pleurotus ostreatus* і *Sacharomyces cerevisiae* [29, 34, 37] і коров'ячого молозива [30, 35, 38]. Раніше було показано, що ці низькомолекулярні компоненти мають вираженою біологічною дією [29]. Дослідження дії біологічно активних сполук у молодих і старих тварин є перспективним підходом у дослідженні механізмів старіння.

Мета і задачі дослідження. Метою дисертаційної роботи було дослідження біохімічної відповіді показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу на гепатотоксичну дію сірчаноокислої міді для з'ясування вік-залежних механізмів пошкодження печінки, а також визначення можливості корегування порушень про-антиоксидантного балансу у молодих та старих тварин за допомогою циклічного режиму годування та використання комплексних субстанцій з антитоксичною дією: комплексу низькомолекулярних компонентів з грибів роду *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* та коров'ячого молозива («Мікс-фактор» та НКМ).

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. З'ясувати вікові відмінності інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів, активності аконітази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, GSH-редуктаз та NADP-дегідрогеназ у печінці та крові тварин за умов інтоксикації сульфатом міді.

2. Дослідити динаміку змін інтенсивності процесів ПОЛ, активності аконітази, та активності антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки через 24 години, 1 місяць, 2 місяці після інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих тварин.

3. Провести порівняльний аналіз змін інтенсивності ПОЛ, активності аконітази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, GSH-редуктаз та NADP-дегідрогеназ у печінці та крові молодих і старих тварин при Cu- та CCl₄ – індукованому ушкодженні печінки.

4. Дослідити вплив циклічного режиму годування (ЦРГ) на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов Cu- індукованого ушкодження печінки у молодих та старих тварин.

5. Дослідити вплив комплексу «Мікс-фактор» та комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива на інтенсивність процесів ПОЛ, активність аконітази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, GSH-редуктаз та NADP-дегідрогеназ у печінці та крові тварин різного віку в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді.

- *об'єкт дослідження* – продукти вільнорадикального окиснення ліпідів та ферментні системи антиоксидантного захисту у клітинах печінки при вік-залежних перебудовах, за умов інтоксикації сульфатом міді та застосування біологічних антидотів.

- *предмет дослідження* – вік-залежні зміни інтенсивності процесів ПОЛ та активності антиоксидантних ферментів і NADP-залежних дегідрогеназ у печінці тварин у нормі, за умов інтоксикації сульфатом міді та застосуванні біологічних антидотів.

Методи дослідження. Під час вирішення поставлених у дисертаційній роботі задач використовувались: спектрофотометричні методи (для визначення вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутаредоксину, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази та малатдегідрогенази), метод диференціального центрифугування, статистична обробка даних за допомогою

програми Microsoft Excel та програмного пакету Statistica 6.

Наукова новизна отриманих результатів. Показано, що триразове введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в LD₃₃ з інтервалом 48 годин супроводжується ураженням печінки (фіброз), формування якого відбувається на фоні окисного стресу.

Вперше встановлено, що у печінці молодих та старих тварин через 24 години після інтоксикації сульфатом міді відбуваються аналогічні зміни про-антиоксидантного балансу. Через 1 і 2 місяці після інтоксикації сульфатом міді та при застосуванні біологічних антидотів було виявлено вік-залежні відмінності.

Вперше показано, що трикратне введення сублетальних доз сірчаноокислої міді та тетрахлорметану індукує однотипні зміни вивчених показників про-антиоксидантного потенціалу.

Вперше встановлено, що циклічний режим годування (ЦРГ) здатен модулювати активність вивчених глутатіон- залежних антиоксидантних ферментів та NADP-дегідрогеназ і зрушувати про-антиоксидантний потенціал у бік антиоксидантів у молодих тварин та нормалізувати вивчені показники про-антиоксидантного потенціалу у старих. Застосування ЦРГ забезпечує можливість більш ефективної адаптації клітин до інтоксикації сульфатом міді.

Вперше показано, що комплекс «Мікс-фактор», який має антитоксичні властивості здатний знижувати інтенсифікацію ПОЛ та інгібування активності вивчених антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді у молодих і старих тварин.

Вперше виявлено, що комплекс низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива (НKM) здатний корегувати вивчені зміни про-антиоксидантного балансу у мітохондріях та цитозолі клітин печінки 3- так і 20-місячних щурів при інтоксикації сульфатом міді у старих тварин та зрушувати баланс у бік антиоксидантного потенціалу у мітохондріях клітин печінки молодих щурів.

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 НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 8 від 19.10.2017 р.)

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно написав огляд літератури, розділ «Матеріали та методи». Дисертантом проведено інформаційний пошук даних наукової літератури за темою дисертаційної роботи. Проведено особисто експериментальні дослідження та їхню статистичну обробку. Підготовлено матеріали публікацій. Аналіз та інтерпретація одержаних результатів проведені спільно з науковим керівником д.б.н., с.н.с. Нікітченком Ю. В. Наукові положення і результати, наведені в дисертаційній роботі, отримані автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати роботи доповідалися на науково-практичних конференціях: IX міжнародна наукова конференція «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2014); III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпро, 2015); X міжнародна наукова конференція молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2015); XI міжнародна наукова конференція молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016); науково-практична конференція «Здоров'я, харчування, довголіття» присвячена 85-річчю від дня народження проф Ю. Г. Григорова (Київ, 2016).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 162 сторінки, з них основного тексту 116 сторінок. Робота ілюстрована 29 таблицями та 15 рисунками. Список використаних джерел містить 244 найменування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційні наукові дослідження проводились протягом 2014 – 2017 років у рамках бюджетних тем планової наукової роботи НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна: «Вживаність і стійкість тварин до дії стресових факторів за експериментального прискореного та уповільненого старіння» (номер державної реєстрації 0115U000490); «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей» (номер державної реєстрації 0115U000502).

Практичне значення отриманих результатів. У роботі з'ясовано деякі вікові закономірності змін показників прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді та перевірено способи корегування виявлених змін у печінці та крові тварин за умов гепатоінтоксикації сульфатом міді і при вік-залежних перебудовах. Ці дослідження можуть бути використані для вибору способів корегування порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу з урахуванням вікових особливостей організму та розробки методичних рекомендацій. Методичні та аналітичні підходи до вивчення вік-залежних відповідей показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу на гепатотоксичну дію ксенобіотиків та розробка способів корегування встановлених патологічних змін прооксидантно-антиоксидантного балансу впроваджені в навчальний процес біологічного факультету у рамках спеціального курсу: «Молекулярна біологія» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загальних курсів біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Молекулярна біологія» та «Біотехнологія» згідно навчального плану.

РОЗДІЛ 1

ЗМІНИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСУ У ПЕЧІНЦІ ТА КРОВІ ТВАРИН ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ КСЕНОБІОТИКАМИ ТА ВІК-ЗАЛЕЖНИХ ДИСФУНКЦІЯХ (літературний огляд)

1. 1 Вік-залежні зміни прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у печінці та крові тварин

З фізіологічної точки зору найбільш універсальним проявом старіння організму є зниження здатності до адаптації і збільшення ймовірності розвитку патологій. Феномен вік-залежного зниження адаптивних можливостей є центральною проблемою геронтології [40].

Однією з найбільш прийнятих теорій старіння у сучасній літературі є вільнорадикальна теорія Д. Хармана, запропонована в середині минулого сторіччя, згідно до якої пошкодження клітинних макромолекул шляхом продукції в аеробних організмах вільних радикалів (які у фізіологічних кількостях є необхідними для функціонування організму) [17, 41, 42] та є основною детермінантою тривалості життя [43, 44]. Більш сучасною версією даної теорії є теорія оксидативного стресу, згідно якої з віком відбувається збільшення генерації активованих кисневих метаболітів, що призводить до функціональних змін, патологічних станів та навіть смерті [27, 43, 45–48]. Оксидативний стрес визначається як надмірна біологічна доступність активних форм кисню (АФК), що є результатом дисбалансу між продукцією АФК та їх деструкцією, в якій приймають участь антиоксидантні захисні системи [49]. Ця дефініція ілюструє два загальновизнаних і однаково важливих аспекти процесу старіння: 1) старіння характеризується як прогресуюче зниження з часом біологічних функцій, та 2) при старінні відбувається зниження функціональної стійкості організму до різних форм

стресу, а також підвищується ризик виникнення низки захворювань [50].

Залежно від віку виділяють три основних стани антиоксидантної системи (АОС): 1) висока активність неферментативної АОС і низька активність ферментативної АОС у молодих статевонезрілих і пубертатних тварин; 2) низька активність неферментативної АОС і висока активність ферментативної АОС у дорослих і старих тварин; 3) низька активність неферментативної АОС та істотно знижена активність ферментативної АОС у сенильних тварин. При цьому, на відміну від першого, другий і третій стани АОС організму при природному старінні характеризуються зниженою можливістю забезпечення GSH-залежних антиоксидантних ферментів GSH і NADPH [51, 52].

Виходячи з результатів щодо вікових змін вмісту продуктів вільнорадикального окислення біологічних молекул та інтенсивності індукованого ПОЛ у тканинах виділяють, в залежності від віку, три основних стани прооксидантного потенціалу: 1) високий - у молодих статевонезрілих і пубертатних тварин; 2) низький - у дорослих і старих тварин; 3) підвищений - у сенильних тварин [51, 52].

Прооксидантний потенціал оцінюють за рівнем концентрації продуктів вільнорадикального окислення біомолекул, здатністю біологічних молекул до вільнорадикального окиснення та швидкістю генерації АФК ферментними системами у тканинах [51-54].

Кінцевим продуктом деградації жирних кислот при перекисному окисненні ліпідів є малоновий діальдегід (МДА) – реакційно активна речовина, що своїми альдегідними групами здатна взаємодіяти з аміногрупами білків, приводячи до їх денатурації та зшивати молекули ліпідів, знижуючи текучість мембран. Це призводить до порушення процесів, пов'язаних зі зміною поверхні мембрани: фагоцитоз, піноцитоз, клітинна міграція та ін. [53, 54]. Малоновий діальдегід утворюється з жирних кислот з трьома і більше подвійними зв'язками. Цьому метаболіту належить важлива роль у синтезі простагландинів, прогестерону та інших стероїдів.

У дослідження, проведених раніше у НДІ біології на щурах 1-, 3-, 12- і 24-міс. віку, було встановлено, що вміст малонового діальдегіду у тканинах серця зменшувався від 1 до 3-міс. віку і при подальшому старінні практично не змінювався. У печінці зміни концентрації МДА мали аналогічну, але менш виражену тенденцію. У ізольованих гепатоцитах вміст первинних ТБК-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у молодих щурів був істотно вищим, ніж у тварин середнього віку та збільшувався у сенильних тварин. Схожа вікова спрямованість змін вмісту МДА виявлена у постмітохондріальній та мікросомальній фракціях гомогенату печінки щурів [44, 46, 47].

Ці результати, що вказують на підвищений рівень продуктів вільнорадикального пошкодження білків і ліпідів в тканинах тварин на ранніх та дуже пізніх етапах постнатального онтогенезу можуть свідчити про підвищену інтенсивність вільнорадикальних процесів у молодих та сенильних тварин.

Аконітатгідратаза (аконітаза) (КФ 4.2.1.3) – Fe^{2+} - вмістний фермент, який каталізує другу реакцію циклу Кребса – перетворення цитрату до ізоцитрату. У еукаріот відомо 2 ізоформи аконітази, одна з яких локалізована у матриксі мітохондрій, інша - у цитоплазмі [57]. Відповідно до літературних даних [42, 54, 58, 59], з усіх вивчених ферментів у мітохондріях печінки та інших тканинах аконітаза є одним з найбільш чутливих до різних стресових впливів. Низка досліджень демонструє, що активність аконітази знижується з віком, під впливом АФК, деяких ксенобіотиків (тетрафторетилен, фторацетат та ін.) та критичних станів (киснево-глюкозного голодування, надлишку нейромедіаторів та ін.) [54, 60].

За допомогою методу електронного парамагнітного резонансу доведено, що при руйнуванні $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ - кластеру мітохондріальної аконітатгідратази супероксидом утворюються Fe^{2+} і пероксид водню, що формують в реакції Фентона гідроксильний радикал. Виникнення гідроксильного радикалу, але з меншим виходом, спостерігалось також при

обробці мітохондріальної аконітатгідратази пероксидом водню [61]. Існують, також дані, які свідчать, що інактивація мітохондріальної аконітази супероксидом є оборотною [62, 63].

Активність аконітази знижується (наряду зі збільшенням вмісту цитрату) у тканинах ссавців в умовах гіпоксії, ішемії та гіпероксії [64], а також при гепатиті, що виник під дією ксенобіотиків [65, 66]. В даний час у низці робіт дослідження активності аконітази використовується для оцінки рівня окисного стресу [54, 67–69]. Відомо, що зниження активності аконітази спостерігається при деяких нейродегенеративних захворюваннях, пов'язаних з розвитком окисного стресу, зокрема хворобах Паркінсона та Альцгеймера [70].

У літературі є дані про те, що зниження активності даного ферменту, має зворотну кореляцію по відношенню до вмісту малонового діальдегіду. Додавання у середовище реакції H_2O_2 також пригнічує роботу ферменту [68].

Припускають, що аконітазна активність може впливати на інтенсивність утворення первинних АФК при окисному стресі наступними шляхами: інгібуванням ініціюючого етапу циклу трикарбонових кислот і зміною ступеню відновлення переносчиків дихального ланцюга мітохондрій; регуляцією рівня іонів Fe^{2+} ; впливом на інтенсивність ліпогенезу та рівень вільних жирних кислот, що забезпечують «м'яке» роз'єднання дихання і фосфорилування [71].

Також особливий інтерес у дослідженні регуляції вільнорадикального окислення при старінні організму представляє питання щодо вікових змін активності ферментативної антиоксидантної системи. Важливою ланкою системи інактивації продуктів вільнорадикального окислення є відновлений глутатіон [72] та комплекс ферментів: глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9), глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) та глутатіонредуктази (КФ 1.8.1.7) [42, 73, 74–76].

Глутатіонпероксидаза (ГП) (КФ 1.11.1.9) каталізує реакцію відновлення гідроперексидів за допомогою глутатіону, має широку субстратну

специфічність до МДА, високу специфічність до GSH та низьке значенням константи Міхаеліса до H_2O_2 . За даними [42, 77–79] глутатіонпероксидаза є ключовим ферментом в захисті клітин як у нормі, так і в умовах окисного стресу. Крім відновлення H_2O_2 глутатіонпероксидаза може утилізувати високореакційні форми азоту та гідроперекиси ліпідів [42, 78, 80].

Більшість представників сімейства глутатіонпероксидаз містять селен у формі селеноцистеїну (Sec). Наразі описані 7 білків з глутатіонпероксидазною активністю. У ссавців з групи глутатіонпероксидаз (ГП) представлені: цитозольна (ізоформа 1), шлунково-кишкова (ізоформа 2), позаклітинна (ізоформа 3), глутатіонпероксидаза гідропероксидів фосфоліпідів (ізоформа 4), епідідимальна (ізоформа 5), глутатіонпероксидаза нюхового епітелію (ізоформа 6) і неселеновоцистеїнова глутатіонпероксидаза гідропероксидів фосфоліпідів [42, 81]. Раніше в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна було встановлено, що глутатіонпероксидазна активність у різних тканинах щурів лінії Wistar істотно збільшується до 24 місячного віку і потім, у дуже старих тварин, достовірно знижується [51].

Глутаредоксини (Grx, КФ 1.20.4.1) - GSH-залежні оксидоредуктази з молекулярною масою (9-14 кДа), що відносяться за своєю структурою до суперсімейства тіоредоксинів та мають важливу роль у клітинних редокс-залежних процесах [82]. На початку досліджень цього редокс-білка функцією Grx вважалася його здатність відновлювати дисульфідні зв'язки і здійснювати деглутатіонування. Однак пізніше було виявлено, що певні ізоформи Grx переважно служать білками-переносниками залізо-сірчаних кластерів [FeS], використовуючи GSH у якості ліганду [83 - 87].

Глутаредоксини функціонально пов'язані з глутатіонредуктазою та зі співвідношенням GSH / GSSG. Співвідношення GSH / GSSG є індикатором клітинного редокс-статусу і важливою детермінантою редокс-потенціалу.

S-глутатіонування білків є важливим регуляторним механізмом біохімічних процесів завдяки оборотній модифікації тіолів білків і може

каталізуватися Grx і глутатіон S-трансферазами [82, 88].

Генерація змішаних дисульфідів тіолів білка з GSH є ключовою подією в регуляції клітинної відповіді на окисний стрес. Grx є основним ферментом, що каталізує як генерацію, так і відновлення змішаних дисульфідів.

Також відомо, що функціонування глутатіон-залежних ферментів антиоксидантного ряду у тканинах пов'язане з активністю глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) - фермента, що відновлює GSH з GSSG. Вони утворюють єдину глутатіон-залежну антиоксидантну систему, що потребує для функціонування участі NADP-залежних дегідрогеназ: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6ФГДГ, КФ 1.1.1.43), малатдегідрогенази (МДГ, КФ 1.1.1.40) та ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ, КФ 1.1.1.42), що генерують відновлений NADP.

За даними низки літературних джерел, глутатіонредуктазна активність зростає з віком у печінці [89], серці [90] і скелетних м'язах [91] щурів. Проте інші джерела повідомляють про відсутність вікових змін глутатіонредуктазної активності або ж про її зниження в печінці, серці [92] і мозку [93]. В цілому, можна зробити висновок, що у процесі постнатального онтогенезу зростає активність ферментативної антиоксидантної системи, особливо глутатіон-залежної.

За результатами авторів [93], в ізольованих гепатоцитах щурів глутатіонредуктазна активність зростає з віком. У гомогенатах печінки глутатіонредуктазна активність збільшується до 3-міс. віку і потім суттєво знижується до 12 і 24 міс. Зниження до 24 міс. віку глутатіонредуктазної активності виявлено і у цитоплазмі печінки [93]. При цьому, у мітохондріях печінки глутатіонредуктазна активність дещо збільшується до 12-міс. віку щурів і при подальшому старінні практично не зменшується. Таким чином, існує припущення, що активність цього ферменту при старінні значно знижується в гомогенатах і практично не змінюється у мітохондріях [26].

З огляду на той факт, що основна частина GSH знаходиться у

розчинній фракції гепатоцитів (близько 90 %) [94], описане зниження з віком глутатіонредуктазної активності у цитоплазмі може бути лімітуючою ланкою у функціонуванні GSH-залежних антиоксидантних ферментів у печінці.

Також для надійного функціонування глутатіонредуктази необхідна певна концентрація відновленого NADP^+ , що генерується NADP-залежними дегідрогеназами: NADP -залежною ізоцитратдегідрогеназою, що належить до сімейства металозалежних β -декарбоксилюючих дегідрогеназ і каталізує окисне декарбоксилювання ізоцитрату до 2-оксоглутарату, CO_2 і NADP та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою- ферментом пентозофосфатного шляху, що забезпечує генерацію клітинного NADPH з NADP^+ , необхідного для підтримки рівня відновленого глутатіону в клітині, синтезу жирних кислот та ізопреноїдів [95]. За даними [96] активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мікросомах може підвищуватися при оксидативному стресі. Також у дослідженні [97] було показано, що пероксид водню пригнічує фермент за змішаним типом (K_i 0,36 мМ і 0,95 мМ в нормі і при експериментальному токсичному гепатиті відповідно). Щодо вікової спрямованості – зміни активності NADP-залежних дегідрогенази у різних груп тварин, дані літератури свідчать, в основному, про зниження активностей ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) та 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6ФГДГ) при старінні [98–102]. Разом з тим, слід зазначити, що характер вікових змін активності ферментів пентозофосфатного циклу, залежить від статі тварин [99, 101]. Так, зокрема, в печінці щурів-самців активності Г6ФДГ і 6ФГДГ знижувалися до 24-міс. віку, а у самок - істотно збільшувалися [99, 101].

Дослідження вікових змін ІЦДГ активності дозволило встановити, що в мітохондріях печінки ця активність істотно не змінювалась, а в гомогенатах та цитозолі [71] печінки значно зростала до 12 міс. віку щурів, а потім дещо знижувалась [101].

Так, описані вище дані свідчать, що з віком у тканинах тварин (більшість описаних досліджень було проведено на щурах) знижується

активність ферментів, які генерують NADPH і GSH, що в умовах окисного стресу може бути основною причиною зниження надійності GSH-залежної антиоксидантної системи. В цілому, наведені дані про збільшення з віком активності антиоксидантних ферментів і, особливо, GSH-залежних, а також той факт, що при старінні знижується активність неферментативної антиоксидантної системи, дозволяють зробити висновок, що з віком збільшується роль ферментативної антиоксидантної системи в регуляції вільнорадикального окислення біомолекул. Так разом з тим, зниження до 24 міс. віку активності ферментів, що генерують NADPH і GSH, описане різними авторами, може бути лімітуючою ланкою в системі GSH-залежного ферментативного захисту у старих тварин, особливо, в умовах окисного стресу.

Підсумовуючи необхідно зазначити: з віком збільшується інтенсивність генерації активних форм кисню (АФК) в редокс-ланцюгах мітохондрій [103, 104], знижується активність неферментативної антиоксидантної системи [105] і активність окремих антиоксидантних ферментів [106], а також збільшення рівня продуктів вільнорадикального пошкодження ДНК [107, 108] білків [109] та ліпідів [110, 111]. Активність АОС - ферментативної - значно збільшується до середнього віку і зберігається на такому ж високому рівні у старих тварин щурів та морських свинок [52].

Так, літературні дані щодо вікових особливостей змін про-антиоксидантного потенціалу у тканинах щурів різних вікових груп під дією стресуючих факторів можуть пояснити більш виражену чутливість старіючого організму до дії несприятливих чинників навколишнього середовища, а також виникнення низки вік-залежних захворювань.

Показано, що під дією низки стресових факторів (включаючи ряд ксенобіотиків) активація вільнорадикального окислення біомолекул була більш виражена у старих тварин [52]. Потужною стресовою дією володіють широкорозповсюджені забруднювачі навколишнього середовища іони

важких металів. Показано, що іони ртуті, кадмію, кобальту та купруму вже через декілька годин після введення щурам призводять до зміщення про-антиоксидантного балансу у клітинах печінки, нирок і крові піддослідних тварин у бік прооксидантів [112, 113, 29].

Поява у надлишкових кількостях продуктів перекисного окиснення ліпідів та активних форм кисню слугує факторами, які не лише призводять до апоптичних явищ та некрозу, а й додатково стимулюють розвиток запалення у печінці. Додатковим місцем розвитку запальних процесів стає печінка, де Купферові клітини (печінкові макрофаги), самі гепатоцити стають джерелом прозапальних цитокінів. В першу чергу продукування прозапальних цитокінів стимулює міграцію нейтрофілів до печінки у відповідь на появу різноманітних пошкоджень тканини. Один із цих факторів, а саме TGF- β , який продукують Купферові клітини, активує тканинні трансамінази і стелатні клітини. Останні перетворюються на колаген-продукуючі міофібробластні клітини, що запускають фіброз. Одним із додаткових активуючих факторів фіброзу є те, що стелатні клітини печінки здатні до фагоцитозу апоптичних тілець і продуктів некрозу і, таким чином, перетворюються на фібробласти, що синтезують колаген [42, 43, 103] .

В цілому, представлені дані, про вікові особливості зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканинах щурів при дії фізичних і хімічних факторів можуть пояснити більш виражену чутливість старіючого організму до дії несприятливих чинників навколишнього середовища, а також виникнення ряду пов'язаних з віком захворювань.

1.2 Зміни прооксидантно-антиоксидантної системи при токсичному ураженні печінки

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я за останні 20 років, спостерігається стійке зростання хронічних захворювань печінки різної

етіології, а смертність від хвороб печінки досягла 4-го місця в світі [2, 12]. Оскільки печінка є центральним органом регуляції гомеостазу та забезпечує функцію детоксикації різних ксенобіотиків, порушення структури клітин печінки викликати системні зміни в організмі. Токсичність виникає при передозуванні, дефіциті субстратів кон'югації та коферментів, ферментів, що необхідні для детоксикації, або впливі індукторів та інгібіторів ферментів. Дозозалежні ураження викликають йони важких металів та інші ксенобіотики: тетрахлорметан, парацетамол, тетрациклін, гризеофульвин, ніацин, аміодарон, естрогени, анаболічні гормони, меркаптопурин, цитостатики та інші речовини.

За ступенем токсичності речовини поділяють на 4 групи: надмірно-токсичні - $LD_{50} = 15$ мг / кг; високотоксичні $LD_{50} = 150$ мг / кг; помірно-токсичні $LD_{50} = 1500$ мг / кг; малотоксичні - LD_{50} більше 1500 мг / кг. Згідно цієї класифікації, сірчанокисла мідь відноситься до високотоксичних сполук. Прояв токсичності може залежати від структури і концентрації речовини, а також від вихідних метаболічних характеристик біооб'єкту. Виходячи з цього, при розробці антидотів можна використовувати як мінімум два підходи, яких умовно можна назвати хімічний і біологічний, при цьому не можна виключати і їх поєднання. Хімічний підхід заснований на використанні різноманітних сполук, здатних до комплексоутворення з токсикантами, зокрема з іонами важких металів [114]. Біологічний може базуватися на використанні способів усунення наслідків дії токсикантів на біологічні субстрати або біологічно активних сполук, які, діючи на регуляторні системи метаболізму забезпечують йому здатність до прояву гормезисного [115], а не токсичного ефекту [29].

Відомо, що у відповідь на дію гепатотоксичних сполук, незалежно від їх природи, індукується розвиток комплексу запальних реакцій [116, 117]. Запальні реакції у печінці можуть супроводжуватися: 1) утворенням осередків регенерації з наступним відновленням гомеостатичних функцій печінки; 2) виникненням фіброзу; 3) подальшим переходом фіброзу у

цироз [12].

Гепатотоксичні ксенобіотичні впливи призводять до розвитку ряду патологічних станів печінки таких як комбінована токсикоз-алергічна реакція; токсичний гепатит; стеатоз; холестаз; фіброз та цироз; пухлини печінки. Цитотоксична дія при цих станах включає вплив вільно-радикальних інтермедіатів [118].

Пошкодження печінки мають певні топографічні особливості, які демонструють структурну і функціональну неоднорідність цього органу. Гепатоцити першої зони ацинуса прилягають до портального тракту і отримують більше кисню та поживних речовин, порівняно з гепатоцитами у третій зоні. У перипортальних гепатоцитах містися більша кількість мітохондрій, що індукує більш інтенсивне протікання енергетичних процесів, обміну амінокислот, синтезу сечовини, глюконеогенезу, бета-окислення жирних кислот. У перивенозних гепатоцитах переважно представлені процеси окисного метаболізму ксенобіотиків при відносному дефіциті антиоксидантних ферментів. Внаслідок цього у зоні перивенозних гепатоцитів утворюється більше реакційних метаболітів і вони складніше знешкоджуються. Тому пошкодження печінки під впливом ксенобіотиків, як втім і запальне, ішемічне, вірусне ушкодження, частіше мають центрлобулярну локалізацію, зачіпаючи гепатоцити перивенозної зони. Більшість класичних гепатотоксинів спричиняють переважно центрлобулярні ураження (чотирихлористий вуглець, парацетамол, хлороформ, галотан, бромбензол, диметилнітрозамін, N-метілформамід, кумарин і багато інших). До токсинів, що найчастіше є причиною перипортальних некрозів, відносять аліловий спирт, вітамін А, а среднезональних некрозів - конканавалін А [118].

Відомо, що потрапляння в організм багатьох ксенобіотиків призводить до підвищення концентрації АФК, продуктів ПОЛ і зниження активності антиоксидантних ферментів у печінці тварин [16, 14, 118]. Серед поширених забруднювачів навколишнього середовища розглядаються іони важких

металів, що є високотоксичними елементами, здатними викликати активацію вільнорадикального окислення у експериментальних тварин. Так показано, що іони ртуті [20, 120], кадмію [13, 121, 122] та кобальту [20] вже через 2 або 24 години після їх введення щурам призводять до зміщення прооксидантно-антиоксидантного балансу в печінці, нирках і крові тварин в сторону прооксидантів. Дослідження впливу іонів важких металів на активність АОС печінки та крові щурів у віковому аспекті дозволило встановити, що активність каталази (КАТ), супероксиддисмутази (СОД) і глутатіонредуктази (ГР) у піддослідних молодих тварин знижувалася більш виражено, ніж у старих [52].

Також однією з поширених моделей індукції пошкоджень печінки є введення розчину CCl_4 [2, 51, 114, 123]. Дводенне введення тетрахлорметану (0,1 мл 50 % масляного розчину / 100 г маси тіла, 1 раз на день) активує вільно-радикальне окислення ліпідів печінки експериментальних тварин. При цьому ступінь активації ПОЛ за даними дослідження [124] є більш вираженою у старих, 24 міс щурів, що визначається, в основному, зниженням активності GSH-залежної антиоксидантної системи. В умовах *in vitro* та *in vivo* CCl_4 збільшує кількість вільних радикалів, дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, вихід етану і пентану, а також знижує вміст GSH [124]. У відповідь на дію CCl_4 знижується активність ферментативної АОС. Дослідження впливу дводенного введення тетрахлорметану на активність ферментативної АОС печінки дозволили встановити зниження Se-залежної глутатіонпероксидазної активності у 24 міс. щурів, а також активності глутатіонтрансферази, Se-незалежної глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у 1, 3 і 24 міс. тварин [52, 123]. Також під час розвитку токсичного гепатиту відбувається посилення пероксидного окислення ліпідів та деструкція гепатоцитів [125].

Активність NADP-ізоцитратдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази згідно дослідження [65] у цитоплазмі клітин печінки, ураженої токсичним гепатитом, збільшується в середньому на 30 % у

порівнянні з нормою. Наряду з цим збільшується концентрація цитрату у мітохондріях клітин печінки. Існує припущення, що зростання концентрації цитрату при інтенсифікації генерації АФК може мати протекторне значення, пов'язане з хелатуючими властивостями даної сполуки по відношенню до іонів Fe^{2+} необхідним для протікання реакції Фентона [65]. Ці дані вказують, що цитрат, будучи активатором NADP-ізоцитратдегідрогенази (далі NADP-ІЦДГ), може сприяти також підвищенню антиоксидантного потенціалу за рахунок зростання рівня NADPH, який істотно визначає активність ферментної системи ГР / ГП. Порівняльна характеристика регуляторних властивостей NADP-ІЦДГ, виділеної з нормальної і ураженої токсичним гепатитом печінки, по відношенню до компонентів системи ГР / ГП показала, що для ферменту також характерні суттєві зміни регуляції активності під дією відновленого і окисленого глутатіону. При патології Кі для GSH, що є конкурентним інгібітором NADP-ІЦДГ по відношенню до ізоцитрата, знижувалася в 1,8 разів. Разом з тим, GSSG активував NADP-ІЦДГ з печінки щурів з токсичним гепатитом за конкурентним типом ($K_a = 0,232 \text{ мМ}$) та не чинив впливу в нормі. Це може мати значення для постачання NADPH ГР / ГП АОС при окисному стресі. Очевидно, при досить високому рівні GSH в клітині відбувається пригнічення окисного декарбоксилювання ізоцитрату, що супроводжується утворенням NADPH, необхідного для глутатіонредуктазної реакції. У той же час, при відносному зростанні вмісту GSSG має місце посилення генерації NADPH в ході NADP - ІЦДГ-реакції, що може бути істотним для активації ГР / ГП-системи в умовах посилення вільно радикального окиснення [65].

Глутатіонредуктазна активність у гомогенаті печінки щурів, при інтоксикації CCl_4 , збільшувалася в 2 рази в порівнянні групою з контролю. Також CCl_4 -індукований гепатит супроводжується зниженням аконітатгідратази активності в 3 рази, при цьому вміст цитрату збільшується в 1,3 рази [126]. Від вмісту цитрату залежить інтенсивність утворення гідроксильного радикалу в реакції Фентона. Цитрат має хелатируючі

властивості по відношенню до Fe^{2+} . Також виявлено зниження активності глутатіонпероксидази у клітинах печінки в 1,5 – 1,8 рази порівняно з контрольними групами інтактних тварин [127].

Одне з завдань, що поставлені у дисертаційній роботі – визначити зміни, які відбуваються під час інтоксикації організму сульфатом міді, а також порівняти отримані дані з тими, що відбуваються під дією тетрахлорметану з метою уніфікації (або розмежування) механізмів змін прооксидантно-антиоксидантного потенціалу під час індукції інтоксикації для вибору оптимального методу корегування патологічних змін під час корегування гепатоінтоксикації.

Іони міді є есенціальними елементами і входять до складу не менш ніж 40 ферментів. Вони здатні утворювати комплекси з різними сполуками в організмі і, залежно від дози, іони міді в організмі можуть проявляти низку ефектів [128]. Було показано, що біологічна дія іонів важких металів залежить не лише від дози іонів металу, а і від функціонального стану біологічних систем. Це може пояснюватися тим, що функціональний стан, ймовірно, впливає на характер зв'язування іонів міді з компонентами клітин, швидкість їх екстракції і формування специфічного патерну внутрішньоклітинного розподілу цих іонів [129]. Однак, механізми, що визначають характер внутрішньоклітинного розподілу іонів міді, залишаються мало дослідженими. Разом з тим, ці знання необхідні для розуміння процесів адаптації до іонів важких металів і механізмів токсичності.

Сірчаноокисла мідь є поширеним промисловим ксенобіотиком. Ця сполука використовується у лабораторіях для зневоднення спиртів, застосовується при виготовленні ацетатного волокна, мінеральних лаків і фарб. Застосовується для просочення деревини, як фунгіцид для обприскування плодових-ягідних дерев, у харчовій промисловості у якості харчової добавки E519, консерванту і емульгатора. Інтоксикація сірчаноокислою міддю супроводжується порушенням транспорту ліпопротеїдів між печінкою і гемолімфою, виходом тригліцеридів в складі ліпопротеїдів з печінки та зниженням синтезу фосфоліпідів у печінці

[130]. Наряду з цим дефіцит купруму, що входить до складу активного центру низки ферментів, може призвести до зниження ступіню антиоксидантного захисту і може привести до переокиснення тканин, серцевої гіпертрофії, анемії та інших захворювань [131 - 133]. Токсичність сірчаноокислої міді пов'язують перш за все з утворенням активних форм кисню та їх здатністю окислювати білки. У роботі [92] показано, що окисний стрес, індукований введенням сірчаноокислої міді *in vivo* молодим щурам, пов'язаний зі змінами каталітичної активності протеасоми 20S. Хронічна інтоксикація сірчаноокислою міддю (40 мг CuSO_4 / щура, масою 205 ± 10 g / день з питною водою протягом 2-х тижнів) приводила до зниження рівня глутатіону та інгібування активності супероксиддисмутази та каталази у мозку, нирках та печінці піддослідних щурів. Це підтверджується і даними [13] дослідження яке свідчить, що при інтоксикації іонами Cu^{2+} (60 мг / кг м. т.) вміст GSH і співвідношення GSH / GSSG помітно знижуються на 79 % та 81 % через 2-4 години після інтоксикації. Також інтоксикація сірчаноокислою міддю індукувала зниження на 26 % активності каталази і підвищення експресії та активності SOD1 та SOD2 у печінці піддослідних тварин через 8 годин після інтоксикації [13].

Так вивчення стану ферментних систем антиоксидантного захисту, що можуть слугувати маркерними показниками, дозволяє виявляти порушення функціонального стану печінки на ранніх етапах, контролювати ступінь ураження печінки, аналізувати відповідь на терапевтичні підходи та розробляти нові способи корегування патологічних станів печінки.

1.3 Вплив аліментарних чинників на стан про-антиоксидантного балансу у печінці та аналіз існуючих способів корегування порушень про-антиоксидантного балансу у печінці за допомогою змін режиму харчування

Відомо, що фактори і режим харчування відіграють важливу роль у фізіологічній або патологічній відповіді тканин печінки на окисний

стрес (ОС). Голодування, калорійність, і склад дієти є одними з найбільш потужних чинників перебудови і регуляції метаболізму. Існує низка досліджень, у яких здійснювали оцінку морфологічних, гістологічних та біохімічних ознак при захворюваннях печінки за умов звичайного режиму харчування та під час обмежених прийомів їжі, або переривчасті дієти (Intermittent Fastig (IF) [134–136].

У дослідженні, в рамках якого за допомогою вправ та дієтичного зниження маси тіла, оцінюючи біомаркери окисного стресу при 10 % втраті маси тіла було встановлено, що вправи та дієтичне зниження маси тіла знижували вміст малонового діальдегіду і ліпопротеїдів низької щільності у мембранах клітин[137]. Модифікація способу життя вплинула на системний антиоксидантний стан шляхом збільшення концентрації ароА1, зниження вмісту білку та активності PON1 в сироватці крові [137]. Також показано, що IF, застосований після ішемії внаслідок операції 2VO (permanent two-vessel occlusion) при хронічній мозковій гіперперфузії приводив до зменшення концентрації МДА та мРНК, а також активності нікотинамідаденіндинуклеотидфосфатоксидази 1. При цьому при IF також зберігався рівень глутатіону та активність супероксиддисмутази у гіпокампі [138]. Також у ряді досліджень продемонстровано протекторний ефект IF до проявів окисного стресу, що є складовою процесів погіршення когнітивної функції, порушення енергетичного метаболізму та дисліпідемії. Переривчасте годування застосовують при хворобі Альцгеймера [139], діабеті [140], серцево-судинних захворюваннях [141], у тому числі ішемічному інсульті [142], слабоумстві [139], стеатозі [143] та ожирінні [140, 144, 145]. Також на різних моделях IF було продемонстровано збільшення тривалості життя дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [146], плодових мух *Drosophila melanogaster* [147], нематод *Caenorhabditis elegans*[147], річкових риб *Nothobranchius guentheri* [148], щурів [149] та інших ссавців [146, 150, 151].

Під час дослідження причин, що призводять до порушення про-

антиоксидантного балансу та розвитку окисного стресу, що є центральним механізмом багатьох патологічних станів печінки [1, 2, 9, 12, 14, 15, 133–135], був виявлений прояв даних ефектів при значному підвищенні або зниженні споживання ряду макро-і мікронутрієнтів: амінокислот (аргінін, гліцин, гістидин і таурин), дрібних пептидів (карнозин) та азотистих метаболітів (наприклад, креатин і сечова кислота), що здатні видаляти ROS, а також інгібувати індуковану синтазу оксиду азоту (iNOS) у різних типах клітин, включаючи гепатоцити [134, 152]. Однак, коли ємність антиоксидантної системи знижується, рівень ROS підвищується і ROS-опосередкована модифікація може змінювати структуру і функцію білків. Окисний стрес може викликати зворотні і незворотні зміни в білках. Зворотна зміна (зазвичай включає цистеїн), може модулювати функцію білка. Необоротна модифікація (зазвичай включає лізин), призводить до постійної втрати функції і може сприяти деградації і накопиченню білків у цитоплазматичних включеннях [153]. Крім цього, окиснені білки також сприйнятливі до протеолітичної атаки протеасом. Так, дієтичний дефіцит білка пов'язаний зі зменшенням синтезу антиоксидантних ферментів і підвищеним вивільненням супероксидного аніону. Аналогічним чином, часткова білкова депривація також може викликати стеатоз, модулюючи експресію генів ліполізу та утилізації ліпідів у печінці [154, 157].

Найчастіше, дослідження взаємозв'язку між раціоном харчування і окисним стресом проводяться через обмеження споживання одного або декількох елементів дієти. Але при оцінці змін режиму харчування в рамках збалансованої дієти також виявлена можливість впливу на прооксидантно-антиоксидантний баланс і здатність подібних режимів корегувати деякі патологічні стани печінки, спричинені інтоксикацією.

Обмеження харчування - фізіологічний стан, що активує гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову вісь (призводячи до збільшення вивільнення адренокортикотропного гормону і глюкокортикоїдів) та індукує зміни показників прооксидантно / антиоксидантної системи [170, 171]. Хоча

помірне обмеження калорійності має корисний вплив на здоров'я тварин [172–174], тривала депривація їжі призводить до виснаження запасів антиоксидантів і збільшення генерації активних форм кисню (АФК) і окислювального пошкодження тканин [175].

Тривала депривація їжі у щурів збільшує генерацію мітохондріальних АФК у печінці, окисне пошкодження білків, перекисне окислення ліпідів [171]. Довготривале обмеження їжі також підвищує активність фактора некрозу пухлини-альфа в жировій тканині щурів [176] і вміст окисленої ДНК у мононуклеарних клітинах крові. Також, тривала харчова депривація призводить до підвищення концентрації перекису водню у міокарді і збільшення ступеню ПОЛ у печінці, знижуючи разом з цим концентрацію глутатіону та активність низки антиоксидантних ферментів [171].

При повному голодуванні значно зміщується прооксидантно-антиоксидантний баланс у тканинах експериментальних тварин у бік прооксидантів [177, 178]. Показано, що повне голодування протягом 24 – 72 годин призводить до зменшення вмісту глутатіону [177], зниження активності ряду антиоксидантних ферментів [177, 178] і активації ПОЛ у печінці щурів [179]. Дослідження впливу повного голодування протягом 72 годин на інтенсивність індукованого ПОЛ в гомогенатах печінки щурів різного віку дозволило встановити, що відносне збільшення накопичення МДА було максимальним у старих тварин [52].

Також щоб перевірити дані про те, що тривала депривація їжі у наземних ссавців збільшує активність АФК, окисне пошкодження і запалення, які можуть бути викликані збільшенням реніангіотензинової системи (RAS) проводили ряд експериментів на слонових тюленях і морських котиках (тварини, для яких харчова депривація протягом 2-3 місяців є звичною). Обмеження харчування викликало збільшення ступеня експресії білків ангіотензинової рецептора 1 AT1 на 50 %, дворазове збільшення Nox4 і збільшення активності (Cu-, Zn- і Mn-супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і каталази) збільшилась на 40-60 % при голодуванні

наряду зі збільшенням активності антиоксидантних ферментів в м'язах і еритроцитах. Але гістологічні та системні показники окисного пошкодження або запалення не збільшувалися при голодуванні. Ці дані свідчать про те, що, незважаючи на спостережуване збільшення RAS і Nox4, зростання активності антиоксидантних ферментів, мабуть, є достатнім для зменшення системних і тканинних показників окисного пошкодження і запалення у цих тварин, що голодували протягом тривалого періоду [180].

Однак найбільш прийнятними для застосування з метою впливу на стан прооксидантно-антиоксидантного балансу є дієти, що не передбачають повного обмеження харчування. Серед них калорійно-обмежена дієта (КОД), що застосовується для збільшення тривалості життя [181, 182], переривчасте голодування (intermittent fasting (IF) [183–187] та досліджуваний у НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна циклічний режим харчування (The Cyclic Feeding Regime (CFR) [31-33, 39].

Вважається, що найбільш значущим ефектом КОД є уповільнення генерації активних форм кисню, азоту та ліпідів у тканинах піддослідних тварин [52, 188, 189]. Іншою причиною зменшення вмісту продуктів ПОЛ у тканинах піддослідних тварин може бути підвищення активності АОС. У ряді робіт [78, 190] показано підвищення вмісту GSH в печінці піддослідних щурів, підвищення активності супероксиддисмутази [191], каталази у відповідь на КОД у цитозолі печінки щурів-самців лінії Фішер-344 значно зростала, перевищуючи рівень активності у контрольних тварин практично в 2 рази [192]. Автори роботи [191] виявили, що КОД у щурів приводила до істотного збільшення глутатіонпероксидазної активності у цитозолі печінки тварин; також у відповідь на КОД в цитозолі печінки щурів збільшувалася глутатіонредуктазна активність [192].

ІФ, досліджене у роботах [174, 185, 186] приводить до зниження ступеню окисного пошкодження також за рахунок інгібування процесів перекисного окиснення білків, ліпідів та нуклеїнових кислот на фоні посилення антиоксидантної функції.

Також у роботі [193] зазначено, що IF супроводжується збільшенням дихальної здатності мітохондрій за умов використання у якості субстратів аскорбату та сукцинату. Це свідчить про те, що посилена дихальна здатність передбачає посилену активність термінальних електронних носіїв. Тканинні рівні мітохондріального комплексу IV (цитохромоксидаза, COX) були значно підвищені в печінці за умов IF. IF знизило відносне вивільнення H_2O_2 / O_2 в печінці через збільшення споживання O_2 . Знижувався рівень карбонілів білків та малонового діальдегіду у серці та підвищувався у мозку піддослідних щурів. Також спостерігалась індукція синтезу GSH у печінці. Активність глутатіонпероксидази, була значно знижена при IF у скелетних м'язах і незмінною у всіх інших тканинах. Глутатіонредуктазна активність, була незмінною під час цієї дієтичної інтервенції у всіх тканинах. Активність каталази (КАТ) була знижена при IF у мозку і незмінною в інших тканинах [193]. Активація ж антиоксидантного захисту у серці, мозку та печінці піддослідних тварин і зниження ступеню ПОЛ було показано у роботах [172, 194–196].

Встановлено, що у відповідь на CFR у молодих тварин збільшувався вміст продуктів ПОЛ та активність антиоксидантних ферментів [32, 33]. Таким чином, існує дієва можливість впливу на прооксидантно-антиоксидантний баланс під впливом аліментарних чинників та змін режиму харчування. Однак варто зазначити, що найчастіше ці зміни носять вік-залежний характер.

1. 4 Способи корегування порушень про-антиоксидантного балансу у печінці за допомогою екзогенних антидотів та гепатопротекторів

Підходи до корегування патологічних станів, зумовлених ПОЛ можна згрупувати за трьома напрямками: 1) елімінація тригерних факторів, застосування хелатуючих речовин; 2) запобігання накопиченню вільних жирних кислот у печінці (припинення впливу токсичних речовин, зниження маси тіла, застосування есенціальних фосфоліпідів (у складі яких є

1,2 дилінолеїлфосфатидилхолін, що має антифібротичні та антиоксидантні властивості) [197]; 3) застосування екзогенних антиоксидантів (флавоноїдів, альфа-токоферолу, каротину, мікроелементів (Mg, Se, Zn) [197].

Також для корегування патологічних станів органів гепатобіліарної системи, залежно від етіологічних факторів, особливостей патогенезу та клінічних проявів застосовують підходи, що умовно можна розподілити на декілька груп засобів: 1) засоби, які впливають на процеси тканинного обміну (наприклад: вітаміни, амінокислоти і гідролізати білків, пептиди, стероїдні і нестероїдні анаболіки, адаптогени) [198]; 2) підвищують дезінтоксикаційну функцію печінки та інших органів; 4) жовчогінні; 5) протівірусні і антимікробні; 6) імуномодулятори; 7) протизапальні (стероїдні та нестероїдні); 8) інгібітори та індуктори систем мікросомального окиснення, що відіграють ключову роль у метаболізмі ксенобіотиків [198]. Важливе місце серед засобів мають антиоксиданти [15, 198–200]. Саме з антиокислювальними властивостями пов'язують гепатопротекторну дію ряду флавоноїдів, вітамінів груп В та Е, ферментних препаратів супероксиддисмутази, селеновмісних сполук, похідних тіобарбітурової кислоти, дібутанолу, ліпоєвої кислоти, біотину, рутину, кверцетину та інших сполук [15, 198–200]. Окисне пошкодження печінки супроводжується збільшенням кількості вільних радикалів, активацією ПОЛ, пригніченням компонентів антиоксидантного захисту, що призводить до порушення про-антиоксидантного балансу та морфофункціонального стану органу [6, 14, 133].

Серед відомих антидотів-гепатопротекторів з антиоксидантною та детоксикуючою дією: адеметіонін [201]; селімарин [202]; урсодезоксихолева кислота [203, 204]; L карнітин, таурин, мелатонін [205], кофеїн у низьких дозах [206] та ін.. У дослідженні [207] при токсичному ураженні тетрахлоретаном показана можливість корегування порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу оксиметилурацилом з янтарною кислотою та мексидолом. Також при моделюванні токсичних гепатопатій, викликаних введенням тетрахлорметану та солянокислого гідразину ефективним було застосування ліпосомних форм

препаратів з інкорпорованими бурштиною кислотою, карнітину хлоридом та цитохромом С. Встановлено, що застосування карнітину хлориду було ефективним у щурів 3- та 8-10 місячного віку. Корегування ліпосомами з інкорпорованими бурштиною кислотою, карнітину хлоридом та цитохромом С, а також їх введення разом з ентеросорбентом “Силард П” мали кращий ефект у тварин всіх вікових періодів [243].

У якості антидотів та факторів регуляції антиоксидантної системи у різних вікових груп тварин також можна використовувати різні природні джерела антиоксидантних сполук, в тому числі компоненти молозива, грибів, дріжджів і мікроводоростей [15, 28–31]. Відомо, що у тканинах більшості рослинних і грибних організмів міститься комплекс водо- і жиророзчинних речовин, що володіють вираженою антиоксидантною дією [289, 290]. Їх низька токсичність, здатність стабілізувати один одного і проявляти синергічний ефект [246, 291] свідчать про доцільність їх вивчення в якості можливих геро- та гепатопротекторів антиоксидантної дії. Разом з тим, необхідно відзначити, що рослинні антиоксиданти, особливо фенольної природи, можуть у відносно високих концентраціях проявляти прооксидантні властивості [208].

Відомо, що більшість неферментативних антиоксидантів представлені «малими молекулами» (глутатіон та ін.). Ці молекули також можуть виконувати різноманітні функції регулювання клітинної активності. У експериментах, проведених раніше у НДІ біології було показано, що комплекс низькомолекулярний комплекс «Мікс-фактор» (або Фунгідол) з компонентів клітин *S. cerevisiae* и *P. ostreatus* має виражені антирадикальні та антитоксичні властивості [29, 34, 35].

Також відомо, що коров'яче молозиво має унікальний склад різноманітних біологічно активних сполук [28, 30, 209] і використовується при лікуванні хвороби Альцгеймера, розсіяного склерозу, хвороби Крона, ревматоїдного артрити та ін. [31, 210, 211]. Представляло інтерес дослідити можливість корегування порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу при Си-індукованому ураженні печінки у молодих та старих тварин і визначити

роль прооксидантно-антиоксидантного балансу у проявах цієї патології. Однак, молозиво містить так звані «важкі» імуноглобуліни, які можуть викликати алергічні реакції [212]. У зв'язку з цим з молозива були видалені ліпіди і високомолекулярні білки, і були отримані низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ), які і використовувалися в цьому дослідженні.

Так, якщо Cu-індуковане ураження печінки супроводжується розвитком оксидативного стресу, а низькомолекулярні компоненти з коров'ячого молозива і «Мікс-фактор» підсилюють активність антиоксидантної системи та здатні усувати прояви окисного стресу - можна очікувати і усунення морфологічних проявів інтоксикації, таким чином забезпечивши зворотність цього стану. Проводячи порівняльний аналіз впливу «Мікс-фактора» та НКМ, на одні й ті ж показники прооксидантно-антиоксидантного балансу можна встановити специфічність дії цих низькомолекулярних субстанцій на розвиток патологічних змін.

Висновки до розділу 1

У цьому розділі зроблено основний огляд літератури. Проведено аналіз сучасного стану знань щодо змін прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у печінці та крові тварин за умов природного, прискореного та уповільненого старіння, а також при індукованому дією ксенобіотиків ураженні печінки у тварин різних вікових груп. Проаналізовано спектр існуючих способів корегування порушень про-антиоксидантного балансу в печінці за допомогою гепатопротекторів, аліментарних чинників та режимів харчування.

Виходячи з даних низки проаналізованих досліджень, прямої кореляції між кількістю вільнорадикальних продуктів і формуванням вік-залежних патологій наразі не виявлено. Тож пошук нових інтерпретацій і можливих механізмів участі показників про / антиоксидантної системи в процесах старіння є актуальним завданням. Зокрема, з віком може не лише змінюватися кількість продуктів вільнорадикальних реакцій, але і здатність метаболічних систем

регулювати функції про / антиоксидантної системи. Такі зміни можуть бути пов'язані з вік-залежними змінами активності імунної, ендокринної та інших регуляторних систем організму. Необхідно враховувати, що продукти вільнорадикальних реакцій виконують різноманітні функції в організмі. Поряд з індукцією окисних процесів і проявом окисного стресу, вільні радикали регулюють проліферативні процеси, активність імунної системи, виконують сигнальну роль у розвитку каскаду запальних реакцій. Наразі немає однозначно встановлених даних про фізіологічні і патофізіологічні концентраційні «кордони» низки продуктів вільнорадикальних реакцій. У зв'язку з цим, розробка експериментальних підходів (створення моделей) дослідження особливостей вік-залежних відповідей на індуктори оксидативного стресу і фактори їх регуляції є актуальним завданням. Також з даних літератури витікає, що низка захворювань (у тому числі захворювань печінки, викликаних інтоксикацією різними індукторами) супроводжуються активацією прооксидантної ланки системи, окисним стресом, що проявляються розвитком запального процесу, який може привести на гибелі клітин та фіброзних змін органу. Часто подібні ефекти мають вік-залежні особливості. Тож, якщо експериментальним шляхом «запобігти» розвитку оксидативного стресу, то прояв запального процесу може бути усунуто у тому випадку, якщо окисний стрес є провідним у розвитку цієї патології і його індукція залежить від віку тварин. Використання такого підходу може вирішити ряд завдань: визначення ролі прооксидантної ланки системи у розвитку вік-залежних адаптивних реакцій, зокрема до надмірних концентрацій іонів міді: такий геронтологічний підхід дозволяє визначити потенційні можливості регуляторних систем у молодих і старих тварин, і обґрунтувати способи їх корекції. Також даний підхід сприяє визначенню ролі оксидативного стресу при Cu-індукованому ушкодженні печінки, шляхом активації антиоксидантної системи застосуванням молодим і старим тваринам біологічних антидотів.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [12, 31–39].

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2. 1 Вибір об'єктів дослідження

Основні серії експериментів були проведені на щурах-самцях лінії Wistar різних вікових груп (3, 12, 20 та 32 міс). Щурів вирощували і утримували у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Дослідження виконані з дотриманням правил Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986).

2. 1. 1 Моделювання інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном

При дослідженні змін інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки (через 24 години, 1 місяць, 2 місяці після трикратного введення розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) молоді (3 міс) масою 270 – 290 г та старі (20 міс) масою 390 – 410 г тварини були розділені на 4 групи:

1 група - контрольні інтактні тварини;

2 група - тварини, яким вводили *внутрішньобрюшинно* розчин сірчаноокислої міді вранці до годування в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг / 1 г печінки), що відповідає LD₃₃ тричі з інтервалом в 48 годин. Через 24 години тварин декапітували під ефірним наркозом і вимірювали ряд показників прооксидантно-антиоксидантного балансу;

3 група - тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді вранці до годування в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг / 1 г печінки), що відповідає LD₃₃ тричі з інтервалом в 48 годин. Через 1 місяць тварин декапітували під

ефірним наркозом і вимірювали ряд показників прооксидантно-антиоксидантного балансу;

4 група - тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді вранці до годування в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг / 1 г печінки), що відповідає LD₃₃ тричі з інтервалом в 48 годин. Через 2 місяці тварин декапітували під ефірним наркозом і вимірювали ряд показників прооксидантно-антиоксидантного балансу [12, 32-35, 37].

При моделюванні інтоксикації печінки дією тетрахлорметану (CCl_4) вводили *per os* 0,1 мл 50 % масляного розчину на 100 г маси тіла 1 раз на день з інтервалом 48 годин протягом 3 днів. Декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу проводили через 24 години після останнього введення.

2. 1. 2 Циклічний режим годування

На першому етапі дослідження впливу *циклічного режиму годування* (ЦРГ) тварин 3 і 20 міс. віку поділяли на контрольну та експериментальну групи. Контрольні тварини знаходилися на стандартному режимі годування віварію. Експериментальні групи переводились на циклічний режим годування (ЦРГ) при якому тварин переводили на такий режим годування, при якому вони за 14 днів втрачали до 30 % маси тіла. Після цього змінювали режим годування так, щоб забезпечити їм відновлення маси тіла за 14 днів - це становило 1-й цикл режиму годування. Після цього щурів переводили на звичайні умови утримання у віварії на 30 днів-так званий, період реабілітації. Далі цикл 30 % втрати та відновлення маси тіла повторювали.

Для досягнення результатів з 30 % втрати маси тіла тварини за 14 днів отримували корм через день, а у дні годування отримували спеціалізований корм повноцінний за вмістом білків, ліпідів, вуглеводів та вітамінів - сухий комбікорм з кормовою цінністю 360 ккал / 100 г малими порціями в залежності від маси тіла (далі м. т.): від 200 – 300 г = 4 г комбікорму /

100 г м. т.; від 300 – 400 г = 3 г комбікорму / 100 г м. т. через день. При переведенні тварин на режим відновлення маси тіла, вони отримували спеціалізований корм щодня *ad libitum*.

Склад спеціалізованого сухого корму: пшениця 22,30 %, ячмінь 18,59 %, кукурудза 7,43 %, соняшник 37,17 %, риба суха 3,72 %, молоко сухе 4,46 %, мука люцерни 1,49 %, яєчний порошок 0,37 %, дріжджі 2,97 %, крейда 0,74 %, сіль 0,37 %, желатин 0,37 % (усього 360 ккал / 100 г).

При 30-ти денному *періоді реабілітації* тварини знаходилися на стандартному раціоні віварію.

Для визначення динаміки досліджуваних показників експериментальних молодих і старих тварин поділяли на 5 груп, у кожній групі по 10-12 тварин (Рис. 2.1).

1 група - *контрольні інтактні тварини* відповідно 3 і 20-ти місячного віку, інтактні, харчування *ad libitum*;

2 група - тварини, що отримували обмежене годування 14 днів і втрачали 30 % маси тіла (*період втрати маси тіла/ або період обмеженого харчування*);

3 група - тварини, які після 30 % втрати м. т. впродовж 14 днів знаходилися на годуванні *ad libitum* та відновлювали масу тіла (*період відновлення маси тіла*);

Далі тварини, які пройшли цикл втрати-відновлення маси тіла протягом 30 днів перебували на звичайному раціоні віварію (*період реабілітації*);

4 група - тварини, які пройшли повний період «*реабілітації*» і 14 днів перебували на обмеженому годуванні через день – (*другий період втрати маси тіла*);

5 група - тварини, які проходили (*2-й період відновлення маси тіла*);

Тварин розташовували по 1 особині у клітках, забезпечували вільний доступ до води, регулярно зважували в один і той же час (о 8 годині ранку) до годування [31, 32, 33, 39].

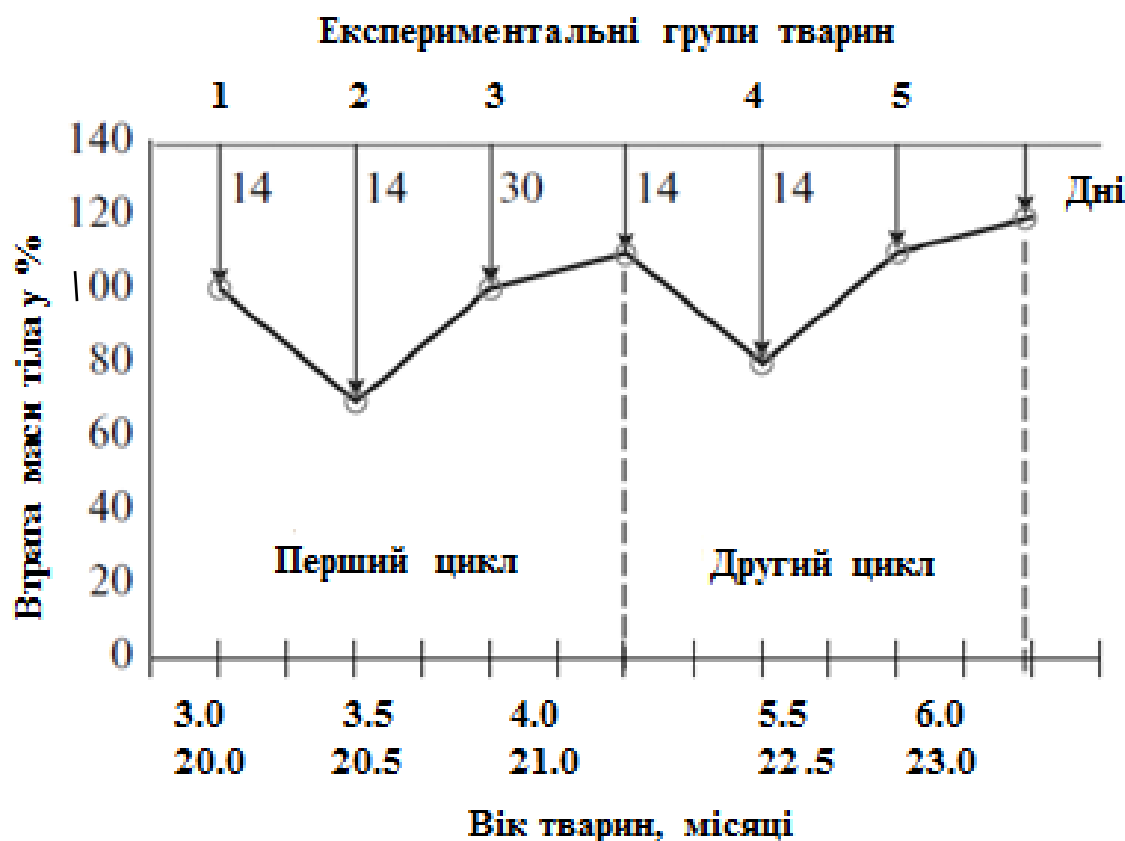


Рис. 2.1 Часові та вікові інтервали втрати та відновлення маса тіла протягом першого і другого циклів циклічного режиму годування [32]

На другому етапі цього дослідження вивчали вплив *циклічного режиму годування (ЦРГ)* на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу після інтоксикації сульфатом міді.

Тварин «контрольних груп» переводили на циклічний режим годування.

Тварин «експериментальних груп» триразово вводили розчин сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг / 1 г печінки) з інтервалом 48 годин, після цього піддослідних тварин переводили на ЦРГ.

2. 1. 3 Застосування комплексу «Мікс-фактор»

Комплекс «Мікс-фактор» [34, 35] (інша назва комплексу - «Фунгідол» [29, 37]) являє собою стерильну рідину темно коричневого кольору, в якій 14 % приходить на сухі речовини. На олігосахариди доводиться 67 %, на

амінокислоти і олігопептиди - 23,3 %, ліпіди - 11 %, вітаміни і мінерали – 1 %.

Склад вільних амінокислот: треонін (3 %), валін (23 %), цистеїн (16 %), метіонін (11 %), лейцин (10 %), аргінін (4 %), ізолейцин (4 %) і лізин (1 %). Наряду з основними компонентами до складу «Мікс-фактор» входять: вітаміни: В1 (0,38 мг / л); В2 (3,24 мг / л) і РР (8,3 мг / л); мікроелементи: кальцій, фосфор, залізо; органічні кислоти [29, 34, 35, 37].

При дослідженні впливу комплексу «Мікс-фактор» на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки тварини були розділені на 5 груп по 15 тварин у кожній групі:

1 група – контрольна (тварини, яким вводили фізіологічний розчин у дозах, що відповідають дозам розчину сірчаноокислої міді та комплексу «Мікс-фактор»).

2 група – тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді внутрішньобрюшинно в дозі 1 мг / 100 г маси, що відповідало LD₃₃, послідовно тричі з інтервалом 48 годин вранці до годування. Декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу проводили через 24 години після останнього введення.

3 група – тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді в тій же дозі, і по тій же схемі, що і групі 2, але за 24 години до кожного введення вони отримували «Мікс-фактор» *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу.

4 група – тварини, яким вводили тільки «Мікс-фактор» послідовно тричі з інтервалом 48 годин між введеннями *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г. Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу.

5 група – тварини, яким триразово вводили розчин сірчаноокислої міді внутрішньобрюшинно в дозі 1 мг / 100 г маси, з інтервалом 48 годин, а потім тричі «Мікс-фактор» *per os* в дозі 4 мг / 100 г (або 0,5 мл розчину на 100 г

м. т.). Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу [34, 35, 37].

При дослідженні тривалої дії комплексу «Мікс-фактор» на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів тварини отримували щодня у дозі 50 мкл /100 г маси тіла на добу з питною водою протягом 1 року.

2. 1. 4 Застосування комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива

При дослідженні впливу комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива (далі НКМ) на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки тварини 3 та 20 місячного віку були розділені на 4 групи:

1 група – контрольна;

2 група - тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді внутрішньобрюшинно в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, що відповідало LD₃₃, послідовно тричі з інтервалом 48 годин вранці до годування. Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу;

3 група - тварини, яким вводили лише НКМ *per os* послідовно тричі з інтервалом 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу;

4 група - тварини, яким триразово вводили розчин сірчаноокислої міді внутрішньобрюшинно в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, з інтервалом 48 годин, а потім тричі НКМ *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу [35, 38].

2. 2 Препаративні методи дослідження

Одержання сироватки крові. Кров збирали в сухі пробірки та зберігали 30 хв при 4 °С. Після цього кров центрифугували 15 хв при 3000 об / хв і відбирали сироватку.

Одержання еритроцитів крові. Кров збирали у пробірки, що містили гепарин. Еритроцити осаджували центрифугуванням (10 хв, 3000 об / хв) і потім два рази промивали фізіологічним розчином.

Одержання мітохондрій печінки. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [213] при 10000 g 30 хв з гомогенатів печінки (співвідношення ваги тканини та об'єму середовища виділення – 1 : 7). Склад середовища виділення: 0,3 М сахароза, 1 мМ трилон Б, 10 мМ трис-НСІ, рН 7,4. Фракцію мітохондрій одержували з двома промиваннями у середовищі виділення без трилону Б; у цьому ж середовищі суспендували й кінцевий осад. Концентрація білка мітохондрій у кінцевій суспензії дорівнювала 60–80 мг / мл.

Одержання цитозольної фракції клітин печінки. Цитозольну фракцію гомогенату печінки одержували методом диференційного центрифугування при 100 000 g 1 годину як описано [213].

Усі маніпуляції проводили при $t \leq 4$ °С.

2. 3 Аналітичні методи дослідження

Вимірювання вмісту малонового діальдегіду. Вимірювання вмісту малонового діальдегіду (МДА) у мітохондріях печінки проводили за методом Ohkawa H. et al. [214], а у сироватці крові – за методом Asakawa T. et al. [215]. Спектр поглинання забарвленого продукту реєстрували на спектрофотометрі та вимірювали різницю екстинкцій при 535 нм та 520 нм. Вміст малонового діальдегіду розраховували в еквівалентній кількості МДА, приймаючи коефіцієнт молярної екстинкції рівним $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12, 31, 34, 35, 37-39].

Визначення глутатіонпероксидазної активності (КФ 1.11.1.9). Глутатіонпероксидазну (ГП) активність визначали у сироватці крові та еритроцитах, мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки спектрофотометрично при 340 нм за методом Paglia D. et al. [216] у 50 мМ K^+, Na^+ -фосфатному буфері, рН 7,4, що містив 1мМ EDTA, 0,1 мМ NADPH, 1 од глутатіонредуктази дріжджів, 1мМ GSH 0,2 % тритон X-100, 0,4 мМ перекису водню та 3 мМ азиду Na для інгібування каталази. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH/хв на 1 мг білка або 1 мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12, 31-39]

Вимірювання активності глутаредоксину (КФ 1.20.4.1). Визначення активності глутаредоксину в мітохондріях клітин печінки щурів проводили спектрофотометрично за методом Raghavachari N. [217] з невеликими змінами Gallogly N. [218] в 50 мМ К-фосфатному буфері (рН 8,0), що містив 0,5 мМ GSH, 0,2 мМ NADPH, 0,4 од / мл глутатіонредуктази дріжджів, 1,25 мМ цистину, 0,2 % тритону X-100. Температура реакційного середовища – 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH/хв на мгбілка з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12, 34, 36]

Визначення глутатіонредуктазної активності (КФ 1.6.4.2). Глутатіонредуктазну активність у MX і ПМХ фракціях печінки вимірювали спектрофотометрично за методом I. Carlberg et al., за зменшенням рівня NADPH [79] у середовищі, яке містило 50 мМ K^+ -фосфатного буфера, рН 7,4, 1мМ EDTA, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ GSSG та 0,2 % тритон X-100, при температурі 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH / хв на 1 мг білка з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12, 31, 34, 35].

Визначення $NADP^+$ -глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.49). Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну (Г6ФДГ) активність вимірювали у мітохондріях та постмітохондріальній фракції печінки спектрофотометрично за швидкістю відновлення $NADP^+$ за методом Zaheer N. [219] в 120 мМ трис-HCl буфері, рН 7,4, який містив 10 мМ $MgCl_2$, 2 мМ глюкозо-6-фосфату,

0,9 мМ NADP^+ , 0,2 % тритону X-100. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль $\text{NADPH}/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка [31, 37].

Визначення NADP^+ -ізоцитратдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.42). Ізоцитратдегідрогеназу (ІЦДГ) активність визначали у МХ і ПМХ фракціях печінки спектрофотометрично за швидкістю відновлення NADP^+ за методом Bauman H. [220] в 34 мМ трис- HCl буфері, рН 7,4, який містив 0,34 мМ EDTA , 1,5 мМ MnCl_2 , 0,1 мМ NADP^+ , 1,5 мМ ізоцитрату, 0,2 % тритону X-100. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль $\text{NADPH} / \text{хв} \cdot \text{мгбілка}$ [31, 37].

Визначення NADP^+ -малатдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.40). Малатдегідрогеназу (МДГ) активність визначали у МХ і ПМХ фракціях печінки спектрофотометрично за швидкістю відновлення NADP^+ за методом Усатенко М. С. [221] в 68 мМ трис- HCl буфері, рН 7,4, який містив 0,85 мМ MnCl_2 , 2 мМ малату, 0,4 мМ NADP^+ , 0,2 % тритону X-100. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль $\text{NADPH}/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка [31, 39].

Аконітатгідратазну активність (КФ 4.2.1.3) визначали в мітохондріях, спектрофотометрично за методом Gardner J. et al. [69]. У середовищі, що містить 50 мМ Трисс- HCl -буфер (рН 8.0), 10мМ MnCl_2 , 10мМ ізоцитрату і мітохондрії інкубували 6 хв з перемішуванням у термостатуючій комірці при температурі 37 °С. Активність виражали в нмоль аконітата на мг білка [12, 33, 35].

Визначення вмісту білка. Вміст білка в зразках, що досліджувались, визначали за методом Lowry O. et al. у модифікації Miller G. L. [222, 12, 31-39].

2. 4 Статистичні методи аналізу

Одержані результати обробляли статистично, використовуючи t -критерій Ст'юдента методи, за допомогою комп'ютерного пакету програм "Statistika V.6". Кореляційний аналіз здійснювали за Пірсоном. Достовірними різними вважалися результати при $p < 0,05$ [12, 31-39].

2. 5 Характеристика використаних реактивів

У роботі використовували такі реактиви: NADPH, NADP, GSH, GSSG, трис (оксиметил) амінометан, людський сироватковий альбумін, глутатіонредуктаза, бичий сироватковий альбумін, тритон X-100, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ЕДТА, сахароза, малат, глюкозо-6-фосфат, ізоцитрат, тритон X-100; KH_2PO_4 , азид натрію – виробництва фірми “Sigma” (США) та вітчизняного виробництва кваліфікації ЧДА, ХЧ та ОСЧ.

Висновки до розділу 2

В даному розділі було охарактеризовано використані у дослідженні спектрофотометричні методи: визначення вмісту продуктів ПОЛ у субклітинних фракціях клітин печінки та сироватці крові, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та статистичного аналізу отриманих результатів

Дані методи були використані у власних дослідженнях, представлених у [12, 31-39].

РОЗДІЛ 3

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3. 1 Вік-залежні зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці та крові щурів при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном

Мідь є есенціальним мікроелементом, що приймає участь у реалізації низки біологічних процесів, оскільки є основним компонентів численних речовин ферментного ряду. В організмі іони міді можуть утворювати міцні зв'язки з білками, проте при надмірному надходженні даного мікроелементу відбувається підвищення концентрації вільних форм металу, що призводить до індукції процесів утворення реакційних гідроксильних радикалів, які чинять потужний токсичний вплив на клітинні мембрани, приводячи до їх руйнування [128]. Активуючи тканинні процеси перекисного окислення ліпідів, мідь призводить до формування структурних змін внутрішніх органів [223]. Показано, що сірчаноокисла мідь в умовах хронічного отруєння може чинити генотоксичну дію, обумовлену активацією процесів ліпопероксидації [224, 225].

3. 1. 1 Динаміка змін інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді (через 24 години, 1 місяць, 2 місяці після введення розчину сірчаноокислої міді) у молодих та старих тварин

Було досліджено вплив сірчаноокислої міді на вміст малонового діальдегіду - одного з головних маркерів окисного стресу; активність мітохондріальної аконітатгідратази – ферменту, активність якого знижується у відповідь на окисний стрес [42, 54]; функціонування елементів антиоксидантної

глутатіонзалежної системи (активності глутатіонпероксидази, глутаредоксину та глутатіонредуктази) і активність ферментів, що поставляють для даної системи NADPH в умовах інтенсифікації вільнорадикального окислення при інтоксикації сульфатом міді [12, 33-38].

Отримані дані свідчать, що інтоксикація сульфатом міді супроводжується супроводжувався дисрегуляцією показників прооксидантно-антиоксидантного балансу і розвитком оксидативного стресу у мітохондріях клітин печінки та сироватці крові тварин обох вікових груп [12, 34, 35, 37, 38].

У дослідження, щодо змін вмісту первинних продуктів ПОЛ малонового діальдегіду (МДА) у сироватці крові молодих і старих щурів було встановлено, що їх вміст у 20 місячних тварин був достовірно нижчим, ніж у 3 місячних (на 34 %) ($P < 0,05$) (Табл. 1). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень, проведених раніше в НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна [52].

При дослідженні впливу трикратного введення LD_{33} доз сірчаноокислої міді на вміст малонового діальдегіду у сироватці крові показано, що через 24 години після введення спостерігається підвищення рівня цих продуктів ПОЛ на 107 % ($P < 0,05$) як у молодих так і у старих тварин. Однак через 1 та 2 місяці після інтоксикації не виникає повної нормалізації показників і вміст малонового діальдегіду залишається підвищеним у старих тварин на 40 % ($P < 0,05$), у молодих тварин достовірного підвищення показника не зафіксовано (Табл. 3.1).

Відомо, що найважливіша роль у захисті від окисного стресу, що часто спостерігається в організмі після впливу ксенобіотиків, належить глутатіонредуктазній / глутатіонпероксидазній антиоксидантній системі. Ця система у клітинах ссавців забезпечує детоксикацію H_2O_2 , що є основним джерелом гідроксильного радикалу, який утворюється в присутності Fe^{2+} у реакції Фентона. Постачальниками NADPH для цієї системи можуть служити NADP- ізоцитратдегідрогеназа (ІЦДГ), глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г6ФДГ) і малатдегідрогеназа (МДГ) [125].

Таблиця 3.1

Вміст малонового діальдегіду та активність Se-глутатіонпероксидази у сироватці крові в контролі та при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів (n = 10- 12)

Показник	вік	контроль	24 години	1 місяць	2 місяць
МДА (нмоль МДА/ мл сир.)	3 міс	4,43 ±0,36	9,19±0,90*	4,77±0,25**	4,60±0,34
	20 міс	2,93±0,51 ^a	6,08±0,38*	4,15±0,20**	4,03±0,11 **
ГП (нмоль NADPH/ хв ·мл сир.)	3 міс	3587,4±258,4	2808,1±211,6 *	2684,7±321,2	2908±112,5
	20 міс	5925,6±423,3 ^a	4565,6±303,7 *	3437,3±523,0 **	3389±265,9

Примітки (тут і далі у підрозділі 3. 1. 1):

- 1.* - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем,
- 2.** - $P < 0,05$ у порівнянні з групою 24 години після інтоксикації.
- 3.^a - $P < 0,05$ у контрольній гр. 3 та 20 місячних тварин
4. Значення, подані у колонках таблиць для груп «контроль» та «інтоксикація сульфатом міді через 24 години» отримані розрахунком середнього значення даних чотирьох експериментів, описаних у підрозділах 3.1.1, 3.1.2, 3.3.1.3 та 3.3.2.2 (n=48) (достовірна різниця між середніми значеннями показників у зазначених експериментах відсутня). Для показників інших експериментальних груп – середнє значення для n=12.

При дослідженні активності основного ферменту, який утилізує МДА у крові тварин - Se-глутатіонпероксидази, виявлено, що активність ферменту у старих контрольних тварин була істотно вище, ніж у молодих щурів (на 65 %) ($P < 0,05$). Ці результати узгоджуються з отриманими раніше у НДІ біології даними, які свідчать про те, що глутатіонпероксидазна активність значно підвищувалася до 12-24 місячного віку і потім дещо знижувалася у дуже старих 30-34 місячних щурів [53]. У відповідь на введення доз сірчаноокислої міді

активність цього ферменту знижувалась однаковою мірою на 22 % та 23 % ($P < 0,05$) у обох вікових групах щурів (МДА/ГП в сир. $r = -0,521$; $r = -0,542$; $p < 0,001$ у молодих та старих щурів відповідно). Впродовж 1 та 2 місяців активність цього ферменту не досягла контрольного рівня і залишалась зниженою на 26 % та 20 % відносно контрольної групи ($P < 0,05$) відповідно (Табл. 3.1). Продовження інтенсифікації процесу ПОЛ та зниження глутатіонпероксидазної активності у сироватці крові, порівняно з контрольною групою у старих тварин може свідчити про наявність запального окисного процесу у крові, що має необхідність корегування за допомогою екзогенних антиоксидантних сполук, або ендогенного стимулювання антиоксидантного потенціалу [12, 33, 35, 37].

Під час дослідження показників про-антиоксидантного балансу у мітохондріях печінки було встановлено, що вміст малонового діальдегіду у молодих тварин був на 38 % ($P < 0,05$) вище, ніж у старих (Табл. 3.2). Через 24 години після інтоксикації збільшувався на 30 % у молодих і на 112 % у старих щурів. Через 1 та 2 місяці після отримання доз сірчаноокислої міді показники ПОЛ залишались підвищеними на 11 % і 15 % ($P > 0,05$) відповідно у молодих та на 54 % і 61 % ($P < 0,05$) у старих тварин (Табл. 3.2).

Іншим надійним верифікованим показником стану прооксидантного потенціалу при старінні або при дії різних стресових чинників може бути величина активності мітохондріальної аконітгідратази (КФ 4.2.1.3; аконітаза), яка каталізує зворотну реакцію перетворення ізоцитрату. Цьому ферменту належить вирішальна роль в регуляції накопичення цитрату. При токсичному гепатиті в печінці щурів відбувається зниження активності даного ферменту, при цьому вміст цитрату збільшується [59, 67, 126]. У літературі є дані, які свідчать, що з усіх вивчених ферментів у мх печінки і ряду інших тканин аконітаза є одним з найбільш чутливих ферментів у мх до різних стресових впливів [54, 58]. У ряді досліджень показано, що активність аконітази знижується під впливом АФК, деяких ксенобіотиків (тетрафторетилен, фторацетат) і критичних станів (киснево-глюкозного голодування, надлишку

нейромедіаторів), а також з віком [42, 54, 68]. У проведеному дослідженні встановлено, що у мх клітин печінки старих тварин Асо активність була на одному рівні з молодими щурами. У відповідь на введення сірчанокислої міді через 24 години відбувалось зниження активності Асо у мх печінки однаковою мірою у молодих і старих тварин на 45 та 46 % ($P < 0,05$) % (МДА/Асо в мх. $r = -0,58$; $r = -0,57$; $p < 0,003$). Через 1 та 2 місяці відбувалось подальше зниження активності Асо на 59 % та 56 % у молодих та 71 % і 65 % у старих тварин ($P < 0,05$), (Табл. 3.2). Виявлене зниження активності аконітази у мх клітин печінки молодих та старих тварин у відповідь на дію йонів сульфату міді може бути обумовлено підвищенням концентрації АФК в органелах цих піддослідних тварин та демонструє необхідність корегування наявних змін цих показників (вмісту МДА та активності Асо), що характеризують стан прооксидантного балансу у мх піддослідних тварин. Збільшення вмісту МДА на фоні зниження активності Асо може свідчити про руйнування $[4Fe-4S]^{2+}$ кластеру мітохондріальної Асо, виходу йонів заліза, індукції процесів ліпопероксидації.

Таблиця 3.2

Вміст малонового діальдегіду та активність аконітатгідратази у мітохондріях клітин печінки в контролі та при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів (n = 10- 12)

Показник	вік	контроль	24 год.	1 місяць	2 місяць
МДА (нмоль МДА/мг білку мх)	3 міс	0,257±0,020	0,333±0,020*	0,287±0,020**	0,298±0,030
	20 міс	0,159±0,010 ^a	0,337±0,020*	0,246±0,010*,**	0,257±0,010*,**
Асо (нмоль аконітату/хв/мг білку мх)	3 міс	27,9±0,7	14,6±1,8*	11,4±0,6*	12,3±1,0*
	20 міс	28,4±3,2	15,8±3,0*	8,2±0,5*	10,2±0,9*

Примітки:

1. * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем
2. ** - $P < 0,05$ у порівнянні з групою 24 години після інтоксикації
3. ^a - $P < 0,05$ у контрольній гр. 3 та 20 місячних тварин

Активність глутатіонпероксидази у мітохондріях печінки тварин контрольної групи була у 4 рази вище у старих тварин, порівняно з молодими ($P < 0,05$). Через 24 години після впливу сульфату міді активність цього фермента знижувалась на 20 % у молодих та на 21 % ($P < 0,05$) у старих (МДА/ГП в мх. $r = -0,42$; $r = -0,45$; $p < 0,001$) [12, 34]. Через 1 та 2 місяці показники залишалися сталими як у молодих так і у старих щурів (Табл. 3.3).

Відомо, що у мх печінки ссавців утилізацію МДА можуть здійснювати не лише ряд ізоферментів селен-залежної глутатіонпероксидази і глутатіон - S - трансферази, а й глутаредоксин 2 (Grx_2). Каталітична ефективність Grx_2 нижче, ніж у глутатіонпероксидази, але співрозмірна з ефективністю тіоредоксин-залежних пероксиредоксинів у мітохондріях. Також відомо, що Grx_2 здатний відновлювати у мх тіоредоксин 2 та GSH. Цей Grx_2 є кофактором пероксиредоксинів 3 і 5 (Prx_3 і Prx_5), які в свою чергу також можуть утилізувати гідроперекиси ліпідів у мітохондріях [42, 82]. У зв'язку з цим, у даній роботі було досліджено активність глутаредоксину у мх печінки молодих і старих контрольних та піддослідних щурів. Отримані дані свідчать, що активність цього ферменту була вище у 2,7 рази у старих тварин ($P < 0,05$) (Табл. 3.3) [36]. Введення розчину сірчанокислої міді через 24 години призводило до зниження активності Grx_2 у молодих щурів та старих щурів на 23 % та 36 % ($P < 0,05$) (МДА/ Grx в мх. $r = -0,50$; $r = -0,54$; $p < 0,011$) [34]. Подальший моніторинг показника через 1 та 2 місяці виявив, що впродовж цього строку показник у піддослідної групи мав тенденцію до нормалізації, залишаючись дещо нижчим, ніж у контрольних молодих (на 5 % та 14 %) та старих (7 % та 17 % відповідно) тварин ($P > 0,05$) (Табл. 3.3).

Дослідження активності ферменту, що забезпечує глутатіонпероксидазу та глутаредоксин у мітохондріях клітин печінки відновленим глутатіоном - глутатіонредуктази, показало, що активність цього ферменту у мітохондріях печінки старих контрольних щурів була достовірно нижче, ніж у молодих тварин. Виявлене зниження глутатіонредуктазної активності з віком, узгоджується з даними інших

авторів [53, 226]. Також у ряді робіт [126, 227, 228] показано, що для глутатіонредуктази з печінки щурів характерні істотні особливості каталітичної дії в умовах розвитку токсичного гепатиту: поява субстратного інгібування, зміна K_m по відношенню до GSSG і NADPH, а також регуляції активності ферменту під дією деяких інтермедіатів циклу Кребса. Зокрема показано, що цитрат у концентраціях до 0,10 мМ може виступати в якості інгібітора ферменту, при цьому активність глутатіонредуктази знижується на 40 % від вихідного рівня. Однак, в діапазоні концентрацій від 0,15 до 0,40 мМ активність ферменту збільшується в 1,3 рази. При подальшому збільшенні концентрації метаболіту знову спостерігається інгібування фермента. Так, при 1 мМ концентрації цитрату активність ферменту становить 55 % від початкової [126, 227, 228].

Продукт ІДГ-реакції, 2-оксоглутарат, при концентрації до 0,10 мМ викликає зниження активності ферменту як у нормі, так і при розвитку токсичного гепатиту. При подальшому підвищенні концентрації даного метаболіту спостерігається підвищення глутатіонредуктазної активності, причому максимальний активуючий ефект спостерігається у діапазоні концентрацій від 0,10 до 0,50 мМ, як в умовах норми, так і при патології. При концентрації метаболіту понад 0,8 мМ має місце інгібування глутатіонредуктази печінки щурів контрольної групи інтактних тварин [126].

Активність іншого NADP-залежного ферменту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мітохондріях клітин печінки контрольних молодих і старих щурів була практично однаковою (Табл. 3.4). У молодих тварин контрольної групи активність глутатіонредуктази була на 37 % вище, ніж у старих ($P < 0,05$). Під дією сульфату міді активність глутатіонредуктази знижувалась на 19 % у молодих ($P < 0,05$) а у старих достовірних змін не зазнавали. Через 1 та 2 місяці ці показники сягали контрольного рівня у тварин обох вікових груп (Табл. 3.3).

Дослідження активності NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази-ферменту, що забезпечує відновленням NADPH глутатіонредуктази,

дозволили встановити, що у мітохондріях клітин печінки старих контрольних тварин активність цього ферменту була на 39 % вище, ніж у молодих щурів ($P < 0,05$) (Табл. 3.4).

Таблиця 3.3

Активність глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів у мітохондріях клітин печінки (нмоль NADPH/ мг білку мх) в контролі та при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів (n = 10- 12)

Показник	вік	контроль	24 години	1 місяць	2 місяць
ГП	3 міс	94,3±4,5	75,9±5,2*	73,5±12,2*	69,6±11,1*
	20 міс	391,7±27,2 ^a	308,8±28,2*	304,0±10,8*	310,1±9,8*
Grx	3 міс	3,01 ±0,30	2,33±0,20*	2,86±0,30	2,59±0,10
	20 міс	8,30±0,50 ^a	5,36±0,60*	7,78±0,20	6,90±0,30*
ГР	3 міс	33,1±2,5	26,9±1,4*	31,55±1,8	30,5±1,5
	20 міс	21,1±2,1 ^a	20,4±1,0	21,6±1,2	20,23±1,2

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Збільшення до 12-24 місячного віку щурів NADP-ізоцитратдегідрогеназної активності в печінці виявлено раніше і іншими авторами [52]. Слід також зазначити, що при моделюванні уповільненого старіння активність NADP-ЩДГ в мх печінки щурів достовірно збільшується [52]. У відповідь на дію сульфату міді через 24 години відбувалось зниження активності NADP-ЩДГ на 28 % та 47 % ($P < 0,05$) (Табл. 3.4). Це може бути пов'язано з накопиченням 2-оксоглутарату і сукцинату, які за даними літератури [229] здатні інгібувати активність NADP-ЩДГ конкурентно по відношенню до ізоцитрату. У регуляції активності ферменту можуть брати участь інтермедіати азотного (глутамін, аргінін, гліцин) і вуглеводного обміну (глюкоза, глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фосфоенолпіруват, α -3-фосфогліцерінова кислота) [229].

Таблиця 3.4

Активність NADP-дегідрогеназ у мітохондріях клітин печінки (нмоль NADPH/ мг білку мх.) в контролі та при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів (n = 10- 12)

Показник	вік	контроль	24 години
ЩДГ	3 міс	108,8±1,4	78,2±2,2*
	20 міс	151,3±3,1 ^a	81,2±4,5*
Г6ФДГ	3 міс	61,2±3,7	94,2±6,1*
	20 міс	52,2±4,1	67,8±4,5

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

У роботі [97] з дослідження впливу іонів Cu^{2+} , що беруть участь в індукції процесів ПОЛ на стадії розгалуження ланцюга показали, що іони Cu^{2+} чинять інгібуючий вплив неконкурентного типу на фермент у нормі і при токсичному гепатиті. Показано, що розвиток окисного стресу у печінці щурів при токсичному гепатиті, індукованому CCl_4 пов'язане з підвищенням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Подібні дані про підвищення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (у мікросомах клітин печінки) при оксидативному стресі були отримані і авторами роботи [96]. Також у дослідженні [97] було показано, що пероксид водню пригнічує фермент за змішаним типом (Ki 0,36 мМ і 0,95 мМ в нормі і при експериментальному токсичному гепатиті відповідно).

У проведеному нами дослідженні було встановлено, що під дією сульфату міді активність Г₆ФД у мітохондріях зростала на 53 % у молодих ($P < 0,05$) та на 29 % у старих щурів (Табл. 3.4) [37].

У цитозолі печінки вміст МДА не мав достовірних відмінностей, різниця становить 7 % збільшення у щурів 20 місячного віку ($P \geq 0,05$). Під дією LD₃₃ сірчаноокислої міді вміст МДА збільшувався як у молодих так і у старих тварин на 79 % та 51 % відповідно ($P < 0,05$) (Табл. 3.5).

Активність Se-глутатіонпероксидази у цитозолі печінки старих тварин була вище на 80 %. Під дією LD₃₃ сірчаноокислої міді через 24 години після останнього введення спостерігалось зниження активності на 13 % у молодих та на 21 % у старих (P <0,05). Через 1 та 2 місяці активність ферменту залишалась зниженою на 10-15 % у обох піддослідних групах (Табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вміст малонового діальдегіду та антиоксидантних ферментів у цитозолі клітин печінки в контролі та при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів (n = 10- 12)

Показник	вік	контроль	24 год.	1 місяць	2 місяці
МДА (нмоль МДА/мг білку цт)	3 міс	0,106±0,01	0,190±0,01*	-	-
	20 міс	0,114±0,010	0,173±0,040*	-	-
ГП (нмоль NADPH/ мг білку цт)	3 міс	336,9±49,3	293,5±48,1*	273,8±25,4*	280,2±50,4
	20 міс	607,7±41,8 ^a	484,4±25,9*	497,3±70,1*	521±36,5
ГР (нмоль NADPH/ мг білку цт)	3 міс	109,6 ±13,1	91,2 ±13,7	101,0±10,3	108,0±9,7
	20 міс	68,2 ±8,2 ^a	58,1 ±5,7	57,7±3,2	60,3±2,1

Примітки:

1. * - P <0,05 у порівнянні з контролем
2. «-» – вимірювання не проводилось

Активність глутатіонредуктази у цитозолі клітин печінки у молодих тварин була вище на 38 %. Після інтоксикації активність знизилася на 16 % у молодих та на 15 % у старих. Після 1 та 2 місяців у молодих тварин активність сягнула контролю, а у старих залишалася нижчою на 15 % до кінця експерименту (Табл. 3.5).

Активність NADP-ізоцитратдегідрогенази у цитозолі вище на 29 % у щурів 20-місячного віку. Після введення доз розчину сірчаноокислої міді відбувалося зняження активності цього ферменту на 26 % у молодих та на

18 % у старих тварин (Табл. 3.6).

Активність іншого NADP- залежного ферменту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в цитозолі клітин печінки контрольних молодих і старих щурів була практично однаковою (Табл. 3.6). У роботі з дослідження впливу іонів Cu^{2+} , що беруть участь в індукції процесів ПОЛ на стадії розгалуження ланцюга показали, що іони Cu^{2+} чинять інгібуючу вплив неконкурентного типу на фермент в нормі і при токсичному гепатиті [97]. Показано, що розвиток окисного стресу в печінці щурів при токсичному гепатиті, індукованому CCl_4 пов'язане зі збільшенням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Пероксид водню пригнічує фермент за змішаним типом (Кі 0,36 мМ і 0,95 мМ в нормі і при експериментальному токсичному гепатиті відповідно) [97].

Таблиця 3.6

Активність NADP-дегідрогеназ у цитозолі клітин печінки (нмоль NADPH/ мг білку цт) при при інтоксикації сульфатом міді у 3- та 20-місячних щурів (n = 10- 12)

Показник	вік	контроль	24 години
ІЦДГ (нмоль NADPH/ мг білку цт)	3 міс	270,0±2,4	202,1±5,8*
	20 міс	349,2±3,5 ^a	287,9±7,1*
Г6ФДГ (нмоль NADPH/ мг білку цт)	3 міс	101,0±4,3	138,2±5,4*
	20 міс	60,1±5,1 ^a	77,8±3,2

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Було встановлено, що під дією сульфату міді активність Г6ФД у цитозолі зростала на 37 % у молодих ($P < 0,05$) та на 29 % у старих (Табл. 3.6).

Так у тварин 3 місячного віку спостерігається підвищений рівень інтенсивності ПОЛ у сироватці крові і мітохондріях печінки наряду зі зниженням активності антиоксидантних ферментів в мх, цт клітин печінки і сироватці крові в порівнянні з тваринами 20 місячного віку. Cu-індуковане пошкодження печінки через 24 години після інтоксикації супроводжується

інтенсифікацією процесів ПОЛ у молодих та старих тварин на фоні пригнічення активності глутатіонпероксидази, глутаредоксину і ізоцитратдегідрогенази, а також підвищення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мітохондріях та цитозолі печінки. Через 1 і 2 місяці після інтоксикації показники інтенсивності ПОЛ у молодих тварин нормалізуються, а у старих залишаються вище контрольного рівня. Підвищений вміст продуктів ПОЛ у молодих тварин і знижена активність аконітатгідратази у мітохондріях і глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові не нівелюються через 1 і 2 місяці після інтоксикації та вимагають корегування за допомогою екзогенного або ендогенного стимулювання. Інтоксикація печінки сульфатом купруму може розглядатися як приклад вільнорадикальної патології і використовуватися в якості моделі *in vivo* для відбору речовин і субстанцій з потенційною антирадикальною і антиокисною активністю [12, 32, 34, 37].

3.1.2 Порівняльний аналіз відповіді показників про-антиоксидантного балансу на моделях гепатотоксикації іонами сірчаноокислої міді та тетрахлорметану у молодих та старих тварин

Тетрахлорметан є органоспецифічним токсином, що має гепатотропний ефект. Гепатотоксична дія CCl_4 обумовлена, в основному, вільнорадикальними продуктами його метаболізму ($\text{CCl}_3\cdot$, $\text{CCl}_5\text{O}_2\cdot$). Зокрема, показано, що в умовах *in vitro* та *in vivo* CCl_4 індукує збільшення кількості вільних радикалів, дієнових кон'югатів, МДА, вихід етану і пентану, а також зниження вмісту GSH [124]. У літературі є відомості про різну чутливість експериментальних тварин різного віку до прооксидантної, гепатотоксичної дії CCl_4 [230].

Проведені експерименти (розділ 3.1) з вивчення дії сірчаноокислої міді на показники про-антиоксидантного балансу дає змогу називати цю речовину прооксидантною також. Для порівняння ступеню прооксидантної дії CCl_4 -

речовини з вивченою гепатотоксичною дією та досліджуваної речовини $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ було проведено порівняльний експеримент, щодо дії CCl_4 та $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ на показники про-антиоксидантного балансу 3 та 20 міс щурів.

Отримані дані свідчать, що введення як $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ так і CCl_4 призводило до активації процесів ПОЛ, про що свідчить підвищення вмісту малонового діальдегіду у сироватці крові у обох досліджуваних вікових групах тварин. Підвищення склало 107 % у молодих при інтоксикації сульфатом міді і на 100 % при CCl_4 –індукованій інтоксикації, а у старих на 107 % при CuSO_4 - залежній інтоксикації і на 141 % при CCl_4 –залежній ($\text{CuSO}_4 / \text{CCl}_4$ $r = 0,98$; $r = 0,92$ $p < 0,001$) (Табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Вміст малонового діальдегіду у сироватці крові та мітохондріях клітин печінки та аконітазна активність у мітохондріях клітин печінки при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном у 3- та 20-місячних щурів (n = 8- 12)

Показник	вік	контроль	CuSO_4	CCl_4
Вміст МДА в сир. (нмоль МДА/мл сир.)	3 міс	4,43 $\pm$ 0,40	9,19 $\pm$ 0,90*	8,87 $\pm$ 0,80*
	20 міс	2,93 $\pm$ 0,50 ^a	6,08 $\pm$ 0,40*	7,07 $\pm$ 0,20*
Вміст МДА в МХ (нмоль МДА/мг білку мх)	3 міс	0,257 $\pm$ 0,023	0,333 $\pm$ 0,021*	0,347 $\pm$ 0,012*
	20 міс	0,159 $\pm$ 0,011 ^a	0,337 $\pm$ 0,023*	0,367 $\pm$ 0,024*
Асо (нмоль аконітату/хв · мг білку мх)	3 міс	27,9 $\pm$ 0,7	14,6 $\pm$ 1,8*	13,9 $\pm$ 2,0*
	20 міс	28,4 $\pm$ 3,2	15,8 $\pm$ 2,9*	12,4 $\pm$ 1,6*

Примітки (тут і далі у підрозділі 3. 1. 2):

1. * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем
2. ^a - $P < 0,05$ у контрольних групах 3 та 20 міс. щурів

Зміни вмісту малонового діальдегіду у мітохондріях, були подібні до змін, що відбуваються з цим показником у сироватці крові. Як у молодих, так і

у старих тварин у відповідь на інтоксикацію досліджуваними гепатотоксинами підвищувався рівень малонового діальдегіду в мітохондріях. У 3-місячних на 29 % при інтоксикації сульфатом міді і на 35 % при CCl_4 –індукованій інтоксикації ($P < 0,05$). У 20-місячних цей показник зростав на 112 % при введенні доз сірчаноокислої міді і на 130 % при введенні доз CCl_4 ($P < 0,05$) ($\text{CuSO}_4 / \text{CCl}_4$ $r = 0,94$; $r = 0,91$ $p < 0,003$) (Табл. 3.7).

Активність глутатіонпероксидази у сир. навпаки зменшувалась під дією як доз CuSO_4 так і CCl_4 . На 22 % та 26 % відповідно у 3-місячних та на 23 % і 28 % у 20-місячних тварин ($\text{CuSO}_4 / \text{CCl}_4$ $r = 0,92$; $r = 0,87$ $p < 0,001$) (Табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність у сироватці крові та мітохондріях клітин печінки при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном у 3- та 20-місячних щурів (n = 8- 12)

Показник	вік	контроль	CuSO_4	CCl_4
ГП у сир. (нмоль NADPH/хв ·мл сир.)	3 міс	3587,4±258,4	2808,1±211,6*	2689,4±115,1*
	20 міс	5925,6±423,3 ^a	4565,6±303,7*	4325±203,0*
ГП у МХ (нмоль NADPH/хв ·мг білку МХ)	3 міс	94,3±4,5	75,9±5,2*	73,1±3,8*
	20 міс	391,7±27,2 ^a	308,8±28,2*	294,0±32,0*
ГР в МХ (нмоль NADPH /мг білку МХ)	3 міс	33,1±2,5	26,9±1,4*	25,4±1,4*
	20 міс	21,1±2,1 ^a	20,4±1,0	17,2±0,9*

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Схожа тенденція спостерігалася при визначенні змін активності мітохондріального та цитозольного ізоферментів глутатіонпероксидази. Під дією сульфату міді, знижуючись на 20 % у молодих, а також на 22 % у старих тварин ($P < 0,05$). Вплив CCl_4 призводив до зменшення активності ферменту на 23 % у 3-місячних і 25 % у мітохондріях клітин печінки 20-місячних щурів ($P < 0,05$) ($\text{CuSO}_4 / \text{CCl}_4$ $r = 0,96$; $r = 0,76$ $P < 0,01$) (Табл. 3.8). У цитозолі клітин

печінки молодих щурів активність глутатіонпероксидази під дією сульфату міді знижувалась на 13 % ($P > 0,05$), у старих на 21 % ($P < 0,05$). У відповідь на інтоксикацію CCl_4 - на 15 % у 3-місячних та 18 % у 20-місячних (Табл. 3.8). Під дією CuSO_4 інгібування активності зазнали також мітохондріальна та цитозольна форми глутатіонредуктази. У молодих тварин встановлено зниження активності на 19 %.

У старих тварин значної варіабельності цього показника у даній піддослідній групі не встановлено.

Під дією CCl_4 у 3-місячних тварин відбувалося інгібування активності фермента на 24 %, у 20-місячних на 19 % у мітохондріальній фракції (Табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Активність антиоксидантних ферментів у цитозолі при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном у 3- та 20-місячних щурів (n = 8- 12)

Показник	вік	контроль	CuSO_4	CCl_4
ГП (нмоль NADPH/хв · мг білку цт)	3 міс	336,9±49,3	293,5±48,1	287±33,6
	20 міс	607,7±41,8 ^a	484,4±25,9*	500±24,9*
ГР (нмоль NADPH /мг білку цт)	3 міс	109,6 ±13,1	91,2 ±13,7	90±9,3
	20 міс	68,2 ±8,2 ^a	68,1 ±5,7	57,9±7,2

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

У цитозольній фракції клітин печінки під дією сульфату міді активність глутатіонредуктази зменшувалась на 17 %, залишаючись сталою у іншій віковій групі. Введення CCl_4 приводило до інгібування активності цього ферменту на 18 % у 3-місячних та на 16 % у 20-місячних щурів ($P > 0,05$) (Табл. 3.9).

Тож введення як розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ так і CCl_4 активує вільнорадикальне окислення ліпідів печінки експериментальних тварин. При цьому ступінь активації ПОЛ була більш вираженою у старих, 20-місячних, щурів, що визначається зниженням активності GSH-залежної системи АОФ.

3.2 Вік-залежний вплив циклічного режиму харчування на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді

3. 2. 1 Вплив циклічного режиму харчування на показники про-антиоксидантного балансу у молодих та старих тварин

Відомо, що режим харчування відіграє значну роль у фізіологічній або патологічній відповіді тканин печінки на окисний стрес. Важливим підходом до вивчення механізмів, що становлять основи старіння і контролюють його швидкість, є застосування різних методів, які збільшують тривалість життя лабораторних модельних організмів [231], або навпаки, зменшують її [53, 232, 233]. Обмеження калорійності харчування є одним з найбільш верифікованих методів збільшення тривалості життя тварин у експерименті. Під час дослідження цієї моделі було з'ясовано, що КОД здатна впливати на ряд фізіологічних показників, поведінкові реакції, частоту виникнення захворювань і, в кінцевому підсумку, на тривалість життя [231]. Обмеження калорійності супроводжується збільшенням тривалості життя у різних експериментальних об'єктів: ссавців [234], безхребетних [235] і мікроорганізмів [236], тобто можна зробити припущення про наявність подібного механізму регуляції тривалості онтогенезу. Однак моделювання збільшення тривалості життя передбачає переведення на КОД лише молодих тварин, а ефект збільшення тривалості життя при КОД пов'язаний з ефектами селекції [237]. Слід також зазначити, що одним з головних чинників дії КОД на рівні клітини є здатність до ослаблення окисного стресу [43, 232, 238]. Тож у НДІ біології було розроблено схему циклічного режиму харчування, що у попередньому експерименті мала вплив на вивчені при КОД параметри про-антиоксидантного балансу як у молодих, так і у старих тварин та збільшувала їх тривалість життя. На думку авторів А. І. Божков, Н. І. Кургузова, Т. В. Криворучко, К. М. Лебідь, О. О. Михайлець, С. Д. Данладі,

А. А. Божков, М. С. Гірич ця модель є зручною для вивчення механізмів тривалості життя та механізмів адаптації організму до стресових чинників, що включають обмеження харчування [32].

У зв'язку з цим було проведено дослідження стану про-антиоксидантного балансу у печінці та крові молодих і старих щурів при циклічному режимі годування.

ЦРГ - це модель годування під час якої тварини за 14 днів втрачали до 30 % маси тіла. Після цього змінювали режим годування так, щоб забезпечити їм відновлення маси тіла за 14 днів - це становило 1-й цикл режиму годування. Після цього щурів переводили на звичайні умови утримання у віварії на 30 днів. Далі цикл втрати та відновлення повторювали. Останній день експерименту включав декапітацію тварин та подальше вимірювання ряду фізіологічних та біохімічних показників.

Для регуляції циклів втрати та набору маси тіла було проведено вимірювання маси тіла на кожному з етапів експерименту та щоденне вимірювання маси тіла для розрахунку добової норми їжі для окремо для кожної тварини (для щурів масою від 200-300 г = 4 г комбікорму/ 100 г м. т.; від 300-400 г = 3 г комбікорму/ 100 г м. т. через день, повноцінного за вмістом білків, жирів, вуглеводів, вітамінів - сухий комбікорм з кормовою цінністю 360 ккал / 100 г).

Проведені дослідження впливу періодичного обмеження харчування і подальшого «відновлення маси тіла» тварин на масові показники тіла, дозволили встановити, що маса тіла контрольних 20 місячних щурів (*група 1 інтактний контроль 3 і 20 міс віку*) була на 24 % вище, ніж у 3 місячних контрольних щурів (Табл. 3.10).

У відповідь на перше обмеження харчування (*група 2 – перший період втрати маси тіла шляхом обмеження харчування*), маса тіла молодих тварин знижувалася на 28 %, а на перше «відновлення маси тіла» протягом 14 днів (*група 3 перший період відновлення маси тіла шляхом годування ad libitum*) збільшувалася практично до рівня маси контрольних тварин. У відповідь на

друге обмеження харчування (група 4 – другий період втрати маси тіла шляхом обмеження харчування) маса піддослідних молодих щурів знову знижувалася на 28 %, і потім на друге «відновлення маси тіла» протягом 14 днів (група 5 - другий період відновлення маси тіла шляхом годування *ad libitum*) збільшувалася до рівня контрольних тварин. У старих щурів у відповідь на ЦРГ, маса тіла змінювалася подібним, але менш вираженим чином (Табл. 3.10) [32, 33].

Таблиця 3.10

Вплив циклічного режиму харчування на масу тіла (г) у молодих та старих щурів (n = 10-12)

Вік щурів	Варіанти груп				
	1	2	3	4	5
3 міс	285±8	204±6*	259±8**	207±8*,***	282±9****
20 міс	399±11 ^a	289±9*	377±16**	290±10*,***	380±12****

Примітки: (тут і далі у підрозділі 3. 2)

1. 1 група - контроль;
2. 2 група – перша 30% втрата маси тіла протягом 14 днів;
3. 3 група – перше відновлення маси тіла протягом 14 днів;
4. 4 група - друга 30% втрата маси тіла протягом 14 днів;
5. 5 група - друге відновлення маси тіла протягом 14 днів;
6. *- P <0.05 у порівнянні з 1 групою;
7. ** - P<0.05 у порівнянні з 2 групою;
8. ***- P<0.05 у порівнянні з 3 групою;
9. **** - P <0.05 у порівнянні з 4 групою.
10. ^a - P <0.05 у контрольній групі 3 та 20 місячних тварин

При дослідженні зміни маси печінки виявлено, що її величина у молодих контрольних щурів (група 1) достовірно не відрізнялася від маси печінки старих тварин (Табл. 3.11). У відповідь на першу втрату м. т. маса печінки 3х місячних щурів знижувалася на 44 % в порівнянні з контрольними

тваринами. У відповідь на перше відновлення маси тіла (група 3) маса печінки збільшувалася, перевищуючи рівень контрольних тварин на 10 % ($0,05 < P < 0,1$).

У відповідь на другу втрату м. т. (група 4) маса печінки знову знижувалася на 43 %, а потім (у відповідь на 2 відновлення маси тіла) збільшувалася до рівня контрольних тварин.

У старих тварин у відповідь на циклічний режим годування, маса печінки при першій втраті м. т. знижувалася на 36 %, а у відповідь на другу втрату м. т. лише на 33 %.

У старих щурів, як і у молодих тварин, маса печінки у відповідь на перше відновлення маси тіла була так само дещо вище (16 %), ніж у контрольних 20-місячних тварин ($0,05 < P < 0,1$).

Таблиця 3.11

Вплив циклічного режиму харчування на масу печінки (г) у молодих щурів (n = 10-12)

Вік щурів	Варіанти груп				
	1	2	3	4	5
3 міс	13,8± 0,4	7,7± 0,6*	15,1± 0,5**	7,9± 0,5',***	13,6± 0,7****
20 міс	14,92± 0,97	9,63± 0,71*	17,25± 0,64**	11,48± 0,79',***	16,10± 0,72**,****

При дослідженні масового коефіцієнта печінки (співвідношення маси печінки у г на масу тіла у г $\times 10^{-3}$) встановлено, що у молодих контрольних тварин (група 1) ця величина була істотно вище, ніж у старих (Табл. 3.12).

У відповідь на першу втрату м. т. у молодих тварин (група 2) масовий коефіцієнт печінки знижувався на 29 % в порівнянні з контрольними тваринами (група 1). У відповідь на перше відновлення маси тіла (група 3) масовий коефіцієнт печінки істотно збільшувався перевищуючи рівень контрольних тварин на 16 % ($P < 0,05$).

У відповідь на друге обмеження харчування та втрату м. т. (група 4) масовий коефіцієнт печінки знижувався на 35 %, і потім на друге відновлення маси тіла (група 5) збільшувався до рівня значень у контрольних тварин.

У старих тварин у відповідь на першу втрату маси тіла масовий коефіцієнт печінки знижувався на 21 %, а у відповідь на перше відновлення маси тіла збільшувався на 24 % в порівнянні зі значеннями контрольних тварин (Табл. 3.12).

При цьому, на відміну від молодих щурів, у старих тварин масовий коефіцієнт печінки після другого обмеження харчування і подальшого відновлення маси тіла був вище рівня контрольних щурів на 5,8 % і 30,0 % відповідно.

Таблиця 3.12

Вплив циклічного режиму харчування на масовий коефіцієнт печінки ($\text{г} / \text{г} \cdot 10^{-2}$) у старих щурів ($n = 10-12$)

Вік щурів	Варіанти груп				
	1	2	3	4	5
3 міс	$5,06 \pm 0,23$	$3,59 \pm 0,23^*$	$5,86 \pm 0,13^{*,**}$	$3,79 \pm 0,25^{*,***}$	$4,86 \pm 0,16^{****}$
20 міс	$3,79 \pm 0,16^a$	$3,03 \pm 0,24^*$	$4,70 \pm 0,19^{**}$	$4,01 \pm 0,29^{***}$	$4,94 \pm 0,22^{*,**,****}$

При дослідженні масового коефіцієнта печінки (співвідношення маси печінки у г на масу тіла у г $\times 10^{-3}$) встановлено, що у молодих контрольних тварин (група 1) ця величина була істотно вище, ніж у старих (Табл. 3.10, 3.11).

У відповідь на першу втрату м. т. у молодих тварин (група 2) масовий коефіцієнт печінки знижувався на 29 % в порівнянні з контрольними тваринами (група 1). У відповідь на перше відновлення маси тіла (група 3) масовий коефіцієнт печінки істотно збільшувався перевищуючи рівень контрольних тварин на 16 % ($P < 0,05$).

У відповідь на друге обмеження харчування та втрату м. т. (група 4) масовий коефіцієнт печінки знижувався на 35 %, і потім на друге відновлення маси тіла (група 5) збільшувався до рівня значень у контрольних тварин.

У старих тварин у відповідь на першу втрату маси тіла масовий коефіцієнт печінки знижувався на 21 %, а у відповідь на перше відновлення маси тіла збільшувався на 24 % в порівнянні зі значеннями контрольних тварин (Табл. 3.12).

При цьому, на відміну від молодих щурів, у старих тварин масовий коефіцієнт печінки після другого обмеження харчування і подальшого відновлення маси тіла був вище рівня контрольних щурів на 5,8 % і 30,0 % відповідно [32, 33].

Під час дослідження стану прооксидантно-антиоксидантного балансу при ЦРГ були отримані наступні результати. Проведені дослідження вмісту первинних продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду (МДА) у мітохондріях печінки молодих і старих щурів дозволили встановити, що його величина у 20 місячних тварин була достовірно нижче, ніж у 3 місячних. Ці дані узгоджуються з результатами досліджень, проведених раніше в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна [52].

Дослідження впливу циклічного режиму годування (ЦРГ) дозволили встановити, що у відповідь на перше обмеження харчування (*група 2*) концентрація МДА у мітохондріях печінки у молодих тварин достовірно збільшувалася на 34 % в порівнянні з *контрольною групою 1*. Потім знижувалася при відгодовуванні (*група 3*) на 41 % відносно групи 2 та на 22 % відносно контрольної групи. При повторному обмеженні харчування (*група 4*) даний показник продуктів ПОЛ знову достовірно підвищувався на 13 % в порівнянні з групою 1. При цьому збільшення вмісту МДА було дещо нижчим, ніж у відповідь на перше обмеження харчування. Під час другого циклу відновлення маси тіла у молодих тварин відбувалося зниження вмісту

малонового діальдегіду як відносно групи 4, так і відносно контрольної групи молодих тварин.

У старих тварин зміна вмісту МДА в мітохондріях клітин печінки (мх) у відповідь на ЦРГ мала схожу спрямованість з молодими щурами, проте зміна цього показника за абсолютними значеннями була нижче практично у всіх експериментальних групах тварин.

При першому обмеженні харчування вміст МДА у мітохондріях збільшувався на 41 % відносно контролю, і потім знижувалася на 43 % в порівнянні з групою 2.

На друге обмеження харчування показники старих тварин мали значно нижчу варіабельність, ніж у молодих. Концентрація продуктів ПОЛ зростала лише на 13 % відносно контролю ($P > 0,05$). Слід зазначити, що у старих тварин групи 5, як і у молодих щурів, вміст МДА був нижче, ніж у контрольних тварин.

Подібні результати були отримані і при вимірюванні вмісту малонового діальдегіду у мікросомах клітин печінки.

Вміст цих продуктів ПОЛ у мікросомах 3-місячних щурів був на 39 % вищим, ніж у 20-місячних ($P < 0,05$) (Рис. 3.1Б).

При першому обмеженні харчування вміст продуктів ПОЛ збільшувався на 52 % у молодих та на 100 % у старих тварин ($P < 0,05$). Тоді як друге обмеження харчування не приводило до вираженого ефекту інтенсифікації процесів ПОЛ, збільшуючись на 10 % у молодих та на 22 % у старих ($P > 0,05$), при цьому спостерігалась індивідуальна різниця ступеню перекисного окиснення ліпідів.

Повторний цикл відновлення маси тіла призводив до зниження досліджуваного показника у молодих тварин (на 52 % відносно групи 4 та на 55 % відносно контролю) ($P < 0,05$).

У старих тварин після другого відновлення маси тіла (група 5) вміст малонового діальдегіду у мікросомах клітин печінки знижувався на 46 % ($P < 0,05$) у порівнянні з групою 4 та достовірно не відрізнялася від

показників контрольної групи експериментальних тварин (Рис. 3.1Б).

Досліджуючи активність аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3) встановлено, що в мітохондріях клітин печінки старих тварин ця активність була на 23 % нижче, ніж у молодих щурів ($P < 0,05$) (Рис. 3.1В).

У відповідь на перше обмеження харчування у 3 місячних тварин спостерігалось зниження активності цього ферменту на 30 % ($P < 0,05$). Подальше відновлення маси тіла супроводжувалося нормалізацією аконітазної активності.

При повторному обмеженні харчування активність досліджуваного фермента також істотно знижувалася (на 29 %), а при другому відгодовуванні достовірно не змінювалася.

Виявлене зниження активності аконітази в мітохондріях клітин печінки молодих тварин на 1 і 2 обмеження харчування може бути обумовлено підвищенням концентрації АФК у мітохондріях піддослідних тварин.

На відміну від молодих щурів, аконітазна активність у старих тварин у відповідь на ЦРГ змінювалася лише в межах 10 % ($P > 0,05$) (Рис. 3.1В).

У зв'язку з цим, слід зазначити, що у старих щурів зміни МДА при першому і особливо другому обмеженні харчування були також менш вираженими, ніж у молодих тварин (Рис. 3.1).

При дослідженні активності основного ферменту, що утилізує МДА у мітохондріях, Se-глутатіонпероксидази, виявлено, що глутатіонпероксидазна активність у мх старих контрольних тварин була істотно вище, ніж у молодих щурів (Рис. 3.2А). Ці результати узгоджуються з отриманими раніше в НДІ біології даними, які свідчать про те, що глутатіонпероксидазна активність значно збільшувалася до 12-24 місячного віку і потім дещо знижувалася у дуже старих 30-34 місячних щурів [53, 239].

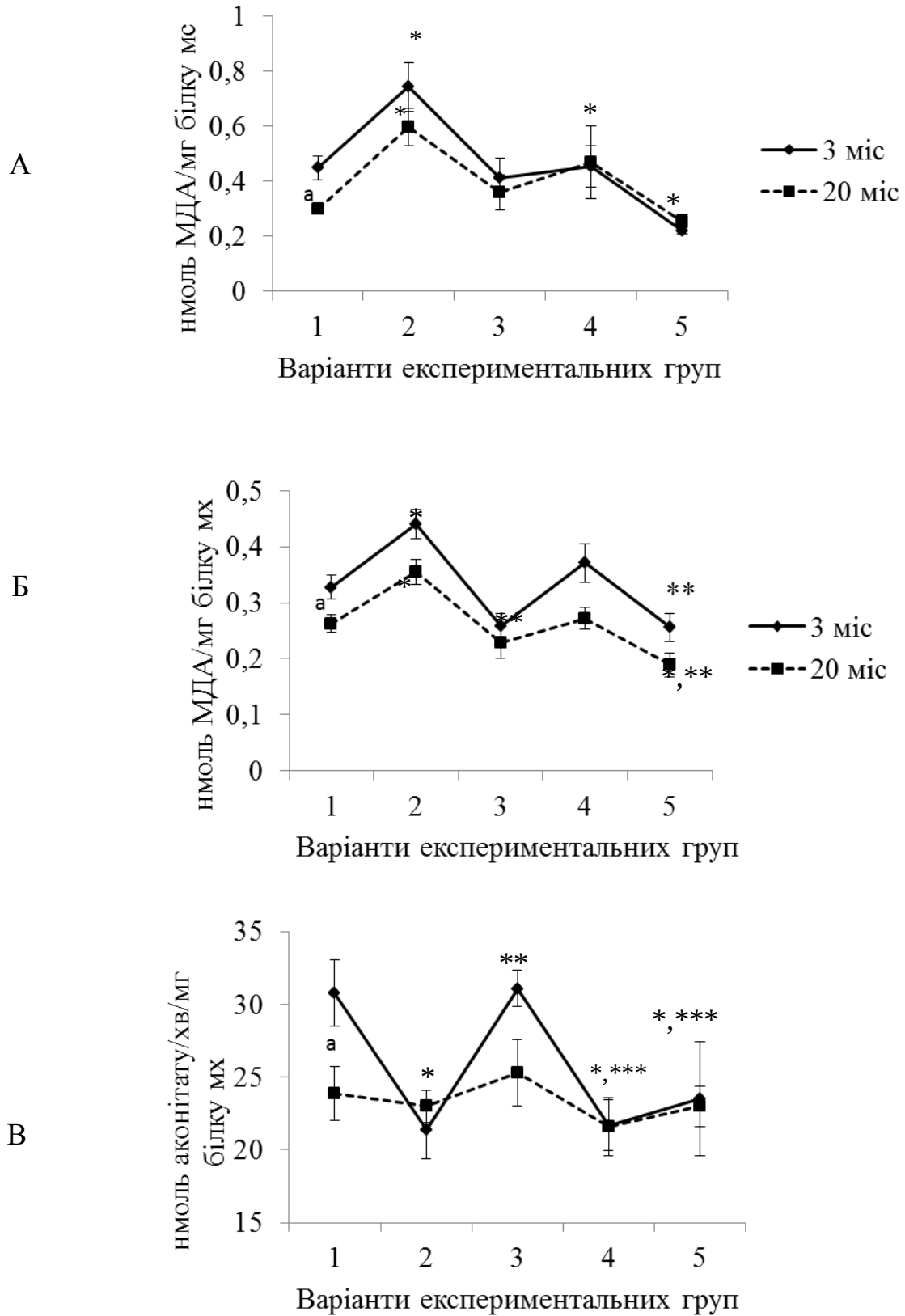


Рис. 3.1 Вплив циклічного режиму годування на вміст малонового діальдегіду і мікросомах (А), мітохондріях (Б) та активність аконітази (В) у мітохондріях печінки молодих і старих щурів (n=8)

Під час першого циклу обмеження харчування призводило до підвищення глутатіонпероксидазної активності на 141 %, далі при відгодовуванні відбувалося зниження активності відносно групи 3 на 43 %, проте залишалася на 37 % вище, ніж у контрольної групи тварин ($P < 0,05$) (Рис. 3.2А).

Друге обмеження харчування супроводжувалося більш вираженим збільшенням глутатіонпероксидазної активності на 250 % відносно групи 1 ($P < 0,05$). При подальшому відновленні маси тіла достовірного зниження показника не спостерігалось (Рис. 3.2А).

У старих тварин активність даного ферменту у відповідь на перше обмеження харчування, відновлення маси тіла і повторне обмеження харчування поступово зростала на 33 %, 87 % і 141 % відносно контролю відповідно ($P < 0,05$). На 2й цикл відновлення маси тіла активність ферменту дещо знижувалася, залишаючись достовірно вище рівня контрольних тварин (Рис. 3.2А). Виявлена більш висока активність Se-глутатіонпероксидази у піддослідних тварин 4 групи (друге обмеження харчування) може пояснювати низький рівень вмісту МДА в мх печінки цих щурів (Рис. 3.2Б).

При дослідженні активності Se-глутатіонпероксидази у цитозолі печінки, виявлено, що її активність у старих контрольних тварин була істотно вище, ніж у молодих щурів (на 132 %), ($P < 0,05$), (Рис. 3.2Б). У відповідь на ЦРГ активність Se-глутатіонпероксидази у цитозолі печінки молодих щурів при першому обмеженні харчування збільшувалася на 60 % ($P < 0,05$), знижуючись при першому відновленні м. т. на 28 % ($P < 0,05$). Друге обмеження харчування (група 4) приводило до більш вираженого збільшення глутатіонпероксидазної активності на 112 % відносно контролю (група 1) ($P < 0,05$). При подальшому відновленні маси тіла достовірного зниження досліджуваної активності не спостерігалось (Рис. 3.2Б).

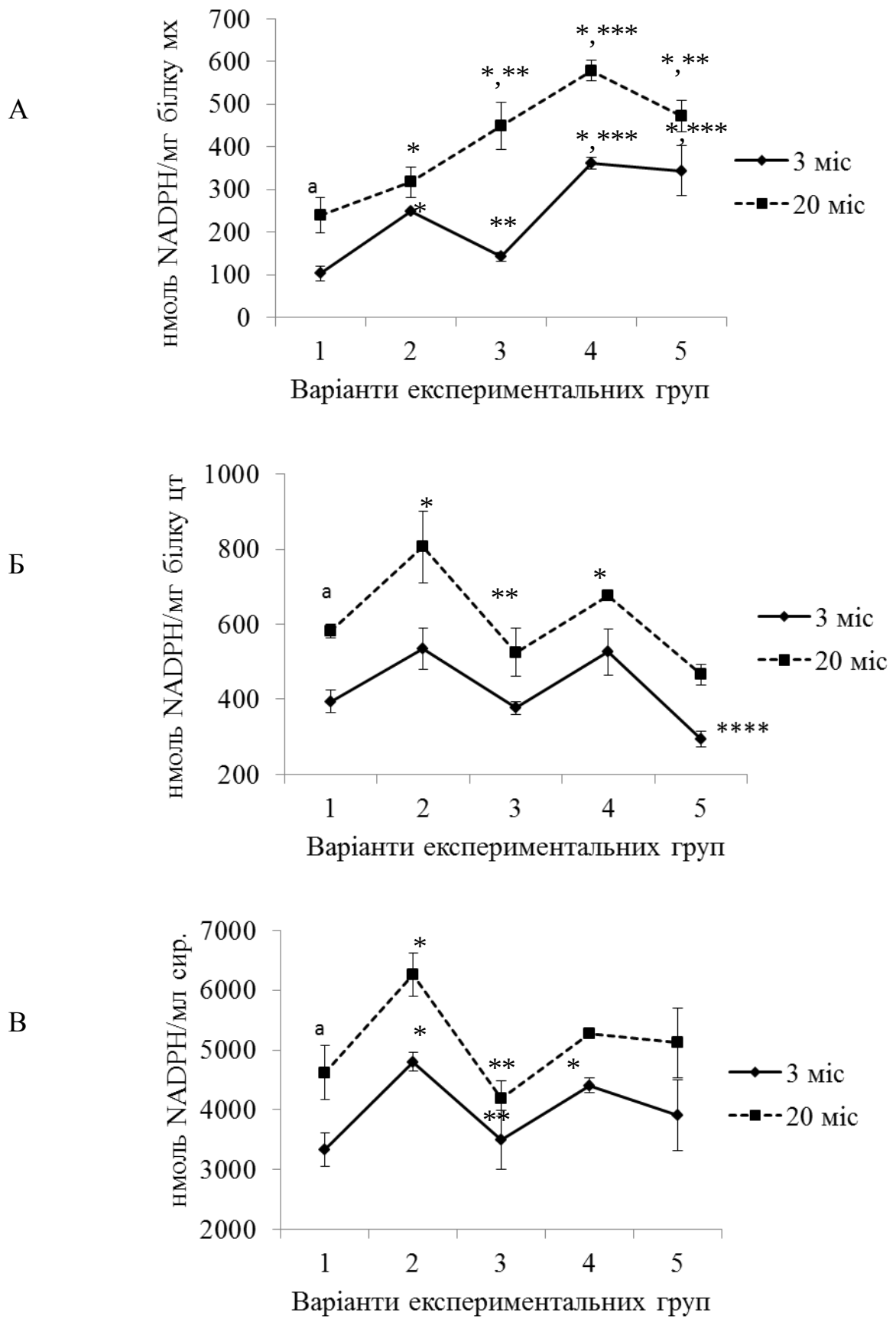


Рис. 3.2 Активність глутатіонпероксидази в мітохондріях (А), цитозолі (Б) печінки та сироватці крові (В) молодих та старих щурів при ЦРГ

У цитозолі печінки старих щурів глутатіонпероксидазна активність на перший цикл обмеження харчування і подальше відновлення маси тіла змінювалася схожим чином з молодими тваринами, але менш виражено (рис. 3.2Б). На противагу цьому на друге обмеження харчування досліджувана активність у цитозолі старих щурів достовірно знижувалася, а на другий цикл відновлення маси тіла (5 група) значно (на 99 %) ($P < 0,05$) зростала у порівнянні з активністю у щурів 4 групи (рис. 3.2Б).

У сироватці крові молодих і старих щурів Se-глутатіонпероксидазна активність, яка представлена в основному позаклітинної глутатіонпероксидазою 3 у 20-місячних щурів контрольної групи ця активність була вище на 39 %, ніж у 3 місячних ($P < 0,05$) (рис. 3.2В). Збільшуючись на перше обмеження харчування на 44 % і 34 %, при відновленні м. т. знижувалася на 27 % і 33 %, знову збільшуючись при повторному циклі на 26 % у молодих та старих тварин ($P < 0,05$). У відповідь на другий цикл відновлення маси тіла молодих і старих щурів глутатіонпероксидазна активність сироватки крові дещо знижувалася і достовірно не відрізнялася від активності у контрольній групі (рис. 3.2В).

Дослідження активності ферменту, що забезпечує глутатіонпероксидазу відновленням глутатіоном – глутатіонредуктази, показало, що активність цього фермента у мітохондріях клітин печінки старих контрольних щурів була достовірно нижче, ніж у молодих тварин (на 28,5 %) (Рис. 3.3А). Виявлене зниження глутатіонредуктазної активності в мітохондріях з віком, узгоджується з даними інших авторів [52, 226].

У відповідь на перше обмеження харчування, перше відновлення маси тіла і повторне обмеження харчування глутатіонредуктазна активність у мітохондріях варіювала у межах 10-15 % ($P > 0,05$), а далі при другому відгодовуванні, дещо знижувалася на 29 % відносно контрольної групи ($P > 0,05$).

У старих тварин у відповідь на ЦРГ глутатіонредуктазна активність у

мітохондріальній фракції клітин печінки достовірно не змінювалася (Рис. 3.3Б).

У цитозольній фракції у відповідь на циклічний режим харчування достовірних змін глутатіонредуктазної активності не виявлено (Рис. 4.3Б).

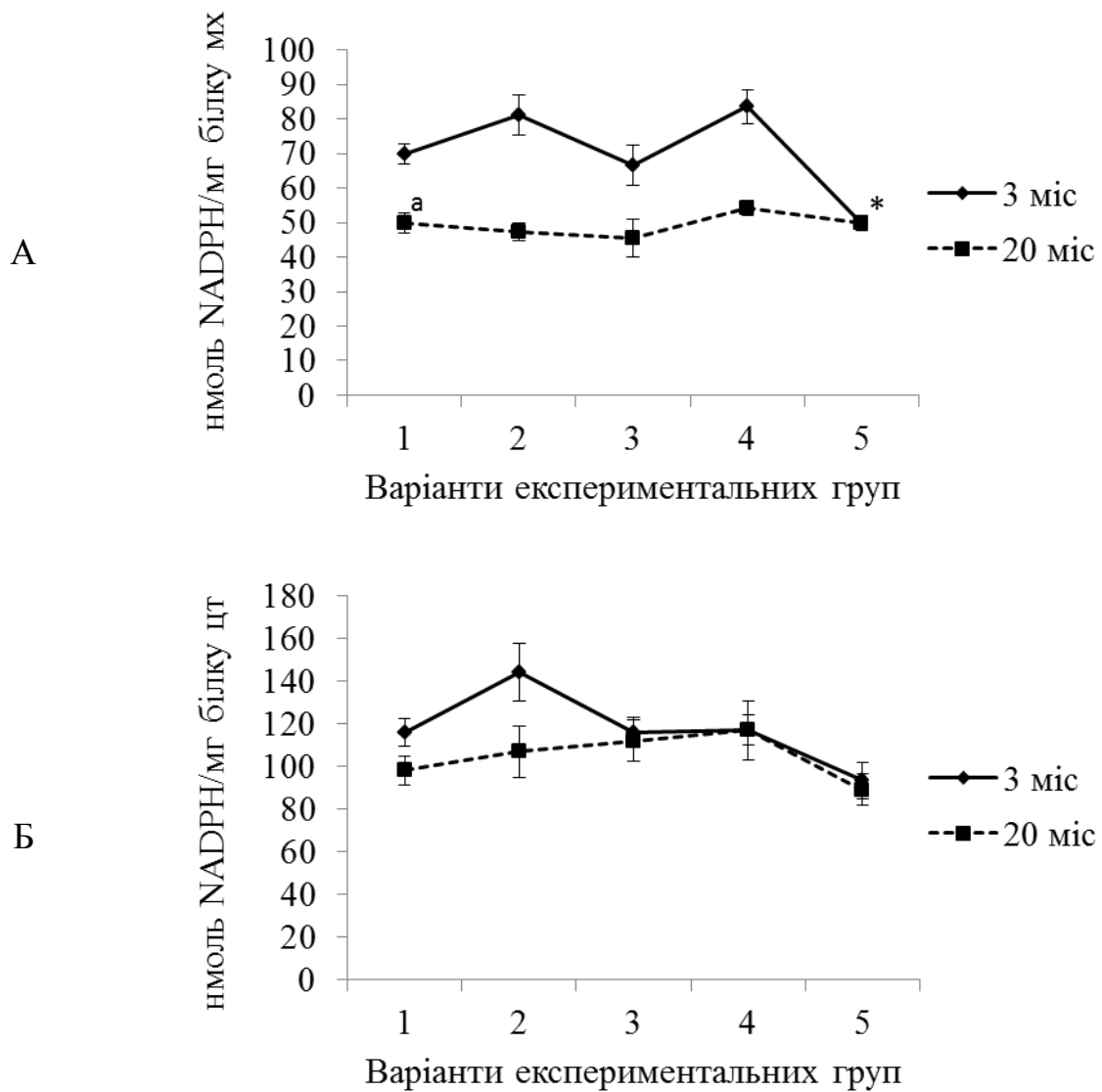


Рис. 3.3 Активність глутатіонредуктази у мітохондріях (А) та цитозолі (Б) печінки молодих та старих щурів при циклічному режимі годування

Активність системи ГР / ГП в основному залежить від рівня NADPH в клітині, який є одним з продуктів реакції, що каталізується NADP-ізоцитратдегідрогеназою, яка забезпечує окисне декарбоксилування

ізоцитрата до 2-оксоглутарата.

Дослідження активності NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ) – ферменту, що забезпечує відновленим NADPH глутатіонредуктази, дозволили встановити, що у мітохондріях печінки старих контрольних тварин активність цього ферменту була на 30 % вище, ніж у молодих щурів (Рис. 3.4А). Збільшення до 12-24 місячного віку щурів активності NADP-ІЦДГ у печінці виявлено також іншими авторами [52, 55].

Перше обмеження харчування приводило до 39 % зростання ($P < 0,05$) активності NADP-ІЦДГ у мітохондріях, а перше відновлення маси тіла – до зниження цієї активності до рівня контрольних тварин. При повторній втраті і відновленні м. т. активність цього ферменту достовірно не змінювалась (Рис. 3.4А).

У старих тварин у відповідь на ЦРГ вивчена активність варіювала в межах 10 % ($P > 0,05$). При цьому за абсолютними значеннями NADP- ІЦДГ активність старих тварин була вищою в усіх вивчених експериментальних групах тварин (Рис. 3.4А).

Активність іншого NADP-залежного ферменту-глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в мітохондріях клітин печінки контрольних молодих і старих щурів достовірно не відрізнялася.

У відповідь на перше обмеження харчування активність даного ферменту у молодих тварин знижувалася на 51 % ($P < 0,05$), а на перше відновлення маси тіла дещо збільшувалась (на 11 % відносно групи 2). При другому обмеженні харчування відбувалось повторне зниження активності зі значним її збільшенням при відгодовуванні (на 43 % відносно групи 4) ($P < 0,05$) (Рис. 3.4А).

У старих щурів глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність у мх печінки у відповідь на ЦРГ змінювалася в межах 5-10 % ($P > 0,05$).

Так, у молодих тварин глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в мх у відповідь на ЦРГ змінювалася протилежно активності NADP- залежної ІЦДГ. Так, у відповідь на перше обмеження харчування активність глюкозо-

6-фосфатдегідрогенази знижувалася в 1,7 рази в той час як активність NADP-залежною ІЦДГ збільшувалася в 1,4 рази ($P < 0,05$) (Рис. 3.4). Таким чином можна припустити, що у мітохондріях клітин печінки піддослідних тварин NADP- ІЦДГ є основним ферментом, що забезпечує глутатіонредуктазу відновленням NADPH.

Активність малатдегідрогенази у мітохондріях печінки молодих та старих тварин при ЦРГ достовірних змін не зазнала (Рис. 3.4Д).

Розглядаючи NADP- ізоцитратдегідрогеназну активність у цитозольній фракції було встановлено, що у молодих тварин ця активність на 28 % нижча, ніж у старих. У тварин обох вікових груп після обмеження харчування ця активність знижувалась (на 16 % у молодих та 25 % у старих тварин) ($P < 0,05$) (Рис. 3.4Б). Після першого відновлення маси тіла у 3 місячних щурів активність NADP-ІЦДГ у цитозольній фракції на 18 % перевищувала показники контрольної групи, а у старих сягала рівня контролю ($P < 0,05$). У другому циклі ЦРГ після другого обмеження харчування NADP-ІЦДГ активність знову знижувалася на 23 % у молодих та на 37 % у старих тварин ($P < 0,05$). Після другого періоду відновлення маси тіла показники NADP- ІЦДГ активність у цитозолі у обох вікових групах достовірно не відрізнялися від рівня контролю (Рис. 3.4Б).

Також виявлено, що у періоди обмеження харчування NADP- ІЦДГ активність у мітохондріальній та цитозольній фракції у молодих тварин змінюється зворотнім чином. Перше обмеження харчування приводило до 39 % зростання ($P < 0,05$) NADP- залежної ІЦДГ активності у мітохондріях та зниження на 16 % NADP- залежної ІЦДГ активності у цитозольній фракції (Рис. 3.4А, Б).

Активність Г-6-ФДГ та МДГ у цитозольній фракції клітин печінки була вище у молодих тварин (на 55 % та 66 % відповідно) ($P < 0,05$) (Рис. 3.4).

Під час переведення експериментальних тварин 3-місячного віку на циклічний режим годування активність NADP-глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у відповідь на перше обмеження харчування

відбувалося зниження досліджуваної активності на 84 %, а у відповідь на перше відновлення маси тіла це зниження становило 56 % ($P < 0,05$). При другому обмеженні харчування відбувалося дещо інтенсивніше зниження цієї активності на 86 % ($P < 0,05$), а під час другого відновлення маси тіла активність також залишалася нижче, ніж у групі контролю (Рис. 3.4Г). У старих тварин у відповідь на перше обмеження харчування активність NADP-глюкозо-6-фосфатдегідрогенази також знижувалася (на 47 %), але під час відновлення маси тіла досягла значень контрольної групи (Рис. 3.4Г). Друге обмеження харчування приводило до 52 % зниження активності, після чого у відповідь на друге відновлення маси тіла як і у першому циклі ЦРГ сягала контрольних значень (Рис. 3.4Г).

Активність малатдегідрогенази у мітохондріях клітин печінки достовірних змін не зазнала на усіх етапах ЦРГ (Рис. 3.4Д).

Активність малатдегідрогенази у цитозолі клітин печінки також знижувалася у відповідь на обмеження харчування у старих та у молодих тварин. У першому циклі експерименту це зниження становило 54 % у молодих та 56 % у старих відносно контрольної групи. Далі під час першого відновлення маси тіла активність цього ферменту залишалася зниженою у обох вікових групах (на 33 % та 25 % у молодих та старих тварин відповідно). При другому обмеженні харчування зміни були дещо більш вираженими ніж при першому циклі: зниження активності на 82 % у 3-місячних та на 64 % у 20-місячних. При другому відновленні маси тіла тварин активність малатдегідрогенази у цитозолі клітин печінки залишалася нижче (на 52 %) у молодих та достовірно не відрізнялася від контрольної групи у старих тварин (Рис. 3.4Є) [31-33, 39].

Також було проведено лонгітудінальне дослідження впливу цього режиму харчування. Були досліджені зміни маси тіла, маси печінки, температури тіла, концентрація глюкози у крові піддослідних тварин. Було показано, що у близько 60 % тварин, що переводили на ЦРГ у 3- та 20-місячному віці збільшувалася тривалість життя до 20 % у порівнянні з

контрольною групою тварин, що дає можливість припустити застосування цієї моделі харчування як геропротекторної для вивчення харчового імпринтингу, що формується на послідовні однотипні «трофічні» впливи та механізмів метаболічних змін, що відбуваються при збільшенні виживаності тварин різних вікових груп [32].

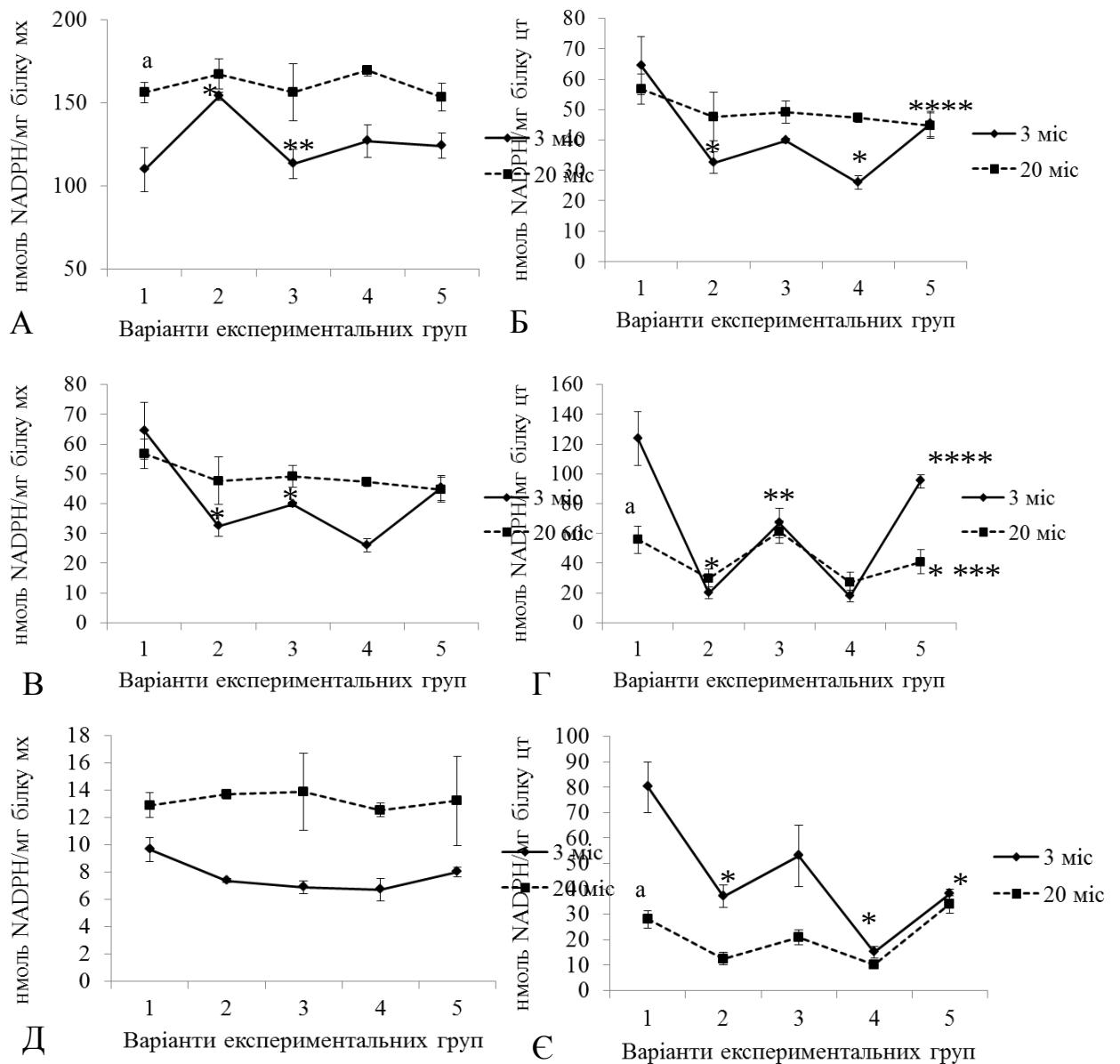


Рис. 3.4 Активність NADP-ізоцитратдегідрогенази у мітохондріях (А) та цитозолі (Б), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мітохондріях (В) та цитозолі (Г), малатдегідрогеназна у мітохондріях (Д) та цитозолі (Е) печінки молодих та старих щурів при циклічному режим годування

Виявлена динаміка змін активності ферментів, що забезпечують глутатіонредуктазу відновленим NADP в мітохондріях печінки дозволяє припустити, що NADP- залежна ІЦДГ є основним ферментом, що генерує NADPH при циклічному режимі годування, особливо при першому обмеженні харчування.

Тож встановлено, що при дослідженні прояву оксидативного стресу у молодих і старих тварин після 2-х послідовних циклів втрати і відновлення маси тіла виявлено, що вміст продуктів ПОЛ у мітохондріях печінки 3 міс. тварин був достовірно вище, ніж у 20 міс. щурів.

При циклічному режимі годування молодих та старих тварин вміст малонового діальдегіду у мітохондріях при першому обмеженні харчування зростає більшою мірою, а у другому циклі ЦРГ цей ефект має меншу вираженість. На перше і друге відновлення маси тіла вміст цих продуктів ПОЛ сягає рівня контролю. Втрата маси тіла і збільшення вмісту ПОЛ в мітохондріях супроводжувалося 30 % зниженням активності аконітази мітохондрій у молодих тварин, а у старих її активність залишалася незмінною. При повторному циклі втрати, відновлення маси тіла оксидативний стрес проявлявся в меншій мірі в порівнянні з першим циклом у молодих тварин і не проявлявся у старих тварин. Отже, оксидативний стрес при циклічному режимі годування проявлявся меншою мірою у старих тварин в порівнянні з молодими [39].

Se-глутатіонпероксидазна активність у мітохондріях печінки молодих щурів при першому та другому обмеженні харчування зростала, а на перше та друге відновлення маси тіла знижувалася до рівня норми. У старих щурів при першому та другому обмеженні харчування та подальшому відгодовуванні Se-глутатіонпероксидазна активність була вище рівня контрольних тварин. Глутатіонредуктазна активність у мітохондріях печінки старих щурів у відповідь на циклічний режим годування не змінилася, а у молодих тварин достовірно знижувалася лише на друге відновлення маси тіла.

Виявлено, що активність досліджених NADP-дегідрогеназ у мітохондріях печінки старих тварин при ЦРГ не змінювалася. У молодих родів NADP-ізоцитратдегідрогена активність була достовірно вищою при першому обмеженні харчування, а глюкозо-6-фосфатдегідрогіназна нижче при першому та другому обмеженні харчування та відгодовуванні.

Зміни активності прооксидантно-антиоксидантного балансу при циклічному режимі годування носять вік-залежний характер. Адаптивні реакції, що відбуваються впродовж 2 циклів втрати та набору маси тіла приводять до активації показників системи антиоксидантного захисту і цей механізм може бути застосований як спосіб активації захистних механізмів при корегуванні пошкоджень печінки, що спричинені активацією окисних механізмів, зокрема ПОЛ, що як показано у розділі 3 супроводжує Cu-індуковане ураження печінки [31, 32, 39].

3.2.2 Вплив циклічного режиму харчування на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу при Cu-індукованому ураженні печінки у молодих та старих щурів

Раніше було показано, що інтоксикація триразовим послідовним введенням експериментальним тваринам сублетальних доз сірчаноокислої міді супроводжувалася розвитком ураження печінки (в т.ч. фіброзні зміни), формування якого відбувалося на фоні окисного стресу (підрозділ 3. 1) [34]. Разом з цим виявлено можливість впливу на прооксидантно-антиоксидантний баланс за допомогою зміни режиму харчування (підрозділ 3. 2. 1), тож було зроблене припущення щодо можливості корегування цього патологічного стану печінки за допомогою дослідженого методу.

У даному циклі експериментів молоді та старі тварини були поділені на «контрольні» групи (що переводилися на циклічний режим годування) та «піддослідні» групи (ті, що перед переведенням на циклічний режим

годування отримували трикратно розчин сірчаноокислої міді у дозі LD₃₃ з інтервалом 48 годин).

Досліджуючи вміст малонового діальдегіду у тварин піддослідної групи та порівнюючи ці дані з результатами, отриманими у попередньому підрозділі про дію циклічного режиму годування на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у молодих та старих тварин у нормі, встановлено, що перша втрата маси тіла у молодих щурів, яким попередньо триразово вводили дози сірчаноокислої міді (далі «піддослідні») призводило до збільшення вмісту малонового діальдегіду у мітохондріях, кількісно подібному з результатами щурів, що не піддавалися дії міді, але отримували перше обмеження харчування на циклічний режим годування (далі «контрольні») (Рис. 3.5). Подальше відновлення маси тіла молодих піддослідних тварин призводило до зниження вмісту цих продуктів ПОЛ такою ж мірою, як і у контрольних щурів до рівня інтактних. Разом з тим, у відповідь на друге обмеження харчування збільшення вмісту малонового діальдегіду у мітохондріях печінки щурів, що попередньо отримували мідь, було більш вираженим, ніж у тварин у «контрольній» групі. Так, у відповідь на друге обмеження харчування у контрольних щурів вміст малонового діальдегіду збільшувався на 13 %, в той час як у піддослідних на 40 % ($P < 0,05$). Відновлення маси тіла у другому циклі супроводжувалося нормалізацією показника у піддослідних тварин і 22 % його зниженням відносно групи 1 у контрольних щурів ($P < 0,05$) (Рис. 3.5 А). У старих тварин, які попередньо отримували сірчаноокислу мідь, вміст малонового діальдегіду у відповідь на перший цикл втрати і відновлення маси тіла змінювалася подібним чином з показниками ПОЛ молодих щурів. Другий цикл втрати та відновлення маси тіла не супроводжувалося достовірними змінами вмісту малонового діальдегіду у щурів піддослідної групи, а значення контрольної групи у відповідь на друге відновлення маси тіла були на 28 % нижче відносно групи інтактних тварин (Рис. 3.5 Б).

У випадку інтоксикації сульфатом міді без застосування корегуючих засобів через 24 години після інтоксикації вміст малонового діальдегіду збільшувався на 30 % у молодих та на 112 % у старих щурів. Через 1 та 2 місяці після отримання доз сірчаною кислотою міді показники ПОЛ залишались підвищеними на 11 % і 15 % відповідно у молодих та на 54 % і 61 % ($P < 0,05$) у старих тварин (підрозділ 3.1, Табл. 3.2). Переведення на циклічний режим годування після інтоксикації сульфатом міді приводило до нормалізації показника у обох вікових групах (Рис. 3.5А, Б).

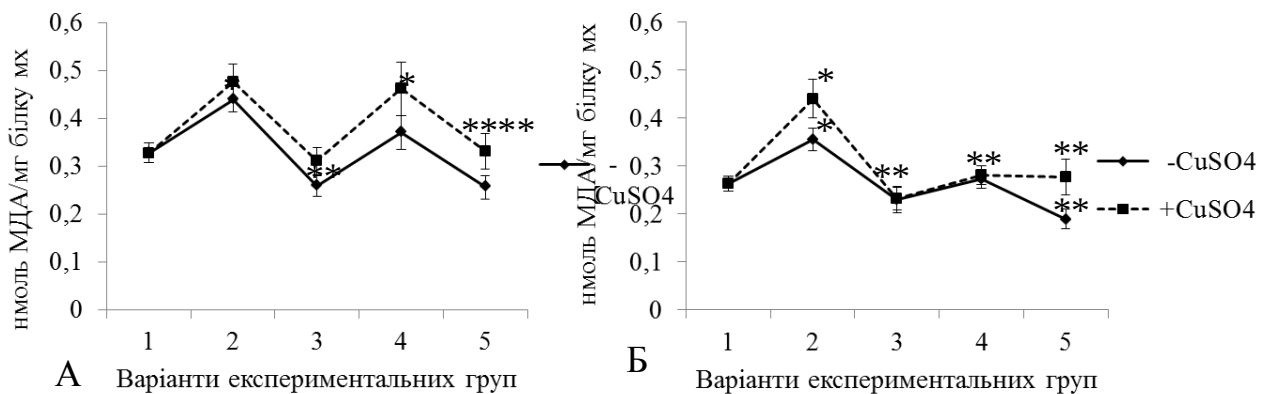


Рис. 3.5 Вплив циклічного режиму годування на вміст малонового діальдегіду у мітохондріях печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

Примітки: (тут і далі у підрозділі)

- 1 – контроль;
- 2 – група після 1го обмеження харчування ;
- 3 - група після 1 відновлення маси тіла ;
- 4- група після 2го обмеження харчування;
- 5 – група після 2го відновлення маси тіла;
6. *- $P < 0.05$ у порівнянні з 1 групою;
7. ** - $P < 0.05$ у порівнянні з 2 групою;
8. ***- $P < 0.05$ у порівнянні з 3 групою;
9. **** - $P < 0.05$ у порівнянні з 4 групою.

Активність аконітази у мітохондріях молодих тварин, що попередньо отримували дози $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ при першому обмеженні харчування знижувалась на 38 %, нормалізуючись після першого відновлення маси тіла (Рис. 3.6). У відповідь на друге обмеження харчування ця активність змінювалась так як при першому циклі, знижуючись на 24 % та досягаючи рівня норми після другого відновлення маси тіла (Рис. 3.6). У старих тварин зміни були більш вираженими. У відповідь на перше обмеження харчування активність Асо у мітохондріях знижувалася на 64 % відносно рівня інтактних тварин. Далі у старих тварин нормалізації вивченого показника не відбувалося. Впродовж першого відновлення м. т., другого відновлення м. т. та другого відновлення м. т. цей показник був знижений на 17 %, 45 % та 22 % відповідно ($P < 0,05$).

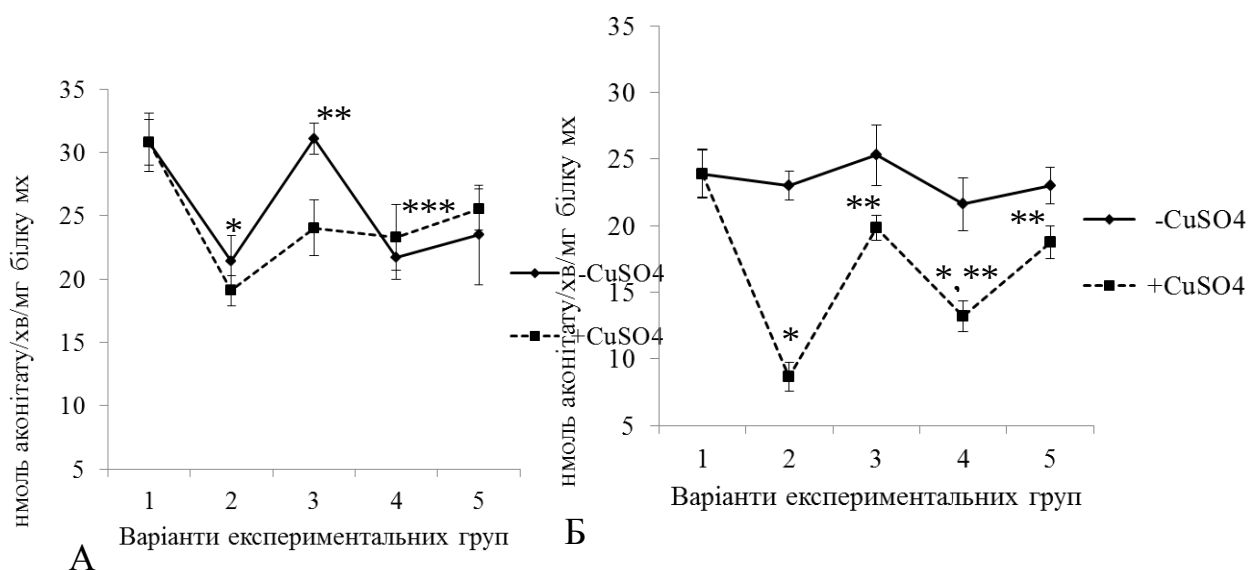


Рис. 3.6 Вплив циклічного режиму годування на активність аконітази у мітохондріях печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

При дослідженні змін, що відбуваються у нормі у відповідь на дію CuSO_4 через 24 години відбувалось зниження активності аконітатгідратази у мх печінки у молодих і старих тварин на 45 та 46 % відповідно ($P < 0,05$). Через 1 та 2 місяці відбувалось подальше зниження активності аконітази на 59 % та 56 % у молодих

та 71 % і 65 % у старих ($P < 0,05$). Тож за показником активності Асо у молодих тварин переведення на ЦРГ після дії сульфату міді призводить до нормалізації значення, а у старих до деякого пом'якшення інгібування активності цього ферменту (Рис. 3.6).

Проведені дослідження Se-глутатіонпероксидазної активності у мітохондріях клітин печінки дозволили встановити, що у молодих тварин, які попередньо отримували дози сірчаноокислої міді, перше обмеження харчування призводило до збільшення досліджуваної активності як у контрольних, так і у піддослідних щурів (на 141 % і 82 % відповідно) ($P < 0,05$). Відновлення маси тіла супроводжувалося достовірним зниженням досліджуваного показника щодо групи 2 у обох групах експериментальних тварин (Рис. 3.7). При повторному обмеженні харчування показники активності Se-глутатіонпероксидази демонстрували більш виражене збільшення в порівнянні з групою 2. У тварин, які отримували дози сірчаноокислої міді, активність була дещо нижчою, ніж у контрольних щурів, як при обмеженні харчування так і при відгодовуванні. При цьому зниження активності, яке мало місце при другому відгодовуванні у щурів, що отримували дози сірчаноокислої міді, у контрольній групі не спостерігалось.

При дослідженні Se- глутатіонпероксидазної активності у старих щурів з попереднім введенням доз сірчаноокислої міді варіабельності показника не виявлено. У той же час у контрольній групі протягом послідовних стадій втрати-відновлення та втрати маси тіла- активність цього ферменту поступово зростала (на 32,5 %, 87,4 % і 141 %) ($P < 0,05$), і тільки при другому відновленні м. т. знижувалася. У тварин, що отримували лише дози сірчаноокислої міді через 24 години після впливу сульфату міді активність цього фермента знижувалась на 20 % у молодих та на 21 % ($P < 0,05$) у старих. Через 1 та 2 місяці показники залишалися сталими як у молодих так і у старих щурів (підозділ 3.1, Табл. 3.3).

Виявлене збільшення активності Se- глутатіонпероксидази (Рис. 3.7), обумовлене обмеженням харчування у щурів, з попереднім введенням доз сірчаноокислої міді, узгоджується з даними про зміни вмісту МДА (Рис. 3.5). Тож стрес, що супроводжує обмеження харчування має стимулюючу дію на

глутатіонпероксидазну активність у мх клітин печінки, а вплив ЦРГ здатен нівелювати зміни глутатіонпероксидазної активності, що відбуваються при Cu-індукованому пошкодженні печінки. Також слід зазначити, що найбільш виражене підвищення Se- глутатіонпероксидазної активності в мх печінки щурів 4ї групи отримували дози сірчаноокислої міді, що узгоджується з даними про зміни вмісту МДА (Рис. 3.5).

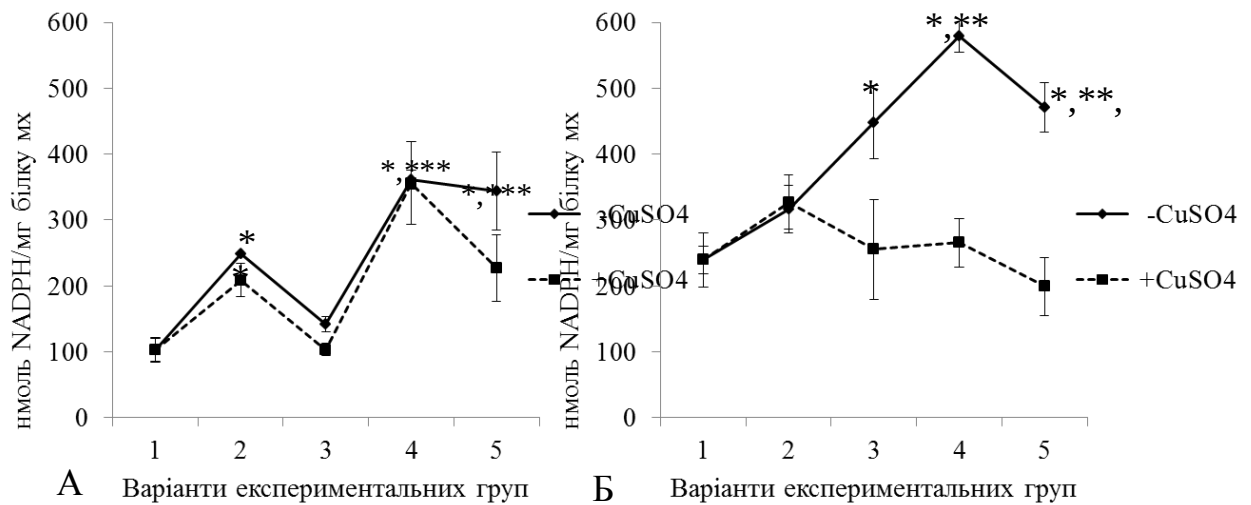


Рис. 3.7 Вплив циклічного режиму годування на активність Se-глутатіонпероксидази у мітохондріях печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

При вивченні глутатіонредуктазної активності у відповідь на перше обмеження харчування і відновлення маси тіла у молодих щурів, які попередньо отримували дози сірчаноокислої міді, спостерігалось зниження показника на 12 % і 40 % відповідно ($P < 0,05$), в той час як активність контрольної групи при обмеженні харчування підвищувалася на 16 % і нормалізувалася при відновленні м. т. (Рис. 3.8) ($P < 0,05$). Друге обмеження харчування призводило до підвищення досліджуваної активності у піддослідних тварин на 43 % щодо групи 3 ($P < 0,05$). При цьому активність глутатіонредуктази у групи тварин, що не отримували дози міді, також збільшувалася (на 20 %) ($P < 0,05$). У відповідь на друге відновлення маси тіла в обох експериментальних групах молодих щурів

спостерігалось зниження активності ГР на 30 % відносно контролю ($P < 0,05$). У старих щурів активність даного ферменту у піддослідній групі поступово знижувалася як при першому обмеженні харчування, так і при відновленні м. т. Повторне обмеження харчування супроводжувалося збільшенням на 15 % активності відносно групи 3 з нормалізацією показника при другому відновленні м. т. (Рис. 3.8) Зміни активності у тварин які не отримували дози сірчанокислої міді варіювали в межах 10 % ($P > 0,05$). Під дією лише сульфату міді активність глутатіонредуктази знижалась на 19 % у молодих ($P < 0,05$), а у старих достовірних змін не зазнавала. Через 1 та 2 місяці ці показники сягали контрольного рівня (підозділ 3.1, Табл. 3.3).

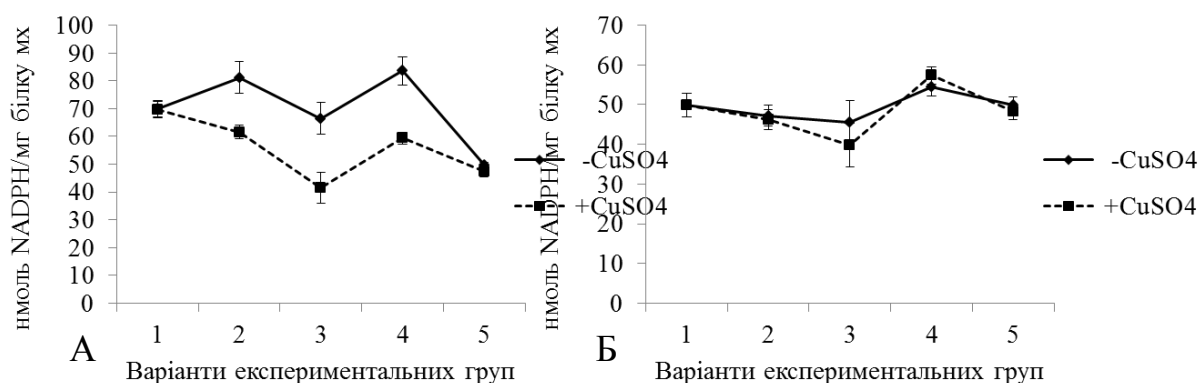


Рис. 3.8 Вплив циклічного режиму годування на активність глутатіонредуктази у мітохондріях печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді ($n=10-12$)

Активність ізоцитратдегідрогенази при першому обмеженні харчування достовірно підвищувалася в обох експериментальних групах, однак при відгодовуванні показники контрольних тварин досягали рівня інтактних щурів, а показники тварин, що отримували дози сірчанокислої міді залишалися на рівні другої експериментальної групи, підвищуючись в два рази при другому обмеженні харчування та дещо знижуючись (на 20 % щодо групи 4) при відновленні м. т. ПЦДГ активність контрольних тварин у відповідь на повторні впливи достовірно не змінювалася

(Рис. 3.9). Активність ІЦДГ у старих тварин обох груп змінювалася менш виражено, проте спостерігалось достовірне підвищення досліджуваного показника у тварин піддослідної групи. У відповідь на друге обмеження харчування, така ж особливість спостерігається і у молодих щурів (Рис. 3.9). У відповідь на дію сульфату міді через 24 години відбувалось зниження активності NADP-ізоцитратдегідрогенази на 28 % та 47 % ($P < 0,05$) (підрозділ 3, Табл. 3.4).

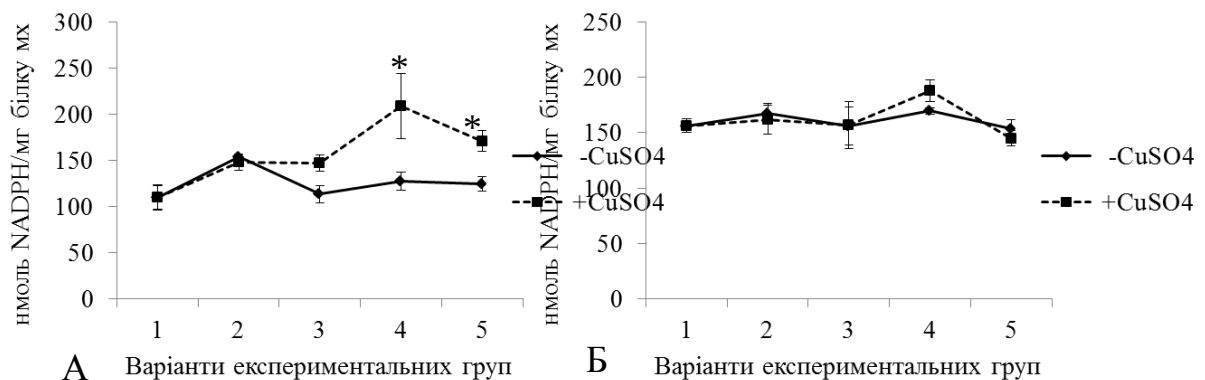


Рис. 3.9 Вплив циклічного режиму годування на активність NADP-ізоцитратдегідрогенази у мітохондріях печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

При дослідженні вмісту МДА у цитозолі печінки піддослідних щурів, виявлено, що у тварин обох вікових груп після проходження ЦРГ цей показник сягає значень інтактних тварин 3 та 20 місячного віку (Рис. 3.10).

При дослідженні ГП активності у цитозолі печінки виявлено, що у молодих тварин, які попередньо отримували дози сірчанокислої міді спрямованість змін досліджуваної активності при ЦРГ була подібна контрольним тваринам, але за абсолютною величиною достовірно нижче (Рис. 3.11).

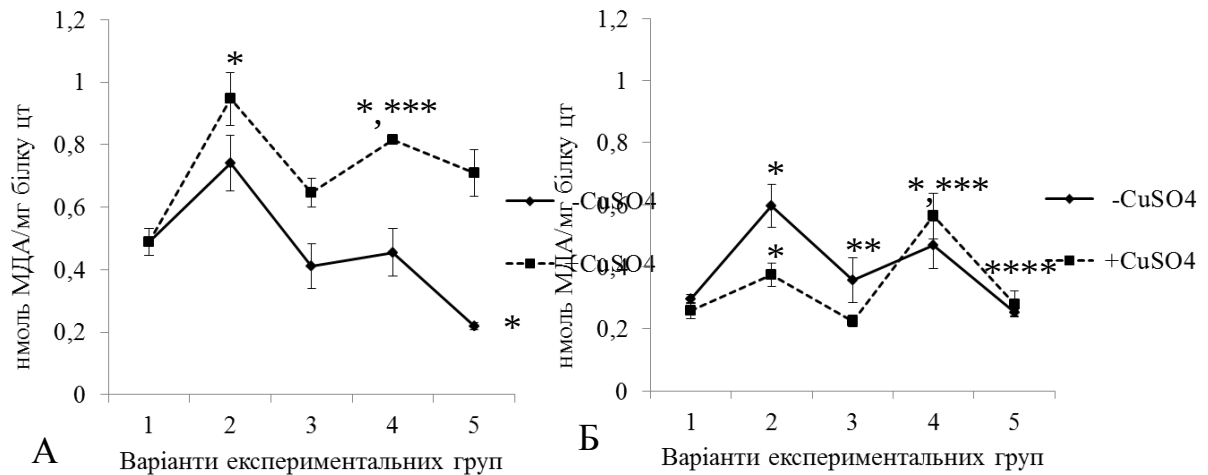


Рис. 3.10 Вплив циклічного режиму годування на вміст ТБК – активних речовин у цитозолі печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

У цитозолі печінки старих щурів отримували дози сірчаноокислої міді при першому обмеженні харчування (група 2) глутатіонпероксидазна активність значно знижувалася і ставала до 2 разів нижче активності контрольних тварин 2 групи. Надалі при першому відновленні м. т., другій втраті і другому відновленні м. т. досліджувана активність у цитозолі печінки контрольних та піддослідних тварин достовірно не відрізнялася.

У молодих піддослідних тварин у відповідь на перше обмеження харчування і подальше відновлення м. т. ГП активність у сироватці крові також достовірно не змінювалася. У відповідь на другу втрату м. т. досліджувана активність у крові піддослідних тварин дещо зростала і потім на другий цикл відновлення маси тіла знижувалася.

В цілому, у більшості експериментальних груп молодих і старих щурів, які попередньо отримували дози сульфату міді ГП активність у цт, мх печінки і сир. крові була нижче, ніж у контрольних тварин.

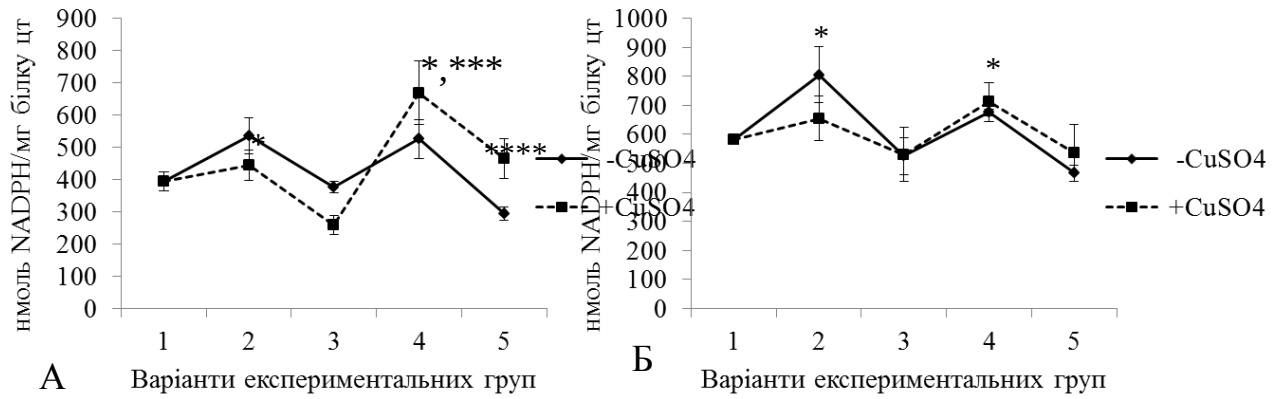


Рис. 3.11 Вплив циклічного режиму годування на активність Se-глутатіонпероксидази у цитозолі печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

Ізоцитратдегідрогеназна активність у цитозолі печінки молодих і старих тварин, що отримували дози сірчаноокислої міді у відповідь на ЦРГ змінювалася аналогічно активності контрольних щурів (Рис. 3.12). Після проходження циклічного режиму годування після інтоксикації сульфатом міді відбувалася нормалізація показника як у тварин обох вікових груп (Рис. 3.12).

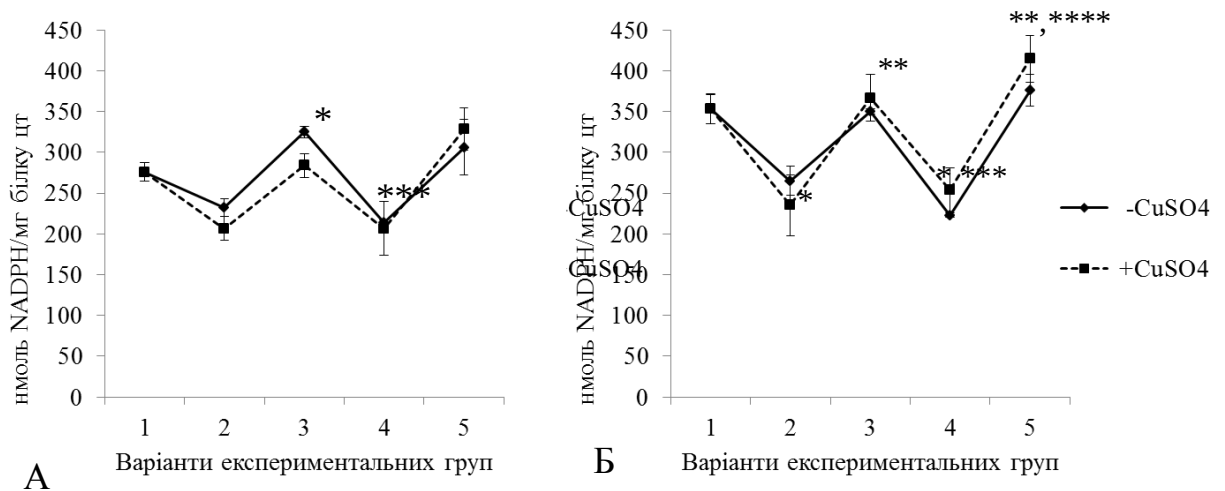


Рис. 3.12 Вплив ЦРГ на активність NADP-ізоцитратдегідрогенази у цитозолі печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12).

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність у цитозолі печінки молодих тварин, що отримували дози сірчаноокислої міді, при ЦРГ змінювалася аналогічно активності контрольних щурів.

У старих тварин, що отримували дози сірчаноокислої міді при першому відновленні м. т. і другій втраті м. т. спостерігалися більш виражені зміни досліджуваної активності (Рис. 3.13).

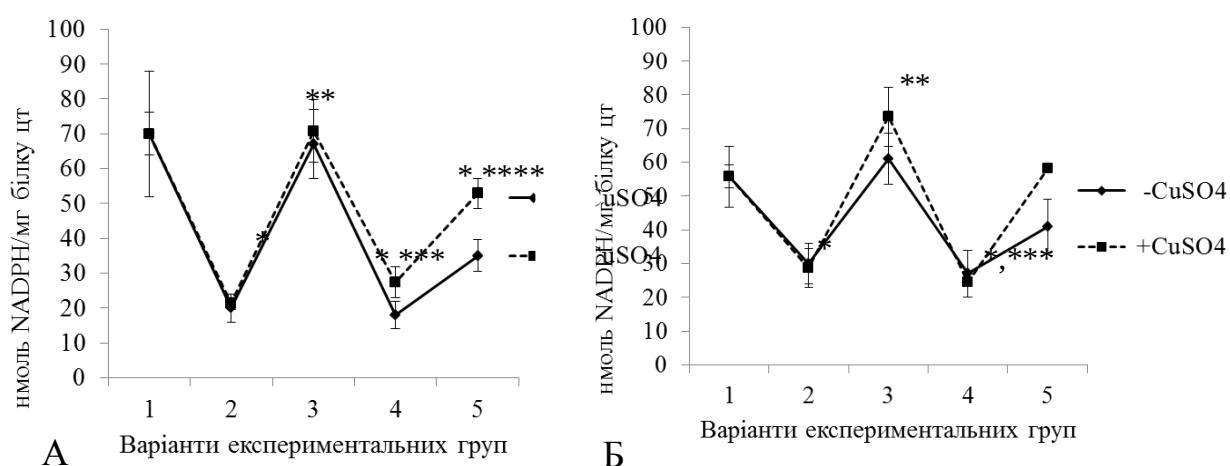


Рис. 3.13 Вплив циклічного режиму годування на активність NADP-глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у цитозолі печінки молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

Глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові молодих тварин, що отримували дози сірчаноокислої міді, після проходження циклічного режиму годування достовірно не відрізнялася від активності цього фермента у інтактних щурів (Рис. 3.14).

У відповідь на введення доз сірчаноокислої міді у старих щурів, яких не переводили на ЦРГ через 1 та 2 місяців активність цього ферменту залишалась зниженою на 26 % та 20 % відносно контрольної групи (P < 0,05) відповідно (Рис. 3.14).

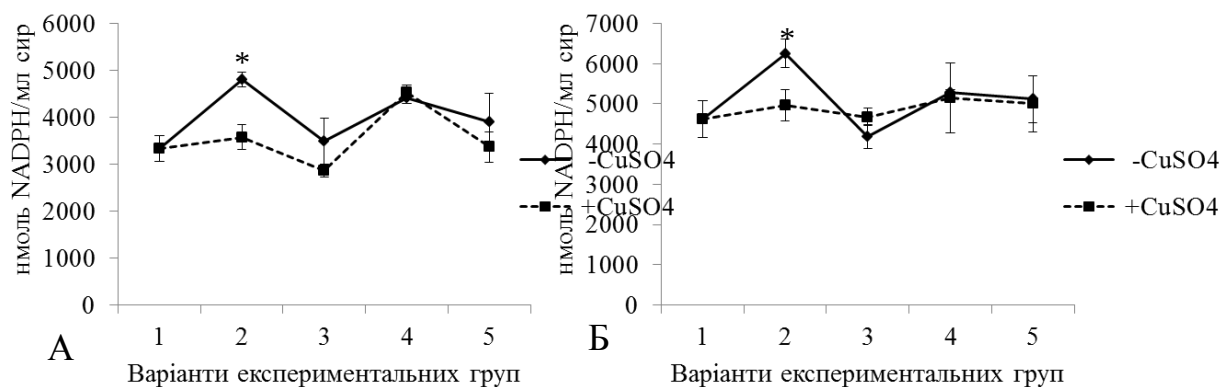


Рис. 3.14 Вплив циклічного режиму годування на активність Se-глутатіонпероксидази у сироватці крові молодих (А) і старих щурів (Б) в нормі та при попередній інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

Так показано, що зміни показників про-антиоксидантного балансу, що виникають під дією циклічного режиму годування виступають у ролі адаптивного процесу, який, завдяки своєму регуляторному впливу на інтенсивність процесів ПОЛ і модуляцію ферментативної активності, забезпечує можливість більш ефективної адаптації клітин до інтоксикації сульфатом міді. Після проходження двох циклів циклічного режиму годування з попереднім введенням доз сірчаноокислої міді у старих тварин нормалізується більшість вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу, а у молодих після проходження циклічного режиму годування після інтоксикації сульфатом купруму стан про-антиоксидантного балансу залишається дещо зрушеним у бік антиоксидантного потенціалу (вміст малонового діальдегіду у мітохондріях та мікросомах клітин печінки нижче рівня контролю, підвищена глутатіонпероксидазна активність у мітохондріях, цитозолі клітин печінки та сироватці крові та активність ізоцитратдегідрогенази у мітохондріях клітин печінки), що дає змогу припустити властивості циклічного режиму годування як підходу, що може розглядатися у якості функціонального антидоту при інтоксикації сульфатом міді [31, 33].

3. 3 Вік-залежний вплив комплексу «Мікс-фактор» та комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді

Більшість патологій, спричинених інтоксикацією, тією чи іншою мірою пов'язані з проявом оксидативного стресу. Використовуючи ендогенні та екзогенні антиоксиданти можна регулювати прояви оксидативного стресу і, як слідство, усунути патології. Крім того, істотне зниження вільнорадикальних процесів у організмі також може призвести до негативних метаболічних ефектів, оскільки продукти вільнорадикальних реакцій виконують фізіологічно важливу функцію сигналіngu. Тому для модуляції антиоксидантної та антиоксидантної функцій необхідно використовувати збалансовані природні регуляторні комплекси речовин. Такий комплекс був розроблений у НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна - «Мікс-фактор» (або Фунгідол [29, 34, 35, 37]). «Мікс-фактор» - це природний комплекс низькомолекулярних компонентів, що представлений вільними амінокислотами, поліпептидами, низькомолекулярними білками, низькомолекулярними вуглеводами, вітамінами і мікроелементами.

Так необхідно було з'ясувати вплив комплексу «Мікс-фактор» на стан про-антиоксидантного балансу з метою визначення можливості його застосування для модуляції антиоксидантної функції при порушеннях про-антиоксидантного балансу, що спостерігається при гепатотоксичних впливах.

3. 3. 1 Вплив застосування комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді

Відомо, що в тканинах більшості грибних організмів міститься

комплекс водо- і жиророзчинних речовин, що має виражену антиоксидантну дію. Низька токсичність, здатність стабілізувати один одного і проявляти синергічний ефект свідчать про доцільність їх вивчення в якості можливих геро- та гепатопротекторів антиоксидантної дії.

У дослідженні було перевірено вплив комплексу низькомолекулярних компонентів «Мікс-фактор», що складається з компонентів клітин *Sacharomyces cerevisiae* и *Pleurotus ostreatus* на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу [29, 34, 35].

Для комплексу «Мікс-фактор» (склад: олігосахариди (66 %), низькомолекулярні білки (мол.маса < 20 кДа, 23 %), ліпіди (10 %), амінокислоти (валін становить 13 %, цистеїн – 16 %, метіонін – 11 %, лейцин – 10 %, аргінін – 4 %, ізолейцин – 4 %, треонін – 3 % і лізин - 1% всіх амінокислот) та вітамінів (В1 - 0,38 мг / л, В2 - 3,24 мг / л і РР - 8,3 мг / л). У дослідженнях, проведених у 2012-2013 р. у НДІ біології імені В. Н. Каразіна було встановлено, що «Мікс-фактор» (або Фунгідол) має антирадикальні та антитоксичні властивості у системі *in vitro* [29].

3.3.1.1 Вплив комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у молодих і старих щурів

Під час дослідження дії комплексу «Мікс-фактор» на стан прооксидантно-антиоксидантного балансу виявлено, що триразове з інтервалом 24 години пероральне введення щурам комплексу у дозі в дозі 4 мг / 100 г маси тіла (дозування було підібране у попередньому підготовчому експерименті). Результати показані після забою тварин через 24 години після останнього введення «Мікс-фактора») приводить до 12 % зниження вмісту малонового діальдегіду у сироватці крові 3-місячних тварин та до 28 % ($P > 0,05$) у 20-місячних. Це зниження продуктів ПОЛ відбувається на фоні 14 % підвищення активності Se-глутатіонпероксидази у молодих та 24 % ($P < 0,05$) підвищення цієї активності у старих щурів (Табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Вміст малонового діальдегіду та активність Se-глутатіонпероксидази у сироватці крові при застосуванні комплексу «Мікс-фактор» на 3- та 20-місячних щурів (n=10-12)

Показник	вік	контроль	«Мікс-фактор»
Вміст МДА (нмоль МДА/ мл сироватки)	3 міс	4,43, $\pm 0,36$	3,90 $\pm 0,34$
	20 міс	2,93 $\pm 0,51^a$	2,12 $\pm 1,03$
ГП (нмоль NADPH/хв·мл сироватки)	3 міс	3587,4 $\pm 258,4$	4113,2 $\pm 69,8^*$
	20 міс	5925,6 $\pm 423,3^a$	7389,3 $\pm 463,7^*$

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Схожі зміни відбуваються також у мітохондріях печінки. Вміст МДА у цих органелах знижується на 25 % у молодих та на 26 % у старих тварин ($P < 0,05$). Натомість Se-ГП активність дещо підвищується – на 8 % у молодих та залишається сталою у старих щурів.

Активність лімітуючого ферменту циклу Кребса – аконітатгідратази при застосуванні «Мікс-фактора» у молодих тварин залишається сталою, а у старих зростає на 78 %. Зростання активності цього ферменту може бути пов'язане з вмістом заліза у складі комплексу, що входить до складу активного центра ферменту (Табл 3.14).

Таблиця 3.14

Вміст малонового діальдегіду та активність аконітази у мітохондріях печінки при застосуванні комплексу «Мікс-фактор» на 3- та 20-місячних щурів (n=10-12)

Показник	вік	контроль	«Мікс-фактор»
Вміст МДА в МХ (нмоль МДА/мг білку МХ)	3 міс	0,257 $\pm 0,023$	0,193 $\pm 0,024^*$
	20 міс	0,159 $\pm 0,011^a$	0,119 $\pm 0,014^*$

Продовження таблиці 3.14

Асо в МХ (нмоль аконітату/хв мг білку мх)	3 міс	27,90±0,68	27,74±0,08
	20 міс	28,40±3,20	50,50±6,30*

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Активність глутаредоксину залишається сталою у молодих тварин, дещо знижуючись у старих на 16 % ($P < 0,05$). Активність глутатіонредуктази у мітохондріальній та цитозольній фракціях не зазнає достовірних змін під час вживання комплексу «Мікс-фактор» (Табл. 3.15).

Натомість дещо змінюється активність Se-глутатіонпероксидази та вміст МДА у цитозольній фракції клітин печінки. Так активність цього ферменту під час вживання «Мікс-фактора» підвищується на 19 % у молодих та на залишається у рамках контролю у старих ($P < 0,05$) (Табл. 3.16).

Таблиця 3.15

Активність глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів у мітохондріях печінки при застосуванні комплексу «Мікс-фактор» у 3- та 20-місячних щурів (n=10-12)

Показник	вік	контроль	«Мікс-фактор»
ГП у МХ (нмоль NADPH/хв· мг білку мх)	3 міс	94,3±4,5	102,0±7,8
	20 міс	391,7±27,2 ^a	384,1±34,8
Grx в МХ (нмоль NADPH /мг білку мх)	3 міс	3,01 ±0,26	3,08±0,30
	20 міс	8,30±0,50 ^a	7,14±0,33*
ГР в МХ (нмоль NADPH /мг білку мх)	3 міс	33,1±2,5	35,2±2,7
	20 міс	21,1±2,1 ^a	25,0±1,0

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Таблиця 3.16

Вміст малонового діальдегіду та активність глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів у цитозолі печінки при застосуванні комплексу «Мікс-фактор» у 3- та 20-місячних щурів (n=10-12)

Показник	вік	контроль	«Мікс-фактор»
Вміст МДА в ЦТ (нмоль МДА/мг білку цт)	3 міс	0,106±0,013	0,135±0,012*
	20 міс	0,114±0,010	0,152±0,029*
ГП у ЦТ (нмоль NADPH/хв· мг білку цт)	3 міс	336,9±49,3	401,6±65,5*
	20 міс	607,7±41,8 ^a	635,7±36,9
ГР ЦТ (нмоль NADPH /мг білку цт)	3 міс	109,6 ±13,1	103,8 ±27,4
	20 міс	68,2 ±8,2 ^a	71,8 ±8,9

Примітка: * - P <0,05 у порівнянні з контролем

Тож можна припустити, що компоненти комплексу «Мікс-фактор» мають антиоксидантні властивості та здатні знижувати вміст продуктів ПОЛ та сприяти деякому підвищенню ГП активності у крові та печінці щурів. Порушення балансу, насамперед, за цими показниками спостерігалось при індукції Cu –індукованого пошкодження печінки. Тому у наступних експериментах було визначено дію комплексу «Мікс-фактор» на показники про-антиоксидантного балансу при Cu –індукованому ураженні печінки [37].

3.3.1.2 Вплив тривалого (12 місяців) застосування комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу печінки і крові щурів, що старіють

При дослідженні впливу тривалого застосування комплексу «Мікс-фактор» [34, 35] на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу

печінки та крові 33-місячних щурів було встановлено, що вміст малонового діальдегіду у мітохондріях печінки та крові, який зростає з віком контрольних тварин, у відповідь на введення комплексу не відрізнявся від рівня у 12-місячних, контрольних тварин та був достовірно нижче рівня контрольних 33-місячних щурів (Табл. 3.17).

Таблиця 3.17

Вплив тривалого (12 місяців) застосування комплексу «Мікс-фактор» на вміст показники про-антиоксидантного балансу у печінці та крові щурів, що старіють (n = 8)

Вік щурів, міс	Варіанти дослідів	
	Контроль	«Мікс-фактор»
Вміст малонового діальдегіду у мітохондріях печінки, нмоль МДА/мг білка		
12	0,238 ± 0,008	—
33	0,298 ± 0,013*	0,216 ± 0,018**
Вміст малонового діальдегіду у сироватці крові, нмоль МДА/мл		
12	2,54 ± 0,08	—
33	3,59 ± 0,39*	2,56 ± 0,19**
GP активність у мітохондріях печінки, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	175,3 ± 6,2	—
33	132,7 ± 16,4*	159,3 ± 12,1
GP активність у ЦТ фракції печінки, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	655,8 ± 59,0	—
33	472,9 ± 53,6*	640,1 ± 110,3
GP активність в еритроцитах, мкмоль NADPH/хв·мг білка		
12	2,27 ± 0,25	—
33	1,58 ± 0,14*	1,99 ± 0,14
GP активність у плазмі крові, мкмоль NADPH/хв·мл		
12	5,67 ± 0,36	—
33	4,09 ± 0,34*	5,87 ± 0,25**

Примітки:

1.* – P < 0,05 відносно 12-місячного контролю

2. ** – P < 0,05 відносно 33-місячного контролю

Однією з причин встановлених змін вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів у печінці та крові з віком та за умов тривалого застосування комплексу «Мікс-фактор» можуть бути зміни глутатіонпероксидазної активності у тканинах, що досліджувалися.

Так дослідження показало, що у 33-місячних контрольних щурів спостерігалось достовірне зниження глутатіонпероксидазної активності у мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки, еритроцитах і сироватці крові у порівнянні з рівнем активності 12-місячних щурів.

За умов тривалого застосування комплексу «Мікс-фактор» глутатіонпероксидазна активність печінки та крові старих щурів зберігалась на рівні активності дорослих, 12-місячних, контрольних тварин (Табл. 3.17).

Такі зміни вмісту малонового діальдегіду і глутатіонпероксидазної активності в досліджених тканинах у відповідь на застосування «Мікс-фактора» якісно узгоджуються зі змінами цих показників, виявленими за умов застосування калорійно обмеженої дієти, яка, як відомо, призводить до вірогідного уповільнення старіння експериментальних тварин [44, 241, 242].

Дослідження ГР активності у цт фракції печінки контрольних щурів спостерігалася тенденція до зниження з віком тварин ГР активності (на 15 %), яка нівелювалася за умов тривалого введення комплексу «Мікс-фактор» (Табл. 3.18).

З усіх досліджених активностей NADP-дегідрогеназ (глюкозо-6-фосфат-, малат- та ізоцитратдегідрогеназ) у цитозольній фракції лише активність малатдегідрогенази постмітохондріальної фракції печінки виявила істотне зниження у 33 міс. щурів (Табл. 3.19).

Таблиця 3.18

**Вплив тривалого застосування комплексу «Мікс-фактор» на
глутатіонредуктазну та NADP-редуктазну активності у мітохондріях
печінки щурів, що старіють (n = 8)**

Вік щурів, міс	Варіанти дослідів	
	Контроль	«Мікс-фактор»
Глутатіонредуктазна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	23,03 ± 2,83	—
33	19,70 ± 0,95	19,55 ± 1,63
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	31,8 ± 7,4	—
33	31,1 ± 3,8	25,5 ± 4,1
Ізоцитратдегідрогеназна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	306,0 ± 29,0	—
33	325,5 ± 20,6	308,1 ± 28,1
Малатдегідрогеназна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	4,03 ± 0,67	—
33	3,61 ± 0,74	3,93 ± 1,05

Так одержані дані свідчать, що тривале застосування комплексу «Мікс-фактор» призводить до уповільнення накопичення продуктів вільнорадикального окислення ліпідів у крові та печінці піддослідних щурів.

При цьому виявлено, що глутатіонпероксидазна активність мітохондріальної, постмітохондріальної фракцій печінки, еритроцитів і плазми крові у контрольних 33-місячних щурів вірогідно знижувалась, а у піддослідних дуже старих тварин залишалась на рівні значень, які є характерними для дорослих, 12-місячних, щурів.

Таблиця 3.19

Вплив тривалого застосування комплексу «Мікс-фактор» на NADP-редуктазну та активності NADP-дегідрогеназ активності у цитозольній фракції печінки щурів, що старіють (n = 8)

Вік щурів, міс	Варіанти досліджу	
	Контроль	«Мікс-фактор»
Глутатіонредуктазна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	86,1 ± 2,9	—
33	73,6 ± 5,4 ^{**}	86,5 ± 6,0
Малатдегідрогеназна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	69,1 ± 9,6	—
33	40,4 ± 5,8 [*]	37,3 ± 8,7 [*]
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	72,3 ± 15,6	—
33	77,1 ± 7,6	72,6 ± 18,4
Ізоцитратдегідрогеназна активність, нмоль NADPH/хв·мг білка		
12	252,0 ± 34,9	—
33	263,4 ± 22,2	233,8 ± 50,9

Примітки:

1. * – $P < 0,05$ відносно 12-місячного контролю
2. ** – $0,05 < P < 0,1$ відносно 12-місячного контролю.

Також встановлено, що глутатіонпероксидазна активність у мітохондріальній і постмітохондріальній фракціях клітин печінки, еритроцитах і плазми крові у контрольних 33-місячних щурів достовірно знижувалася, а у піддослідних дуже старих тварин залишалася на рівні значень, характерних для дорослих, 12-місячних, щурів.

Активність інших вивчених антиоксидантних ферментів

(глутатіонредуктази та NADP- дегідрогеназ) у мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки 33-місячних піддослідних щурів достовірно не відрізнялась від рівня активності у контрольних тварин.

3.3.1.3 Вплив комплексу «Мікс-фактор» на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих щурів

Проведені дослідження показників прооксидатного потенціалу в мітохондріях печінки молодих щурів дозволили встановити, що у відповідь на 3х кратне введення тваринам розчину сірчаноокислої міді вміст малонового діальдегіду збільшувався на 30 %. В мітохондріях клітин печінки старих 20-місячних тварин введення сірчаноокислої міді призводило до більш вираженого збільшення вмісту цих продуктів ПОЛ. Так у цьому випадку вміст малонового діальдегіду у 20-місячних піддослідних щурів був на 112 % вищим, ніж у контрольних тварин (Табл. 3.19). Виявлена більш виражена активація ПОЛ у старих тварин, які отримували CuSO_4 , якісно узгоджується з раніше отриманими у НДІ біології даними при дослідженні короточасної дії на проксидантно-антиоксидантний баланс щурів ряду стресових факторів (3х-денного повного голодування, гострого охолодження і подальшого самозігрівання, тотальної ішемії, ішемії-реперфузії, введення актиноміцину Д, тироксину, тетрахлорметану, NG - нітро - L-аргініну, тетрацикліну, парацетамолу та фенобарбіталу [52].

Трикратне введення комплексу «Мікс-фактор» (або Фунгідол) після інтоксикації CuSO_4 сповільнювало збільшення вмісту малонового діальдегіду в мітохондріях молодих і старих тварин (на 19 % і 38 % відповідно) (Табл. 3.20).

Подібні зміни вмісту цих продуктів ПОЛ виявлено і у тварин, що 3 рази отримували «Мікс-фактор» після 3х-кратного введення сірчаноокислої міді. Разом з тим слід зазначити, що у молодих щурів при введенні

комплексу «Мікс-фактор» до та після інтоксикації сульфатом міді, вміст малонового діальдегіду у мітохондріях печінки нормалізувався, а у старих тварин залишався дещо вище рівня контролю (Табл. 3.20).

Таблиця 3.20

Вплив комплексу «Мікс-фактор» на вміст малонового діальдегіду, активність аконітази у мітохондріях печінки молодих і старих щурів щурів при інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

Показник	вік	контроль	CuSO ₄	Мікс-ф.+ CuSO ₄	CuSO ₄ + Мікс-ф.
Вміст МДА в МХ (нмоль МДА/мг білку МХ)	3 міс	0,257 ±0,023	0,333 ±0,021*	0,284 ±0,025**	0,277 ±0,039**
	20 міс	0,159 ±0,011 ^a	0,337 ±0,023*	0,277 ±0,090 *,**	0,214±0,01 *,**,***
Асо в МХ (нмоль аконітату/хв·мг білку МХ)	3 міс	27,9±0,7	14,6±1,8*	21,6±2,9 **	18,45±1,2*
	20 міс	28,4±3,2	15,8±2,9*	23,9±3,9**	23,1±3,7**

Примітки:

1. * – P <0,05 у порівнянні з контролем
2. ** – P <0,05 у порівнянні з групою CuSO₄
3. ***– P <0,05 у порівнянні з групою Мікс-фактор+ CuSO₄

Виявлене суттєве уповільнення накопичення продуктів ПОЛ при застосуванні «Мікс-фактора» до та після введення доз сірчаноокислої міді може пояснюватися описаною у попередніх підрозділах здатністю цього біологічно-активного комплексу проявляти властивості стимулювання антиоксидантного потенціалу.

Виявлено, що 3х-кратне введення «Мікс-фактора» щурам знижувало вміст малонового діальдегіду у мітохондріях печінки молодих тварин на 25 %, а у старих на 25 % в порівнянні з контролем (Табл. 3.20).

Дослідження іншого показника, що характеризує стан прооксидантного потенціалу мітохондрій печінки - активності мітохондріальної аконітази дозволило встановити, що у відповідь на 3х-кратне введення щурам доз сірчаноокислої міді, аконітазна активність значно знижувалася. Так, у молодих тварин досліджувана активність була нижчою на 48 %, а у старих - на 44 %, ніж у контрольних щурів відповідного віку.

Застосування «Мікс-фактора» до впливу сульфату міді нормалізувало аконітазну активність у мітохондріях клітин печінки у молодих і старих тварин (Табл. 3.20).

На відміну від попереднього введення доз сірчаноокислої міді і «Мікс-фактора», 3х-кратне введення «Мікс-фактора» після 3х-кратного введення доз сірчаноокислої міді молодим щурам не приводило до істотного уповільнення зниження аконітазної активності у мітохондріях молодих тварин. Наряду з цим у старих щурів введення комплексу нормалізувало активність досліджуваного ферменту після введення доз сірчаноокислої міді. Тож 3-кратне введення «Мікс-фактора» молодим щурам істотно не впливало на аконітазну активність у мітохондріях печінки, а у старих - призводило до нормалізації дослідженого показника (Табл. 3.20).

В цілому, аналізуючи дані про стан прооксидантно потенціалу в мітохондріях печінки молодих і старих тварин, можна зробити висновок, що у відповідь на введення доз сірчаноокислої міді вміст малонового діальдегіду значно збільшувався, а аконітазна активність пропорційно знижувалася. При спільному введенні «Мікс-фактора» до інтоксикації сульфатом міді або введення «Мікс-фактора» після впливу сульфату міді зміни обох досліджуваних показників, що характеризують прооксидантний потенціал мітохондрій, пропорційно сповільнювалися. Проведені дослідження глутатіонпероксидазної активності у мітохондріях печінки щурів дозволили встановити, що введення тваринам доз сірчаноокислої міді призводило до зниження досліджуваної активності Se-глутатіонпероксидази у мітохондріях

у молодих щурів на 19,5 % ($P < 0,05$), а у старих на 21,2 % ($0,1 > P > 0,05$), (Табл. 3.21).

Таблиця 3.21

**Вплив комплексу «Мікс-фактор» на активність GSH –
антиоксидантних ферментів у мітохондріях печінки молодих і старих
щурів щурів при інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)**

Показник	вік	контроль	CuSO ₄	Мікс-ф.+ CuSO ₄	CuSO ₄ + Мікс-ф.
ГП у МХ (нмоль NADPH/хв· мг білку мх)	3 міс	94,3±4,5	75,9±5,2*	77,3±8,4	87,5±20,8
	20 міс	391,7±27,2 ^a	308,8±28,2 *	314,0±23,3	310,1±45,7 *
Gtx2 в МХ (нмоль NADPH /мг білку мх)	3 міс	3,01 ±0,26	2,33±0,16*	2,40±0,54*	2,86±0,68
	20 міс	8,30±0,50 ^a	5,36±0,58*	5,82±0,43*	5,74±0,34*
ГР в МХ (нмоль NADPH /мг білку мх)	3 міс	33,1±2,5	26,9±1,4*	35,7±4,3**	38,7±5,4*
	20 міс	21,1±2,1 ^a	20,4±1,0	24,8±1,2**	21,1±1,6

Примітка:

1. * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

2. ** – $P < 0,05$ у порівнянні з групою CuSO₄

Введення «Мікс-фактора» до інтоксикації сульфатом міді та введення «Мікс-фактора» після 3х-кратного введення доз сірчаноокислої міді не завдало значного впливу на глутатіонпероксидазну активність у мітохондріях печінки молодих і старих піддослідних щурів.

Разом з тим слід зазначити, що невелике збільшення варіабельності значень величини глутатіонпероксидазної активності у мітохондріях печінки щурів, які отримували спільно з дозами сульфату міді «Мікс-фактор» і тварин, які отримували «Мікс-фактор» після 3х-кратного

введення доз сірчаноокислої міді, нівелювало достовірне зниження активності цього ферменту у молодих і старих тварин, що отримували лише дози $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Табл. 3.21).

Інтоксикація сульфатом міді приводила до зниження активності глутаредоксину у мітохондріях (Grx_2) молодих щурів на 23 %, а у старих на 35 % у порівнянні з контролем. Спільне введення доз сірчаноокислої міді з «Мікс-фактором» (до інтоксикації) та введення «Мікс-фактора» після 3х-кратного введення доз $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у молодих щурів нормалізувало досліджувану активність, а у старих істотних змін встановлено не було. Виявлені вікові особливості зміни активності Grx_2 в мітохондріях печінки обох вікових груп піддослідних тварин, можуть пояснюватися тим, що, по-перше, 3х-кратне введення «Мікс-фактора» у молодих щурів достовірно не впливало на досліджувану активність, а у старих - призводило до незначного її зниження (на 14 %; $0,1 <P> 0,05$); а по-друге, у старих тварин зниження активності Grx_2 , у відповідь на введення доз сірчаноокислої міді, було більш вираженим, ніж у молодих щурів (Табл. 3.21).

У сироватці крові молодих щурів вміст малонового діальдегіду був на 34 % вище, ніж у старих ($P < 0,05$). Після трикратного введення LD_{33} доз CuSO_4 спостерігається підвищення рівня цих продуктів ПОЛ на 107 % ($P < 0,05$) як у молодих так і у старих тварин (Табл. 3.22). При застосуванні комплексу «Мікс-фактор» молодим тваринам до інтоксикації відбувається підвищення вмісту малонового діальдегіду на 52 % ($P < 0,05$) відносно контролю, але відносно групи з CuSO_4 – індукованою інтоксикацією цей показник є на 55 % нижчим ($P < 0,05$). У разі застосування «Мікс-фактора» після інтоксикації вміст МДА є вищим на 37 % від контролю, але нижчим на 65 % від групи що отримувала лише CuSO_4 (Табл. 3.22).

У старих тварин вміст МДА підвищується на 107 % при інтоксикації сульфатом міді, був на 28 % (при введенні «Мікс-фактора» до дії CuSO_4) та на 29 % (при введенні «Мікс-фактора» після дії сульфату купруму) у порівнянні з групою, що отримувала ураження дозами сірчаноокислої міді.

Глутатіонпероксидазна активність у старих контрольних тварин була істотно вище, ніж у молодих щурів (на 65 %) ($P < 0,05$). У відповідь на введення доз сірчаноокислої міді активність цього ферменту знижувалась однаковою мірою на 22 % та 23 % ($P < 0,05$) у обох вікових групах щурів. При попередньому застосуванні «Мікс-фактора» молодим тваринам, а також при застосуванні «Мікс-фактора» після дії сульфату купруму достовірних змін активності цього ферменту відносно контролю встановлено не було. У старих тварин ефект нормалізації ГП активності було встановлено лише у випадку його застосування після інтоксикації. Під час попереднього застосування комплексу ефект достовірно не відрізнявся від ефекту при дії сульфату купруму (Табл. 3.22).

Таблиця 3.22

Вплив комплексу «Мікс-фактор» на вміст малонового діальдегіду та активність Se-глутатіонпероксидази та у сироватці крові молодих і старих щурів при Cu-індукованому пошкодженні печінки (n=10-12)

Показник	вік	контроль	CuSO ₄	Мікс-фактор+ CuSO ₄	CuSO ₄ + Мікс-фактор
Вміст МДА (нмоль МДА/мл сир.)	3 міс	4,43, ±0,36	9,19±0,9*	6,73±0,56 *,**	6,05±0,83 *,**
	20 міс	2,93±0,51 _a	6,08±0,38*	4,38±0,3 *,**	4,33±0,3*,**
ГП (нмоль NADPH/хв/ мл сир.)	3 міс	3587,4±258,4	2808,1±211,6 *	3320,5±3793	4087,5±304,0* *
	20 міс	5925,6±423,3 _a	4565,6±303,7 *	4472,9±176,6 *	6180,9±525,0 **,***

Примітки:

1. * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем
2. ** – $P < 0,05$ у порівнянні з групою CuSO₄
3. *** – $P < 0,05$ у порівнянні з групою Мікс-фактор+ CuSO₄
4. *** – $P < 0,05$ у порівнянні з групою CuSO₄+ Мікс-фактор

Тож за визначеними показниками прооксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові можна зазначити, що застосування «Мікс-фактора» як у випадку до так і після інтоксикації проявляє протекторний ефект щодо змін індукованих введенням доз сірчаної кислоти міді.

У цитозолі печінки вміст МДА достовірно не відрізнявся від вмісту МДА у щурів 20 місячного віку. Під дією LD₃₃ сірчаної кислоти міді вміст МДА збільшувався як у молодих так і у старих тварин на 79 % та 51 % відповідно (Табл. 3.23).

Таблиця 3.23

Вплив комплексу «Мікс-фактор» на вміст малонового діальдегіду та активність антиоксидантних ферментів у цитозолі печінки молодих і старих щурів щурів при Cu –індукованому пошкодженні печінки (n=10-12)

Показник	вік	контроль	CuSO ₄	Мікс-ф.+ CuSO ₄	CuSO ₄ + Мікс-ф.
Вміст МДА в ЦТ (нмоль МДА/мг білку ЦТ)	3 міс	0,106±0,013	0,190±0,013*	-	0,167±0,016*
	20 міс	0,114±0,010	0,173±0,042*	-	0,121±0,017
ГП у ЦТ (нмоль NADPH/хв · мг білку ЦТ)	3 міс	336,9±49,3	293,5±48,1	337,3±61,9	313,9±77,3
	20 міс	607,7±41,8	484,4±25,9*	585,9±109,4	564,7±79,5
ГР в ЦТ (нмоль NADPH /мг білку ЦТ)	3 міс	109,6±13,1	91,2 ±13,7	107,9 ±9,1	93,3 ±13,9
	20 міс	68,2 ±8,2	68,1 ±5,7	71,0 ±4,8	68,2 ±2,3

Примітки:

1. * – P <0,05 у порівнянні з контролем
2. «-» - вимірювання не проводилось

При застосуванні «Мікс-фактора» після інтоксикації молодим тваринам цей показник зменшувався на 12 % відносно групи з інтоксикацією. У старих він становив 30 % зниження відносно групи з інтоксикацією.

Активність Se-глутатіонпероксидази у цитозолі печінки старих тварин була вищою на 80 %. Під дією LD₃₃ сірчаноокислої міді через 24 години після останнього введення спостерігалось зниження активності на 13 % у молодих та на 21 % у старих (Табл. 3.23). При застосуванні «Мікс-фактора» до та після інтоксикації достовірних змін активності відносно контролю не було виявлено у обох вікових групах тварин.

Активність глутатіонредуктази у цитозолі клітин печінки у молодих тварин була вище на 38 %. Після інтоксикації активність знизилася на 16 % у молодих та на 15 % у старих. При застосуванні комплексу «Мікс-фактор» до та після інтоксикації достовірних змін глутатіонредуктазної активності відносно контролю не було виявлено у обох вікових групах тварин, як і у випадку з дослідженням глутатіонпероксидазної активності (Табл. 3.23).

Так встановлено, що комплекс «Мікс-фактор», який у експериментах *in vitro* проявляв антирадикальні властивості [29] проявляв ефект стимуляції антиоксидантної функції під час експерименту *in vivo* також, знижуючи вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях та вміст МДА у цитозолі клітин печінки, а також підвищення глутатіонпероксидазної активності у сироватці молодих та старих тварин.

Під час довготривалого (12 місяців) вживання комплексу «Мікс-фактор» відбувається інгібування деяких змін прооксидантно-антиоксидантного балансу, що характерні для старіючого організму, що дає змогу припустити його гепатопротекторні та геропротекторні властивості у онтогенезі.

Встановлено, що комплекс «Мікс-фактор» здатний затримувати (при попередньому вживанні) та знижувати (у випадку вживання після

інтоксикації) інтенсифікацію ПОЛ та інгібування активності вивчених антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді. У молодих тварин цей ефект був більше вираженим, ніж у старих тварин [34, 35].

3.3.2 Вплив комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих тварин

У якості факторів регуляції, в тому числі і АОС можна використовувати різні природні джерела антиоксидантних сполук, в тому числі компоненти молозива, грибів, дріжджів і мікроводоростей [15, 28–30].

Відомо, що молозиво має унікальний склад різноманітних біологічно активних сполук і використовується при лікуванні хвороби Альцгеймера, розсіяного склерозу, хвороби Крона, ревматоїдного артрити та ін.. Представляло інтерес дослідити можливість усунення наслідків гепатоінтоксикації сульфатом купруму застосуванням комплексу компонентів з коров'ячого молозива. Проте у молозиві також містяться так звані «важкі» імуноглобуліни, що викликають алергічні реакції. У зв'язку з цим з молозива методом мембранної фільтрації було видалено ліпіди і високомолекулярні білки (молекулярною масою < 50 кДа), і були отримані низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ), що використовувалися у дослідженні [243].

3.3.2.1 Вплив комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у молодих та старих тварин

Комплекс низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива тваринам вводили *per os* послідовно тричі з інтервалом 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла (дозування було підібране у

попередньому підготовчому експерименті описаному у роботі [35]). Визначення показників проводили через 24 години після останнього введення комплексу. Було встановлено, що вживання комплексу знижує на 15 % вміст малонового діальдегіду у сироватці старих тварин та достовірно не впливає на глутатіонпероксидазну активність у сироватці крові (Табл. 3.24).

Таблиця 3.24

Вміст малонового діальдегіду та активність Se-глутатіонпероксидази у сироватці крові при застосуванні НКМ на 3- та 20-місячних щурів (n = 8)

Показник	вік	контроль	НКМ
Вміст МДА (нмоль МДА/ мл сир.)	3 міс	4,43, $\pm 0,36$	4,03 $\pm 0,11$
	20 міс	2,93 $\pm 0,51^a$	2,5 $\pm 0,34^*$
ГП (нмоль NADPH/хв·мл сир.)	3 міс	3587,4 $\pm 258,4$	3798 $\pm 145,7$
	20 міс	5925,6 $\pm 423,3^a$	6008,1 $\pm 387,9$

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

У мх печінки введення комплексу НКМ приводило до деякого зниження вмісту МДА у мітохондріях клітин печінки на 15 % ($P > 0,05$) та 27 % ($P < 0,05$) у 3- та 20-місячних щурів відповідно (Табл. 3.25). Активність аконітатгідратази у мітохондріях мала тенденцію до підвищення на 28 % у молодих та на 39 % у старих щурів ($P < 0,05$). Введення НКМ не чинило достовірного впливу на Se-ГП активність у молодих та старих тварин. Активність глутатіонредуктази у мітохондріях достовірних змін також не зазнавала (Табл. 3.25).

Таблиця 3.25

Вміст малонового діальдегіду, активність аконітази та глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів у мітохондріях печінки при застосуванні НКМ на 3- та 20-місячних щурів (n = 8)

Показник	вік	контроль	НКМ
Вміст МДА в МХ (нмоль МДА/мг білку мх)	3 міс	0,257 $\pm 0,023$	0,220 $\pm 0,014$
	20 міс	0,159 $\pm 0,011^a$	0,117 $\pm 0,007^*$

Асо в МХ (нмоль аконітату/хв/ мгбілку мх)	3 міс	27,9±0,7	35,7±1,0*
	20 міс	28,4±3,2	39,4±2,2*
ГП у МХ (нмоль NADPH/хв/ мг білку мх)	3 міс	94,3±4,5	100,1±5,1
	20 міс	391,7±27,2 ^a	422,1±32,2
ГР в МХ (нмоль NADPH /мг білку мх)	3 міс	33,1±2,5	33,0±3,3
	20 міс	21,1±2,1 ^a	22,3±1,1

Примітка: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Вимірювання активності Se-глутатіонпероксидази у цитозольній фракції клітин печінки показало деяке підвищення активності на 12 % ($P > 0,05$) у 3-місячних щурів, а у 20-місячних залишалася сталою.

Активність глутатіонредуктази у цитозолі в експерименті не варіювала у обох вікових групах тварин (Табл. 3.26).

Таблиця 3.26

Активність глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів у цитозолі печінки при застосуванні комплексу НКМ у 3- та 20-місячних щурів (n = 8)

Показник	вік	контроль	НКМ
ГП у ЦТ (нмоль NADPH/хв· мг білку ЦТ)	3 міс	336,9±49,3	378,7±35,1
	20 міс	607,7±41,8 ^a	635±30,8
ГР ЦТ (нмоль NADPH /мг білку ЦТ)	3 міс	109,6 ±13,1	112,0±10,0
	20 міс	68,2 ±8,2 ^a	70,2±9,4

Тож виявлений вплив комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива на показники інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та активність аконітатгідратази у мітохондіях печінки тварин дає змогу припустити, що цей комплекс буде здатним до індукції корегування деяких змін показників прооксидантно-антиоксидантного балансу, що відбуваються при Cu –індукованому пошкодженні печінки [35].

3.3.2.2 Вплив комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих щурів

У експериментах, описаних у підрозділі 3.3.2.1 було встановлено, що комплекс низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива здатний впливати на показники інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та здатний індукувати інтенсифікацію активності глутатіонпероксидази у мітохондріях печінки тварин. Необхідно було перевірити, чи буде цей комплекс здатним корегувати патологічних змін показників про-антиоксидантного балансу, що відбуваються при інтоксикації сульфатом міді. Триразове введення LD_{33} доз сірчаноокислої міді призводить до збільшення вмісту малонового діальдегіду у сироватці крові на 107 % ($P < 0,05$) як у молодих так і у старих тварин, а активність захистного ферменту – глутатіонпероксидази – знижувалась на 22 % та 23 % ($P < 0,05$) у 3- та 20-місячних щурів відповідно. Застосування комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива призводить до нормалізації цих показників до рівня контрольної групи (Табл. 3.27).

Таблиця 3.27

Вплив комплексу НКМ на активність Se-глутатіонпероксидази та вміст малонового діальдегіду у сироватці крові молодих і старих щурів при інтоксикації сульфатом міді (n=12)

Показник	вік	контроль	$CuSO_4$	$CuSO_4 + НКМ$
Вміст МДА (нмоль МДА/мл сир.)	3 міс	4,43±0,36	9,19±0,90*	4,35 ± 0,50**
	20 міс	2,93±0,51 ^a	6,08±0,38*	3,04±0,25**
GP (кмоль NADPH/хв·мл сир.)	3 міс	3587,4±258,4	2808,1±211,6*	3840 ± 400*
	20 міс	5925,6±423,3	4565,6±303,7*	6001±278,1**

Примітки:

1. * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем
2. * - $P < 0,05$ у порівнянні з групою $CuSO_4$

Під час дослідження прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у мітохондріях клітин печінки встановлено, що при інтоксикації сульфатом міді через 24 години збільшувався вміст малонового діальдегіду на 30 % ($P < 0,05$) у молодих та на 112 % ($P < 0,05$) у старих щурів. Після застосування НКМ відбувалася нормалізація цього показника у молодих та старих тварин відносно контролю ($P < 0,05$), (Табл. 3.28).

У проведеному дослідженні встановлено, що у мітохондріях печінки старих тварин аконітазна активність була на одному рівні з молодими щурами. У відповідь на дію сульфату міді через 24 години відбувалось зниження активності аконітатгідратази у мітохондріях печінки однаковою мірою у молодих і старих тварин на 45 та 46 % ($P < 0,05$). У молодих тварин вживання НКМ приводило до нормалізації цього показника до рівня контрольної групи. У старих тварин після вживання НКМ після дії сульфату міді аконітатгідратазна активність залишалась дещо нижчою від рівня контролю (на 17 %), але достовірно підвищувалася відносно групи після інтоксикації сульфатом міді (Табл. 3.28).

Активність глутатіонпероксидази у мітохондріях після впливу сульфату міді знижувалась на 20 % у молодих та на 21 % у старих ($P < 0,05$). Вживання НКМ призвело до зростання активності цього ферменту на 96 % та 37 % відносно групи тварин, що отримували дози сірчаноокислої міді ($P < 0,05$), та на 58 % ($P < 0,05$) у молодих та 8 % ($P > 0,05$) у старих тварин відносно контрольної групи. Нормалізація порушень, що спостерігались при інтоксикації сульфатом міді (зниження активності на 19 % у молодих тварин ($P < 0,05$)) спостерігалась і для активності глутатіонредуктази (Табл. 3.28).

Під час вивчення змін активності антиоксидантних ферментів у цитозолі клітин печінки встановлено, що під дією LD_{33} сірчаноокислої міді спостерігалось зниження активності на 13 % у молодих та на 21 % у старих, а активність глутатіонредуктази на 16 % та 15 % у 3- та 20-місячних щурів. Застосування НКМ приводило до нормалізації цих змін відносно контролю за обома показниками у обох вікових групах тварин (Табл. 3.29) [35, 38].

Таблиця 3.28

Вплив комплексу НКМ на вміст малонового діальдегіду, активність аконітази, активність антиоксидантних ферментів у мітохондріях печінки молодих і старих щурів при інтоксикації сульфатом міді (n=8)

Показник	вік	контроль	CuSO ₄	CuSO ₄ +НКМ
Вміст МДА в мх (нмоль МДА/мг білку мх)	3 міс	0,257 ±0,023	0,333 ±0,021*	0,270± 0,012**
	20 міс	0,159 ±0,011 ^a	0,337 ±0,023*	0,170±0,008**
Асо (нмоль NADPH/ мг білку мх)	3 міс	27,9±0,7	14,6±1,8*	28,2±0,9**
	20 міс	28,4±3,2	15,8±2,9*	23,6±1,8**
GP у мх (нмоль NADPH/хв· мг білку мх)	3 міс	94,3±4,5	75,9±5,2*	149,5± 17,9*
	20 міс	391,7±27,2 ^a	308,8±28,2*	423,2±12,7**
GR в мх (нмоль NADPH /мг білку мх)	3 міс	33,1±2,5	26,9±1,4*	31,2±2,7
	20 міс	21,1±2,1	20,4±1,0	22,1±0,9

Примітка: * – P <0,05 у порівнянні з контролем

Таблиця 3.29.

Вплив комплексу НКМ на глутатіонпероксидазну та глутатіонредуктазну активність у цитозолі печінки молодих і старих щурів при інтоксикації сульфатом міді (n=8)

Показник	вік	контроль	CuSO ₄	CuSO ₄ +НКМ
ГП у цт (нмоль NADPH/хв·мг білку цт)	3 міс	336,9±49,3	293,5±48,1	376± 57,6
	20 міс	607,7±41,8 ^a	484,4±25,9*	640,2±28,9
ГР в цт (нмоль NADPH /мг білку цт)	3 міс	109,6 ±13,1	91,2 ±13,7	110,2±9,2
	20 міс	68,2 ±8,2 ^a	68,1 ±5,7	68,7±7,5

Примітка: * – P <0,05 у порівнянні з контролем

Висновки до розділу 3

Встановлено, що інтоксикація трикратним послідовним введенням експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в дозі LD₃₃ з інтервалом у 48 годин супроводжувалася розвитком ураження печінки, формування якого відбувалося на фоні інтенсифікації вільнорадикального окислення та формування окисного стресу.

При введенні сірчаноокислої міді тваринам спостерігалось зниження активності глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази і NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази що, очевидно, пов'язано зі зменшенням постачання NADPH для роботи глутатіонзалежної системи. При цьому було зареєстровано підвищення вмісту продуктів ПОЛ і зниження активності аконітатгідратази, що не нівелюються через 1 та 2 місяці після інтоксикації, тож вимагають корегування за допомогою екзогенного чи ендогенного стимулювання. Для молодих та старих тварин було зареєстровано однотипні зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу через 24 години після інтоксикації. Відмінності у метаболічних реакціях були виявлені у період корегування організмом патологічних змін.

Також отримані дані свідчать, що введення як розчину CuSO₄·5H₂O так і CCl₄ активує вільнорадикальне окислення ліпідів печінки експериментальних тварин. При цьому ступінь активації ПОЛ була більш вираженою у старих, 20-місячних, щурів, що визначається зниженням активності GSH-залежної системи антиоксидантних ферментів.

Тож модель триразового введення сублетальних доз сірчаноокислої міді що призводить до порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, подібного змінам при CCl₄ індукованному пошкодженні може розглядатися як модель вільнорадикальної патології і використовуватися для відбору речовин і субстанцій з потенційною антиокисною активністю.

При дослідженні прояву оксидативного стресу у молодих і старих тварин після 2-х послідовних циклів втрати і відновлення маси тіла під час

циклічного режиму годування виявлено, що вміст продуктів ПОЛ у мітохондріях печінки 3 міс тварин був достовірно вище, ніж у 20 міс щурів.

При циклічному режимі годування молодих та старих тварин вміст малонового діальдегіду у мітохондріях при першому обмеженні харчування зростає більшою мірою, а у другому циклі ЦРГ цей ефект має меншу вираженість. На перше і друге відновлення маси тіла вміст цих продуктів ПОЛ сягає рівня контролю.

Втрата маси тіла та збільшення вмісту ПОЛ в мітохондріях супроводжувалося зниженням активності аконітази мітохондрій у молодих тварин, а у старих її активність залишалася незмінною.

При повторному циклі втрати та відновлення маси тіла оксидативний стрес проявлявся меншою мірою, порівняно з першим циклом у молодих тварин і не проявлявся у старих тварин. Отже, оксидативний стрес при циклічному режимі годування проявлявся меншою мірою у старих тварин в порівнянні з молодими.

Se-глутатіонпероксидазна активність у мітохондріях печінки молодих щурів при першій та другій втраті маси тіла зростала, а при першому та другому відновленні маси тіла знижувалася до рівня норми. У старих щурів при першому та другому обмеженні харчування та подальшому відновленні маси тіла Se-глутатанопероксидазна активність була вище рівня контрольних тварин. Глутатіонредуктазна активність у мітохондріях печінки старих щурів у відповідь на циклічний режим годування не змінилася, а у молодих тварин достовірно знижувалася лише на друге відновлення маси тіла.

Виявлено, що активність досліджених NADP-дегідрогеназ у мітохондріях печінки старих тварин при ЦРГ не змінювалася. У молодих родів NADP-ізоцитратдегідрогеназна активність була достовірно вищою при першому обмеженні харчування, а глюкозо-6-фосфатдегідрогіназна нижче при першому та другому обмеженні харчування та відновленні маси тіла.

Тож виявлено, що зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу при циклічному режимі годування носять вік-залежний характер.

Адаптивні реакції, що відбуваються впродовж 2 циклів втрати та набору маси тіла приводять до активації показників системи антиоксидантного захисту у тварин обох вікових груп і цей механізм може бути застосований як спосіб активації захистних механізмів при корегуванні пошкоджень печінки, що спричинені активацією окисних механізмів, зокрема ПОЛ, що як показано у розділі 3 супроводжує Cu-індуковане ураження печінки.

Так показано, що зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу, що виникають під дією циклічного режиму годування виступають у ролі адаптивного процесу, який, завдяки своєму регуляторному впливу на інтенсивність процесів ПОЛ, стан мембранної проникності і модуляцію ферментативної активності, забезпечує можливість більш ефективної адаптації клітин до інтоксикації сульфатом міді та після проходження двох циклів ЦРГ нормалізує більшість вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у старих тварин, а у молодих після проходження ЦРГ з попереднім введенням доз сірчаноокислої міді стан прооксидантно-антиоксидантного балансу залишається дещо зрушеним у бік антиоксидантного потенціалу (вміст МДА в мс та мх печінки нижче рівня контролю, підвищена глутатіонпероксидазна активність у мітохондріях, цитозолі печінки та сироватці крові та ізоциторадегідрогеназна активність у мітохондріях клітин печінки), що дає змогу припустити властивості ЦРГ як підходу, що може розглядатися у якості функціонального антидоту при інтоксикації сульфатом міді.

Також встановлено, що застосування комплексу «Мікс-фактор» індукує зниження інтенсифікації ПОЛ та інгібування активності вивчених антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді. У молодих тварин цей ефект був більше вираженим, ніж у старих тварин.

Комплекс низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива здатний до корегування змін прооксидантно-антиоксидантного балансу у мітохондріях та цитозолі клітин печінки, що супроводжують Cu-індуковане ураження печінки як 3- так і 20-місячних щурів.

Таким чином, комплекси НКМ та «Мікс-фактор» можуть розглядатися у якості антидотів функціональної дії, відносно патологічних змін прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді.

Результати досліджень даного підрозділу наведено в таких публікаціях [12, 31-39].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальну наукову задачу з дослідження інтенсивності процесів ПОЛ та активності антиоксидантних ферментів у печінці та крові молодих і старих тварин при Cu-індукованому пошкодженні печінки та з'ясування можливості корегування деяких супутніх порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу за допомогою циклічного режиму годування та використання комплексних субстанцій з антиоксидантною дією. Отримані нові наукові результати у своїй сукупності мають важливе значення для розвитку біохімічної діагностики печінки та гепатології.

Основні результати дисертаційних досліджень:

1. Встановлено вік-залежні механізми відповідної реакції прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці щурів при інтоксикації сульфатом міді, застосуванні циклічного режиму годування та впливі біологічних антидотів, що виражалися у модуляції активності антиоксидантних ферментів та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів у печінці та крові тварин.

2. Інтоксикація трикратним введенням LD₃₃ сірчаноокислої міді через 24 години у молодих та старих щурів супроводжується аналогічними змінами показників про-антиоксидантного балансу: інтенсифікацією процесів ПОЛ на фоні інгібування активності глутатіонпероксидази, глутаредоксину і ізоцитратдегідрогенази, а також підвищенням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мітохондріях та цитозолі клітин печінки.

3. Через 1 і 2 місяці після інтоксикації сульфатом міді показники інтенсивності ПОЛ у молодих тварин нормалізуються, а у старих залишаються достовірно вище контрольного рівня. Підвищений вміст продуктів ПОЛ у молодих тварин і знижена активність аконітатгідратази у мітохондріях і глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові не нормалізуються через 1 і 2 місяці після інтоксикації та вимагають

корегування за допомогою екзогенного чи ендогенного стимулювання.

4. Введення сірчаноокислої міді і тетрахлорметану індукує однотипні зміни вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу. Cu-індуковане пошкодження печінки щурів може бути ефективною моделлю для вивчення молекулярних механізмів вікових порушень прооксидантно-антиоксидантної системи організму та використовуватися для скринінгу способів, що сповільнюють вільнорадикальне пошкодження печінки.

5. Зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу при циклічному режимі годування носять вік-залежний характер. Найбільш значні відмінності у молодих та старих тварин спостерігаються при повторному циклі втрати та відновлення маси тіла. Більшість вивчених показників у 20-місячних тварин після ЦРГ сягають рівня контролю, а у 3-місячних відбувається зниження вмісту МДА у цитозолі та мікросомах печінки, активності аконітази на фоні підвищення активності глутатіонпероксидази у мітохондріях відносно контрольного рівня.

6. Показано, що переведення тварин з Cu-індукованим пошкодженням печінки на циклічний режим годування після проходження двох циклів ЦРГ нормалізує більшість вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у старих тварин, а у молодих індукує зрушення у бік антиоксидантного потенціалу.

7. Встановлено, що субстанція «Мікс-фактор» і комплекс низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива, сприяючи підвищенню активності антиоксидантних ферментів у печінці і крові щурів, мають протекторні властивості щодо прооксидантної дії сірчаноокислої міді та є перспективними підходами для вивчення та розробки природних систем регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці при патологічних змінах, спричинених інтоксикацією сульфатом міді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hernandez-Gea V., Friedman, S. Pathogenesis of accelerated fibrosis in HIV/HCV co-infection// Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2011. Vol. 6. P. 425–456.
2. Bataller R., Brenner D. Liver fibrosis. the journal of clinical investigation // Journal, Journal of Clinical Investigation. 2005. Vol. 115. P. 209–218.
3. Fujii H., Kawada N. Fibrogenesis in alcoholic liver disease / World Journal of Gastroenterology : WJG. 2014. Vol. 20, N 25. P. 8048–8054.
4. Wang F., Fan J., Zhang Z., Gao B., Wang H. The global burden of liver disease: the major impact of China // Hepatology. 2014. Vol. 60, N 6. P. 2099–2108.
5. Liangpunsakul S., Haber P., McCaughan G. Alcoholic liver disease in Asia, Europe, and North America // Gastroenterology. 2016. Vol. 150, N 8. P. 1786–1797.
6. Kim H., Kisseleva T., Brenner D. Aging and liver disease // Current opinion in gastroenterology. 2015. Vol. 31, N 3. P. 184–191.
7. Sepanlou S., Malekzadeh G., Naghavi M. Trend of gastrointestinal and liver diseases in iran: results of the global burden of disease study // Middle East Journal of Digestive Diseases. 2015. Vol. 7. P. 121–137.
8. Kim Y. W., West X. Z., Byzova T. V. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease// Journal of Molecular Medicine. 2013. Vol . 91. P. 323-328.
9. Cichoż-Lach H., Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor. Abstract in liver diseases// World Journal of Gastroenterology. 2014. Vol. 20, N 25. P. 8082–8091
10. Indo H., Yen H., Nakanishi I., Matsumoto K., Tamura M., Nagano Y., Matsui H., Gusev O., Cornette R., Okuda T., Minamiyama Y., Ichikawa H., Suenaga S., Oki M., Sato T., Ozawa T., Daret K., Hideyuki J. Majima

A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging // Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2015. Vol. 56. P. 1–7.

11. Halliwell B., Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford : Oxford University Press, 2015. 905 p.

12. Bozhkov A. I., Klimova O. M., Nikitchenko Yu.V., Kurguzova Natalya I., Linkevych O. S., Lebid K. M., Protsenko O.S., Remneva N. A., Al-Bahadly Ali M. M., Al-Begai M. A. Y. Ontogenetic approach to the study of mechanisms of copper-induced liver fibrosis // Advances in Aging Research. 2017. N 6. P. 39–54.

13. Musacco-Sebioa R., Saporito-Magriñáa C., Semprinea J., Tortib H., Ferrarottiac N., Castro-Parodid M., Damianod A., Boverisa A., Repetto M. Rat liver antioxidant response to iron and copper overloads // Journal of Inorganic Biochemistry. Vol. 137. 2014. P. 94-100.

14. Li S. Tan H., Wang N. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases // International Journal of Molecular Sciences. 2015. Vol. 16, N 11. P. 26087–26124.

15. Kuntz E., Kuntz H. Hepatology, principles and practice: history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy / Springer: Science & Business Media, 2006. 902 p.

16. Barja G. The mitochondrial free radical theory of aging // Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2014. Vol. 127. P. 1–27.

17. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты Москва: Наука интерпериодика, 2001. 343 с.

18. Singal A. K., Jampana S. C., Weinman S. A. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease // Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver. 2011. Vol. 31, N 10. P. 1432–1448.

19. Takahashi Y., Sugimoto K., Inui H., Fukusato T. Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis // World Journal of Gastroenterology. 2015. Vol. 21, N 13. P. 3777–3785.

20. Valko M., Morris H., Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress // *Current Medicinal Chemistry*. 2005. Vol. 12, N 10. P. 1161–1208.
21. Sunderman F. W. Metals and lipid peroxidation // *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. 1986. Vol. 59. P. 248–255.
22. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Биологическая роль глутатиона // *Успехи Современной Биологии*. 1990. Vol. 110, N 1. P. 20–32.
23. Rojas C., Cadenas S., Pérez-Campo R. Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993. Vol. 306, N 1. P. 59–64.
24. Indo H., Yen H., Nakanishi I. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2015. Vol. 56, N 1. P. 1–7.
25. Божков А. И., Малеев В. А. Снижается ли способность печени к регенерации с возрастом? Динамика функциональной активности митохондрий в процессе регенерации печени // *Успехи геронтологии*. 2004. Т. 13. С. 58–65.
26. Трегубова Н. В., Косолапов В. А., Спасов А. А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы // *Успехи физиологических наук*. 2012. Т. 43, № 1. С. 75-94.
27. Bokov A., Chaudhuri A. The role of oxidative damage and stress in aging // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2004. Vol. 125. P. 811–826.
28. Fox P., Uniacke-Lowe T., McSweeney P., O'Mahony J. Heat-induced changes in milk // *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2015. Vol. 34, N 2. P. 584.
29. Kurguzova N. I., Bozhkov A. I., Nikitchenko Y. V. Al Begai M., Goltvyansky A. V. Interconnection of antitoxic and antioxidant systems of the organism under the action of natural low molecular complex – Fungidol // *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2015. Vol. 2, N 6. P. 25.
30. Mcgrath H., Patrick F. Fox, Paul L., Mcsweeney H., Alan H, Kelly L. Composition and properties of bovine colostrum: a review // *Dairy Science &*

Technology, EDP sciences // Springer. 2016. Vol. 96, N 2. P. 133-158.

31. Lebid K. The influence of a cyclic feeding regime on the prooxidant-antioxidant balance in liver mitochondria of rats of various ages // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали міжнародної конференції молодих вчених, 18–21 листопада 2014. Харків, 2014. С. 22.

32. Bozhkov A. I., Kurguzova N. I., Lebed E. N., Mikhailets A. O., Danladi S. D., Bozhkov A. A., Girich M. S. A Cyclic Feeding Regime: A New Model in Experimental Gerontology // Advances in Gerontology. 2014. Vol. 4, N 4. P. 252–259.

33. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Lebed K. N., Linkevych O. S., Kurguzova N. I., Klimova O. M., Al. Begai M.A.Y., Al - Bahadly A. M. M., Alsardia M. M. A. The cyclic feeding regime induces decaying age-dependent oxidative stress and regulates the cell chain of the immunity // Advances in aging research. 2016. N 5. P. 151–165.

34. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Klimova E. M., Linkevych O. S., Lebid K. M., Al-Bahadli A. M. M., Alsardia M. M. A. Young and old animals use different metabolic strategies to adapt to the Cu-induced fibrosis of the liver // Advances in Gerontology. 2016. Vol. 29, N 4. P. 555–566.

35. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Lebid K. M., Ivanov E. G., Kurguzova N. I., Gayevoy S. S., Sharko M. O., Alsardia Mohammad M. A., Al Begai Mohammad A. Y. Low Molecular Weight Components from Various Sources Eliminate Oxidative Stress and Restore Physiological Characteristic of Animals at Early Stages of Cu- Induced Liver Fibrosis Development // Translational Biomedicine. 2017. Vol. 8, N 2. P. 1–9.

36. Никитченко И., Боцула И., Лебедь Е., Никитченко Ю. Изменение активности глутаредоксинов и глутатионпероксидаз в митохондриях печени крыс в процессе постнатального онтогенеза // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: збірник тез міжнародної наукової конференції, 24-25 вересня 2015 р. Дніпропетровськ, 2015. С. 134-135.

37. Лебедь Е. Н., Афанасьева А. В. Влияние комплекса «Фунгидол» на

состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса у животных с избыточным питанием в раннем периоде постнатального онтогенеза // Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів XI міжнародної конференції молодих вчених, 29 листопада–2 грудня 2016 р. Харків, 2016. С. 11.

38. Лебедь Е. Н., Афанасьева А. В., Гаевой С. С. Низкомолекулярные компоненты молозива регулируют активность показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса крови крыс // Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів міжнародної конференції молодих вчених, 2–4 грудня 2015 р. Харків, 2015. С. 15–16.

39. Кургузова Н. И., Бондарь В. В., Лебедь Е. Н., Аль Бегаи М. А. Ю., Алсардиа М. М. А. Возрастзависимый характер проявления оксидативного стресса при циклическом режиме кормления // Здоров'я, харчування, довголіття: збірник матеріалів науково-практичної конференції, 16-17 травня 2016 р. Київ, 2016. С. 345.

40. Божков А. И. Эпигенетические механизмы формирования возрастных стратегий адаптаций // VII Международный симпозиум биологические механизмы старения: сборник материалов научно-практической конференции, 24-27 мая 2006 г. Харьков, 2006. С 4.

41. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiological Reviews. 2002. N 82. P. 47–95.

42. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты Москва : Слово, 2006. 556 с.

43. Harman D. Free-radical theory of aging: increasing the functional life span // Annals of the New York Academy of Sciences. 1994. Vol. 717. P. 1–15.

44. Кольтовер В. К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк // Успехи геронтологии. 2000. Т. 4. С. 33–40.

45. Hagen T. M. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process // Antioxidants & Redox Signaling. 2003. Vol. 5. P. 503–506.

46. Balaban R. S. Mitochondria, oxidants, aging // *Cell*. 2005. Vol. 120. P. 483–495.
47. Harman D. Aging: overview // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001. Vol. 928. P. 1–21.
48. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // *Physiological reviews*. 2002. Vol. 82. P. 47 – 95.
49. Merry B. J. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2002. Vol. 34, N 11. P. 1340–1354.
50. Yim H. E., Ha K. S., Bae I. S. Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin–angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012. Vol. 23, N 8. P. 937–945.
51. Никитченко Ю. В. Роль прооксидантно-антиоксидантной системы в процессах старения и экспериментальные подходы к регуляции продолжительности жизни // VII международный симпозиум биологические механизмы старения: сборник материалов научно-практической конференции, 24-27 мая 2006 г. Харьков, 2006. С.4.
52. Кричковская Л. В., Никитченко Ю. В., Дзюба В. Н. Химия и биохимия антиоксидантной системы организма при старении : учеб. пособие для вузов . Харьков. : НТУ "ХПИ", 2012. 153 с.
53. Лемешко В. В. Липопереокисление мембран миокарда и его регуляция при старении миокарда // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1982. Т. 94, № 11. С. 12–14.
54. Матасова. Л. В., Попова Т. Н. Аконитаза млекопитающих при окислительном стрессе // *Биохимия*. 2008 . Т. 73, № 9. С.1189–1198.
55. Лемешко В. В. Система микросомального окисления при развитии и старении организма // *Биохимия*. 1980. Т. 45, № 11. С. 1964–1969.
56. Caro A. A., Cederbaum A. I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of cyp2e1 // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.

2004. Vol. 44. P. 27–42.

57. Gruer M. J., Artymiuk P. J., Guest J. R. The aconitase family: three structural variations on a common theme // *Trends in Biochemical Sciences*. 1997. Vol. 22, N 1. P. 3–6.

58. Gardner P. R., Nguyen D. D., White C. W. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. Vol. 91, N 25. P. 12248–12252.

59. Popova T. N., Agarkov A. A., Verevkin A. N. Intensity of free radical processes in rat liver under type 2 diabetes and introduction of epifamin // *Acta Naturae*. 2013. Vol. 5, N 4. P. 118–122.

60. Delaval E., Perichon M., Friguet B. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and atp-stimulated protease in rat liver and heart // *European Journal of Biochemistry*. 2004. Vol. 271, N 22. P. 4559–4564.

61. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Саиди Л. Влияние цитрата на оксидативный статус тканей крыс при экспериментальном токсическом гепатите // *Биомедицинская химия*. 2010. Т. 56, № 4. С. 490–497.

62. Recalcati S., Alberghini A., Campanella A., Gianelli U., De Camilli E., Conte D., Cairo G. Iron regulatory proteins 1 and 2 in human monocytes, macrophages and duodenum: expression and regulation in hereditary hemochromatosis and iron deficiency// *Haematologica*. 2006. Vol. 91. P. 303–310.

63. Gardner P., Fridovich I. Inactivation-reactivation of aconitase in escherichia coli // *The Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267, N 13. P. 8757–8763.

64. Медведева Л. В., Попова Т. Н., Артюхов В. Г., Матасова Л. В., Акатова Р. В. Оксидативный статус и распределение активности NADP-изоцитратдегидрогеназы и аконитатгидратазы в кардиомиоцитах крыс в норме и при ишемии // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 2006.

№ 34. С. 151–156.

65. Андреещева Е. М., Попова Т. Н., Артюхов В. Г., Рахманова Т. И., Матасова Л. В. Интенсивность свободнорадикального окисления и каталитические свойства NADP-изоцитратдегидрогеназы в печени крыс в норме и при токсическом гепатите // Бюлетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137, № 4. С. 399-402.

66. Gardner P., Raineri I., Epstein L. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells // The Journal of Biological Chemistry. 1995. Vol. 270, N 22. P. 13399–13405.

67. Попова Т. Н., Семенихина А. В., Сафонова О. А., Свиридов М. М. Оксидативный статус, содержание цитрата и активность аконитатгидратазы в тканях крыс при хронической алкогольной интоксикации // Наркология. 2008. Т. 7, № 5 (77). С. 34–37.

68. Радилов А. С., Теплова В. В., Петрова О. И., Миндукшев И. В., Зинченко В. П., Гончаров Н. В., Касымов В. А., Бережнов А. В., Дженкинс Р. О., Сенченков Е. В. Изучение взаимосвязи внутриклеточных сигнальных и метаболических путей при ингибировании митохондриальной аконитазы фтор ацетатом // Цитология. 2007. № 12. С. 1023-1031.

69. Varghese S., Tang Y., Imlay J. Contrasting sensitivities of escherichia coli aconitases a and b to oxidation and iron depletion // Journal of Bacteriology. 2003. Vol. 185, N 1. P. 221–230.

70. Hinerfeld D., Traini M., Weinberger R., Cochran B., Doctrow S., Harry J., Melov S. Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice // Journal of Neurochemistry. 2006. Vol. 88. P. 657—667.

71. Лемешко В. В., Никитченко Ю. В., Калиман П. А. Активация перекисного окисления липидов мембран в печени молодых и старых крыс тироксином и актиномицином Д // Український біохімічний

журнал. 1983. Т. 55, № 2. С. 206 – 209.

72. Freedman J., Ciriolo M., Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity // *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, N 10. P. 5598–5605.

73. Костюк В. А., Потапович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты Минск : БГУ, 2004. 179 с.

74. Горячковский А. И. Справочное пособие по клинической биохимии. Одесса : Окфа, 1994. 415 с.

75. Тарасевич И. С., Ринейская О. Н. Активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и уровень глутатиона восстановленного в печени, мозге и эритроцитах крыс в возрастном аспекте // *Биохимия*. Т 1. 2011. С. 167–171.

76. Deleve I. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity // *Pharmacology*. 1991. Vol. 52. P. 287–305.

77. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // *Биохимия*. 2002. Т. 67, №. 3. С. 339–352.

78. Rebrin I., Kamzalov S., Sohal R. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice // *Free Radical Biology & Medicine*. 2003. Vol. 35, N 6. P. 626–635.

79. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // *The Journal of Biological Chemistry*. 1975. Vol. 250. P. 5475–5480.

80. Freminet A. Carbohydrate and acid metabolism during acute hypoxia in rats blood and heart metabolites // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1981. Vol.70, N 3. P. 427-430.

81. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб : Наука, 2003. 468 с.

82. Калинина Е. В., Чернов Н. Н. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // *Биологическая химия*. 2014. Т. 54. С. 299–348.

83. Rouhier N. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron–sulphur centre assembly // *New Phytologist*. 2010. Vol. 186, N 2. P. 365–372.
84. Johansson C., Lillig C., Holmgren A. Human mitochondrial glutaredoxin reduces s-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase // *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, N 9. P. 7537–7543.
85. Mashamaite L. N., Rohwer J. M., Pillay C. S. The glutaredoxin mono- and di-thiol mechanisms for deglutathionylation are functionally equivalent: implications for redox systems biology // *Bioscience Reports*. 2015. Vol. 35, N 1. P. 3456-3459.
86. Lundström-Ljung J., Holmgren A. Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease a together with protein disulfide-isomerase // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270, N 14. P. 7822–7828.
87. Holmgren A., Johansson C., Berndt C. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems // *Biochemical Society Transactions*. 2005. Vol. 33, N 6. P. 1375–1377.
88. Mailloux R. J., Willmore W. G. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2014. Vol. 2. P. 68.
89. Tian L., Cai Q., Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging // *Free Radical Biology & Medicine*. 1998. Vol. 24, N 9. P. 1477–1484.
90. Stio M., Iantomasi T., Favilli F. Glutathione metabolism in heart and liver of the aging rat // *Biochemistry and Cell Biology*. 1994. Vol. 72, N 1–2. P. 58–61.
91. Vertechy M., Cooper M., Ghirardi O., Ramacci M. T. Antioxidant enzyme activities in heart and skeletal muscle of rats of different ages // *Experimental gerontology*. 1989. Vol. 24, N 3. P. 211–218.
92. Kumara V., Kalitaa J., Himangsu K., Usha B., Misra K. Relationship of

antioxidant and oxidative stress markers in different organs following copper toxicity in a rat model // *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 293, N 15. 2016. P. 37–43

93. Vohra B. P., Sharma S. P., Kansal V. K. Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs // *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2001. Vol. 38, N 5. P. 321–326.

94. Meredith M. J., Reed D. J. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte // *The Journal of Biological Chemistry*. 1982. Vol. 257, N 7. P. 3747–3753.

95. Beutler E., Rentier F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective // *Blood*. 2008. Vol. 111. P. 16-24.

96. Hino Y., Ishio S., Inakami M. Glucose-6-phosphate oxidation pathway in rat-liver microsomal vesicles. stimulation under oxidative stress // *European Journal of Biochemistry*. 1987. Vol. 165. P. 195-199.

97. Левенкова М. В., Попова Т. Н., Семенихина А. В. Регуляторные свойства глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени крыс в условиях интенсификации свободнорадикального окисления при токсическом гепатите // *Биомедицинская химия*. 2006. Т. 52, № 3. С. 278–286.

98. Vitorica J., Cano J., Satrústegui J., Machado A. Comparison between developmental and senescent changes in enzyme activities linked to energy metabolism in rat heart // *Mechanisms of Ageing and Development*. 1981. Vol. 16, N 2. P. 105–116.

99. Парина Е. В., Калиман П. А. Механизмы регуляции ферментов в онтогенезе. Харьков : Вища школа, 1978. 204 с.

100. Калиман П. А. Возрастные особенности активности и некоторые механизмы регуляции NADP⁺-зависимых дегидрогеназ в процессе развития и старения организма // *Биохимия и физиология*. 1992. Т 1, № 2. С. 107 – 117.

101. Петренко В. В. Активность цитозольных NADPH-генерирующих

ферментов печени крыс при индукции микросомального окисления фенобарбиталом в связи с возрастом и полом // Биохимия и физиология. 1992. Т 1, № 2. С. 164 – 170.

102. Ганусова Г. В. Возрастные особенности активности nadp-зависимых дегидрогеназ и содержания цитохромов P-450 и b5 в печени крыс при развитии оксидативного стресса, вызванного хлоридом кобальта // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. 2005. Т 1, № 1. Р. 33–38.

103. Alexeyev M. F., Ledoux S. P., Wilson G. L. Mitochondrial DNA and aging // Clinical science. 2004. Vol. 107. P. 355 – 364.

104. Skulachev V. P. Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group // Aging cell. 2004. Vol. 3, N 1. – P. 17 – 19.

105. Rebrin I., Forsterb M., Sohal R. Effects of age and caloric intake on glutathione redox state in different brain regions of c57bl/6 and dba/2 mice // Brain Research. 2007. Vol. 1127. P. 10–18.

106. Vohra B. P., Sharma S. P., Kansal V. K. Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs // Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 2001. Vol. 38, N 5. P. 321–326.

107. Lopez-Torres M. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative dna damage in rat liver mitochondria // Free Radical Biology & Medicine. 2002. Vol. 32, N 9. P. 882 – 889.

108. Wei Y. H., Lee H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging // Experimental Biology and Medicine. 2002. Vol. 227, N 9. P. 671 – 682.

109. Stadtman E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases // Annals of the New York Academy of Sciences. 2001. Vol. 928. P. 22 – 38.

110. Pamplona R., Barja G., Portero-Otin M. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a

homeoviscous-longevity adaptation // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. Vol. 959. P. 475 – 490.

111. Zhu Y., Carvey P., Ling Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain // *Brain research*. 2006. Vol. 1090, N 1. P. 35–44.

112. Стрельченко Е. В., Никитченко И. В., Калиман П. А. Гемоксигеназная активность в органах крыс при введении хлорида кадмия // *Український біохімічний журнал*. 2002. Т. 74, № 5. С. 108–112.

113. Kaliman P. A., Nikitchenko I. V., Sokol O. A., Strelchenko E. V. Regulation of heme oxygenase activity in rat liver during oxidative stress induced by cobalt chloride and mercury chlorid // *Biochemistry*. 2001. Vol. 66, N 1. P. 72–82.

114. Flora S., Saxena G., Mehta A. Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: role of reactive oxygen species and intracellular Ca^{2+} // *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007. Vol. 322, N 1. P. 108–116.

115. Ковалева М. К., Мензянова Н. Г. Эффект гормезиса у *Dunaliella viridis* teodor. (chlorophyta) под действием сернокислой меди // *Альгология*. 2011. Том. 21, № 3. С. 33–39.

116. Thanan R., Oikawa S., Hiraku Y., Ohnishi S., Pinlaor S., Yongvanit P., Kawanishi S., Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer // *International journal of molecule biology science*. 2015. Vol. 16, № 1. P. 193-217.

117. Macallister S., Maruf A., Wan L., Chung E., P. O'brien. Modeling xenobiotic susceptibility to hepatotoxicity using an in vitro oxidative stress inflammation model // *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2013. Vol. 91. P. 236–240.

118. Пентюк А. А., Мороз Л. В., Паламарчук О. В. Поражения печени ксенобиотиками // *Современные проблемы токсикологии*. 2001. № 1. С. 8–16.

119. Venditti P., Balestrieri M., Meo S. Di, T. de Leo Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissues // *Journal of Endocrinology*. 1997. Vol. 115. P. 151–157.
120. Gonzales S., Polizio A., Erario M., Tomaro M. Glutamine is highly effective in preventing in vivo cobalt-induced oxidative stress in rat liver // *World Journal of Gastroenterology*. 2005. Vol. 11, N 23. P. 3533–3538.
121. Матолінець О. М. Вікові особливості антиоксидантної системи у тварин з кадмієвим токсикозом // *Медична хімія*. 2000. Т. 2, № 1. С. 44 – 48.
122. Liu J., Qu W., Kadiiska M. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009. Vol. 238, N 3. P. 209–214.
123. Li X. Wang L., Chen C. Effects of exogenous thymosin β 4 on carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, N 1. P. 58–72.
124. Zhu W., Fung P. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes nos and nadph in CCl_4 -induced acute liver injury of mice // *Free radicals in biology and medicine*. 2000. Vol. 29, N 1. P. 870–880.
125. Макеева А. В., Попова Т. Н., Матасова Л. В Действие тиоктовой кислоты на функционирование антиоксидантной глутатионзависимой системы при токсическом гепатите у крыс // *Биомедицинская химия*. 2007. Т. 53, № 2. С. 181–189.
126. Агарков А. А., Попова Т. Н., Семенихина А. В. Каталитические свойства глутатионредуктазы из печени крысы в норме и при токсическом гепатите // *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55, № 2. С. 169–176.
127. Шульгин К. К. Регуляция активности глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени крыс и действии веществ - протекторов // автореф. дис. на соискание научной степени доктора биол. наук : спец.

03.00.04 «Биохимия». Минск, 2008. 36 с.

128. Gaetke L. M., Chow C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients // *Toxicology*. 2003. Vol. 189, N 1. P. 147–163.

129. Божков А. И., Сидоров В. И., Длубовская В. Л., Шевцова М. Я., Суров Ю. Н. Проявление эффекта импринтинга в паттерне внутриклеточного распределения ионов меди в печени после многократных введений сернокислой меди // *Биомедицинская химия*. 2010. Т. 56, № 2. С. 195–208.

130. Танеева А. И. К механизму действия меди на черноморских мидий // *Экология моря*. 1989. Т. 1. С. 83–87.

131. Saari J. T. Chronic treatment with dimethyl sulfoxide protects against cardiovascular defects of copper deficiency // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York). 1989. Vol. 190, N 1. P. 121–124.

132. Evans P., Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status // *British Journal of Nutrition*. 2001. Vol. 85, N 2. P. 67–74.

133. Cesaratto L., Vascotto C., Calligaris S., Tell G. The importance of redox state in liver damage // *Annals of Hepatology*. 2004. Vol. 3, N 3. P. 86–92.

134. Arrigo T., Leonardi S., Cuppari C. Role of the diet as a link between oxidative stress and liver diseases // *World Journal of Gastroenterology*. 2015. Vol. 21, N 2. P. 384–395.

135. Nobili V., Manco M., Devito R. Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial // *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2008. Vol. 48, N 1. P. 119–128.

136. Huang M., Greenson J., Chao C. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study // *The American Journal of Gastroenterology*. 2005. Vol. 100, N 5. P. 1072–1081.

137. Rector R., Warner S., Liu Y. Exercise and diet induced weight loss

improves measures of oxidative stress and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome // *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2007. Vol. 293, N 2. P. 500–506.

138. Hu Y., Zhang M., Chen Y. Postoperative intermittent fasting prevents hippocampal oxidative stress and memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion // *European Journal of Nutrition*. 2018. Vol. 5. P. 589–600.

139. Shin B., Kang S., Kim D., Park S. Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats // *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.). 2018. Vol. 243, N 4. P. 334–343.

140. Liu H., Javaheri A., Godar R. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway // *Autophagy*. 2017. Vol. 13, N 11. P. 1952–1968.

141. Lindström J., Uusitupa M. Lifestyle intervention, diabetes, and cardiovascular disease // *Lancet* (London, England). 2008. Vol. 371, N 9626. P. 1731–1733.

142. Fann D. Y.-W., Poh, T. V. Arumugam Positive effects of intermittent fasting in ischemic stroke // *Experimental Gerontology*. 2017. Vol. 89. P. 93–102.

143. Hennebelle M., Roy M., St-Pierre V. Energy restriction does not prevent insulin resistance but does prevent liver steatosis in aging rats on a western-style diet // *Nutrition*. 2015. Vol. 31, N 3. P. 523–530.

144. Harvie M., Pegington M., Mattson M. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women // *International Journal of Obesity*. 2011. Vol. 35, N 5. P. 714–727.

145. Golbidi S., Daiber A., Korac B. Health benefits of fasting and caloric restriction // *Current Diabetes Reports*. 2017. Vol. 17, N 12. P. 112–123.

146. Fontana L., Partridge L., Longo V. Extending healthy life span—from

yeast to humans // Science. 2010. Vol. 328, N 5976. P. 321–326.

147. Clancy D., Gems D., Harshman L. Extension of life-span by loss of chico, a drosophila insulin receptor substrate protein // Science. 2001. Vol. 292, N 5514. P. 104–106.

148. Wang X., Du X., Zhou Y. Intermittent food restriction initiated late in life prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in the annual fish *nothobranchius guentheri* // Biogerontology. 2017. Vol. 18, N 3. P. 383–396.

149. Piper M., Selman C., McElwee J., Partridge L. Separating cause from effect: how does insulin/igf signalling control lifespan in worms, flies and mice? // Journal of Internal Medicine. 2008. Vol. 263, N 2. P. 179–191.

150. Taormina G., Mirisola M. Longevity: epigenetic and biomolecular aspects // Biomolecular Concepts. 2015. Vol. 6, N 2. P. 105–117.

151. Taormina G., Mirisola M. Calorie restriction in mammals and simple model organisms // BioMed Research International. — 2014. Vol. 7, N 1. P. 565–569.

152. Wu G., Meininger C. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors // Annual Review of Nutrition. 2002. Vol. 22. P. 61–86.

153. Lu S. C. Antioxidants in the treatment of chronic liver diseases: why is the efficacy evidence so L. G. Sanchez-Lozada, C. Cicerchi weak in humans? // Hepatology (Baltimore, Md.). 2008. Vol. 48, N 5. P. 1359–1361.

154. Uebanso T., Taketani Y., Fukaya M. Hypocaloric high-protein diet improves fatty liver and hypertriglyceridemia in sucrose-fed obese rats via two pathways // American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. 2009. Vol. 297, N 1. P. 76-84.

155. Agius L. High-carbohydrate diets induce hepatic insulin resistance to protect the liver from substrate overload // Biochemical Pharmacology. 2013. Vol. 85, N 3. P. 306–312.

156. Lanaspá M. A. Uric acid stimulates fructokinase and accelerates fructose metabolism in the development of fatty liver // PloS One. 2012. Vol. 7, N 10.

P. 479–481.

157. Nomura K., Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012. Vol. 23, N 3. P. 203–208.

158. Hao W., Wong O., Liu X. Ω -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes // *Journal of Pediatric Surgery*. 2010. Vol. 45, N 12. P. 2412–2418.

159. Ronis M., Korourian S., Zipperman M. Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition // *The Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 134, N 4. P. 904–912.

160. Oller do Nascimento C. M., Ribeiro E. B., Oyama L. M. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat / C. M. Oller do Nascimento // *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*. 2009. Vol. 81, N 3. P. 453–466.

161. Ibrahim S., Kohli R., Gores G. Mechanisms of lipotoxicity in nafld and clinical implications // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2011. Vol. 53, N 2. P. 131–140.

162. Loguercio C., De Girolamo V., Federico A. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease // *Biological Trace Element Research*. 2001. Vol. 81, N 3. P. 245–254.

163. Rayssiguier Y., Durlach J., Gueux E. Magnesium and ageing. i. experimental data: importance of oxidative damage // *Magnesium Research*. 1993. Vol. 6, N 4. P. 369–378.

164. Hosseini M., Shaki F., Ghazi-Khansari M., Pourahmad J. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ros production // *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014. Vol. 70, N 1. P. 367–381.

165. Seth R., Yang S., Choi S. In vitro assessment of copper-induced toxicity

- in the human hepatoma line, hep g2 // *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2004. Vol. 18, N 4. P. 501–509.
166. Lang P. A., Schenck M., Nicolay J. P. Liver cell death and anemia in wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide // *Nature Medicine*. 2007. Vol. 13, N 2. P. 164–170.
167. Roberts E., Sarkar B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008. Vol. 88, N 3. P. 851-854.
168. Young I. S., Trouton T. G., Torney J. J. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis // *Free Radical Biology & Medicine*. 1994. Vol. 16, N 3. P. 393–397.
169. Tanaka H., Fujita N., Sugimoto R. Hepatic oxidative dna damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C // *British Journal of Cancer*. 2008. Vol. 98, N 3. P. 580–586.
170. Mitsui T., Umaki Y., Nagasawa M., Akaike M., Aki K., Azuma H., Ozaki S., Odomi M., Matsumoto T. Mitochondrial damage in patients with long-term corticosteroid therapy: development of oculoskeletal symptoms similar to mitochondrial disease // *Acta Neuropathologica*. 2002. Vol. 104, N 3. P. 260–266.
171. Sorensen M., Sanz A., Gómez J. Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria // *Free Radical Research*. 2006. Vol. 40, N 4. P. 339–347.
172. Ahmet I, Wan R, Mattson M., Lakatta E., Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats // *Circulation*. 2005. Vol. 112. P. 3115-3121.
173. Chandrasekar B., Nelson J., Colston J., Freeman G. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2001. Vol. 280, N 5. P. 2094-2102.
174. Mattson M., Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems // *The Journal of*

Nutritional Biochemistry. 2005. Vol. 16, N 3. P. 129–137.

175. Mårtensson J. The effect of fasting on leukocyte and plasma glutathione and sulfur amino acid concentrations // *Metabolism*. 1986. Vol. 35, N 2. P. 118–121.

176. Brouckaert P., Gent U., Olivecrona T. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF- α is involved // *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*. 2004. Vol. 5. P. 711-717.

177. Wohaieb S. A., Godin D. V. Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats // *Diabetes*. 1987. Vol. 36, N 2. P. 169 – 173.

178. Godin D. V., Wohaieb S. A. Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status // *Free Radical Biology & Medicine*. 1988. Vol. 5, N 3. P. 165 – 176.

179. Igarashi T., Satoh T., Ueno K., Kitagawa H. Species difference in glutathione level and glutathione related enzyme activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters // *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 1983. Vol. 6, N 12. P. 941 – 949.

180. Vázquez-Medina J. P., Crocker D. E., Forman H. J., Ortiz R. M. Prolonged fasting does not increase oxidative damage or inflammation in postweaned northern elephant seal pups // *Journal of Experimental Biology*. 2010. Vol. 213, N 14. P. 2524–2530.

181. Mccay C. M., Growell M. F. Prolonging the life span // *Medical Science Monitor*. 1934. Vol. 39. P. 405–421.

182. Mccay C. M., Growell M. F., Maynard L. A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size // *The Journal of Nutrition*. 1935. Vol. 10. P. 63–79.

183. Wegman M. P., Guo M. H., Bennion D. M. Practicality of intermittent fasting in humans and its effect on oxidative stress and genes related to aging and metabolism // *Rejuvenation Research*. 2015. Vol. 18, N 2. P. 162–172.

184. Mattson M. P. Dietary factors, hormesis and health // *Ageing Research Reviews*. 2008. Vol. 7, N 1. P. 43–48.
185. Martin B., Mattson M., Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging // *Ageing Research Reviews*. 2006. Vol. 5, N 3. P. 332–353.
186. Anson R., Guo Z., R. de Cabo Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. Vol. 100, N 10. P. 6216–6220.
187. Mattson M., Longo V., Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes // *Ageing Research Reviews*. 2017. Vol. 39. P. 46–58.
188. Gredilla R., Barja G. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146, N 9. P. 3713–3717.
189. Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction // *Ageing Research Reviews*. 2002. Vol. 1, N 3. P. 397–411.
190. Pamplona R., Portero-Cotín M., Requena J. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2002. Vol. 123. P. 1437–1446.
191. Saxon D. M., Snyder D. L., Chen L. H. Effects of age and food restriction on antioxidant parameters in rats // *The FASEB Journal*. 1990. Vol. 4, N 3. P. 1566–1571.
192. Laganier S., Yu B. P. Effect of chronic food restriction in aging rats. ii. liver cytosolic antioxidants and related enzymes // *Mechanisms of Ageing and Development*. 1989. Vol. 48, N 3. P. 221–230.
193. Chausse B., Vieira-Lara M., Sanchez A. Intermittent fasting results in tissue-specific changes in bioenergetics and redox state // *Plos One*. 2015.

Vol. 10, N 3. P. 402-413.

194. Sharma S., Singh R., Kaur M., Kaur G. Late-onset dietary restriction compensates for age-related increase in oxidative stress and alterations of HSP 70 and Synapsin 1 protein levels in male Wistar rats // *Biogerontology*. 2010. Vol. 11, N 2. P. 197–209.

195. Castello L., Froio T., Maina M. Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF-KB activation // *Free Radical Biology & Medicine*. 2010. Vol. 48, N 1. P. 47–54.

196. Longo V. D., Mattson M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. // *Cell Metabolism*. 2014. Vol. 19, N 2. P. 181–192.

197. Гундерманн К. И. Новейшие данные о механизмах действия и клинической эффективности эссенциальных фосфолипидов // *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2002. № 2. С. 48-54.

199. Molina M., Sanchez-Reus I., Iglesias I., Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003. Vol. 26, N 10. P. 1398–1402.

200. Kilmurry M., Cauch-Dudek K., O'Rourke K., Heathcote E. Is the mayo model useful for predicting survival following the introduction of ursodeoxycholic acid treatment for primary biliary cirrhosis? // *Gastroenterology*. 1995. Vol. 108, N 4. P. 1148-1153.

201. Подымова С. Д. Возможности клинического использования адеметионина у больных с заболеваниями печени // *Фармакология*. 2010. № 3. С. 17–24.

202. Яковенко Э. П., Иванов А. Н. Фиброз печени: механизмы развития и вопросы терапии // *Фарматека*. 2011. № 12. С. 16–22.

203. Кучерявый Ю. А. Хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома - звенья одной цепи // *Клинические*

Перспективы Гастроэнтерологии, Гепатологии. 2012. № 5. С. 3–11.

204. Gutiérrez-Rebolledo G., Siordia-Reyes A., Meckes-Fischer M., Jiménez-Arellanes A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016. Vol. 9, N 7. P. 644–651.

205. Popov S. S., Pashkov A. N., Zoloedov V. I., Shvedov G. I. The use of melatonin in combined therapy of drug-induced hepatitis // *Клиническая медицина*. 2013. Т. 91, № 3. С. 50–53.

206. Cachón A., Quintal-Novelo C., Medina-Escobedo G. Hepatoprotective effect of low doses of caffeine on ccl4-induced liver damage in rats // *Journal of Dietary Supplements*. 2017. Vol. 14, N 2. P. 158–172.

207. Чернов В. Н. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита печени стареющего организма при экспериментальной интоксикации тетрахлорметаном // дис. на соискание научной степени кандидата медицинских наук : 14.00.16. Москва, 2008. 144 с.

208. Ferguson L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability // *Mutation Research*. 2001. Vol. 475. P. 89–111.

209. Steele J., Sponseller J., Schmidt D., Cohen O., Tzipori S. Hyperimmune bovine colostrum for treatment of gi infections // *Journal human vaccines & Immunotherapeutics*. 2013. Vol. 9, N 7. P. 1565-1568.

210. Sacerdote P., Mussano F., Franchi S., Panerai A.E., Bussolati G., Carossa S., Bartorelli A., Bussolati B. Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum // *Journal of Dairy Science*. 2013. Vol. 96, N 3. P. 1745–1754.

211. Rathe M., Müller K., Sangild P. Clinical applications of bovine colostrum therapy // *Nutrition reviews*. 2014. Vol. 72 N 4. P. 237 – 254.

212. Walter L., Hurley P. Theil Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk // *Nutrients*. 2011. Vol. 3, N 4. P. 442-474.

213. Kamatch S. A., Narayan K. A. Interaction of Ca²⁺ with endoplasmatic reticulum of rat liver: a standard procedure for the isolation of microsomes //

Analytical Biochemistry. 1972. Vol. 48, N 1. P. 53–61.

214. Ohkawa H., Ohahi N., Jadi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Analytical Biochemistry. 1979. Vol. 95, N 2. P. 351–358.

215. Asakawa T., Matsushita S. coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. 1980. Vol. 15, N 3. P. 137–140.

216. Ланкин В. З., Гуревич С. М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами при экспериментальном злокачественном росте // Биохимия. 1976. Т. 226, № 3. С. 705–708.

217. Raghavachari N., Lou M. Evidence for the presence of thioltransferase in the lens // Experimental Eye Research. 1996. Vol. 63. P. 433–441.

218. Gallogly M., Shelton M., Qanungo S. Glutaredoxin regulates nuclear factor kappa-B and intercellular adhesion molecule in Müller cells: model of diabetic retinopathy // Antioxidants & Redox Signaling. 2010. Vol. 12, N 12. P. 1339–1353.

219. Zaheer N., Tewary K., Krishnan P. Mitochondrial forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase in rat liver // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1967. Vol. 120, N 1. P. 22–34.

220. Bauman D. E., Brown R. E., Davis C. J. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow and cow // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1970. Vol. 140, N 1. P. 237–244.

221. Усатенко М. С., Цончева А. В. Влияние инсулиннедостаточности и гидрокортизона на активность NADP- и NAD-зависимых малатдегидрогеназ в печени и коре почек крыс // Вопросы медицинской химии. 1974. Т. 20, № 4. С. 401–406.

222. Miller G. L. Protein determination for large numbers of samples // Analytical Chemistry. 1959. Vol. 31, N 5. P. 964–966.

223. Wang X., Wang H., Li J., Yang Z., Zhang J., Qin Z., Wang L., Kong X.. Evaluation of bioaccumulation and toxic effects of copper on hepatocellular structure in mice // *Biological Trace Element Research*. 2014. Vol. 159, N 1. P. 312–319.
224. Брин В. Б., Митциев К. Г., Митциев А. К., Кабисов О. Т. Влияние экспериментальной гиперкальциемии на кардиоваскулярные проявления хронической медной интоксикации // *Вестник новых медицинских технологий*. 2014. Т. 21, № 2. С. 63-68.
225. Darwish W. S., Ikenaka Y., Nakayama S., Ishizuka M. The effect of copper on the mrna expression profile of xenobiotic-metabolizing enzymes in cultured rat h4-ii-e cells // *Biological Trace Element Research*. 2014. Vol. 158, N 2. P. 243–248.
226. Никитин В. Н. Задерживающее рост питание и его влияние на возрастные изменения организма и изменение тканевых фракций фосфора и структурных белков печени у молодых крыс под влиянием длительного задерживающего рост питания и последующего откорма // *Биохимия*. 1960. Т. 29. С. 111 – 123.
227. Агарков А. А., Попова Т. Н., Матасова Л. В. Воздействие мелатонина на антиоксидантный статус при сахарном диабете 2 типа у крыс // *Биомедицинская химия*. 2013. Т. 59, № 4. С. 434-442.
228. Freminet A. Carbohydrate and acid metabolism during acute hypoxia in rats blood and heart metabolites // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1981. Vol. 70, N 3. P. 427–430.
229. Рахманова Т. И. Попова, А. В. Некоторые особенности функционирования надф-изоцитратдегидрогеназы в митохондриях гепатоцитов крысы // *Вестник Воронежского Государственного Университета*. 2001. N 2. P. 142–146.
230. Губский Ю. И. Коррекция химического поражения печени // *Киев : Здоровье*, 1989. 168 с.
231. Speakman J. R., Mitchell S. E. Caloric restriction // *Molecular Aspects of*

Medicine. 2011. Vol. 32, N 3. P. 159–221.

232. Masoro E. J. Caloric restriction and aging: an update // *Experimental Gerontology*. 2000. Vol. 35, N 3. P. 299–305.

233. Sharma R. Dietary restriction and its multifaceted effects // *Current Science*. 2004. Vol. 87. P. 1203–1210.

234. Cohen H. Y., Miller C., Bitterman K. J. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the sirt1 deacetylase // *Science (New York)*. 2004. Vol. 305, N 5682. P. 390–392.

235. Hansen M. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *caenorhabditis elegans* genomic rnai screen // *Plos genetics*. 2005. Vol. 1, N 1. P. 119–128.

236. Lin S., Kaeberlein M., Andalis A. Calorie restriction extends *saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration // *Nature*. 2002. Vol. 418, N 6895. P. 344–348.

237. Божков А. И. Низкокалорийная диета как модель увеличения продолжительности жизни и исследования механизмов старения // *Успехи геронтологии*. 2001. Т. 7. С. 89–99.

238. Schäfer D. Aging, longevity, and diet: historical remarks on calorie intake reduction // *Gerontology*. 2005. Vol. 51, N 2. P. 126–130.

239. Lee C., Klopp R., Weindruch R., Prolla T. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction // *Science*. 1999. Vol. 285. P. 1390–1393.

240. Finkel T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // *Nature*. 2000. Vol. 408. P. 239–247.

241. Foster M., Sohal B., Sohal R. Reversible effects of long-term caloric restriction on protein oxidative damage // *The journals of gerontology*. 2000. Vol. 55. P. 522–529.

242. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Al Begai M. A. Y., Alsardia M. M. A., Kurguzova N. I. Low-molecular weight cow colostrum components in functional nutrition // *Translational medicine*. 2017. Vol. 6, N 1. P. 11–17.

243. Кліщ І. М. Вікові особливості перебігу окиснювальних процесів за

умов токсичного ураження печінки та способи їх корекції : дис. на здобуття наукового ступеня доктора біол. наук : 03.00.04. Львів, 2003. 372 с.

244. Ravin H. A. Rapid test for hepatolenticular degeneration // Lancet. 1956. Vol. 1. P. 7267 – 7271.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:

1. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., **Lebid K. M.**, Ivanov E. G., Kurguzova N. I., Gayevoy S. S., Sharko M. O., Alsardia Mohammad M. A., Al Begai Mohammad A. Y. Low molecular weight components from various sources eliminate oxidative stress and restore physiological characteristic of animals at early stages of Cu- induced liver fibrosis development // Translational Biomedicine. 2017. Vol. 8, N 2. P. 1–9. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

2. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Klimova E. M., Linkevych O. S., **Lebid K. M.**, Al-Bahadli A. M. M., Alsardia M. M. A. Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis //Advances in Gerontology. 2017. Vol. 7, N 1. P. 41–50. (SCOPUS, PubMed). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, вимірювання фізіологічних показників, вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

3. Bozhkov Anatoliy I., Klimova Olena M., Nikitchenko Yuriy. V., Kurguzova Natalya I., Linkevych Olena S., **Lebid Katherine M.**, Protsenko Olena S., Remneva Natalya A., Al-Bahadly Ali M. M., Al-Begai Mohammad A. Y. Ontogenetic approach to the study of mechanisms of copper-induced liver fibrosis // Advances in Aging Research. 2017. N 6. P. 39–54. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.

4. Bozhkov Anatoly I., Nikitchenko Yuriy V., **Lebed Katerina N.**, Linkevych Olena S., Kurguzova Natalia I., Klimova Olena M., Al. Begai Mohammad A.Y., Al -Bahadly Ali M. M., Alsardia Mohammad M. A. The Cyclic Feeding Regime Induces Decaying Age-Dependent Oxidative Stress and Regulates the Cell Chain of the Immunity // *Advances in Aging Research*. 2016. N 5. P. 151–165. *“Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експерименту (вимірюванні фізіологічних показників, вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази та глутатіонпероксидази), участь у обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті”.*

5. Bozhkov A. I., Kurguzova N. I., Krivoruchko T. V., **Lebed’ E. N.**, Mikhailets A. O., Danladi S. D., Bozhkov A. A. and Girich M. S. A Cyclic Feeding Regime: A New Model in Experimental Gerontology // *Advances in Gerontology*. 2014. Vol. 4, N 4. P. 252–259. (SCOPUS, PubMed). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, вимірювання фізіологічних та біохімічних показників, моніторингживаності тварин, участь у обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті”.*

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

6. **Лебедь Е. Н.**, Афанасьева А. В. Влияние комплекса «Фунгидол» на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса у животных с избыточным питанием в раннем периоде постнатального онтогенеза // *Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів XI міжнародної конференції молодих вчених, 29 листопада–2 грудня 2016 р. Харків, 2016. С. 11. “Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, написання тез”.*

7. Кургузова Н. И., Бондарь В. В., Лебедь Е. Н., Аль Бегаи М. А. Ю., Алсардиа М. М. А. Возрастзависимый характер проявления оксидативного стресса при циклическом режиме кормления // Здоров'я, харчування, довголіття: збірник матеріалів науково-практичної конференції, 16–17 травня 2016 р. Київ, 2016. С. 345. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів”*.

8. Лебедь Е. Н., Афанасьева А. В., Гаевой С. С. Низкомолекулярные компоненты молозива регулируют активность показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса крови крыс // Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів міжнародної конференції молодих вчених, 2–4 грудня 2015 р. Харків, 2015. С. 15–16. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, написання тез”*.

9. Никитченко И., Боцула И., Лебедь Е., Никитченко Ю. Изменение активности глутаредоксинов и глутатионпероксидаз в митохондриях печени крыс в процессе постнатального онтогенеза // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: збірник тез міжнародної наукової конференції, 24–25 вересня 2015 р. Дніпро, 2015. С. 134–135. *“Особистий внесок здобувача: вимірювання активності глутатіонпероксидази та глутаредоксину, обговоренні та інтерпретації результатів”*.

10. **Lebid K.** The influence of a cyclic feeding regime on the prooxidant-antioxidant balance in liver mitochondria of rats of various ages // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали міжнародної конференції молодих вчених, 18–21 листопада 2014. Харків, 2014. С. 22.

Апробація результатів дисертації

1. Міжнародна наукова конференція «Біологія: від молекули до біосфери». Харків. 29 листопада–2 грудня 2016. Очна форма участі.
2. Науково-практична конференція «Здоров'я, харчування, довголіття». Київ. 16–17 травня 2016. Очна форма участі.
3. Міжнародна наукова конференція «Біологія: від молекули до біосфери». Харків. 2–4 грудня 2015. Очна форма участі.
4. Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» Дніпропетровськ. 24–25 вересня 2015. Заочна форма участі.
5. Міжнародна наукова конференція «Біологія: від молекули до біосфери». Харків. 8–21 листопада 2014. Очна форма участі.

ДОДАТОК 2 ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з навчальної та інноваційної роботи Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

М. О. Азаренков від 21.11.2017

АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи Лебідь Катерини Миколаївни «Дослідження біохімічної відповіді молодих і старих тварин на гепатотоксичну дію сірчаноокислої міді та вплив біологічних антидотів» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі: завідувача кафедри молекулярної біології та біотехнології, професора, доктора біологічних наук Божкова А. І., заступника декана з наукової роботи біологічного факультету, заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Наглова О. В. та голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації Лебідь К. М., а саме: методичні та аналітичні підходи до вивчення вік-залежних відповідей показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу на гепатотоксичну дію ксенобіотиків та розробка способів корегування встановлених патологічних змін прооксидантно-антиоксидантного балансу впроваджені в навчальний процес біологічного факультету у рамках спеціального курсу: «Молекулярна біологія» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загальних курсів біологічного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна «Молекулярна біологія» та «Біотехнологія».

Завідувач кафедри
молекулярної біології та
біотехнології,
д.б.н., професор

Заступник декана з навчальної
роботи, к.б.н., доцент

Голова методичної комісії
біологічного факультету,
к.б.н., доцент



А. І. Божков



О. В. Наглов



В. В. Мартиненко