

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

Кваліфікаційна
наукова праця на
правах рукопису

МОХАММАД МОРШЕД АЙЕД АЛСАРДІА

УДК 577.1:615.099:591:546.56

ДИСЕРТАЦІЯ

**«ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ «ВІДНОВЛЕННЯ» ПЕВНИХ
БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ
СПОЛУКАМИ ПІСЛЯ ДІЇ ТОКСИЧНИХ ДОЗ ІОНІВ МІДІ»**

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
_____ **МОХАММАД МОРШЕД АЙЕД АЛСАРДІА**

Науковий керівник: Божков Анатолій Іванович, доктор біологічних наук,
професор

Харків - 2019

АНОТАЦІЯ

МОХАММАД МОРШЕД АЙЕД АЛСАРДІА. Дослідження механізмів «відновлення» певних біохімічних показників біологічно активними сполуками після дії токсичних доз іонів міді. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Дослідження механізмів регуляції біологічних процесів є центральною проблемою сучасної біохімії, без знань яких не можуть бути вирішені проблеми регуляції тривалості життя і усунення патологічних станів. Дослідження механізмів патогенезу різних захворювань показало, що найбільш загальною і інтегральною характеристикою є зміни показників про-антиоксидантної системи. Як відомо, однією з найбільш популярних гіпотез про механізми старіння, що широко обговорюються, є вільнорадикальна гіпотеза старіння. Отже, показники редокс-системи можуть розглядатися як показники зміни регуляторних систем організму. Разом з тим, залишається нез'ясованим, чи є окислювальний стрес причиною або наслідком розвитку патологій і старіння організму. Сучасні дані переконливо показали, що продукти вільнорадикальних реакцій в біологічних системах можуть виконувати як патологічну, так і фізіологічну роль. У зв'язку з цим, дослідження фізіологічної і патологічної ролі продуктів вільнорадикальних реакцій є актуальним і надзвичайно складним завданням. Для вирішення такого завдання необхідно застосовувати експериментальні моделі. В якості такої моделі можна використати індукцію тих чи інших метаболічних-патологічних станів.

Відомо, що іони міді – одні з найбільш поширених токсичних сполук середовища. Екзогенна мідь накопичується переважно в печінці і може викликати фіброз печінки та інші патології, в тому числі й хворобу Вільсона-

Коновалова. Розвиток фіброзу залежить не лише від дози токсикантів, а й від метаболічних станів організму. Отже, досліджуючи механізми індукції тієї чи іншої патології одним і тим самим індуктором у тварин різних вікових груп можна визначити роль вікових метаболічних змін і оцінити вік-залежну реакцію на ті чи інші екзогенні впливи. Розуміння цих механізмів є важливим методологічним підходом в геронтології і фармакології. В даний час остаточно не вирішено питання про механізми дії високих доз сірчаноокислої міді.

У зв'язку з цим, досліджували механізми прояву окисного стресу у тварин на тлі інтоксикації іонами міді після багатократного послідовного впливу сірчаноокислої міді в дозі 1 мкг / 100 г маси тіла.

З метою визначення ролі про-антиоксидантної системи в розвитку патології, зокрема, фіброзу печінки, використовували низькомолекулярні компоненти молозива і біологічно активну добавку «мікс-фактор», які мають широкий спектр дії на біологічні системи, і в тому числі справляють й антиоксидантний ефект.

Можна вважати, що справляючи вплив на прооксидантно-антиоксидантну систему, біологічно активні добавки («мікс-фактор» і низькомолекулярні компоненти – НМК) можуть забезпечити усунення ефектів інтоксикації сірчаноокислою міддю або збільшувати тривалість життя старих тварин, які можуть мати підвищену кількість продуктів вільнорадикальних реакцій в результаті старіння.

Метою роботи було дослідження механізмів регуляції деяких показників про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю і впливу низькомолекулярних компонентів біологічного походження («мікс-фактор», НМК) на ці показники, а також встановлення взаємозв'язку показників про-антиоксидантної системи з фізіологічними особливостями організму і тривалістю життя експериментальних тварин (щурів).

У роботі використали біохімічні методи досліджень (дослідження активності про-антиоксидантної системи, ферментів, визначення біохімічних показників активності печінки (вміст триацилгліцеридів, холестерину, альбуміну

та ін.)), а також фізіологічні показники (температура і маса тіла, працездатність експериментальних тварин).

Було показано, що багаторазове послідовне введення сірчаноокислої міді з інтервалом між введенням 48 годин у дозі 1 мг / 100 г маси тіла, яка становила 30 % від летальної дози, супроводжувалося втратою маси тіла, зниженням температури тіла на $0,5 \pm 1$ °C і зниженням працездатності. У цих тварин вміст гідроперекисів ліпідів як в мітохондріях печінки, так і сироватці крові був збільшений порівняно з контролем на 45-90 %. При цьому активність глутатіонпероксидази як в мітохондріях і мікросомах печінки, так і сироватці була зменшена на 35-40 %. Активність γ -глутамілтрансферази була збільшена на 263 % порівняно з контролем. Разом з тим, такі показники активності печінки, як активність аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази залишалися в межах контрольних значень. Незмінним у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю залишався і вміст триацилгліцеридів, креатину й альбуміну. Ці результати дозволяють стверджувати, що після триразового введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді мала місце початкова стадія розвитку фіброзу печінки, і на початкових стадіях змінювалися, насамперед, показники про-антиоксидантної системи та активність ГГТ. Отримані результати підтверджують припущення про те, що редокс-система може розглядатися як інтегральна система первинної реакції на токсичні або патофізіологічні чинники.

Для вирішення поставленої мети проводили оцінку можливого ефекту нормалізації досліджуваних показників. В якості робочої гіпотези було висловлено таке припущення: якщо біологічно активні сполуки природного походження будуть нормалізувати фізіологічні показники, то, визначаючи показники редокс-системи організму, можна встановити взаємозв'язок між ними і фізіологічними показниками тварин, що є актуальною проблемою біохімії.

Виявили, що введення експериментальним тваринам «мікс-фактора» в дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла на тлі інтоксикації організму сірчаноокислою міддю забезпечувало інтенсивне зростання маси тіла тварин, вони не відрізнялися від

контрольних тварин за температурою тіла, і у них збільшувалася здатність здійснювати роботу в тесті плавання з вантажем, хоча не досягала контрольних значень.

У наступних серіях експериментів визначали здатність «мікс-фактора» виконувати функцію антидоту. З цією метою тварини отримували «мікс-фактор» в дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла з подальшим введенням їм летальної дози сірчаноокислої міді. Виявилося, що якщо в контрольному варіанті гинуло більше 90 % тварин, то після «мікс-фактора» - лише 40 % тварин. Отже, «мікс-фактор» має властивості антидоту. Збільшення працездатності тварин після дії «мікс-фактора», який вводили на тлі інтоксикації організму сірчаноокислою міддю, було пов'язано з тим, що він забезпечував «збереження» кількості еритроцитів у крові. У той же час на тлі інтоксикації сірчаноокислою міддю кількість еритроцитів у кров'яному руслі зменшувалася на 30 % порівняно з контролем.

Було виявлено, що низькомолекулярні компоненти молозива, які представлені амінокислотами, пептидами і низькомолекулярними біогенами, цукрами і вітамінами чинили подібні до «мікс-фактору» ефекти на фізіологічні показники після інтоксикації організму. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що «мікс-фактор» і НКМ, незважаючи на відмінності в складі, викликають подібні фізіологічні ефекти.

У наступних серіях експериментів досліджували можливість корекції показників про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю.

Виявилося, що введення експериментальним тваринам «мікс-фактора» і НКМ на тлі інтоксикації сірчаноокислою міддю супроводжувалося нормалізацією або збереженням кількості гідроперекисів ліпідів у сироватці крові, в той час як їх вміст на тлі інтоксикації був збільшеним на 90 %. Активність глутатіонпероксидази, яка була знижена, також відповідала нормі після введення «мікс-фактора», а після введення цим тваринам НКМ навіть перевищувала контрольний рівень в сироватці крові.

«Мікс-фактор» і НКМ приводили до норми вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки тварин після інтоксикації сірчаною кислотою, що корелювало зі збільшенням активності глутатіонпероксидази в сироватці крові цих тварин.

Як відомо, аконітаза, яка входить до циклу Кребса, є чутливим маркером окислювального стресу. Виявлено, що інтоксикація сірчаною кислотою організму супроводжувалася дворазовим зменшенням активності аконітази в мітохондріях, а після введення тваринам «мікс-фактора» її активність не відрізнялася від контролю. Ці результати переконливо свідчать про те, що інтоксикація сірчаною кислотою супроводжувалася індукцією окисного стресу, а введення цим тваринам на тлі інтоксикації «мікс-фактора» або НКМ супроводжувалося усуненням окисного стресу, що проявлялося у зміщенні рівноваги про-антиоксиданти в бік антиоксидантів. Можна вважати, що «мікс-фактор, як і НКМ, має антиоксидантні властивості або ж активує антиоксидантні системи в організмі.

Було показано, що НКМ у малих дозах (0,01-0,1 мкг / 100 г маси) виявляв антиоксидантні властивості, що проявлялося в дозо-залежній активації глутатіонпероксидази в сироватці крові. Якщо у вихідному контрольному рівні вона становила близько 20 нмоль НАДФН / мл сироватки, то після введення тваринам НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г – 38-40 нмоль НАДФН / мл сироватки, при цьому вміст гідроперекисів ліпідів залишався на одному рівні. При введенні великих доз НКМ (0,1-3 мг / 100 г) мало місце лінійне збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів на тлі лінійного зменшення активності глутатіонпероксидази.

Отже, відновлення показників про-антиоксидантної системи до рівня норми у тварин з інтоксикацією сірчаною кислотою, введенням «мікс-фактора» або НКМ поновлювало зміни фізіологічних показників у експериментальних тварин.

Про взаємозв'язок про-антиоксидантної системи з фізіологічними показниками можуть свідчити й дані, отримані щодо впливу «мікс-фактора» на

відновлення рівня вмісту гідроперекисів у сироватці крові та мітохондрій печінки й активності глутатіонпероксидази у 22- і 30- міс. тварин до рівня 12- міс. тварин і покращення якості їхнього життя (збільшення працездатності і зменшення смертності).

Показана роль редокс-системи в розвитку фіброзу печінки і можливості її відновлення після інтоксикації організму сірчаноокислою міддю, «мікс-фактором», НКМ.

Ключові слова: антиоксидантна система, біохімічні показники функції печінки, іони міді, біологічно активні сполуки, окислювальний стрес.

ABSTRACT

MOHAMMAD MORSHED AYED ALSARDIA. The study of the mechanisms of "recovery" of certain biochemical parameters of biologically active compounds after exposure to toxic doses of copper ions. – 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, 2019.

Measurement of mechanisms of regulation of biological processes is a key problem of modern biochemistry, without knowledge of these processes the problems of regulation of life expectancy and elimination of pathological conditions cannot be solved. Measurement of the mechanisms of the pathogenesis of various diseases has shown that the most common and integral characteristic of these states is the change in the values of the pro-antioxidant system. It is commonly known that one of the most discussed of the popular hypotheses about the mechanisms of aging is the free radical hypothesis of aging. Consequently, the values of the redox system can be considered as values of changes in the regulatory system of the body. However, it remains unclear whether oxidative stress is the cause or consequence of the development of pathologies and aging of the organism. Modern data has convincingly shown that products of free radical reactions in biological systems can carry both a pathological and physiological

role. In this regard, the measurement of the physiological and pathological role of products of free radical reactions is an urgent task. To solve such a task, it is necessary to apply experimental models. The induction of certain metabolic-pathological states can be used as such models.

It is known that copper ions are one of the most common toxic compounds of the environment. Exogenous copper is accumulated mainly in the liver and can cause fibrosis of the liver and other pathologies including Wilson-Konovalov disease. The development of fibrosis depends not only on the dose of toxicants, but also on the metabolic states of the organism at the time of its impact. Thus, measurement the mechanisms of induction of one or another pathology by the same inductor in animals of different age groups can determine the role of age-related metabolic changes and assess the age-dependent response to certain exogenous influences. Understanding these mechanisms is an important methodological approach in Gerontology and Pharmacology. At present, there is no definitive decision on the mechanisms of action of high doses of cuprous sulphate.

In this regard, mechanisms of oxidative stress consequence in animals were measured against the background of intoxication with copper ions after multiple successive exposure to cuprous sulphate in a dose of 1 µg / 100 g body weight.

In order to determine the role of pro-antioxidant system in the development of pathology, in particular, liver fibrosis, low molecular weight components of colostrum and a biologically active additive "mix-factor" that have a wide range of effects on biological systems, including those having antioxidant effect, were used.

It can be assumed that by effecting the pro-oxidant-antioxidant system, biologically active additives ("mix-factor" and low molecular weight components - "LMWC") can: eliminate the effects of intoxication with cuprous sulphate or increase the life expectancy of older animals that may have an increased number of free radical reactions as a result of aging.

The purpose of the work was to measure the mechanisms of regulation of some values of the pro-antioxidant system in animals after intoxication with cuprous sulphate and the influence of low molecular weight components of biological origin ("mix-

factor", " LMWC ") on these values, as well as the interrelation of values of the pro-antioxidant system with physiological characteristics and life expectancy of experimental animals (rats).

The biochemical methods of research (activity of the pro-antioxidant system, enzymes, determination of biochemical parameters of liver activity (content of triacylglycerides, cholesterol, albumin, etc.)), as well as physiological parameters (temperature and body weight, working capacity of experimental animals) were used in this work.

It has been shown that repeated multiple consecutive administration of cuprous sulphate, at intervals of 48 hours, at a dose of 1 mg / 100 g body weight, which was 3 % of the lethal dose, was accompanied by weight loss, a decrease in body temperature by $0.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, decrease of working capacity. In these animals, the content of lipid hydroperoxides in both liver and blood serum mitochondria was increased by 45-90 % compared with control. In this case, the activity of glutathione peroxidase in both mitochondria and liver microsomes and serum was reduced by 35-40 %. The activity of γ -glutamyltransferase (GGT) was increased by 263 % compared with the control. However, such values of liver activity as the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase remained within the control values. In animals after the intoxication with cuprous sulphate, the content of triacylglycerides, creatine, albumin remained unchanged. These results suggest that after the 3-fold administration of cuprous sulphate to experimental animals, an initial stage of development of liver fibrosis was detected and in the initial stages the indexes of the anti-oxidative system and GGT activity were primarily changed. The results obtained confirm the assumption that the redox system can be considered as an integral system of the primary response to toxic or pathophysiological factors.

To achieve this goal, an assessment was made of the possible effect of normalization of the studied parameters. As a working hypothesis, the following assumption was made. If the biologically active compounds of natural origin will normalize the physiological values, then determining the values of the redox system of

the body, you can establish the interrelation between them and the physiological values of animals, which is an urgent problem of biochemistry.

It was found that the administration of the "mix-factor" in a dose of 0.05 ml / 100 g of body weight to experimental animals against the background of intoxication of the body with cuprous sulphate provided an intensive increase in body weight of animals, they did not differ from control animals in body temperature and their ability to perform work in a swim test with a load, although they did not reach control values.

In the next series of experiments, the ability of the "mix-factor" to perform the function of an antidote was determined. With this objective in view, animals received a "mix-factor" at a dose of 0.05 ml / 100 g of body weight, followed by administration of a lethal dose of cuprous sulphate. It turned out that if in the control variant more than 90 % of the animals died, then after the "mix-factor" only 40 % of the animals died. Consequently, the "mix-factor" has antidote properties. The increase in the working capacity of animals after the action of the "mix-factor", which was injected against the background of intoxication of the body with cuprous sulphate, was due to the fact that it ensured the "safety" of the number of erythrocytes in the blood. At the same time, against the background of cuprous sulphate intoxication, the number of erythrocytes in the bloodstream decreased by 30% compared with the control.

It was found that the low molecular weight components of colostrum, which are represented by amino acids, peptides and low molecular weight proteins, sugars and vitamins, had similar to the "mix-factor" effects on physiological parameters after intoxication of the organism. The obtained results allow us to conclude that the "mix-factor" and " LMWC ", despite the differences in the composition, cause similar physiological effects.

In the following series of experiments, the possibility of correcting the values of the pro-antioxidant system in animals after cuprous sulphate intoxication was investigated.

It turned out that the introduction of the "mix-factor" and " LMWC " to experimental animals on the background of cuprous sulphate intoxication was accompanied by normalization or preservation of the amount of lipid hydroperoxides

in serum, while their content against the background of intoxication was increased by 90 %. The activity of glutathione peroxidase, which was reduced, also corresponded to the norm after the introduction of the “mix-factor”, and after the introduction of “LMWC” to these animals, it even exceeded the level of control activity in the blood serum.

The “mix-factor” and “LMWC” normalized the content of lipid hydroperoxides in the liver mitochondria of animals after cuprous sulphate intoxication, which correlated with an increase in the activity of glutathione peroxidase in the blood serum of these animals.

As it is commonly known, aconitase, which is part of the Krebs cycle, is a sensitive marker for oxidative stress. It was found that intoxication with cuprous sulphate was accompanied by a twofold decrease in the activity of aconitase in mitochondria, and after the introduction of the “mix-factor” into animals, its activity did not differ from the control. These results convincingly indicate that cuprous sulphate intoxication was accompanied by induction of oxidative stress, and the introduction of “mix-factor” or “LMWC” to these animals against the background of intoxication was accompanied by the elimination of oxidative stress towards antioxidants. It can be assumed that the "mix-factor" as well as " LMWC " have antioxidant properties or activate antioxidant systems in the body.

It was shown that “LMWC” in small doses (0.01–0.1 μg / 100 g mass) showed antioxidant properties, which was manifested in the dose-dependent activation of glutathione peroxidase in blood serum. If in the initial control level, it was about 20 nmol NADPH / ml serum, after administration of “LMWC” to animals at a dose of 0.1 mg / 100 g - 38-40 nmol NADPH / ml serum, while the content of lipid hydroperoxides remained at a constant level. With the introduction of large doses of " LMWC " (0.1-3 mg / 100 g) there was a linear increase in the content of lipid hydroperoxides against the background of a linear decrease in the activity of glutathione peroxidase.

Therefore, the restoration of values of the pro-antioxidant system to the level of the norm in animals with cuprous sulphate intoxication with the introduction of a “mix-

factor” or “LMWC” restored the changes in physiological parameters in experimental animals.

The interrelation of the pro-antioxidant system with physiological indices can also be evidenced by data obtained from the influence of the “mix-factor” on the restoration of the level of hydroperoxides in serum and liver mitochondria and the activity of glutathione peroxidase at 22 and 30 months. animals up to the level of 12 months. animals and improving their quality of life (increased efficiency and reduced mortality).

The role of the redox system in the development of liver fibrosis and the possibility of its recovery after intoxication of the body with cuprous sulphate, “mix-factor”, and “LMWC” is shown.

Key words: antioxidant system, biochemical parameters of liver function, copper ions, biological active compounds, oxidative stress.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у зарубіжних спеціалізованих виданнях:

1. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Al Begai Mohammad A.Y., **Alsardia Mohammad M. A.**, Kurguzova N. I. Low-molecular weight cow colostrum components in functional nutrition // Journal of Nutritional Therapeutics. 2017. Vol. 6, N 1. P. 11-17. (GoogleScholar, CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: визначенні активності показників антиоксидантної системи, визначення активності глутатіонпероксидази, статистична обробка даних).*
2. 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. (CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: виготовлення зразків для гістології, аналіз морфології печінки, визначення вмісту альбуміну, креатиніну, триглицеридів, холестеролів).*
3. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Kurguzova N. I., **Alsardia Muhammad M. A.**, Akzhigitov R.A., Baranikova S. Ya., Potapova V. I., Chuprikova A. S. The toxic effects of low molecular weight components of cow colostrums: the short-term and long-term effects // Journal of Nutritional Therapeutics. 2017. Vol. 6, N 4. P. 84-91. (CrossRef) *(Особистий внесок здобувача: визначення зміни маси органів (печінка, селезінки, нирок) в динаміці, статистична обробка даних).*
4. Божков А. И., Никитченко Ю. В., Климова Е. М., Ленъкевич Е. С., Лебедь Е. Н., Аль-Бахадли А. М. М., **Алсардиа М. М. А.** Молодые и старые животные используют различные метаболические стратегии адаптации к Cu- индуцированному фиброзу печени // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. № 4. С. 555–566. (Pubmed). (Перевидана в: 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)). (*Особистий внесок здобувача: оцінка працездатності тварин, моделювання фіброзу печінки, визначення фагоцитарного індексу*).

5. 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. Vol. 5, N 6. P. 151-165. (Google Scholar, CrossRef). (*Особистий внесок здобувача: визначення фагоцитарного індексу, активності нейтрофілів, статистична обробка даних*).

6. Kurguzova Natalia Igorevna, Bozhkov Anatoliy Ivanovich, Nikitchenko Yuriy Viktorovich, Al Begai Mohammad Ali Yousef, Goltvyansky Anatoliy Vladimirovich, **Alsardia Mohammad Morshed Ayed**, Bozhkov Andrew Anatoliyovich. 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 6-1. P. 25-32. (CrossRef). (*Особистий внесок здобувача: вимірювання температури тіла тварин, виділення мітохондрій, визначення активності ферментів антиоксидантної системи, визначення кількості еритроцитів*).

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

7. **Алсардіа Мохаммад Моршед Айед** Дослідження гепатопротекторних властивостей препарату (фунгідол) при Cu-індукованому фіброзі // Молодь і поступ біології : XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 25-27 квітня 2017 р. : тези доп. Львів, 2017. С. 22-23.

8. 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 // Проблемы старения и долголетия : матеріали науково-практичної конференції «Здоров'я, харчування, довголіття» пам'яті проф. Ю. Г. Григорова (до 85-річчя від дня народження), 16—17 травня 2016 р. : тези доп. Київ, 2016. Т. 25, № 2. С. 345. (*Особистий внесок здобувача: визначення тривалості життя тварин після циклічного режиму харчування, фракціонування печінки, статистична обробка даних*).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. РОЛЬ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ СПОЛУК У МЕХАНІЗМАХ РЕГУЛЯЦІЇ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ (літературний огляд)	25
1.1 Характеристика запальних процесів і роль у цьому іонів важких металів.....	25
1.2 Метаболізм ксенобіотиків в організмі.....	32
1.2.1 Глутатіонова система метаболізму ксенобіотиків	34
1.2.2 Роль іонів міді в організмі.....	37
1.3 Можливі механізми захисту при оксидативному стресі	42
Висновки до розділу 1.....	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	46
2.1. Експериментальні об'єкти.....	46
2.1.1 Моделювання Cu-індукованого токсикозу у щурів.....	46
2.1.2 Модель для оцінки дії «мікс-фактору» на показники гомеостазу	46
2.1.3 Модель для дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на показники гомеостазу.....	49
2.1.4. Виведення тварин з експерименту.....	50
2.2 Фізіологічні методи дослідження.....	50
2.3 Препаративні методи дослідження	50
2.3.1 Одержання сироватки для дослідження.....	51
2.3.2 Одержання еритроцитів крові та визначення їх кількості	51
2.3.3 Одержання мітохондрій із печінки	51
2.3.4 Одержання мікросомальної фракції (ендоплазматичного ретикулуму) клітин печінки.....	52

	16
2.3.5 Одержання цитозольної фракції клітин печінки.....	52
2.3.6 Гістологічні дослідження печінки.....	52
2.4 Аналітичні методи дослідження.....	53
2.5 Статистичні методи дослідження.....	58
Висновки до розділу 2.....	58
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	60
3.1 Фізіолого-біохімічні характеристики тварин із Cu-індукованим токсикозом	60
3.1.1 Соматичні показники у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю	60
3.1.2 Деякі біохімічні показники у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю.....	63
3.1.3 Деякі характеристики «мікс-фактора» і НКМ.....	67
3.2 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на деякі фізіологічні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом печінки	72
3.2.1 Вплив «мікс-фактора» на деякі соматометричні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом печінки.....	72
3.2.2 Захисний ефект «мікс-фактора» на мембрани еритроцитів	75
3.2.3 Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі соматометричні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом.....	76
3.3 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на деякі показники про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю та тривалість життя експериментальних тварин.....	81
3.3.1 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на вміст гідроперекисів ліпідів і активність глутатіонпероксидази в сироватці крові у щурів після інтоксикації сірчаноокислою міддю	81

3.3.2 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на вміст холестерину, триацилгліцеридів, креатину і альбуміну у тварин після інтоксикації сірчаною кислотою.....	86
3.3.3 Вплив «мікс-фактора» та НКМ на вміст гідроперекисів ліпідів і активність глутатіонпероксидази в мітохондріях і мікросомах печінки після інтоксикації міддю.....	88
3.3.4 Вплив «мікс-фактора» на деякі показники про-антиоксидантної системи при їх тривалому застосуванні, починаючи з 22 і 30,5 місяців до кінця життя.....	95
3.3.5 Вплив «мікс-фактора» на тривалість життя в експерименті	101
3.4 Обговорення отриманих результатів.....	106
Висновки до розділу 3.....	118
ВИСНОВКИ.....	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	144
ДОДАТОК 2.....	147

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Асо – аконітатгідратаза

АЛТ – аланінамінотрансфераза

Аст – аспартатамінотрансфераза

АПОЛ – аспаратзалежне перекисне окиснення ліпідів,

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

СПОЛ – спонтанне перекисне окиснення ліпідів

ГП – глутатіонпероксидаза

ГР – глутатіонредуктаза

NADP⁺ – нікотинамідадениндинуклеотидфосфат окиснений

NADPH – нікотинамідадениндинуклеотидфосфат відновлений

Г-6-ФГДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза

ГПЛ – гідроперекиси ліпідів

ГТ – глутатіонтрансфераза

ЕПР – ендоплзматичний ретиклум

ІЦДГ – ізоцитратдегідрогенази

МДГ – малатдегідрогеназа

НМК – низькомолекулярні компоненти молозива

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Дослідження механізмів регуляції біологічних процесів є центральною проблемою сучасної біохімії [19, 29, 138]. Як відомо, збереження гомеостатичних показників на відносно сталому рівні лежить в основі життєдіяльності та функціонування біологічних систем. Стійкі або хронічні зміни біохімічних показників, як правило, супроводжуються розвитком тих чи інших патологій. Пошук способів регуляції зміни біохімічних характеристик і підтримання гомеостазу є актуальним завданням сучасної біохімії.

Інтенсивні дослідження молекулярних механізмів патогенезу багатьох захворювань показали, що однією з первинних ланок, які формують адаптивну відповідь є показники про-антиоксидантної системи. Вони змінюються при наявності в організмі токсичних сполук різної природи, зокрема, іонів важких металів [49, 159, 186].

Як відомо, зміщення рівноваги в бік прооксидантів формує окислювальний стрес [58, 78]. Показано, що на тлі окислювального стресу розвиваються різні патології [50, 127, 153]. Разом із тим, залишається не з'ясованим, чи є окислювальний стрес причиною або наслідком розвитку патології і старіння організму. Інтенсивне дослідження вільнорадикальних процесів у біологічних системах, які були проведені за останні декілька років, показали, що продукти вільнорадикальних процесів у ряді випадків виконують регулярні функції біохімічних процесів [96, 191].

Отже ми маємо справу з виконанням різних функцій продуктів вільних радикалів у біологічних системах. Дослідження патологічної або фізіологічної ролі продуктів вільнорадикальних реакцій є важливим і актуальним завданням сучасної біохімії [22]. Як відомо, успіх у вирішенні тієї чи іншої проблеми залежить від особливостей методичних підходів, які застосовуються при вирішенні тих чи інших питань [22, 147].

Відомо, що іони міді – одні з найбільш поширених хімічних сполук водного середовища [20, 72, 75]. Збільшення вмісту іонів міді в організмі супроводжується порушенням метаболізму і розвитком цілої низки патологій [98]. Остаточно не вирішено питання щодо прооксидантних властивостей іонів міді, а наявні дані досить суперечливі.

Вивчення прооксидантних властивостей іонів міді та взаємозв'язок цього показника з порушенням біохімічних показників в організмі є актуальним завданням біохімії та фізіології. Тому в роботі досліджували вплив багаторазових ін'єкцій сірчанокислої міді на деякі біохімічні показники про-антиоксидантної системи, та фізіологічні характеристики експериментальних тварин.

Раніше в нашій лабораторії було показано, що низькомолекулярні компоненти молозива, до складу яких входять пептиди, білки, амінокислоти, вітаміни та вуглеводи, мають антиоксидантні властивості та здатні регулювати функціональну активність про-антиоксидантної системи організму. У зв'язку з цим, використання низькомолекулярних компонентів біологічного походження (рослинного, тваринного) може бути перспективним при використанні їх в якості регуляторів окислювального стресу.

Дисертаційна робота виконана у відділі біофізики мембран та відділі молекулярної біології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було дослідження механізмів регуляції низькомолекулярними компонентами біологічного походження (різні види грибів, компоненти молозива) деяких показників про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчанокислою міддю, а також взаємозв'язку показників про-антиоксидантної системи з фізіологічними особливостями та тривалістю життя експериментальних тварин (щурів).

У межах теми дослідження визначені наступні завдання:

1. Дослідження деяких показників про-антиоксидантної системи у тварин

після інтоксикації сірчаноокислою міддю (триразове введення сірчаноокислої міді з інтервалами 48 годин) і показників функціональної активності печінки.

2. Встановлення можливого взаємозв'язку між показниками про-антиоксидантної системи та деякими морфофункціональними показниками лабораторних тварин (зміна маси тіла, температури тіла, здатності здійснювати роботу).

3. Дослідити вплив «мікс-фактора» на вміст гідроперекисів ліпідів і активність деяких антиоксидантних ферментів в клітинах печінки і сироватці крові.

4. Вивчити можливий вплив «мікс-фактора» в якості біологічного антидоту на моделі інтоксикації організму сірчаноокислою міддю.

5. Дослідити вплив низькомолекулярних компонентів молозива на показники про- та антиоксидантної системи організму у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю.

6. Дослідити вплив «мікс-фактора» на показники окислювального стресу у старих тварин (22 – 30 міс. віку), на тривалість життя і працездатність тварин у процесі природного старіння.

Об'єкт дослідження – механізми «поновлення» деяких біохімічних показників біологічно активними сполуками після дії токсичних доз іонів міді.

Предмет дослідження – дослідження деяких показників про-антиоксидантної системи у тварин під впливом «мікс-фактора» на показники окислювального стресу.

Методи дослідження. Під час експерименту використовували такі фізіологічні методи дослідження, як вимірювання маси та ректальної температури тіла, визначення працездатності щурів. Також застосовували препаративні методи дослідження: одержання сироватки; еритроцитів крові та визначення їхньої кількості; мітохондрій, мікросомальної фракції (ендоплазматичного ретикулума) клітин печінки; цитозольної фракції клітин печінки та гістологічні методи дослідження печінки. З метою дослідження механізмів «відновлення» біохімічних показників також застосовували такі

аналітичні методи: спектрофотометричні методи визначення вмісту АЛТ, АСТ, холестерину, триацилгліцеридів, креатиніну, альбуміну, гідроперекисів ліпідів, глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної, малатдегідрогеназної, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної, ізоцитратдегідрогеназної, глутатіон-S-трансферазної активності в сиворотці крові і клітинах печінки; електрофоретичні методи оцінки низькомолекулярних компонентів молозива та методи статистичного аналізу отриманих результатів. Отримані результати експериментів обробляли статистично з використанням пакету програм "Statistika V.6".

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше показано, що низькомолекулярні компоненти, отримані з різних біологічних об'єктів (різні види грибів («мікс-фактор»), низькомолекулярні компоненти молозива), мають здатність усувати окислювальний стрес, який індукований дією іонів міді або виникає внаслідок природного старіння організму. Показано наявність взаємозв'язку між показниками про-антиоксидантної системи та фізичною активністю організму. Вперше з'ясовано, що привітний прийом «мікс-фактора» усуває токсичну дію сірчанокислої міді, тобто він проявляє властивості антидоту. Досліджено, що низькомолекулярні компоненти молозива здатні виявляти як антиоксидантні властивості (при низьких концентраціях 0,05 - 0,1 мг / 100 г), так і прооксидантні властивості (при високих концентраціях більш 1 мг / 100 г маси тіла), що забезпечує їхню здатність регулювати функції про-антиоксидантної системи.

Вперше показано, що «мікс-фактор» і низькомолекулярні компоненти молозива нормалізували показники про-антиоксидантної системи, фізіологічну активність тварин і біохімічні показники функціональної активності печінки з Cu-індукованим фіброзом.

Показали, що збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки і сироватці крові, яке корелювало зі зменшенням активності глутатіонпероксидази в цих системах на пізніх етапах онтогенезу (30 – 33 міс. віку), може бути відновлено тривалим прийомом м'яких доз «мікс-

фактора», що супроводжувалося поліпшенням якості і тривалістю життя таких тварин, тобто «мікс-фактор» може розглядатися як потенційний геропротектор.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно з відповідними законами України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 3 від 23 березня 2017 р.).

Особистий внесок здобувача полягає в тому, що дисертантом самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертації, виконано експериментальні дослідження, проведено статистичні розрахунки, написано та оформлено розділи дисертації. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф., директором НДІ біології Божковим А.І.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації були представлені на конференціях Всеукраїнського та міжнародного рівнів: XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017); науково-практичній конференції «Здоров'я, харчування, довголіття» пам'яті проф. Ю. Г. Григорова (до 85-річчя від дня народження) (Київ, 2016).

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел і 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 147 сторінки, з них основного тексту 107 сторінок. Робота ілюстрована 27 рисунками та 5 таблицями. Список використаних джерел містить 196 найменувань.

Практичне значення отриманих результатів. Дослідження можливих механізмів дії «мікс-фактора» і низькомолекулярних компонентів молозива показали, що вони мають гепатотропну дію на моделі з Су-індукованим фіброзом. Ці результати лежать в основі розробки технічних умов на

виготовлення біологічно активних сполук, які будуть рекомендовані як біологічно активні добавки. Результати, які були отримані, дозволяють рекомендувати «мікс-фактор» в якості геропротектора. Отримані результати враховані при виконанні експериментальних робіт в НДІ біології.

Результати дослідження впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, враховані при розробці робочих програм нормативних дисциплін «Біохімія» та «Біотехнологія» для студентів, які навчаються за освітньою програмою «Біологія», та при розробці методичних вказівок для виконання лабораторних робіт з дисциплін «Біологія клітин» та «Біохімія» для студентів, які навчаються за освітньою програмою «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні освіти (впровадження підтверджено відповідним актом) (впровадження підтверджено відповідним актом).

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ СПОЛУК У МЕХАНІЗМАХ РЕГУЛЯЦІЇ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ

(літературний огляд)

1.1 Характеристика запальних процесів і роль у цьому іонів важких металів

Відомо, що запалення – це комплексний процес, який з’являється у відповідь на різного роду пошкодження біологічних структур або патогенного подразнювача, та проявляється в реакціях, спрямованих на усунення утворюваних продуктів або подразнювального агента. В ідеальному випадку запальний процес може завершуватися максимальним відновленням у зоні пошкодження [107].

Мабуть, уперше ознаки запалення описав римський філософ і лікар Карнелій Уельс, суттєво доповнив ці уявлення Галей (129-200 рр. н. е.) [71]. Найвагоміший вклад у дослідження та інтерпретацію запалення як загальнобіологічного явища надав І.І.Мечніков в кінці XIX сторіччя. Він сформував теорію запалення, згідно з якою запалення – це пристосувальна реакція, яка сформувалась в ході еволюції, а найважливішим її проявом є фагоцитоз, що забезпечує видалення патогенних агентів та одужання організму [77].

Дослідженню запалення приділяли велику увагу такі визначні вчені як Д. Хантер (1728-1794), С. Самуель (1833-1899), Р. Вірхов (1821-1902), П. Ерліх (1854-1915), І. Мечніков (1845-1916) та інші [71].

Зараз розроблено різні класифікації патогенних чинників і досить глибоко досліджено механізм та етапи розвитку запального процесу [121, 140].

Усі патогенні чинники запалення поділяють на три групи:

- фізичні фактори (механічне пошкодження, обмороження або опік – тобто різка зміна температури, вплив радіації);
- біологічні агенти (інфекційні агенти, паразити, а також утворені в організмі циркулюючі імунні комплекси);
- хімічні фактори (різноманітні токсичні речовини, у тому числі, іони важких металів).

Термін «важкі метали» (ВМ), який характеризує широку групу забруднюючих речовин, отримав останнім часом значного поширення. У різних наукових і прикладних роботах автори по-різному трактують значення цього поняття. У зв'язку з цим кількість елементів, відносно до групи ВМ, змінюється в широких межах. Як критерії належності до важких металів використовують численні характеристики: атомна маса, щільність, токсичність, поширеність у природньому середовищі, ступінь залученості в природні та техногенні цикли [73].

У роботах, присвячених проблемам забруднення навколишнього природнього середовища та екологічного моніторингу, на сьогодні до важких металів відносять більше ніж 40 металів періодичної системи Д. І. Менделєєва з атомною масою більше ніж 50 атомних одиниць: вольфрам (V), хром (Cr), марганець (Mn), залізо (Fe), кобальт (Co), нікель (Ni), мідь (Cu), цинк (Zn), молібден (Mo), кадмій (Cd), олово (Sn), ртуть (Hg), свинець (Pb), бісмут (Bi) та ін. [73]. При цьому важливу роль у класифікаціях важких металів відіграють такі умови: їхня висока токсичність для живих організмів відносно низьких концентрацій, а також здатність до біоаккумуляції [23, 52].

У роботах Ю. А. Ізраєля (1979), які вже стали класичними, у переліку хімічних речовин, що підлягають визначенню в природних середовищах на станціях у біосферних заповідниках, у розділі важкі метали названо свинець (Pb), ртуть (Hg), кадмій (Cd), миш'як (As) [33]. З іншого боку, згідно з рішенням Цільової групи щодо викидів важких металів, яка працює під егідою Європейської Економічної Комісії ООН, яка займається збором та аналізом інформації відносно викидів забруднених речовин в європейських країнах, лише

цинк (Zn), миш'як (As), селен (Se) та олово (Sb) було віднесено до важких металів. За визначенням Н. Реймерса, окремо від важких металів стоять благородні і рідкі метали, відповідно, залишаються тільки Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg. У прикладних роботах до переліку важких металів найчастіше додають Pt, Ag, W, Fe, Au, Mn [65]. Стосовно класифікації Н. Ф. Реймерса (1990), важкими слід вважати метали з щільністю більш ніж 5 г/см. За біологічною класифікацією хімічних елементів, важкі метали належать до груп мікро- та ультрамікроелементів [67].

До важких металів, на думку більшості дослідників, відносять Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg. Важкі метали при надмірному попаданні до об'єктів навколишнього середовища поведуться як токсиканти й екотоксиканти. При цьому до токсикантів відносять елементи та сполуки, що чинять шкідливий вплив стосовно окремого організму або групи організмів, а до екотоксикантів – елементи або сполуки, які негативним чином впливають не лише на окремі організми, але і на екосистему в цілому. Фахівцями з охорони довкілля серед металів-токсикантів виділена пріоритетна група, до якої входять кадмій, мідь, миш'як, нікель, ртуть, свинець, цинк та хром як найбільш небезпечні для здоров'я людини і тварин [75, 192].

Отже, іони важких металів є найбільш поширеними хімічними агентами, здатними індукувати запальні реакції в організмі. Особливу роль у цьому відіграють іони міді [112]. Необхідно зазначити, що розвиток запального процесу умовно можливо уявити як 3 послідовні стадії: альтерація, ексудація та проліферація.

Альтерація – пошкодження, яке запускає розвиток запальної реакції. Центральну роль в цьому процесі грають медіатори запалення [114].

Відомо, що медіатори запалення – це різноманітні біологічно активні продукти. Медіатори виділяються у кров'яне русло гранулоцитами, лімфоцитами, тромбоцитами, макрофагами і тучними клітинами [15, 131, 132]. Серед різноманітних медіаторів особливе значення мають гістамін і серотонін [111, 189]. Медіатори запалення підвищують прониклість судин і ведуть до

прояву судинних реакцій [85, 173]. Це проявляється збільшенням величини вязкості крові і утворенням тромбів у венулах [160]. Це веде до венозного повнокров'я і, як наслідок, до гіпоксичного пошкодження. Підвищення прониклості судин супроводжується витіканням плазми в зону запалення (плазморагія) [166].

У той же час клітини крові мігрують у зону запалення, насамперед, це гранулоцити, лімфоцити, моноцити, що проникають через змінені стінки судин [70, 115]. Причиною клітинної міграції є хемотаксис, який забезпечується реакціями в осередку запалення [115].

Найважливішим етапом у розвитку запального процесу є фагоцитоз [162]. Відомо, що існує два типи фагоцитозу: мікрофагальний (нейтрофільний), коли фагоцитуючі клітини здатні захопити дрібні частинки-антигени (наприклад, мікроорганізми), та макрофагальний (моноцитарний) – коли фагоцитуючі клітини здатні захоплювати не лише дрібні, але й великі за молекулярною вагою частинки антигенів [161, 171, 193].

Необхідно відзначити, що фагоцитарна активність мікрофагів забезпечується лізосомальними ферментами, у той час як макрофаги реалізують свою фагоцитарну активність за рахунок протеолітичних ферментів і окислювальної активності – окислювальний вибух або окислювальний стрес [134, 135].

Захоплення мікробного антигену фагоцитом може мати різні наслідки – в одному випадку антигени повністю руйнуються, тобто має місце завершений фагоцитоз. В іншому випадку має місце незавершений фагоцитоз, коли антигени інактивуються, але не руйнуються повністю [163]. Така незавершеність фагоцитозу може бути викликана різними чинниками: наявністю імунодефіциту або біологічними особливостями мікробних антигенів [120].

При хронічному запаленні характерним є утворення ексудату й інфільтрату. Ексудат – це рідина, що містить продукти розпаду клітин і тканин, яка, у свою чергу, справляє додатковий біологічний ефект. В тому випадку, коли

продукти клітинних компонентів переважають над ексудатом, його називають інфільтратом [79].

На завершальному етапі запалення в організмі формуються зони, які відмежовують запалення від навколишніх тканин. На цьому етапі активуються процеси проліферації, які забезпечуються стовбуровими клітинами. Вони проходять диференціювання у фібробласти, макрофаги та інші типи клітин [191].

На процеси розвитку запальної реакції впливає вік організму [156], однак особливості залежних від віку етапів запального процесу вивчені не повністю. У зв'язку з цим, дослідження означеного питання має важливі теоретичні та практичні рішення.

Ми вважаємо, що дослідження впливу іонів міді як одних із найпоширеніших іонів металів на запальні процеси у молодих і старих тварин може забезпечувати вирішення двох фундаментальних проблем: ролі іонів важких металів у формуванні та особливостях розвитку запальних реакцій, і роль віку в цих процесах, а також зрозуміти адаптивні можливості старих тварин до токсичних факторів середовища, що є центральною проблемою геронтології.

Актуальність проблеми забруднення навколишнього середовища важкими металами пояснюється, перш за все, широким спектром їхньої дії на організм людини. Важкі метали впливають практично на всі системи організму, справляючи токсичну, алергічну, канцерогенну, гонадотропну дію [130, 144, 150, 177].

Доведено й ембріотоксичну дію важких металів, які здатні долати фетоплацентарний бар'єр, а також їхню мутагенну дію [158, 170]. Багато важких металів мають тропність – вибірково накопичуються в певних органах і тканинах, структурно і функціонально порушуючи їх. Так, іони міді накопичуються в печінці і мозку [99, 127].

Вибір тропного органу залежить також від дози та шляхів надходження важких металів в організм. На сьогоднішній день відродився інтерес до ролі мікроелементів у патогенезі багатьох соматичних і ендемічних захворювань [25]. Забруднення навколишнього середовища токсичними металами, у першу чергу,

впливає на метаболічні процеси молодих особин, оскільки інтенсивне накопичення різних токсичних елементів відбувається ще в плаценті [59, 69]. Це призводить до появи вроджених вад, зниження імунітету, розвитку безлічі хвороб, часто з хронізацією патологічного процесу, затримкою розумового і фізичного розвитку. Виростає покоління ослаблених людей, чутливих до інфекції, з високим ризиком розвитку ішемічної хвороби серця та онкопатології [61, 182]. Сполуки важких металів надходять в організм переважно через шлунково-кишковий тракт із харчовими продуктами, водою, меншою мірою – через органи дихання. Важкі метали надходять також через шкіру при контакті із забрудненими об'єктами середовищами: повітрям, водою [42].

Важкі метали, потрапляючи в організм людини, накопичуються вздовж біологічного ланцюга: ґрунт (вода) – рослина – тварина – продукція – людина. Тому необхідний ретельний токсикологічний контроль продуктів, який повинні забезпечувати відповідні служби: станції захисту рослин, агрохімічні і ветеринарні лабораторії, центри державного санітарно-епідеміологічного нагляду [73].

Чисельні публікації та наукові дослідження останніх років присвячено вивченню вмісту і накопиченню важких металів у харчовій сировині та продуктах харчування рослинного і тваринного походження, а також розробкою рекомендацій, спрямованих на попередження несприятливого впливу цих токсикантів на організм людини [17, 20, 24, 31, 38, 41, 53, 63, 76]. Відповідно до міжнародних вимог, які розроблені об'єднаною комісією ФАО / ВОЗ, першочергово необхідний контроль за змістом у харчових продуктах таких важких металів як – Pb, Cd, As, Hg, Zn, Cu [34]. Наразі визначені допустимі рівні вмісту токсичних елементів у різних групах продовольчої сировини і харчових продуктів. Відповідно до сучасних уявлень токсичність хімічних сполук для різних індивідумів коливається в досить широких межах [72].

Індивідуальна переносимість хімічних сполук, толерантність організму людини до хімічних речовин техногенного походження обумовлені генетичними

особливостями кожного індивідуума [21, 26, 28, 68, 81, 119]. Іноді генетичні особливості виражені настільки істотно, що це проявляється надзвичайно високою чутливістю до тих чи інших хімічних речовин, що виходить за межі довірчого інтервалу мінливості популяції [56, 62].

Відомо, що більшість чужорідних речовин (ксенобіотиків) під час надходження в організм людини не мають прямого біологічного ефекту, тому що спочатку піддаються різним перетворенням – метаболізму [74]. Метаболізм хімічних сполук обумовлений генетично детермінованою біохімічною індивідуальністю кожної людини [9, 80].

Доведено, що метаболізмом хімічних сполук знаходиться під генетичним контролем, тому в залежності від особливостей геному різні індивіди можуть зберігати стійкість або, навпаки, виявляти підвищену чутливість до хімічних агентів техногенного генезу. З точки зору генетики ці відмінності пояснюються індивідуальними особливостями, в основі яких лежить генетичний поліморфізм організму [34, 35, 90]. Зараз відомо більше 300 генів, відповідальних за знешкодження ксенобіотиків в організмі [14]. Такі гени отримали назву «гени навколишнього середовища» («environmental genes») або «гени схильності» («predisposing genes»).

Залежно від особливостей дії, субстратів ферментативних реакцій і ролі в метаболічних процесах, гени схильності поділяють на гени метаболізму (гени зовнішнього середовища), гени – тригери (гени перенесення сигналу) і гени клітинних рецепторів [4]. Для дослідження генетичного поліморфізму має значення детектування біохімічних змін як ендогенних фізіологічних процесів, так і метаболізму екзогенних сполук [6, 18, 47, 57, 149]. Відповідно до думки дослідників, в організмі людини присутні ферменти, що беруть участь у біотрансформації токсичних хімічних сполук [12].

Система ферментів метаболізму ксенобіотиків є сформованим у процесі еволюції механізмом адаптації організму до дії токсичних екзогенних і ендогенних речовин. Передбачається, що відмінності в швидкості деградації

різних субстратів ферментами метаболізму можуть лежати в основі неоднаковою сприйнятливості до ряду захворювань [119].

Однією з основних детоксицируючих систем в організмі є глутатіонова система, що складається з багатофункціональної родини ферментів [175]. Індуцібельний і генетичний поліморфізм ферментів біотрансформації хімічних речовин в основі широкої межіндивідуальної варіабельності в метаболізмі чужорідних сполук створюють можливість дисбалансу процесів детоксифікації останніх [175].

1.2 Метаболізм ксенобіотиків в організмі

Сучасні уявлення про механізми контролю за метаболізмом токсичних сполук вказують на взаємозв'язок між особливостями патологічних процесів і здатністю організму до біотрансформації токсичних речовин. Якісні або кількісні зміни функцій основних складників компонентів системи біотрансформації незмінно ведуть до порушення процесів метаболізму, найчастіше зі шкідливими наслідками для організму [29, 80, 136]. Згідно з класичним визначенням під метаболізмом, або біотрансформацією, ксенобіотиків розуміють складний багатоетапний процес, до якого залучено велику кількість речовин, що знаходяться у взаємодії одна з одною. Біотрансформація, як правило, призводить до зниження активності токсикантів – дезактивації. Однак у деяких випадках метаболіти ксенобіотиків стають, навпаки, більш токсичними сполуками, а також можуть змінити характер токсичної дії або ініціювати інший токсичний процес [45, 55, 66, 109, 119]. Відповідно до сучасних уявлень біотрансформація токсичних сполук здійснюється у двох фазах.

У першу фазу здійснюється модифікація молекули токсиканта у більш полярну і більш гідрофільну сполуку порівняно з вихідною речовиною за рахунок приєднання нових або вивільнення існуючих активних функціональних груп (-OH, -SH, -NH₂). Реакції першої фази забезпечуються різними

ферментними системами, локалізованими більшою мірою в клітинах печінки [45, 80, 179].

Чужорідні для організму речовини активуються за допомогою цитохромів Р-450 (родини ферментів цитохромів). Для багатьох цитохромів Р-450 описані високоспецифічні субстрати. Однак однією з особливостей як цитохрому Р-450, так і його індивідуальних форм є здатність до метаболізму великої кількості субстратів. Тому ізоформи цитохрома Р-450 перекриваються в своїй субстратній специфічності, і навіть високоспецифічні субстрати можуть піддаватися метаболізму багатьма з них [66, 80]. У першій фазі біотрансформації також можуть брати участь і деякі інші ферменти класів оксидаз, редуктаз і дегідрогеназ.

Друга фаза – етап біологічної кон'югації вихідної речовини і / або його продуктів метаболізму з ендogenousними молекулами, такими як глюкуронова кислота, глутатіон, сульфат, в результаті чого утворюються полярні сполуки, які легко виводяться нирками або жовчю із організму [80, 179]. Під час II фази біотрансформації проміжні метаболіти з'єднуються з ендogenousними лігандами, посилюючи гідрофільну природу з'єднання, тим самим сприяючи його виведенню з організму.

Утворені короткоживучі електрофільні метаболіти мають токсичні властивості. До ферментів, залучених до другої фази біотрансформації, відносяться N-ацетилтрансферази, глутатіон-S-трансферази, глюкуроніл-трансферази, епоксидгідролази і метилтрансферази [137].

Реакції першої і другої фаз каталізуються ферментами, відомими як ферменти, що метаболізують ксенобіотики (ФМК). Більша частина цих ферментів зосереджена в печінці, хоча активність ФМК також проявляється і в інших органах і тканинах. Рівновага між ферментами першої і другої фаз є необхідною для здійснення детоксикації та елімінації ксенобіотиків. Тим самим здійснюється захист організму від пошкоджень, що викликаються впливами ксенобіотиків зовнішнього середовища. Пізніше було показано існування специфічних переносників екзогенних сполук – Р-глікопротеїнів, що

забезпечують переміщення ксенобіотиків у організмі. Ці переносники забезпечують екскрецію ксенобіотиків у жовч або кров, що представляє третю фазу біотрансформації – фазу евакуації [48, 62, 66].

1.2.1 Глутатіонова система метаболізму ксенобіотиків

У першу фазу біотрансформації вихідна хімічна речовина піддається ферментативним реакціям, у тому числі окислювальним. У результаті чого запускаються вільнорадикальні процеси, що супроводжуються гіперпродукцією активних форм кисню (гідроперекиси), які активізують процес перекисного окислення ліпідів, в ході якого пошкоджуються мембрани клітин [30, 62, 143]. Вільнорадикальному окисленню в організмі протистоїть антиоксидантний захист, здатний гальмувати, зменшувати інтенсивність перекисного окислення ліпідів, нейтралізувати утворювані вільні радикали і радикальні форми [19, 122, 151].

Глутатіонова система в організмі забезпечує антиоксидантну, кон'югаційну й елімінаційну функції ксенобіотиків.

Основними ферментами, що реалізують антиоксидантну функцію глутатіонової системи у вигляді знешкодження утворених гідроперекисів на рівні клітини, є супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза [186]. Супероксиддисмутаза каталізує реакцію дісмутації супероксидних радикалів з утворенням перекису водню і кисню і таким чином бере участь в регуляції вільнорадикальних процесів у клітинах на початковій стадії. У результаті реакції дисмутації відбувається збільшення в клітині концентрації перекису водню, яка надає шкідливу дію на клітинні компоненти. Каталаза активно долучається до метаболізму перекису, нейтралізуючи її до води, тим самим перешкоджає накопиченню даної сполуки в клітинах [19, 44, 105, 108, 122, 123]. Глутатіонпероксидаза попереджає виникнення і розвиток пероксидації в клітині, тобто каталізує розкладання перекису водню та інших гідроперекисів за допомогою окислення [44]. Існує декілька ізоферментів глутатіонпероксидази,

які кодуються різними генами. У людини були ідентифіковані вісім ізоформ глутатіонпероксидази [44]. Ізоформи глутатіонпероксидази відрізняються за локалізацією в клітині і субстратною специфічністю. Глутатіонпероксидаза 1 (GPx1) – найбільш поширена форма ферменту, яка виявлена в цитоплазмі практично всіх тканин ссавців; субстратом GPx1 є пероксид водню. Глутатіонпероксидаза 4 (GPx4) має велике значення в метаболізмі пероксидів ліпідів; GPx4 також експресується практично в всіх клітинах ссавців, але в менших кількостях. Глутатіонпероксидаза 2 (GPx2) експресується в кишківнику і є позаклітинним ферментом. У плазмі крові людини в основному зустрічається глутатіонпероксидаза 3 (GPx3), яка також є позаклітинним ферментом [105].

Основними ферментами глутатінової системи, що реалізують кон'югаційну і елімінаційну функції, є глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Глутатіонредуктаза каталізує реакцію відновлення глутатіону з окисленої його форми GS-SG. Глутатіонредуктаза діє в парі з глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою – ферментом, необхідним для відновлення окисленого глутатіону. При цьому в якості донора водню використовується кофермент нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат, який утворюється в пентозофосфатному шляху під час глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної реакції.

Основна функція глутатіонредуктази і глюкозо-6 фосфатдегідрогенази – підтримка відновленої форми глутатіону, необхідного для здійснення кон'югації молекули глутатіону з токсичними сполуками, у тому числі з ароматичними вуглеводнями (бензолом, фенолом) [19, 29, 122].

Глутатіон-S-трансфераза належить до сімейства ферментів, що нейтралізують токсичний вплив різних гідрофобних і електрофільних сполук шляхом їх кон'югації з відновленим глутатіоном. Основна функція глутатіон-S-трансферази – захист клітин від токсичних хімічних речовин і продуктів перекисного окислення ліпідів за допомогою їх відновлення, приєднання до субстрату молекули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп [80, 81, 148]. Існують кілька класів глутатіон-S-трансфераз

залежно від субстрату та органної приналежності ферментів. Їх синтез контролюється генами, розташованими на різних хромосомах. Для кожного з них описано кілька видів поліморфізму, який впливає на функціональну активність ферментів [13]. Глутатіон-S-трансферази - мультігенне сімейство відповідних ферментів, яке бере участь в метаболізмі великої кількості електрофільних сполук шляхом їх кон'югації з глутатіоном, а також в біотрансформації деяких ендогенних сполук (гормонів, ліпідів, простагландинів, лейкотрієнів).

Синтез глутатіонової S-трансферази контролюється різними генами, в яких виявлено поліморфізм, що робить істотний вплив на їхні функції [13, 144]. Отже, під час другої фази біотрансформації ферменти глутатіонової системи значно прискорюють процес кон'югування метаболіту токсиканта і подальше його виведення з організму. Генетичний поліморфізм характерний для генів, що кодують ферменти другої фази метаболізму, так і ізоферменти цитохрому Р-450.

Експресія мутантних алелів може призводити до синтезу ферментів зі зміненою активністю, що, в свою чергу, може бути причиною зміни швидкості метаболізму ксенобіотиків [56, 176]. Швидкість біотрансформації визначається активністю певного ферменту метаболізму (метод фенотипування); за ідентифікацією мутантних алелів ферментів детоксикації ксенобіотиків (метод генотипування); шляхом поєднання цих методик [144]. Зараз генотипово ідентифіковано більш ніж 1 000 ізоферментів цитохрому Р-450, розроблено їхню класифікацію. Але для практичної медицини методики генотипування залишаються недоступними через складність їх проведення і високу вартість. Фенотипічні ж методи (визначення біотрансформаційної здатності організму за швидкістю метаболізму модельної речовини) недосконалі. З точки зору сучасної біології та медицини саме від метаболічного статусу організму залежать ризик розвитку та характер перебігу багатьох захворювань [90].

Як було відзначено, однією з найбільш поширених токсичних сполук серед важких металів є іони міді. У той же час іони міді є есенціальним і виконують велику кількість важливих функцій в організмі.

Залежно від швидкості біотрансформації ксенобіотиків одна і та сама речовина може надавати різну дію на різні індивідууми: від індиферентної до токсичної [99, 101].

1.2.2 Роль іонів міді в організмі

Мідь – один з найважливіших незамінних мікроелементів, необхідних для життєдіяльності людини, тварин і рослин. В організмі дорослої людини міститься 1,57–3,14 ммоль міді, причому половина цієї кількості припадає на м'язи і кістки, а 10 % на печінку. Невеликі кількості цього елемента знаходяться в легенях, кишківнику, селезінці, шкірі та волоссі. Всі ендокринні органи містять невеликі кількості міді. Значна частина міді плазми крові знаходиться в церулоплазміні – найважливішому білку, який містить мідь [64].

Концентрація міді в печінці, м'язах і інших тканинах новонароджених в кілька разів вище, ніж у відповідних тканинах дорослих. Мідь плода має материнське походження, причому під час вагітності її споживання у матері збільшується, а виведення знижується. Тільки до 6–12 місяців рівень тканинної міді у дітей досягає рівня дорослого організму [141].

Надходження міді з їжею має становити 2–5 мг на добу, до того ж добове споживання менше 2 мг небезпечно у зв'язку з можливістю розвитку мідьдефіцитних станів. Основні процеси всмоктування міді відбуваються в шлунку і тонкій кишці, слизова оболонка якої містить металотіонеїни, що утворюють комплексні сполуки з міддю. Близько 30 % добового надходження міді засвоюється, а решта міді в шлунково-кишковому тракті перетворюється на нерозчинні сполуки, що виводяться з калом [86]. Із загальної кількості іонів міді, що резорбуються, близько 80 % виводиться з жовчю і близько 16 % стінками

шлунково-кишкового тракту. Із сечею виділяється близько 4 % міді. Незначна кількість цього елемента виділяється з потом.

Ключову роль в обміні міді віграє печінка [27, 124]. Потрапляючи в печінку через систему ворітної вени, іони міді зв'язуються спочатку металотіонеїном, які виявлені в печінці людини і більшості досліджених тварин. Синтез металотіонеїнів регулюється вмістом цинку і міді в печінці на рівні транскрипції мРНК [178]. Тіонеїн виконує функції детоксикації міді та її внутрішньоклітинного транспорту. Підвищення вмісту міді може призвести до ампліфікації тіонеїнових генів і різкого підвищення синтезу даного білка [133].

Мідь спочатку зв'язується з металотіонеїном, надалі переноситься на молекулу церулоплазміну, й інші ферменти, що містять мідь, і компоненти жовчі. Наразі виявлено понад 30 ферментів, до складу яких входять іони міді. Церулоплазмін виконує також роль транспортного білка, що переносить мідь на тканинні ферменти, у першу чергу, на цитохромоксидазу [138]. Церулоплазмін – мультифункціональний білок, якому властива активність фероксидази, аміноксидази і частково супероксиддисмутази, що бере участь у гомеостазі міді та відіграє важливу роль в формуванні гострої фази запальних процесів, захищає ліпідні мембрани від перекисного окислення [183].

Синтез церулоплазміну здійснюється на рибосомах печінки. У печінці здійснюється щонайменше три важливих процеси перетворення міді: синтез самого церулоплазміну, депонування міді у складі металотіонеїнів і перетворення міді в недіалізовану форму, що виділяється через жовч. Ці процеси відбуваються в просторово роз'єднаних компартментах тканини печінки, до того ж, між першим і другим відбувається безперервний обмін «пучко» пов'язаної міді [139]. Вміст міді в плазмі крові регулюється нейрогуморальними механізмами. Відзначено підвищення концентрації цього мікроелемента в крові при гіпертиреозі і її зниження при гіпофункції щитовидної залози [88, 92]. При підвищенні вмісту естрогенів у крові (наприклад, при вагітності) і при використанні протизаплідних засобів з естрогенною дією підвищується вміст міді в крові, що пов'язано з індукцією синтезу церулоплазміну [128]. Підвищення

концентрації церулоплазміну при видаленні гіпофіза, надниркових залоз і щитоподібної залози пояснюється затримкою виділення міді з жовчю, що веде до підвищення запасів міді в печінці, що в свою чергу викликає індукцію синтезу церулоплазміну. Болюче подразнення, стресові ситуації та інфекційні захворювання викликають підвищення вмісту в крові міді і церулоплазміну, діючи на обмін цього металу частково через нейрогуморальну систему [113, 117, 181].

Іони міді впливають на активність великої кількості ферментів, відповідальних за окислення і клітинне дихання, стимулює вироблення жіночих статевих гормонів і тироксину, сприяє синтезу гема, з якого утворюється гемоглобін, бере участь у синтезі нейромедіаторів (катехоламінів), меланіну і мієліну, важлива для нормальної структури сполучної тканини (хряща, зв'язок). Цей метал входить до складу аскорбіноксидази, бутіріл-коензим-А-дегідрози, каталази, тирозинази і багато інших ферментів. Основні фізіологічні функції міді пов'язані з її включенням до складу ферментів цитохромоксидази, СОД, моноаміноксидази, лізілоксидази, тирозинази [187]. Церулоплазмін (металоглікопротеїн) є найважливішим позаклітинним антиоксидантом, окислювачем катехоламінів, кінінів, двовалентного заліза в тривалентне (в цьому стані залізо зв'язується з трансферином і транспортується кров'ю до тканин), грає роль антиоксиданту-перехоплювача супероксидного іона-радикала в осередках запалення. Крім того, мідь знижує рівень адреналіну в крові, підвищує активність інсуліну і тироксину, впливає на біосинтез кератину і фосфоліпідів [89, 106].

Дефіцит міді викликає у сільськогосподарських і лабораторних тварин ураження ЦНС, анемію і низку інших патологій [153].

Встановлено, що дефіцит міді відбивається на ліпідному складі плазми крові: підвищення вмісту холестерину, тригліцеридів і фосфоліпідів, не пов'язане з посиленням біосинтезу холестерину або затримкою виділення стероїдів жовчю [87].

Отже, іони міді виконують цілу низку життєво важливих функцій, і її недолік в організмі веде до розвитку ряду патологій [142, 154]. Однак, надлишок цього металу проявляє токсичні ефекти, які зв'язані з окисним процесом [99, 101].

У загальному вигляді початкові етапи окислювального стресу (ОС) відображені на схемі (Рис. 1. 1).

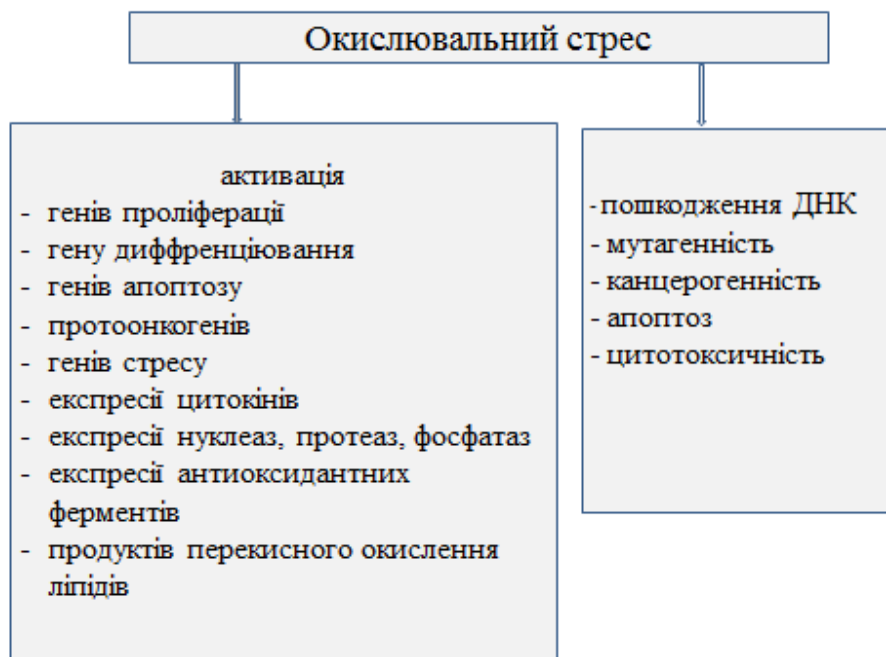


Рис. 1.1 Етапи окислювального стресу

Ключову роль в механізмах окислювального стресу відіграє радикал $\cdot\text{OH}$, що утворюється при гіперпродукції O_2^- (синглетного кисню). Початкові етапи окислювального стресу характеризуються різноманіттю клітинних відповідей – активується широкий спектр генів, причому деякі з них контролюють прямо протилежні реакції.

Передбачається, що дія окислювального стресу на клітини залежить від концентрації активних форм кисню (АФК), які продукуються. При рівні супероксиду і інших АФК, характерному для нормально функціонуючих клітин (декілька пкмоль / л), вони здійснюють певні медіаторні функції, приймають участь у процесах сигнальної трансдукції і, в цілому, в регуляції окислювально-відновного гомеостазу клітин або гомеостазу Ca^{2+} перекисом водню. При

значному окислювальному стресі, коли концентрація АФК, що генеруються, перевищує норму в 2-3 рази, в клітинах спостерігається активація сигнальної трансдукції і зростання деяких стимулюючих факторів, посилюється активність проліферативних процесів. При цьому також спостерігаються і генотоксичні ефекти АФК. Більш високий рівень АФК (10-100-разове перевищення концентрації окремих АФК понад норми) супроводжується руйнівною цитотоксичною дією. При окислювальному стресі відбувається модифікація практично всіх типів макромолекул – нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів [98, 103].

При окислювальному стресі виникають пошкодження білків не лише в ядрі (крос-зшивання між основами ДНК і амінокислотними залишками ядерних білків), але і в інших компартментах клітин, а також індукується перекисне окислення ліпідів (ПОЛ). Перекиси ліпідів розкладаються з утворенням АФК, включаючи $\cdot\text{OH}$, що ініціюють розгалужені ланцюгові вільно-радикальні реакції, а також насичених альдегідів, що володіють гено- і цитотоксичною дією [126, 189].

Під дією продуктів ПОЛ ($\text{L}\cdot$ і $\text{LO}\cdot$) відбувається модифікація мембранних білків, у першу чергу, уражаються SH-групи білків. Руйнування SH-груп сприяє порушенню катіонної і аніонної проникності мембран, виходу кальцію з ендоплазматичного ретикулума. При ПОЛ фосфоліпіди перетворюються в лізофосфоліпіди (при відщепленні ненасиченої жирної кислоти), що призводить до збільшення проникності ліпідного шару, тобто до порушення функціонування транспортних систем [152].

Таким чином, шкідлива дія АФК на мембрани пов'язана з модифікацією білків і активацією ПОЛ під впливом $\cdot\text{OH}$ та інших вільних радикалів.

Дані багатьох досліджень свідчать про те, що АФК та окислювальний стрес відіграють важливу індукуючу і медіаторну роль в апоптозі [175].

Можливо, найбільш важливим (але не єдиним) механізмом в індукції апоптозу є пошкодження ДНК. Імовірність розвитку апоптозу істотно залежить від вихідного статусу редокс-систем клітин, розрізняється у різних типів клітин,

і природи апоптоз-індукованих сигналів. Рівень ПОЛ в клітинах адекватно відображає стан систем генерації АФК і безпосередньо асоціюється з апоптозом, індукованим різними агентами [93].

1.3 Можливі механізми захисту при оксидативному стресі

Дослідження антитоксичних ефектів, індукованих важкими металами, має велике соціальне значення. Відомо, що більше 6% населення планети страждає від різноманітних патологій печінки, в яких беруть участь іони металів [91]. Одним із перших проявів захворювань печінки є запальний процес, який може переходити в гепатит, фіброз і в кінцевій стадії – цироз печінки [8]. Однією з найбільш виражених первинних відповідних реакцій під час розвитку запального процесу є окислювальний стрес. Захистом від шкідливої дії окислення є активація антиоксидантної системи (АОС), дія якої пов'язана з обмеженням швидкості утворення вільних радикалів у клітинах; стимуляцією перетворення вільних радикалів у стабільні молекули; активацією процесів утилізації карбонільних продуктів метаболізму [101]. АОС складається з двох типів молекул: антиоксидантних ферментів і неферментативних антиоксидантів, до числа яких відносяться аскорбінова кислота, α -токоферол, рутин, флавоноїди, β -каротин, глутатіон, білірубін, сечова кислота і багато інших [49].

Найбільший внесок у захист клітин від вільнорадикального ушкодження вносять антиоксидантні ферменти, ефективність антиоксидантної дії яких істотно вища, ніж у неферментативних антиоксидантів. Ці ферменти характеризуються високою специфічністю дії, спрямованої проти певних форм АФК; специфічністю клітинної, тканинної та органної локалізації, які часто перекриваються комплементарним способом; специфічністю використання [164].

Особлива роль у захисті клітин від окисного стресу належить пероксисомам, в яких локалізовані антиоксидантні ферменти: каталаза, Cu, Zn- і Mn-супероксиддисмутаза (СОД), і глутатіонпероксидаза [150].

СОД знижує концентрацію супероксиду, пригнічуючи перетворення Fe^{3+} в Fe^{2+} , каталаза і глутатіонпероксидаза пригнічують реакцію взаємодії двовалентного заліза з перекисом водню [180].

Один із напрямків захисту від оксидативного стресу – зв'язування металів змінної валентності хелаторами, які обмежують залучення атомів відновлених металів у реакції радикалоутворення (тобто в реакції Фентона). До хелаторів відносяться ферритин – у клітинах, трансферин і церулоплазмін – у плазмі крові, карнозин – у м'язах та ін. [1].

Інший важливий напрям захисту – це стабілізація структури біологічних мембран. Важливу роль у цьому відіграє й α -токоферол [168].

Підвищення концентрації металів у ґрунті, продуктах харчування, воді, що відзначається зараз, є факторами, які сприяють розвитку і прогресуванню нефропатій, пошкоджень імунної системи і патології печінки, особливо у дітей. Велике число дітей із захворюваннями нирок і органів імунної системи, що неухильно зростає, обумовлює актуальність робіт, спрямованих на вивчення механізмів розвитку цих захворювань.

Наявні в літературі відомості про метаболічні порушення, що призводять до розвитку і прогресуванню нефропатій, а також про роль біогенних металів в обміні речовин, свідчать про те, що під час вивчення особливостей розвитку низки патологій при гіпо- та гіпермікроелементозах, особливо при тривалому введенні, необхідно вивчати особливості стану про- та антиоксидантних систем, білкового та ліпідного обміну, а також проаналізувати вплив на ці системи імуноотропних препаратів.

Разом із тим, препаратів, здатних ефективно усувати розвиток запальних реакцій, індукованих іонами важких металів, недостатньо, і часто вони мало ефективні. У зв'язку з цим, необхідним є подальший пошук біологічно-активних субстанцій, здатних забезпечувати ефективний захист організму від окислювального стресу.

Ми вважаємо, що субстанція, яка має ефективну дію щодо пригнічення окисного стресу і розвитку запальних реакцій в організмі, повинна не лише

усувати негативну дію вільних радикалів і їх продуктів, а й чинити регуляторну дію на активність імунної системи і інші функціональні системи організму, зокрема функції детоксикації організму. Можна вважати, що подібні системні ефекти дії будуть мати біологічні субстанції, до складу яких входять різноманітні біологічно активні речовини. У нашій лабораторії були отримані такі субстанції: «мікс-фактор» і низькомолекулярні компоненти молозива [94, 95, 101, 152].

Субстанція «мікс-фактор» належить до групи імунотропних препаратів, які мають здатність чинити пряму або опосередковану дію на активність імунної системи і володіють антиоксидантною дією [3, 152].

Субстанція «мікс-фактор» є глікопротеїною олігопептидною композитною субстанцією, яка отримана з екзометаболітів мікроорганізмів і вищих грибів, що містить мікроелементи, вітаміни, амінокислоти, ферменти, олігопептиди, ліпопротеїди, нуклеїнові кислоти, олігонуклеотиди, глікопротеїди, низькомолекулярні і високомолекулярні вуглеводи [3, 152].

Відомо, що молозиво багате на різні біологічно-активні речовини, які мають виражену імунотропну активність [94, 95]. У зв'язку з цим, в роботі досліджували можливий вплив цих біологічних субстанцій на активність антиоксидантної системи організму вразі інтоксикації іонами міді.

Висновки до розділу 1

У цьому розділі зроблено основний огляд літератури. Проведено аналіз сучасного стану знань щодо ролі біологічно-активних сполук у механізмах регуляції запальних процесів. Наявні дані переконливо свідчать, що іони важких металів широко поширені в природних екосистемах та можуть накопичуватися в організмі тварин і людини. Іони важких металів мають широкий спектр дії. Однак найбільш виражений і, на думку багатьох фахівців, основний механізм їх дії на біологічні системи, пов'язаний з індукцією вільно-радикальних реакцій.

Серед іонів важких металів іони міді посідають особливе місце. З одного боку, вони дуже часто зустрічаються в навколишньому середовищі, мають

високу токсичність, а з іншого – недолік іонів міді в організмі призводить до різноманітних патологій. Тобто іони міді високотоксичні і есенціальні. Надлишок іонів міді в організмі супроводжується розвитком різноманітних патологій (Хвороба Вільсона-Коновалова та ін.) і розвитком фіброзу печінки [99].

Дослідження механізмів розвитку запальних реакцій, які займають вагоме місце в захворюваннях печінки, індукованих іонами міді, є актуальним завданням, що може забезпечити створення біологічно-активних субстанцій, що усувають розвиток патологій печінки.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [3, 94, 95, 99, 101, 152].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Експериментальні об'єкти

Експериментальну частину роботи виконували в лабораторіях НДІ біології та кафедри молекулярної біології і біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Дослідження проводили на лабораторних щурах - самцях лінії Wistar різного віку. Тварин утримували у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Тварин для експерименту відбирали без анатомічної патології та порушень у поведінці. Тварини кожної вікової групи були розділені на експериментальні групи.

2.1.1 Моделювання Cu-індукованого токсикозу у щурів

Для моделювання Cu-індукованого токсикозу були використані тварини різного віку. Щурам тричі з інтервалом у 48 год внутрішньочеревно вводили розчин сірчаноокислої міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в дозі 1 мг /100 г маси тіла (0,23 мг /1 г печінки). Така доза складала 33 % від летальної дози (LD_{33}) [3, 99, 101].

2.1.2 Модель для оцінки дії «мікс-фактору» на показники гомеостазу

«Мікс-фактор» є комплексом низькомолекулярних компонентів грибів. Це стерильна рідина темно-коричневого кольору, в якій 14 % припадає на сухі речовини, серед яких – 64,2 % – на олігосахариди; 23,3 % – на амінокислоти і олігопептиди; 11 % – ліпіди, 1 % – вітаміни і мінерали. Склад вільних амінокислот: треонін (3 %), валін (23 %), цистеїн (16 %), метіонін (11 %), лейцин (10 %), аргінін (4 %), ізолейцин (4 %) і лізин (1 %). Поряд з основними компонентами, до складу «мікс-фактору» входять: вітаміни: В1 (0,38 мг / л);

B2 (3,24 мг / л) і РР (8,3 мг / л); мікроелементи: кальцій, фосфор, залізо; органічні кислоти.

Для оцінки антитоксичної функції «мікс-фактору» у тварин після введення сірчаноокислої міді було сформовано 3 групи, кожна з яких включала по 8 щурів.

1-а група отримувала фізіологічний розчин у дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла.

2-а група отримувала послідовно розчин сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла.

3-я група отримувала сірчаноокислу мідь в дозі 1 мг / 100 г маси тіла і «мікс-фактор» у дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла.

Схема формування вказаних вище груп представлена на Рис. 2.1.

Для оцінки антитоксичної функції «мікс-фактору» у тварин до летальних доз сірчаноокислої міді було сформовано 4 групи, кожна з яких включала по 10 щурів.

1-а група – контрольна, отримувала трикратне введення фізіологічного розчину, а через 24 год. – сірчаноокислу мідь в дозі 2,5 мг / 100 г маси тіла.

2-а група – тварини, яким попередньо вводили тричі сірчаноокислу мідь в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, а після цього – летальну дозу – 2,5 мг / 100 г маси тіла.

3-я група – тварини, яким вводили сірчаноокислу мідь з попереднім введенням «мікс-фактору» в дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла і після цього – летальну дозу сірчаноокислої міді – 2,5 мг / 100 г маси тіла.

4-а група – тварини, яким вводили тричі «мікс-фактор» , а після цього летальну дозу сірчаноокислої міді – 2,5 мг / 100 г маси тіла.

Для дослідження дії «мікс-фактору» на соматометричні та біохімічні показники у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю було сформовано групу тварин, що отримувала тричі «мікс-фактор» *per os* в дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла з інтервалом 24 годин (год) між введенням сірчаноокислої міді.

Схема введення сірчаноокислої міді та «мікс-фактора» тваринам представлена на рисунку 2.1.

Для дослідження впливу «мікс-фактора» на деякі показники про-антиоксидантної системи при його тривалому застосуванні, починаючи з 22 місяців і 30,5 місяців до кінця життя тварини отримували «мікс-фактор» щоденно з питною водою в дозі 0,05 – 0,06 мг/100 г маси тіла.

Для вивчення впливу «мікс-фактора» на тривалість життя із групи тварин 22-місячного віку було сформовано дві експериментальні групи – контрольна (31 тварина) та дослідна (30 тварин), які отримували щоденно з питною водою «мікс-фактор» в дозі 0,05 – 0,06 мл на 100 г / маси тіла до кінця життя [3, 101, 152].

2.1.3 Модель для дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на показники гомеостазу

При дослідженні впливу комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива (далі НКМ) на показники гомеостазу у тварини з Cu-індукованим токсикозом щурам внутрішньочеревинно вводили CuSO_4 в дозі 1 мг / 100 г маси тіла з інтервалом 48 годин, після чого тричі з інтервалом 24 години вводили НКМ *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла [94, 95, 101, 112, 152].

Для дослідження впливу НКМ на вміст гідроперекисів ліпідів та активність глутатіонпероксидази в сироватці крові після інтоксикації сірчаною кислотою міддю були сформовані групи тварин, яким після інтоксикації вводили НКМ в різних дозах:

- в дозі 0,01 мг/100 г маси тіла;
- в дозі 0,05 мг/100 г маси тіла;
- в дозі 0,1 мг/100 г маси тіла;
- в дозі 1 мг/100 г маси тіла;
- 3 мг/100 г маси тіла.

Таким чином, в роботі вивчали вплив різних доз НКМ на біохімічні показники сироватки крові у експериментальних тварин.

2.1.4 Виведення тварин з експерименту

Забій тварин і проведення експериментів починали завжди в один і той же час доби (8.00 – 9.00 ранку). Тварин присипляли ефірним наркозом. В експериментах дотримувалися рекомендацій проведення медико-біологічних досліджень згідно з міжнародними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» і норм біомедичної етики, відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [32].

2.2 Фізіологічні методи дослідження

Масу тіла контрольних і дослідних тварин визначали щодня з 8 до 9 години до годування [94, 95, 99, 101, 152].

Ректальну температуру тіла визначали в один і той же час з 8 до 9 ранку до прийому їжі термометром MicroTherma 2THandHeld (BraintreeScientific, INC., USA) [94, 95, 99, 101, 152].

Працездатність щурів визначили в тесті плавання з вантажем при температурі води в басейні 12-14 °C та за часом бігу в тредбані до знемоги, при швидкості руху стрічки 40 м / хв. До початку експерименту визначали максимальний час бігу тварин, який приймали за 100% як вихідний рівень. Після чого тварини проходили тренування до бігу з однаковим навантаженням. Час бігу складав 10 % від часу бігу вихідного рівню. Тренування проводили протягом 5 днів. Потім визначали максимальний час бігу у відсотках від початкового [99, 101, 152].

2.3 Препаративні методи дослідження

В роботі отримували сироватку крові та еритроцити, з клітин печінки отримували мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум та цитозольну фракцію.

2.3.1 Одержання сироватки для дослідження

Під час декапітації експериментальних тварин кров збирали у сухі пробірки, які витримували протягом 30 хв. при температурі 4 °С. Після закінчення зазначеного часу кров центрифугували протягом 15 хв. при 1000 g і відбирали у чисті сухі пробірки отриману сироватку [99, 101, 103].

2.3.2 Одержання еритроцитів крові та визначення їх кількості

Для отримання еритроцитів 1 мл крові вносили у пробірку, яка містила 0,4 мл гепарину (концентрація 5000 МО/мл). Еритроцити осаджували шляхом центрифугування протягом 10 хв при 1000 g, після чого еритроцити двічі відмивали фізіологічним розчином.

Визначення кількості еритроцитів проводили методом підрахунку в розрахунковій камері Горяєва [40]. Для цього кров розводили у 200 разів 3 % розчином хлориду натрію. 0,02 мл отриманого розведення змішували з 4 мл 3 % розчину хлористого натрію, заповнювали камеру Горяєва. Кількість еритроцитів рахували під малим збільшенням мікроскопа. Проводили перерахунок на 1 мл крові [152].

2.3.3 Одержання мітохондрій із печінки

Печінку перфузували холодним (4 °С) 0,15 М розчином хлористого натрію. Наважку охолодженої тканини продавлювали через прес, додавали 100 мМ тріс-НCl буферу, рН 7,4, що містив 250 ммоль сахарози, 5 ммоль KCl і 1 ммоль MgSO₄. Гомогенізували протягом 1 хв. при 8000 об / хв. і фільтрували через нейлонову тканину. Мітохондрії і мембрани ендоплазматичного ретикулуму виділяли методом диференційного центрифугування при 10000 g 30 хв з гомогенатів печінки [148]. Співвідношення ваги тканини та об'єму середовища виділення становило 1 : 7. Середовище для виділення мітохондрій містило 0,3 М

сахарози, 1 мМ трилону Б, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4. Фракцію мітохондрій одержували шляхом двохкратного промивання у середовищі виділення без трилону Б. У цьому ж середовищі готували суспензію та кінцевий осад. Концентрація білка мітохондрій у останній суспензії складала від 60 до 80 мг / мл [99, 101, 103, 152].

2.3.4 Одержання мікросомальної фракції (ендоплазматичного ретикулуму) клітин печінки

Постмітохондріальну фракцію клітин печінки центрифугували при 90 000 g 60 хвилин при температурі 4 °С. Надосадову рідину переносили в чисті пробірки. Осад суспендували в 10 мМ трис-НСl буфері, що містив 0,25 М сахарози 5 мМоль КСl і 1 мМоль MgSO₄. [101, 103, 152].

2.3.5 Одержання цитозольної фракції клітин печінки

Цитозольну фракцію гомогенату печінки отримували після диференційного центрифугування при 90 000 g протягом 60 хвилин. Усі маніпуляції проводили при $t \leq 4^{\circ}\text{C}$ [99].

2.3.6 Гістологічні дослідження печінки

Після декапітації тварин фрагменти печінки забирали з однієї і тієї ж частини лопасті і фіксували її у 10 % розчині формаліну протягом 48 годин. Зразки печінки для гістологічного дослідження готували за стандартною методикою. За допомогою мікротома готували зрізи завтовшки 5 мкм. Препарати фарбували барвником [168]. Гістологічні препарати аналізували на мікроскопі марки Marka при 100- і 400-кратному збільшенні [3, 99, 152].

2.4 Аналітичні методи дослідження

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) визначали в сироватці крові спектрофотометрично за уніфікованим методом Райтмана-Френкеля [37]. Принцип реакції полягає в тому, що трансаміназа трансамінування субстрату L-аланіну з утворенням пірувату в пробі на основі реакції з 2,4-динітрофенілгідразином. Для визначення активності АЛТ використали набір реактивів виробництва фірми «SPINREACT». Вимірювання оптичної щільності досліджуваних проб, забарвлення яких стабільне протягом 60 хв., проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda = 505$ нм. Активність АЛТ прямо пропорційна кількості пірувату [3, 46, 94, 95, 99].

Активність аспаратамінотрансферази (АСТ) визначали в сироватці крові спектрофотометрично за уніфікованим методом Райтмана-Френкеля [37]. Принцип реакції полягає в тому, що трансаміназа АСТ проводить реакцію трансамінування субстрату L-аспартату з утворенням оксалоацетату в пробі на основі реакції з 2,4-динітрофенілгідразином. Для визначення активності АСТ використали набір реактивів виробництва фірми «SPINREACT». Вимірювання оптичної щільності досліджуваних проб, забарвлення яких стабільне протягом 60 хв., проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda = 505$ нм. Активність АСТ прямо пропорційна кількості пірувату [3, 46, 94, 95, 99].

Концентрацію холестерину визначали в сироватці крові ензиматичним колориметричним методом [37]. Холестерин визначається після ензиматичного гідролізу і окислення. Індикатор квіноментин формується з перекису водню і 4-амінофеназону в присутності фенолу і пероксидази. Забарвлення продуктів реакції проводили з використанням набору реактивів виробництва фірми «HUMAN». Концентрацію холестерину в зразках визначали за величиною оптичної щільності на біохімічному аналізаторі Beckman Coulter AU480 (Німеччина) при довжині хвилі 492 нм [3, 46, 101].

Концентрацію триацилгліцеролів в сироватці крові визначали ферментативним методом, принцип якого оснований на реакції гідролітичного

розщеплення триацилгліцеролів під впливом ферменту ліпази [37]. Гліцерол, що при цьому вивільняється, далі ферментативно окислюється з утворенням пероксиду водню. Пероксид водню реагує з хромогеном під впливом пероксидази з утворенням забарвленого продукту реакції хіноніміну. 10 мкл досліджуваної сироватки змішували з 1 мл реагенту такого складу: АТФ – 1 ммоль/л, 4-аміноантипірин – 0,4 ммоль / л, гліцеролфосфатоксидаза (ГФО) – 2000 Од / л, ліпаза – 200 000 Од / л, гліцеролкіназа (ГК) – 6000 Од / л, пероксидаза – 500 Од / л у буфері. Ретельно перемішували вміст пробірок і інкубували при кімнатній температурі 18-25 °С протягом 15 хв. Вимірювали оптичну щільність дослідної та калібрувальної проби (замість сироватки містила 10 мкл калібратора) проти холостої проби (містила лише реагент) на біохімічному аналізаторі Beckman Coulter AU480 (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту триацилгліцеролів у дослідному зразку [3, 101].

Концентрацію креатиніну в сироватці крові визначали спектрофотометрично за інтенсивністю забарвлення сполуки оранжево-червоного кольору, що утворюється при взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою в лужному середовищі [37]. Для цього в дослідну пробу вносили 0,5 мл досліджуваної сироватки крові, 1 мл дистильованої води та 0,5 мл трихлороцтової кислоти. У калібрувальну пробу (еталонну) – 0,5 мл калібрувального розчину (концентрація креатиніну – 177 мкмоль/л), 1 мл дистильованої води та 0,5 мл трихлороцтової кислоти. Вміст пробірок ретельно перемішували, і після 5-хвилинної експозиції при кімнатній температурі 18-25 °С центрифугували 1 000 g протягом 5 хв. Надосадову рідину зливали, у дві центрифужні пробірки вносили по 1 мл надосадової рідини з кожної проби, додавали по 0,5 мл пікринової кислоти (0,04 моль / л) і 0,5 мл NaOH (0,75 моль / л). Ретельно перемішували і через 20 хв. вимірювали оптичну щільність зразків на біохімічному аналізаторі Beckman Coulter AU480 (Німеччина) при довжині хвилі 505 нм проти розчину порівняння, який містив 1,5 мл дистильованої води та 0,5 мл трихлороцтової кислоти, 0,5 мл пікринової кислоти та 0,5 мл натрію

гідроксиду. Концентрацію креатиніну (X) в мкмоль/л у сироватці крові розраховували за формулою:

$$X = (C_{em} \times E_{\partial.}) / E_{em}, \quad (2.1)$$

де

C_{em} – концентрація креатиніну в еталонній пробі (177 мкмоль/л);

$E_{\partial.}$ – оптична щільність дослідної проби;

E_{em} – оптична щільність еталонної проби [3, 101].

Вміст альбуміну в сироватці крові визначали спектрофотометрично за методом, принцип якого полягає у наступному: альбумін утворює у слабнокислому середовищі з індикатором бромкрезоловим зеленим у присутності детергенту забарвлений комплекс, інтенсивність якого пропорційна концентрації альбуміну [37]. Дослідні проби сироватки в об'ємі 0,02 мл ретельно перемішували, уникаючи утворення піни, з 2,0 мл робочого розчину індикатору. Після 5 хв.-ї експозиції вимірювали оптичну щільність зразків на біохімічному аналізаторі Beckman Coulter AU480 (Німеччина) при довжині хвилі $\lambda = 620$ нм відносно холостої проби, яка замість сироватки містила дистильовану воду. Калібрувальна проба замість сироватки містила 0,02 мл калібрувального розчину альбуміну. Концентрацію альбуміну (C) в г/л у сироватці крові розраховували за формулою:

$$C = (E_{\partial oc} / E_{кл.} \times A), \quad (2.2)$$

де

C – концентрація альбуміну в сироватці, г / л;

A – концентрація альбуміну в калібрувальному розчині (50 г/л);

$E_{\partial oc}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{кл.}$ – оптична густина калібрувальної проби [3, 101].

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) визначали в мітохондріях і фракціях мікросом печінки за методом Ohkawa [167] і в сироватці за методом Asakawa [82]. Спектр поглинання забарвленого продукту записували на двопробеному спектрофотометрі Specord UV VIS, вимірюючи різницю екстинкції при довжині хвилі 535 нм і 520 нм [159]. Вміст ГПЛ виражали в

еквівалентних кількостях МДА, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [46, 99, 101, 103, 152].

Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали в сироватці крові, еритроцитах, мітохондріальній, постмітохондріальній та цитозольній фракціях та мікросомах печінки спектрофотметрично при 340 нм у 50 мМ K^+ , Na^+ -фосфатному буфері, рН 7,4, що містив 1 мМ EDTA, 0,1 мМ NADPH, 1 од глутатіонредуктази дріжджів, 1 мМ 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 $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [3, 101, 103, 152].

Активність глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) у мітохондріальній, постмітохондріальній та цитозольній фракціях печінки визначали спектрофотометрично за зменшенням NADPH [84] у середовищі, що містить 50 мМ K^+ -фосфатний буфер, рН 7,4, 1 мМ EDTA, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ GSSG, 0,2 % тритон X-100. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH / хв мг білка з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [99, 101, 152].

Активність малатдегідрогенази (МДГ, КФ 1.1.1.40) визначали у мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки спектрофотометрично за швидкістю відновлення NADP + [185] в 68 мМ трис-HCl буфері, рН 7,4, що містить 0,85 мМ MnCl_2 , 2 мМ малат, 0,4 мМ NADP^+ , 0,2 % тритон X-100. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH / хв мг білка [99, 152].

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФГДГ) (КФ 1.1.1.49) (КФ 1.1.1.44) вимірювали у мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки спектрофотометрично за швидкістю відновлення NADP^+ [195], в 120 мМ трис-HCl буфері, рН 7,4, що містить 10 мМ MgCl_2 , 0,9 мМ NADP^+ , 0,6 мМ 6 фосфоглюконат, 0,2 тритон X-100. Г6ФДГ активність визначали шляхом вирахування 6ФГДГ активності із загальної (6ФГДГ + Г6ФДГ) активності, яку вимірювали у вищеописаному середовищі з додаванням 2 мМ

глюкозо-6-фосфату. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH / хв мг білка з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [99, 152].

Активність ізоцитратдегідрогенази (ЩДГ, КФ 1.1.1.42) у мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки визначали спектрофотометрично за швидкістю відновлення NADP^+ [83] в 34 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4, що містить 0,34 мМ ЕДТА, 1,5 мМ MnCl_2 , 0,1 мМ NADP^+ , 1,5 мМ ізоцитрат, 0,2% тритон Х-100. Температура – 37 °С. Активність виражали в нмоль NADPH / хв мг білка [99, 152].

Активність глутатіон-S-трансферази (ГТ, КФ 2.5.1.18) вимірювали в цитозолі, мітохондріях і мікросомах печінки спектрофотометрично при 340 нм [191] в середовищі, що містить 0,1 М K^+ -фосфатний буфер, рН 6,5, 1мМ 1 хлор-2,4-динітробензол, 5мМ GSH, 0,2 % тритон Х-100. Температура – 37 °С. Активність розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $9,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [152].

Вміст білку в досліджуваних зразках визначали за методом [157].

Вміст білку в молозиві оцінювали за електрофоретичним розділенням в градієнті 5-15 % поліакріламідному гелі. Низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ) включали білки з молекулярною масою менше 25-30 кДа [95].

Активність аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3) визначали в мітохондріях спектрофотометрично. У середовищі, що містить 50 мМ Трисс-НСІ-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 мітохондрій [46, 103, 152].

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) у фракції мікросом печінки щурів при спонтанному ПОЛ та аскорбантіндукованому ПОЛ визначали родановим методом, що ґрунтується на отриманні рожевого забарвлення при взаємодії ГПЛ з роданистим амонієм в присутності етанолу та соляної кислоти з наступним фотоколориметруванням при довжині хвилі 480 нм [11]. Визначення малонового

диальдегіду (МДА) і кінцевих характеристики процесу ПОЛ проводили тіобарбитуратовим методом, заснованим на взаємодії МДА з тіобарбитуратом з утворенням забарвленого у рожевий колір триметинового комплексу, що має максимум поглинання при 532 нм. При цьому проби інкубували при 37 °С в присутності іонів заліза та аскорбату, для чого використали 4·10⁻⁵ М розчин солі Мора і 2,6 мМ розчин аскорбінової кислоти [101, 152].

Активність гамма-глутамілтрансфери визначали ферментативно-кінетичними методом, що ґрунтується на визначенні швидкості зміни забарвлення реакційної суміші за рахунок утворення р-нітроаніліна [37]. Методику виконували з використанням набору «СпайнЛаб» виробництва ООО «Лаборатория Гранум» на біохімічному аналізаторі при довжині хвилі 405 нм [94, 152].

2. 5 Статистичні методи дослідження

Всі експерименти повторювали від 3 до 5 біологічних повторів. У кожній експериментальній групі було не менше 5 тварин. Отримані результати обробляли статистично з використанням пакету програм "Statistika V.6". Достовірність відмінностей між групами, що аналізувалися, оцінювали за допомогою методів параметричної (t-критерій Ст'юдента) та непараметричної статистики (критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні). Відмінності вважали статистично достовірними при $P < 0,05$, які позначали в графіках і таблицях символом «*».

Висновки до розділу 2

У даному розділі було охарактеризовано використані в дослідженнях експериментальні моделі тварин, фізіологічні методи визначення ваги, температури тіла, виживання, працездатності дослідних тварин; препаративні методи отримання сироватки, еритроцитів, гістологічних препаратів, фракцій

мітохондрій і мембран ендоплазматичного ретикулума; спектрофотометричні методи визначення вмісту АЛТ, АСТ, холестерину, триацилгліцеридів, креатиніну, альбуміну, гідроперекисів ліпідів, глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної, малатдегідрогеназної, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної, ізоцитратдегідрогеназної, глутатіон-S-трансферазної активності, електрофоретичні методи оцінки низькомолекулярних компонентів молозива та методи статистичного аналізу отриманих результатів.

Означені методи були використані у власних дослідженнях, представлених у роботах [3, 46, 94, 95, 99, 101, 103, 152].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Фізіолого-біохімічні характеристики тварин із Cu-індукованим ТОКСИКОЗОМ

3.1.1 Соматичні показники у тварин після інтоксикації сірчаною кислотою

Багаторазове послідовне введення експериментальним тваринам сірчаної кислоти в дозі, що містить 33 % від летальної, супроводжувалося зниженням маси тіла тварин у порівнянні з масою тварин контрольної групи (Рис. 3.1 А).

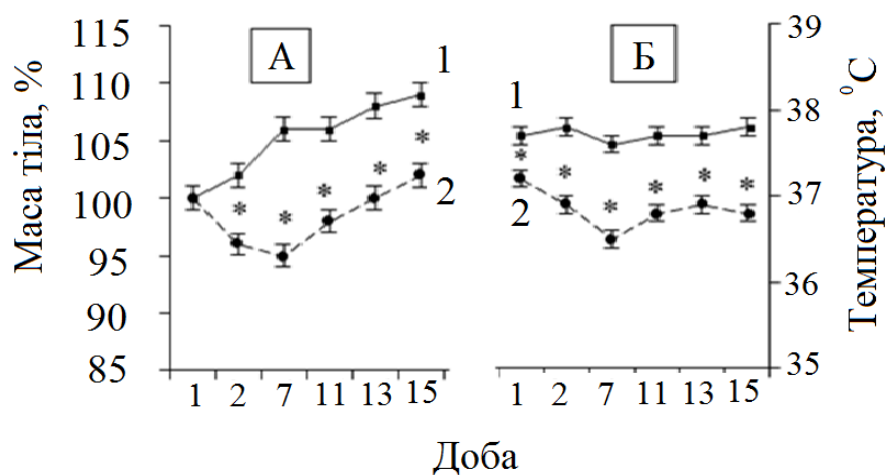


Рис. 3.1 Зміна маси тіла (А) і ректальної температури тіла (Б) в інтактної групи (1) і груп після багаторазових введеннь сірчаної кислоти (2); час введення показано з 1 по 15 день спостережень

Примітка. * - відзначені достовірні відмінності між групами $P < 0,05$

Так, уже на 3-ю добу після початку введення цього токсиканту маса тварин не збільшувалася, як в контрольній групі, а зменшувалася на 4 % від вихідної. Втрата маси тіла у таких тварин тривала до 7-х діб експерименту, а далі після припинення введення сірчаноокислої міді, вона поволі відновлювалася до початкового рівня до 13 доби спостережень, однак значно відставала від контролю в цей час (Рис. 3.1 А).

Такий ефект пригнічення маси тварин був пов'язаний з порушенням функції травлення, пригнічення функції печінки й інгібування загального метаболізму. Про це свідчить порушення перистальтики кишечника, пригнічення інтенсивності загального метаболізму, що проявлялося в зниженні температури тіла у Cu-індукованих токсикозом тварин (Рис. 3.1 Б). Так, у інтактних тварин температура тіла не змінювалася і відповідала 37,6 - 37,8 °С, в той час як у тварин, що отримували триразово сірчаноокислу мідь, вона була знижена на 0,8 - 1,0 °С (Рис. 3.1 Б).

Як відомо, зниження температури тіла навіть на 0,3-0,5 °С впливає на швидкість ферментативних реакцій. Таке зниження температури тіла може бути викликане декількома причинами: пригніченням функції щитоподібної залози і, як наслідок, зменшенням вмісту тироксину в організмі. Як відомо, гормони щитоподібної залози приймають участь в регуляції термогенезу [100]. Не можна виключити і того, що підвищений вміст іонів міді в організмі впливає на функції нервової системи і, як наслідок, впливає на функцію щитоподібної залози й інші регуляторні системи організму.

Пригнічення загального метаболізму повинно позначатися на здатності таких тварин адаптуватися до екстремальних факторів середовища. Для оцінки цього, контрольні та експериментальні групи тварин піддавалися оцінці здатності здійснювати роботу в тесті плавання з вантажем у ванній з температурою води 12-14 °С. У таких умовах можна оцінити не лише здатність тварин виконувати роботу, але і їхню стійкість до психо-емоційного стресу. Виявилося, що якщо через 24 години після останнього введення тваринам сірчаноокислої міді, що відповідає «піку» падіння маси тіла тварин і

максимальному зниженню температури тіла (Рис. 3.1), то час утримання таких тварин на поверхні води був скороченим порівнянно з контрольною групою тварин в 2,5-3 рази (Рис. 3.2).

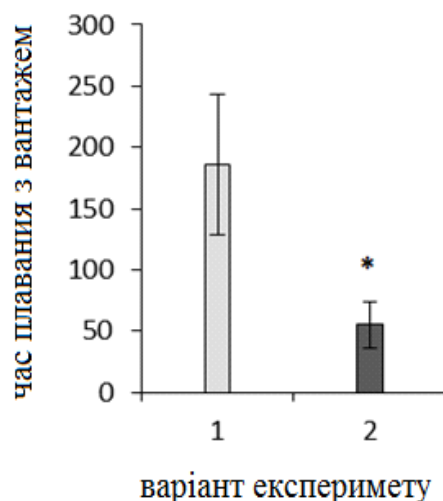


Рис 3.2 Час плавання з вантажем контрольної (1) та експериментальної груп після введення сірчаноокислої міді (2)

Примітка. * - $P < 0,05$ у порівнянні з контрольними тваринами

Отже, триразове послідовне введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді з інтервалом між введенням 48 годин, проявилось як гострий токсикоз. Це супроводжувалося втратою маси тіла, зниженням температури тіла і зниженням працездатності [95, 99, 101, 152].

Відомо, що введення іонів міді експериментальним тваринам супроводжується накопиченням цього металу, перш за все, в клітинах печінки. Збільшення іонів міді в печінці може супроводжуватися пригніченням функцій печінки і розвитком початкових стадій фіброзу печінки [10, 97, 99, 101].

Отже, далі визначали біохімічні показники стану печінки у тварин після інтоксикації сірчаноокислої міді.

3.1.2 Деякі біохімічні показники у тварин після інтоксикації сірчаною кислотою

Для оцінки функціонального стану печінки використовують комплекс біохімічних і гістологічних показників, серед яких активність аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази посідають перше місце, тому що ці трансферази синтезуються в печінці і збільшення їх активності в сироватці крові свідчить про руйнування гепатоцитів і неспецифічний для них перехід у кров. Для оцінки функцій печінки визначали відносну активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в порівнянні з контрольним рівнем як показника функціональної активності печінки. Виявилось, що через добу після останнього введення сірчаної кислоти тваринам, активність цих трансфераз змінювалася в порівнянні з контрольним рівнем (Рис. 3.3). Ці результати показують, що в цьому випадку клітини печінки зберегли свою структуру. На користь того, що основні функції печінки зберігалися, свідчить незмінна кількість холестерину, триацилгліцеролів, креатиніну й альбуміну в порівнянні з контрольними тваринами. (Рис. 3.3).

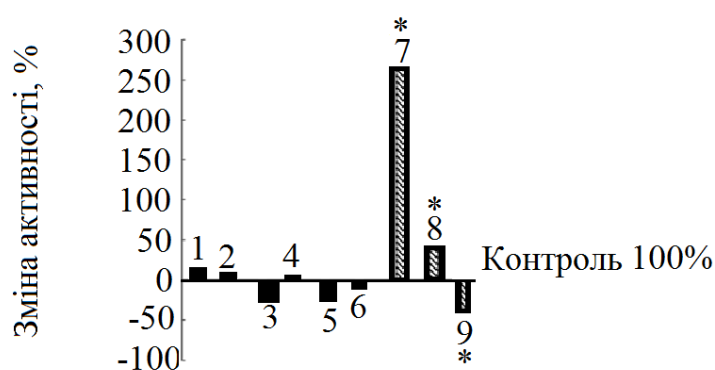


Рис. 3.3 Зміна активності АЛТ (1), АСТ (2), вміст холестерину (3), триацилгліцеридів (4), креатиніну (5), альбуміну (6), активності ГГТ (7), вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці (8) і активності глутатіонпірроксидази в сироватці (9) крові у тварин після введення сірчаної кислоти у відсотках, у відношенні до контрольного рівня, який прийнятий за 100 %

Примітка. * – $P < 0,05$ у порівнянні з контрольними тваринами

Поряд із цим, активність гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) у тварин, які отримали сірчаноокислу мідь, збільшилася на 263 % в порівнянні з контрольними тваринами (Рис. 3.3). Відомо, що ГГТ, фермент печінки і підшлункової залози, його підвищення в крові є діагностичним тестом на патологію печінки або інших внутрішніх органів. Тест на активність ГГТ є найбільш чутливим тестом щодо холестазу (застою жовчі) [2]. Цей фермент підвищується швидше в крові, ніж активність лужної фосфатази [2], яка так само використовується в оцінці функції печінки. Однак підвищення активності ГГТ в крові не є суто специфічним показником, тому що порушення функції печінки, незалежно від патологічного факторів, супроводжується збільшенням його активності в крові.

Відомо, що однією з найбільш чутливо та «швидко» реакційних на різноманітні зміни систем клітини є редокс-система. Як відомо, у біологічних системах окислення-відновлення відбувається за участю активних форм кисню (АФК) [60]. Багаторічні дослідження регуляторних систем АФК і тіол-дисульфідного обміну дозволили сформулювати положення редокс-гіпотези окисного стресу [146]. Відповідно до цієї гіпотези процес окислення-відновлення забезпечує регуляцію клітинних функцій [145]. Характеристика окислювачів (проксидантів) і відновників, є важливою характеристикою редокс-системи. Визначення вмісту гідроперекисів ліпідів у сироватці крові після численних послідовних введень сірчаноокислої міді збільшувалося на 37 % у порівнянні з контролем (Рис.3.3). У той же час активність глутатіонпероксидази у цих тварин була достовірно зменшеною порівняно з контролем (Рис. 3.3). Отже, Cu-індукований токсикоз супроводжувався зміною низки фізіологічних характеристик тварин, при цьому основні параметри функції печінки залишалися в межах норми. Однак в печінці мав місце окислювальний стрес (інгібування антиоксидантного ферменту глутатіонпероксидази і збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів в сироватці крові) і збільшення активності гамма-глутамілтрансферази. Ці результати свідчать про початкові стадії дисфункції печінки, які проявилися зміною і деяких фізіологічних показників у таких тварин [3, 95, 99, 101].

Як відомо, обмін речовин, процеси дихання, фотосинтезу і ін. у своїй основі є окислювально-відновними процесами. Уразі аеробного метаболізму основним окислювачем є молекулярний кисень, а відновники – органічні речовини продуктів харчування. Можна вважати, що розробка систем регуляції характеристик редокс-систем організму є найважливішим теоретичним завданням у розумінні загальних систем регуляції метаболізму, його спрямованості і визначення фізіологічних проявів. У нашій лабораторії було розроблено концепцію модулізації редокс-систем організму низькомолекулярними компонентами біологічного походження. Такі низькомолекулярні компоненти були отримані з харчових грибів (*Pleurotus ost*) дріжджів (*Sacharomyces cerevisiae*) і коров'ячого молозива. Ці низькомолекулярні компоненти були названі «мікс-фактором» і низькомолекулярними компонентами молозива (НКМ).

Надалі проводили гістологічний аналіз фрагментів печінки після 3-послідовних введень сірчаноокислої міді. На гістологічних препаратах контрольних тварин: печінкова капсула тонка, компактна, щільно прилягає до паренхімі печінки (Рис. 3.4а). Навколо центральної вени дольки печінки між балками є тонкий колагеновий матрикс, який радіально розходить до портальних трактів, що характерно для нормальної тканини печінки (Рис. 3.4б). Портальні тракти представлені класичної тріадою (печінкова артерія, портальна вена, жовчний протік) з вираженим колагеновим компонентом, що оточують їх (Рис. 3.4 в). Гепатоцити мають типову морфологію, клітинні ядра помірно гіперхромні, місцями зустрічаються двоядерні форми (Рис. 3.4 б) уже через 24 години після останнього введення сірчаноокислої міді морфологічна організація печінки відрізнялася від такої контрольних тварин [46, 103, 152].

У паренхімі мало місце виражене венозне повнокров'я, як в центральній вені, так і в венах портального тракту (Рис. 3.4 е). У деяких гілках ворітної вени виявляється «сепарація» формених елементів від плазми крові, що може свідчити про венозний застій (Рис. 3.4 ф). Дифузно по всій паренхімі зустрічаються гепатоцити в стані гідропічної дистрофії (клітини з «пінистої» цитоплазми), з

елементами некробіозу («тіні» ядер) і некрозу (втратили ядра) (Рис. 3.4 е, h). Збереження цілісності клітин говорить про незвичайний некроз гепатоцитів за апоптозним типом. У морфологічно збережених гепатоцитів часто виявляються до 3 ядерець, що може бути показником адаптивної проліферативної активності клітин (Рис. 3.4). Найбільш виражені зміни морфології печінки експериментальних тварин виявлено в організації капсули органу. На відміну від контрольного варіанту, вона була місцями пухка, нещільно спаяна з паренхімою, місцями з повним відшаруванням від паренхіми (Рис. 3.4 d, g).

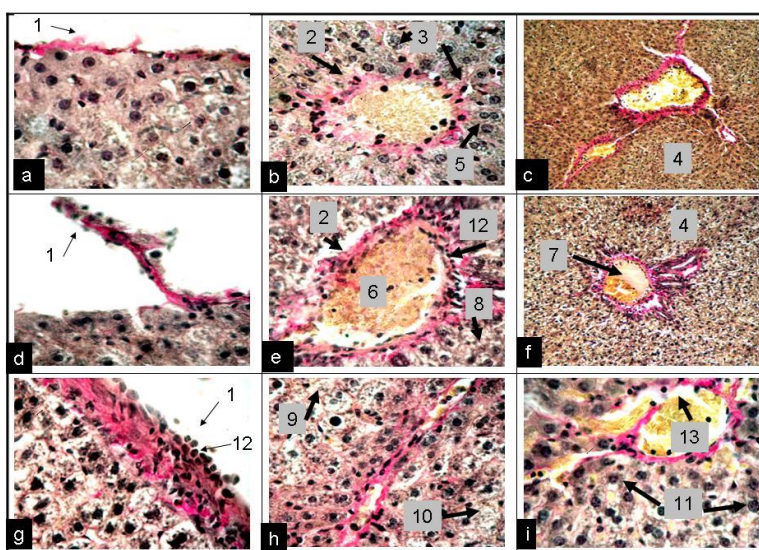


Рис. 3.4 Мікрофотографії препаратів печінки контрольних (a-c) і піддослідних тварин (d-i). Забарвлення за Ван-Гизоном. Збільшення X100 (c, f) і X400 (a, b, d, e, g, h, i)

Позначення: 1. Капсула. 2. Центральна вена. 3. Колагеновий матрикс. 4. Портальний тракт. 5. Двоядерні форми гепатоцитів. 6. Венозне повнокров'я. 7. «Сепарація» формених елементів. 8. Клітини з «пінистої» цитоплазмою. 9. «Тіні» ядер. 10. Клітини, що втратили ядра. 11. «Многоядришкові» клітини. 12. Інфільтрація мононуклеарних елементів. 13. Пошкодження ендотелію судини.

У ній була присутня велика кількість фібробластів, лімфоцитів, ретикулоцитів, моноцитів (Рис. 3.4 g). Інфільтрат мононуклеарних елементів виявлявся також в стромі портальних трактів (Рис. 3.4 е). Описані явища є ознаками запального процесу в сполучної тканини. У ряді випадків мало місце пошкодження ендотелію судин, що супроводжувалося крововиливом в паренхіму органу, це призводило до зміни кольору печінки, вона мала темний колір (Рис. 3.4 і).

Отже, виявлення зміни на морфологічному рівні тканини печінки свідчить про відносно невеликі зміни цього органу після 3-х послідовних уведень сірчанокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, здебільшого, на початкових етапах (5 діб) розвитку запалення [46, 103, 152].

3.1.3 Деякі характеристики «мікс-фактора» і НКМ

Ідея роботи полягала в тому, що комплекс низькомолекулярних компонентів біологічного походження може брати участь у регуляції редокс-систем організму і, як наслідок, системно регулювати метаболізм. Пошук таких комплексів важливий з кількох причин. По-перше, цей підхід надзвичайно перспективний при дослідженні загальних механізмів регуляції метаболізму. По-друге, такі біологічно активні сполуки можуть бути використані в якості перспективних і універсальних антидотів при токсичних отруєннях, зокрема іонами важких металів, в тому числі й іонами міді.

«Мікс-фактор» виробляється за ТУУ 10.8-33206207-002:2018 і є комплексом цукрів, на які припадає понад 60 % сухої речовини від інших компонентів (Рис. 3.5). Як відомо, основна функція цукрів – енергетична. Однак, численні дослідження метаболізму цукрів показали їх активну участь у регуляції метаболізму. У зв'язку з цим, можна очікувати, що цукри, які містяться в «мікс-факторі», можуть брати участь у механізмах регуляції різних систем організму. До складу «мікс-фактора» входить близько 10 % ліпідних компонентів, і

невелика кількість вітамінів В1 (0,038 мг / л), В2 (3,24мг / л) і РР (8,3 мг / л) (Рис. 3.5).

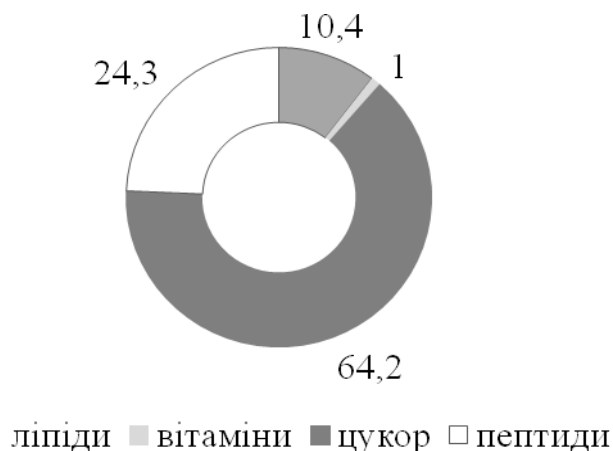


Рис. 3.5 Склад компонентів «мікс-фактора» у відсотках

Однак найбільший інтерес мали пептиди й амінокислоти «мікс-фактора», які становили понад 20 % від інших компонентів (Рис. 3.5). Дослідженню регуляторної ролі пептидів присвячена велика кількість експериментальних робіт (Хавінсон, Морозов, Анісімов) [43, 58, 78].

«Мікс-фактор» – стерильна рідина, темного кольору, на сухі речовини припадає 14 %, яка має специфічний запах, схожий з хлібним квасом. У нашій лабораторії було розроблено методику видалення жирів і високомолекулярних білків молозива. У результаті вдалося отримати весь комплекс відносно низькомолекулярних компонентів молозива. Так, до його складу входять 6-7 білкових фракцій з ММ від 10 до 45 кДа (Рис. 3.6).

Низькомолекулярні компоненти молозива (НМК) висушували в м'яких умовах (вакуумне сушіння). Сухі зразки зберігали при температурі 4 °С. Як експериментальний зразок суху наважку розчиняли у фізіологічному розчині (1 г/ мл). Це розведення брали за вихідний зразок НКМ і його вводили *per os* тваринам для оцінки біологічної активності. При визначенні фізико-хімічних характеристик вихідний зразок розводили додатково водою в 100, 150 і 200 разів.

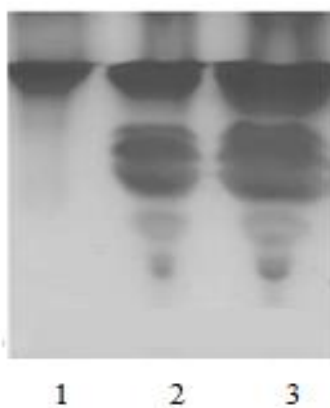


Рис. 3.6 Електрофореграма білків молозива після отримання фракції НМК:
1 – маркер; 2, 3 – компоненти молозива в різних концентраціях

В 1 мл вихідного зразка містилося 59 мг / мл сухих речовин, з них 54 мг / мл становили білки, лише 0,31 мг / мл – вуглеводи, вміст білків і вуглеводів був 54,3 мг/мл, що складало 92 % сухих речовин. Отже, близько 8 % сухих речовин складали інші речовини (Рис. 3.7.).

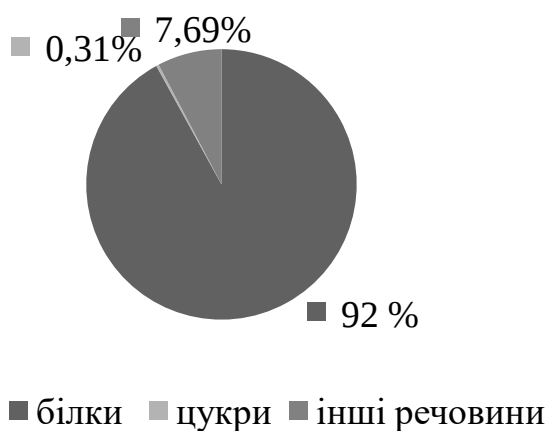


Рис. 3.7 Склад основних компонентів, що містяться в НМК, %

Відносна щільність отриманого зразка становила $1,018 \pm 0,001$, розведення в 100 разів цього зразка показало зниження щільності до 0,995, тобто на $0,023 \text{ г / см}^3$. Розведення вихідного зразка в 150 і 200 разів більше не впливало на відносну щільність розчину.

Ще одним важливим фізико-хімічним показником розчину є величина рН. Вихідний розчин НМК відразу після приготування становив 6,25 од. Розведення

водою в 100 разів супроводжувалося зменшенням величини рН на 0,05 од, в 150 разів на 0,2 од., а в 200 разів на 0,25 од. від вихідного розчину (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Значення рН вихідного розчину НКМ, після його розведення і через 7 діб його зберігання при кімнатній температурі

Розчин	Показник		
	рН свіжоприготованого розчину	рН через 7 діб	Різниця рН (Δ)
Вихідний розчин	6,25 $\pm$ 0,01	4,25 $\pm$ 0,01	2,0
Розведення 100	6,20 $\pm$ 0,01	5,25 $\pm$ 0,01	0,45
Розведення 150	6,05 $\pm$ 0,01	5,90 $\pm$ 0,01	0,15
Розведення 200	6,00 $\pm$ 0,01	5,75 $\pm$ 0,01	0,25

Примітка. представлені середні значення з 6-ти визначень

У тому випадку, якщо приготовані зразки зберігалися при 20-22 °С 7 діб, то в усіх зразках значення рН зменшувалися, тобто зразки закислювалися при зберіганні (табл. 3.1). Це виявлялося особливо виражене для вихідного розчину НКМ, на 2,0 (табл. 3.1).

Отже, приготований розчин НКМ використали відразу після отримання. Це свідчить про те, що компоненти НКМ нативні й швидко можуть руйнуватися. Важливим показником багатоконпонентних біологічних рідин є спектр їх поглинання. Оскільки основний склад НКМ представлений білками, то вони повинні поглинати в ультрафіолетовій області. Визначити спектр поглинання вихідного розчину НКМ було неможливо, оскільки поглинання було вище 2,0. Спектри поглинання НКМ після розведення в 100, 150 і 200 разів наведені на рис. 3.8. Як видно з даних Рис. 3.8, максимум поглинання був при 230 нм. Виявлявся другий пік поглинання при 270 нм, що відповідало білкам і нуклеїновим кислотам. Як видно з Рис. 3.7, в області 330-450 нм спектр поглинання і спектральний характер мало залежав від концентрації компонентів.

Для підтвердження специфічності спектра поглинання НКМ був знятий спектр поглинання низькомолекулярних компонентів розробленого нами комплексу – «мікс-фактора». Як видно з рисунку 3.9, спектр поглинання «мікс-фактора» відрізнявся від такого НКМ.

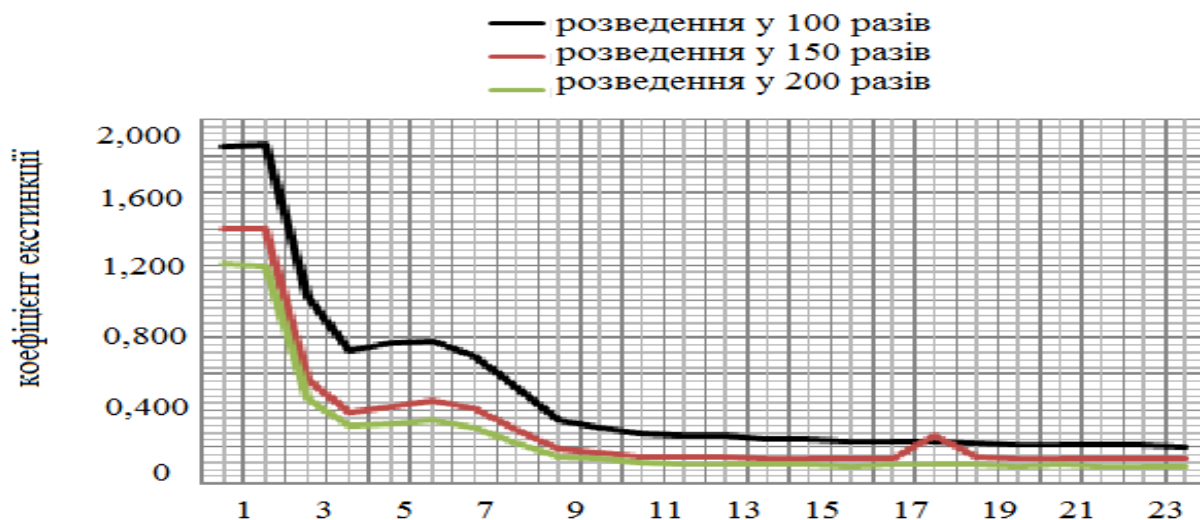


Рис. 3.8 Спектр поглинання компонентів НКМ після розведення в 100, 150 і 200 разів водою. Примітка. 1— довжина хвилі – кожний інтервал – 10 нм

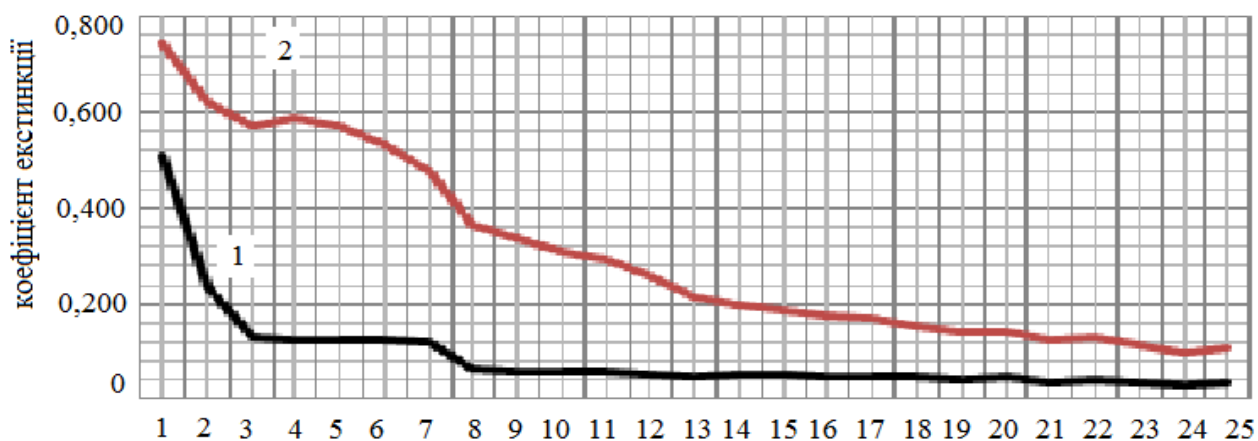


Рис. 3.9 Спектр поглинання молозива і «мікс-фактора».

Примітка. 1 – «мікс-фактор»; 2 – молозиво

Отримані данні можна зв'язати з тим, що «мікс-фактор» та НКМ, які отримані з різних джерел, суттєво різнились між собою: до складу «мікс-фактору» входило більш 60 % цукрів, то в НКМ більш 80 % доводилося на білкові компоненти. [94, 95, 101, 152].

3.2 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на деякі фізіологічні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом печінки

3.2.1 Вплив «мікс-фактора» на деякі соматометричні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом печінки

Для оцінки антитоксичної функції «мікс-фактора» тваринам до індукції фіброзу печінки за 24 години до введення токсиканту вводили «мікс-фактор» у дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла і надалі тваринам вводили сірчаноокислу мідь кожні 48 годин, а між її введеннями вводили «мікс-фактор» за схемою (Рис. 2.1).

У тому ж випадку, якщо тварини отримували сірчаноокислу мідь на тлі введення «мікс-фактора», то їх маса тіла не лише не відставала від контрольних тварин, але навіть перевершувала контроль на 10 %, температура їх тіла не відрізнялася від контролю, а здатність виконувати роботу збільшувалася, хоча і не досягала показників контрольної групи тварин (табл. 3.2).

Отже, «мікс-фактор» у дозі 0,05 мл / 100 г маси тіла, що вводили *per os*, на тлі введення сірчаноокислої міді усував токсичну дію цього токсиканту, тобто він мав антитоксичний ефект.

Раніше було показано, що одноразове внутрішньочеревинне введення сірчаноокислої міді в дозі (2,5-3,0) мл / 100 г маси тіла викликало прояв гострої токсичності, і тварини гинули через 1-6 годин після введення [104]. У тому випадку, якщо тваринам попередньо вводили малі дози сірчаноокислої міді (1 мг / 100 г маси тіла), через 24 години їм же вводили летальну дозу (2,5-3,0 мг / 100 г маси тіла), то 70-80 % тварин виживали. Тобто у них проявляється індукована резистентність до сірчаноокислої міді [9].

Таблиця 3.2

Зміна маси тіла, температури тіла та час плавання з вантажем в контрольній групі після інтоксикації сірчаною кислотою міддю, а також після інтоксикації та дії «мікс-фактора» (n=8)

Група тварин	Показник		
	Зміна маси тіла, %	Температура тіла, °C	Час плавання, с
Контроль	100,0 ± 0	37,03 ± 0,3	900,0 ± 25,5
Після інтоксикації	98,0 ± 1,2*	36,13 ± 0,3*	167,0 ± 10,1*
Після інтоксикації та дії «мікс-фактора»	115,0 ± 2,0*	37,6 ± 0,3	267,0 ± 15,2*

Примітка. * - позначена достовірна різниця в порівнянні з контролем.

У наступній серії експериментів визначали можливий вплив «мікс-фактора» на усунення гострої токсичності після введення тваринам летальних доз сірчаною кислотою міді. Для цього були сформовані 4 групи експериментальних тварин по 10 щурів у кожній групі (Рис. 3.10).

Контрольна група одержувала триразове введення фізіологічного розчину, а через 24 години сірчаною кислотою мідь у дозі 2,5 мг / 100г маси тіла. Через 3 доби всі тварини загинули (Рис. 3.10 - група 1).

Виявилося, що триразове попереднє введення малих доз сірчаною кислотою міді з подальшим введенням летальної дози забезпечує виживання більш 70 % тварин (Рис. 3.10).

У тому випадку, якщо експериментальним тваринам вводили малі дози сірчаною кислотою міді та «мікс-фактор», після чого вони отримували летальну дозу сірчаною кислотою міді, то в живих залишалося більше 90 % тварин (Рис. 3.10), тобто «мікс-фактор» у поєднанні з малими дозами сірчаною кислотою міді збільшували стійкість тварин і токсичну дію сірчаною кислотою міді. У тому випадку якщо тваринам вводили тільки «мікс-фактор» з подальшим введенням їм летальної дози сірчаною кислотою міді, то в живих залишалося більше 60 % (Рис. 3.10). Отже,

«мікс-фактор» виявляв виражені антитоксичні функції, навіть до летальних доз сірчаноокислої міді [3, 152].

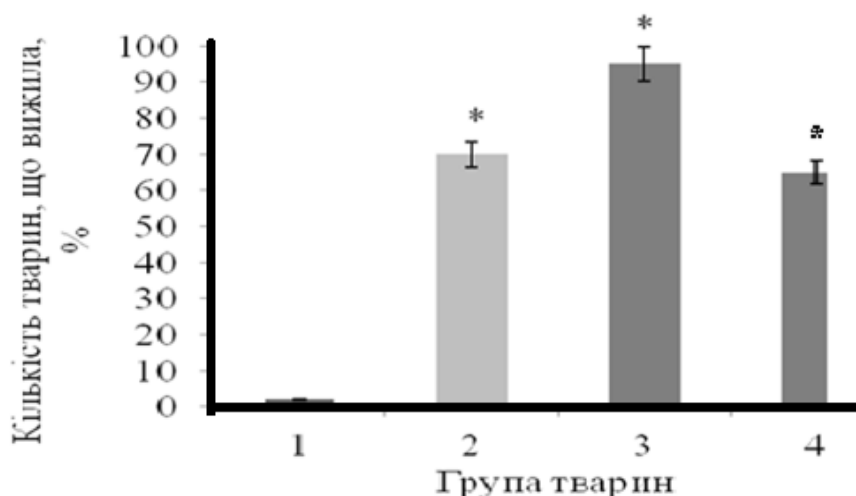


Рис. 3.10 Кількість тих тварин, що вижили у відсотках через добу після введення сірчаноокислої міді в дозі 2,5 мг / 100 г маси. Контрольна група тварин, яка попередньо отримувала фізіологічний розчин (1); група тварин, якій попередньо вводили 3 рази сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг / 100 г маси тіла, а після цього їм вводили летальну дозу 2,5 мг / 100 г маси тіла (2); група тварин, яким також вводили сірчаноокислу мідь із попереднім введенням «мікс-фактора» в дозі 0.05 мл / 100 г маси тіла, а після цього летальну дозу 2,5 мг / 100г маси тіла (3); група тварин, яким вводили 3 рази «мікс-фактор» , а після цього летальну дозу 2,5 мг / 100 г маси тіла (4)

Примітка. * – $P < 0,05$ у порівнянні з варіантом 1 (контроль)

Той факт, що спільне введення малих доз сірчаноокислої міді та «мікс-фактора» забезпечувало найбільший ефект захисту від летальних доз сірчаноокислої міді, у порівнянні з іншими варіантами, вказують на те, що індукція резистентності іонами міді та «мікс-фактором» може реалізуватися різними механізмами. Тож компоненти «мікс-фактора» мають антитоксичний ефект і здатні посилювати гормезисний ефект до іонів міді [101].

3.2.2 Захисний ефект «мікс-фактора» на мембрани еритроцитів

Як відомо, вільні радикали індукують у біологічних системах типовий ланцюговий процес з вираженим розгалуженням. Його розвиток може перериватися з двох основних причин: перехоплення компонентами антиоксидантної системи з подальшою адаптивною перебудовою метаболізму або загибеллю клітини з її подальшою елімінацією. Коли клітинна загибель не компенсується проліферативними процесами, то можуть формуватися нові метаболічні і тканинні відношення, які проявляються в тих чи інших патологіях в залежності від локалізації оксидативного стресу в ієрархічній структурі біологічної системи і часу збереження цих змін.

Для перевірки цього положення ми виходили з того, що загибель тварин при гострій інтоксикації міддю настає в результаті пригнічення функції кровообігу, спазму кровоносних судин, порушення функції печінки і нирок. Одним з можливих молекулярних механізмів гострої токсичної дії великими концентраціями іонів міді є індукція окислювальних процесів клітинних мембран, у першу чергу, мембран еритроцитів. Якщо це так, то окислення компонентів мембран еритроцитів може призводити до некрозу клітин, зменшення їхньої кількості в кров'яному руслі, а клітини, що залишилися, можуть втрачати свою функціональну активність, і це призводить до порушення дихання й загибелі тварин.

Визначення кількості еритроцитів у крові контрольної групи тварин показало, що воно становило $(6,1 \pm 0,42)$ млн / мл. У тому випадку, якщо тварини отримували триразово сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг / 100 г маси тіла, то кількість еритроцитів у них була на 32 % менше контрольного рівня (Рис. 3.11).

Отже, іони міді індукували гемоліз частини еритроцитів, і це не могло не вплинути на виживання тварин. Не можна виключати й того, що іони міді інгібують гемопоєз у кістковому мозку.

У тому випадку, якщо ті ж дози сірчаноокислої міді вводили на тлі введення тваринам «мікс-фактора», то кількість еритроцитів не відрізнялася від

контрольного рівня (Рис. 3.11). Еритроцити після введення «мікс-фактора» в дозі 0,1 мл / 100 г не відрізнялися від еритроцитів контрольних тварин [152].

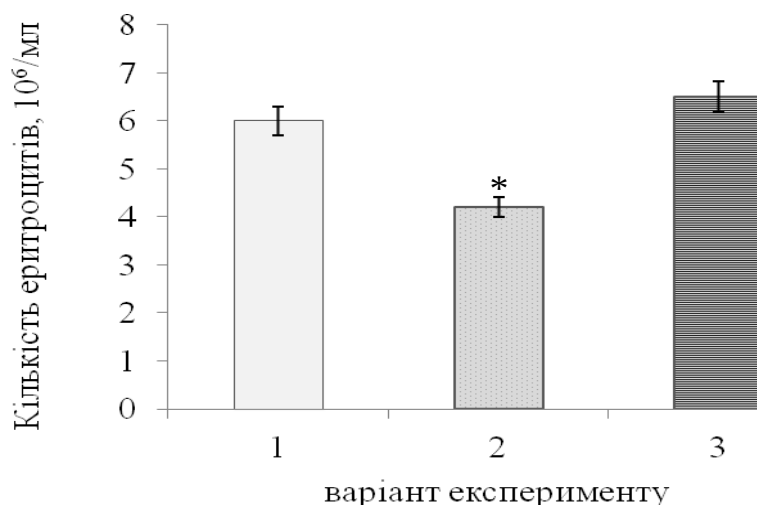


Рис. 3.11 Кількість еритроцитів у групі контрольних тварин (1); тварин, які отримували лише сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг / 100 г тричі (2); тварин, які отримували сірчаноокислу мідь на тлі «мікс-фактора» в дозі 0.05 мл / 100 г маси тіла. (3). Примітка. * - $P < 0,05$ в порівнянні з контролем

Отже, компоненти «мікс-фактора» забезпечували «захист» мембран еритроцитів від токсичної дії іонами міді, або стимулювали еритропоез. На тлі токсикозу незалежно від механізму дії вони збільшували стійкість тварин до токсичної дії іонів міді. Після повторного введення сірчаноокислої міді процес втрати маси тіла проявлявся меншою мірою, що свідчить про індукції адаптивної реакції у цих тварин. Ці результати підтверджують встановлений раніше факт про індукції гормезісного ефекту до цього токсиканту у тварин.

3.2.3 Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі соматометричні показники тварин з Cu-індукованим токсикозом

Отримані результати про вплив «мікс-фактора» на усунення токсичної дії сірчаноокислої міді можуть вказувати на те, що комплекс низькомолекулярних

сполук, виділених з біологічних об'єктів, мають оцінити ефективність принаймні щодо сірчаноокислої міді. Подальше дослідження можливих механізмів дії вимагає відповіді на питання про специфічність їхньої дії.

Не можна виключати і того, що компоненти «мікс-фактора» надають неспецифічну дію на організм, тобто впливають на такі інтерактивні системи, як редокс-система, мінеральний обмін та ін. Перевірка цього припущення має принципове значення у дослідженні механізму його дії. Для вирішення цього питання було досліджено вплив низькомолекулярних компонентів з іншого біологічного джерела-коров'ячого молозива. Низькомолекулярні компоненти коров'ячого молозива були виділені в нашій лабораторії.

Маса 3-х місячних самців з 1-го по 5-й день спостережень, що відповідало часу індукції токсикозу з наступним введенням біологічно активних субстанцій, відповідало стандартним показникам. За цей час маса їхнього тіла збільшується на 12 % від початкової, яку брали за 100 % (Рис. 3.12).

Триразове послідовне введення тваринам сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, що відповідає 33 % від летальної дози призводило до різкої і значущої втрати маси тіла. Вже на 3 добу після введення сірчаноокислої міді вони втрачали 10 г маси тіла (Рис. 3.12 А). Після повторного введення сірчаноокислої міді процес втрати маси тіла проявлявся меншою мірою, що свідчить про індукцію адаптивної реакції у цих тварин. Ці результати підтверджують встановлений раніше факт про індукцію гормезисного ефекту до цього токсиканту у тварин.

У тому випадку, якщо тварини на фоні введення сірчаноокислої міді отримували НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла, вони не відрізнялися від контролю за динамікою маси тіла.

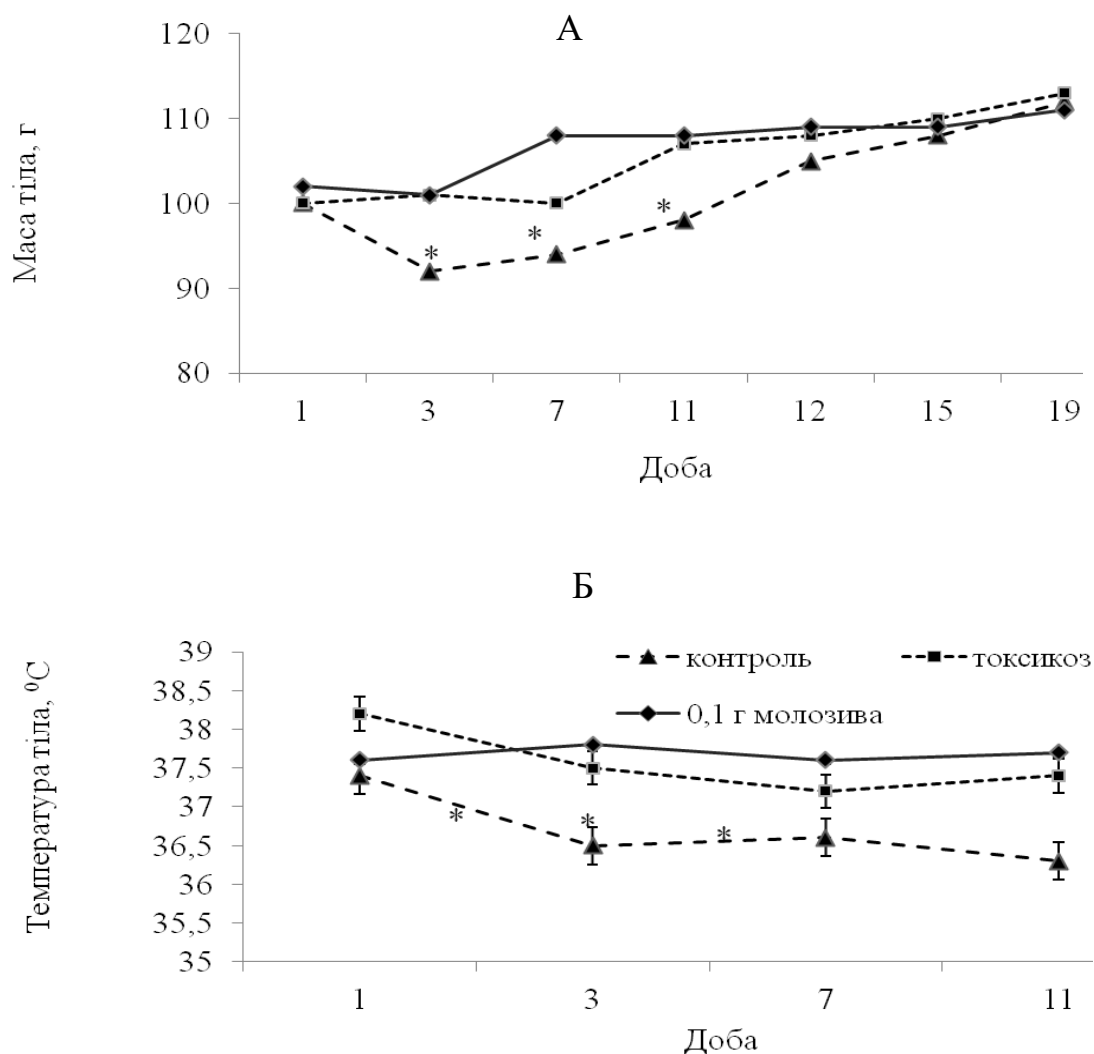


Рис. 3.12. Динаміка маси тіла (А) контрольної групи тварин (—▲—), тварин з Cu-індукованим токсикозом (-■-) і тварин з Cu-індукованим токсикозом, яким вводили НКМ в дозі 0,1г / 100г маси (—◆—), і динаміка ректальної температури (Б) інтактних тварин (—▲—), тварин з токсикозом (-■-) і тварин з фіброзом, які отримували 0,1 г / 100 г маси НКМ(—◆—).

На 7 добу вони втрачали лише 2-3 % від початкової маси тіла і в подальшому не відрізнялися за інтенсивністю росту від інтактного контролю (Рис. 3.12 А). У даному випадку можна говорити про невелику затримку в рості на 3-7 добу експерименту. Ці результати переконливо свідчать

про те, що НКМ у дозі 0,1г / 100г маси тіла усували гальмівну дію сірчаноокислої міді на динаміку маси тварин, що було характерно і для «мікс-фактора».

У наступній серії експериментів визначали зміну ректальної температури в експериментальних тварин як показника змін загального метаболізму у цих тварин. Температура тіла в групі інтактних тварин у період з 1 по 13 день експерименту залишалася незмінною, а точніше зберігалася в межах фізіологічних коливань (Рис. 3.12 Б). У той же час температура тіла тварин з Си-індукованим токсикозом знижувалася на 1°C, причому це зниження було стабільним принаймні протягом 11 діб від першого введення сірчаноокислої міді (Рис. 3.12 Б). Якщо тварини з токсикозом отримували НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла, то температура їхнього тіла достовірно не відрізнялася від інтактного контролю і була достовірно вище, ніж у тварин з токсикозом (Рис. 3.12 Б).

Отже, між втратою маси тіла та зниженням ректальної температури тіла спостерігався взаємозв'язок для тварин з Си-індукованим токсикозом. Це можна інтерпретувати як інгібування іонами міді загального метаболізму у цих тварин.

Введення тваринам з токсикозом печінки НКМ тричі з інтервалом 24 години між введеннями, усували зниження температури тіла і знижувало швидкість втрати маси тіла у цих тварин, так само як і в разі «мікс-фактора». Якщо це так, то можна очікувати, що це проявиться і на здатності тварин здійснювати роботу. У наступній серії експериментів визначали здатність цих груп тварин здійснювати роботу в тесті плавання з вантажем. Виявилося, що працездатність у групі тварин з токсикозом достовірно нижча контрольної групи тварин, що було показано в попередній частині роботи. Введення тваринам НКМ незначно збільшувало їхню працездатність (Рис. 3.13). Ці результати підтверджують висновок про здатність НКМ усувати інгібування загального метаболізму іонами міді [99, 101, 152].

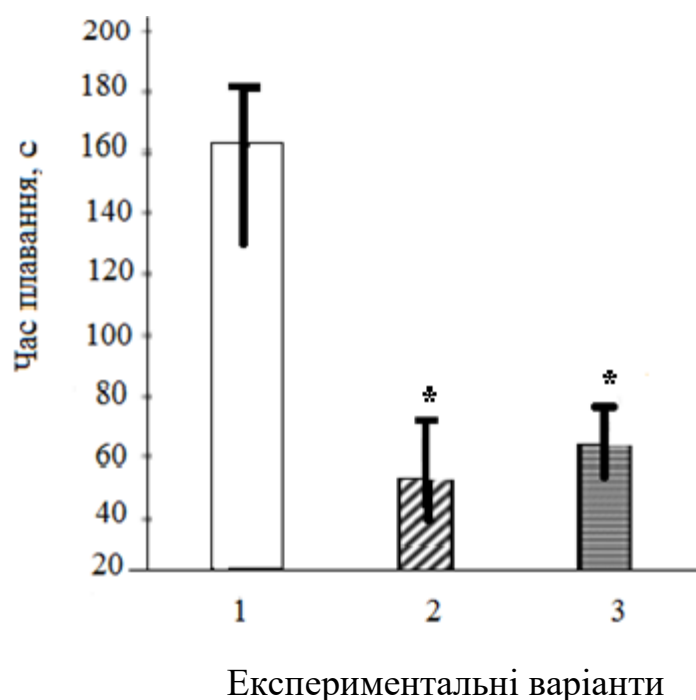


Рис. 3.13 Здатність виконувати роботу (час плавання) у контрольних тварин (1), тварин з токсикозом (2) і тварин, які отримували НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г маси на тлі токсикозу (3)

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з варіантом 1 (контроль)

Отримані результати підтверджують висловлене припущення про можливу неспецифічну дію низькомолекулярних компонентів із різних біологічних джерел. Ці результати дозволяють припустити, що їхня дія може бути реалізована через зміну характеристик редокс-систем організму як однієї з регуляторних систем і модуляції активності імунної систем.

Тобто, ці компоненти впливають на такі загальні фізико-хімічні характеристики, як зміна іонного складу клітин за рахунок впливу на проникність мембран, і як наслідок, це може призводити до зміни характеристик проокисантів і антиоксидантів. Зміна активності антиоксидантних ферментів може впливати на протеому клітини, таким чином, неспецифічна регуляція низькомолекулярними компонентами («мікс-фактор», НКМ) може проявлятися на фізіологічному рівні і може бути інтерпретованою як специфічні механізми дії.

3.3 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на деякі показники про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю та тривалість життя експериментальних тварин

3.3.1 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на вміст гідроперекисів ліпідів і активність глутатіонпероксидази в сироватці крові у щурів після інтоксикації сірчаноокислою міддю

Як відомо, активні форми кисню запускають низку реакцій, які ведуть до утворення різних продуктів вільнорадикальних реакцій. Одним із кінцевих продуктів таких реакцій є гідроперекиси ліпідів [16]. У характеристиці проксидантних показників найчастіше визначають вміст гідроперекисів ліпідів. Це пояснюється тим, що ліпіди здатні до окислення за рахунок великої кількості подвійних зв'язків. Вміст ліпідних компонентів досить значний щодо інших компонентів клітини, і гідроперекиси ліпідів є кінцевим продуктом окислення. Виходячи з цього, ми визначали вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові, бо він є одним з інтегральних показників редокс-системи організму.

У наших спільних дослідженнях [97] було показано, що багаторазові послідовні введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді супроводжувалося майже дворазовим (90 %) збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів у порівнянні з контрольними тваринами (Рис. 3.14).

Ці результати узгоджуються з раніше встановленим фактом про прояв окисного стресу у тварин на тлі Cu-індукованого фіброзу [101].

У тому випадку, якщо тваринам із фіброзом печінки вводили *per os* «мікс-фактор», то вміст ГПЛ у сироватці крові був нижчим на 37 % порівняно з інтоксикацією міддю і достовірно не відрізнявся від значень інтактного контролю (Рис. 3.14).

Ці результати переконливо свідчать про те, що компоненти «мікс-фактора» усували прояв окисного стресу, або значно знижували його ефект у тварин після інтоксикації. З метою з'ясування можливих механізмів такого антиоксидантного

ефекту «мікс-фактора» були проведені такі ж дослідження з використанням низькомолекулярних компонентів молозива. У тому випадку, якщо будуть отримані аналогічні результати, можна стверджувати про те, що такий антиоксидантний ефект низькомолекулярних природних сполук є неспецифічним, тобто характерним не лише для «мікс-фактора». Введення *per os* тваринам після інтоксикації НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла також призводило до зменшення вмісту ГПЛ у сироватці крові на 40 % (Рис. 3.14).

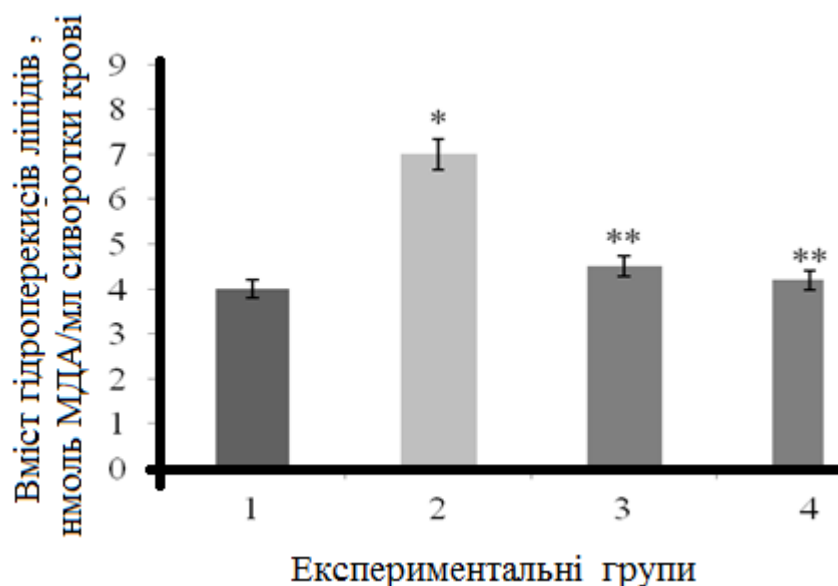


Рис. 3.14 Вміст гідроперексидів ліпідів у сироватці крові контрольних тварин (1), тварин з триразовим введенням сірчаноокислої міді (2) і тварин, які отримували тричі «мікс-фактор» *per os* в дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла з інтервалом 24 години між введенням сірчаноокислої міді (3), у тварин, які отримували НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла на тлі введення сірчаноокислої міді (4). Представлені середні значення з 5 незалежних експериментів

Примітка. * - $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** - $P \leq 0,05$ у порівнянні з тваринами, яким тричі вводили розчин сірчаноокислої міді (варіант 2)

Отже, як і «мікс-фактор», так і НКМ зменшували розвиток окисного стресу, який був індукований іонами міді. Можна стверджувати, що цей ефект не є специфічним, і низькомолекулярні компоненти з різних біологічних джерел

мають однаковий ефект. Такий антиоксидантний ефект «мікс-фактора» і НКМ може бути забезпечений різними механізмами і один з них – це збільшення активності антиоксидантних ферментів. Раніше проведені нами дослідження показали, що найбільш виражена кореляція між вмістом ГПЛ і антиоксидантними ферментами проявляла глутатіонпероксидаза (ГП) [3, 22, 94, 102].

Виявилося, що введення «мікс-фактора» тваринам в дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла на тлі інтоксикації сірчаною кислотою міddю незначно збільшував активність ГП. Однак вона не відрізнялася за активністю від контролю (Рис. 3.15).

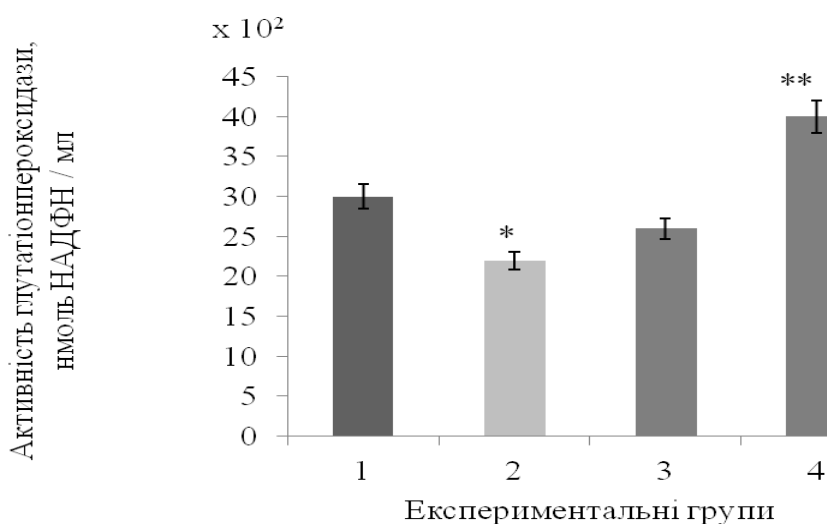


Рис. 3.15 Активність глутатіонпероксидази в сироватці крові контрольних інтактних тварин (1), тварин із триразовим введенням сірчаною кислотою міddю (2), тварин, які отримували тричі «мікс-фактор» *per os* з інтервалом 24 години між введенням на тлі інтоксикації (3), у тварин, які отримували НКМ на тлі введення сірчаною кислотою міddю (4). Представлені середні значення з 5 незалежних експериментів

Примітка. * - $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** - $P \leq 0,05$ у порівнянні з тваринами, яким тричі вводили розчин сірчаною кислотою міddю

У тому випадку, якщо тваринам із запальним процесом вводили НКМ, то активність ГП була збільшена на 68 % у порівнянні з групою тварин після інтоксикації і значно перевершувала активність ГП у порівнянні з контрольними

тваринами (Рис. 3.15). При цьому активність ГП після введення НКМ і «мікс-фактора» не відрізнялася від інтактного контролю (Рис. 3.15).

Отже, «мікс-фактор», і особливо НКМ, вірогідно, збільшували активність ГП у тварин після введення сірчаноокислої міді і, ймовірно як наслідок, зменшували вміст ГПЛ в сироватці крові [3].

Вплив НКМ на антиоксидантну систему дозволяє стверджувати, що ці біологічно активні субстанції можуть бути віднесені до природних антиоксидантів, або регуляторів активності антиоксидантної системи. У зв'язку з цим необхідно було встановити дозову залежність впливу НКМ на вміст гідроперекисів ліпідів і активність глутатіонпероксидази.

Виявили, що при введенні НКМ після інтоксикації в дозі 0,01 мг / 100 г маси тіла вміст ГПЛ зменшувався на 43 % в порівнянні з групою тварин, які отримали сірчаноокислу мідь без введення НКМ.

Збільшення дози НКМ до 0,05 і 0,1 мг / 100 г маси тіла чинило такий самий ефект на вміст ГПЛ (Рис. 3.16). Доза 1 мг / 100 г маси супроводжувалася, навпаки, збільшенням вмісту ГПЛ у сироватці крові на 109 % по відношенню до малих доз (Рис. 3.16).

У тому випадку, якщо групі тварин з токсикозом вводили НКМ у дозі 3 мг / 100 г, то вміст ГПЛ у сироватці крові збільшувався на 114 % у порівнянні з інтактним контролем (Рис. 3.16). У той же час, активність глутатіонпероксидази в сироватці крові не змінювалась при введенні НКМ в дозі 0,01 мг / 100 г в порівнянні з інтоксикацією і була нижчою інтактного контролю на 39 % (Рис. 3.16). Збільшення дози НКМ до 0,05 – 0,1 мг / 100 г супроводжувалося збільшенням активності ГП, однак при дозах 1 – 3 мг / 100 г її активність різко зменшувалася (Рис. 3.16). Так, вона була навіть нижче такої групи після інтоксикації у разі дози 3 мг / 100 г маси тіла на 41 % і на 62 % в порівнянні з інтактним контролем (Рис. 3.16).

Отже, між активністю глутатіонпероксидази і вмістом гідроперекисів ліпідів у сироватці крові існує Y-подібна залежність, при малих дозах НКМ (0,01

– 0,1 мг / 100 г маси тіла) проявляється антиоксидантна активність, а при великих (1 - 3 мг / 100 г маси тіла) – прооксидантна активність [152].

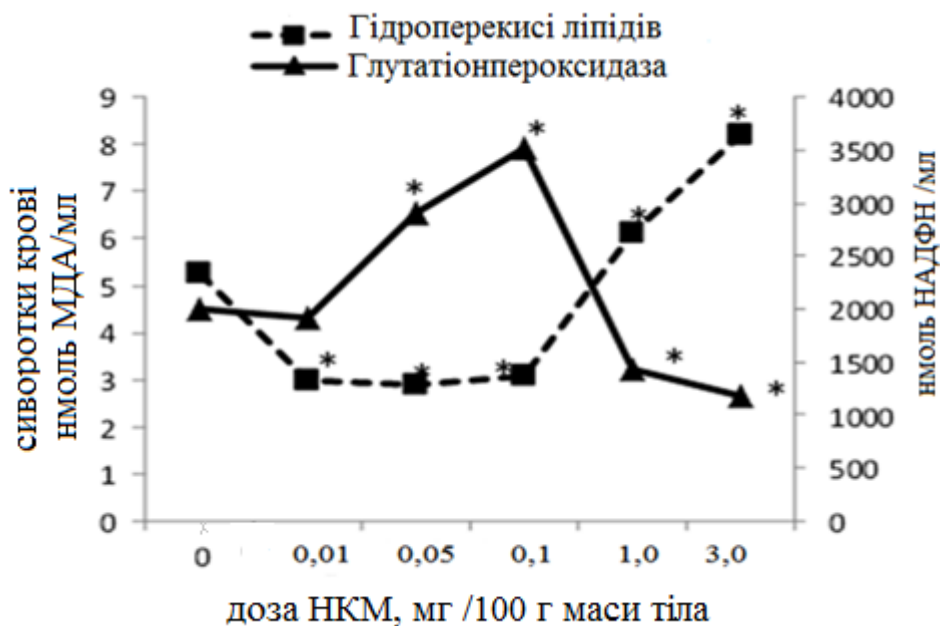


Рис. 3.16 Вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові (—■—) і активність глутатіонпероксидази в сироватці крові (—▲—) у тварин після триразового введення сірчаноокислої міді і після введення різних доз НКМ (мг / 100 г маси тіла)

Примітка. * - $P < 0,05$ у порівнянні з токсикозом після введення CuSO_4

Отримані результати про вплив різних доз НКМ в системі *in vivo* не дозволяють віднести цю біологічну субстанцію до прооксидантів або антиоксидантів, тому що це показники однієї системи й зміна одного з показників системи буде впливати на функціональну активність всієї системи. У зв'язку з цим була проведена серія експериментів з оцінки антиоксидантної активності «мікс-фактора» в системі *in vitro*.

Компоненти «мікс-фактора» володіли добре вираженим ефектом перехоплення ОН-радикалів (Рис. 3.17).

Так, у концентрації 2,5 мкл / мл у модельній системі «мікс-фактор» інгібував генерацію ОН - радикалів на 43 %, а при 10 мкл / мл – на 74,6 %. Для

порівняння зазначимо, що відомий гасник ОН-радикалів, етанол в концентрації 0,5 мг / мл, інгібував генерацію ОН-радикалів на 67,5 % (Рис. 3.17).

Отже, «мікс-фактор» мав виражені антиокисні й антирадикальні властивості в системі *in vitro*, і цим можна пояснити його захисний ефект токсичності сірчаноокислої міді [152].

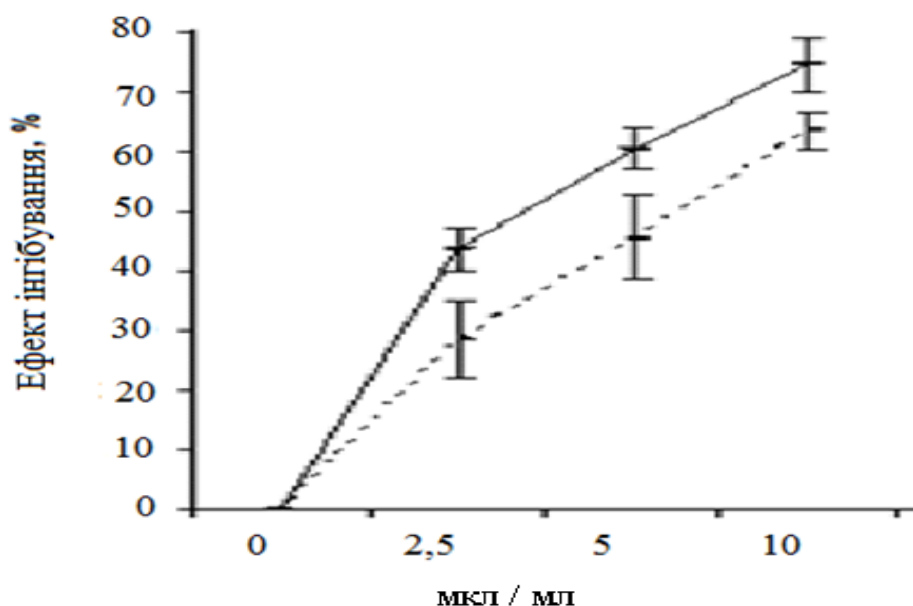


Рис. 3.17 Антиокислювальна (---) і антирадикальна (-) активність «мікс-фактора» в системі *in vitro* у відсотках від контрольного значення

Як відомо, основне місце утворення ГПЛ у клітині – це мітохондрії [36]. У наступній серії експериментів визначали вміст ГПЛ і активність ГП в мітохондріях печінки.

3.3.2 Дослідження впливу «мікс-фактора» і НКМ на вміст холестерину, триацилгліцеридів, креатину і альбуміну у тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю

Як відомо, печінка забезпечує синтез ліпідів, альбуміну та інших важливих для організму макромолекул. Оцінка вмісту холестерину, триацилгліцеридів, альбуміну може служити показником функціональної активності печінки.

Виявилося, що інтоксикація сірчаною кислотою міддю не має впливу на вміст холестерину, триацилгліцеридів, креатиніну та альбуміну (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вміст холестерину, триацилгліцеридів, креатиніну й альбуміну в сироватці крові інтактних тварин, тварин після інтоксикації сірчаною кислотою міддю і з подальшим введенням «мікс-фактора» і НКМ

Експериментальна група	Показник			
	Холестерин, ммоль/л	Триацилгліцериди, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л	Альбумін, г/л
Інтактні	$1,6 \pm 0,2$	$0,77 \pm 0,13$	$69,7 \pm 15,1$	$32,3 \pm 0,4$
Інтоксикант	$1,2 \pm 0,4$	$0,79 \pm 0,27$	$50,0 \pm 3,9$	$29,3 \pm 2,6$
Інтоксикант із наступним введенням НКМ	$1,5 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,48$	$93,0 \pm 10,0$	$33,5 \pm 4,0$
Інтоксикант із наступним введенням «мікс-фактора»	$1,2 \pm 0,2$	$0,91 \pm 0,84$	$49,0 \pm 2,6$	$30,3 \pm 2,3$

Отже, як уже зазначалося, у експериментальних тварин мали місце тільки початкові стадії розвитку пошкодження печінки. Введення тваринам НКМ в дозі 0,1 мг / 100 гр не впливало на досліджувані показники за винятком деякого збільшення вмісту креатину. Однак цей показник був досить варіативним [95, 101, 152]. Це може пояснюватися збільшенням «навантаження» на видільну систему організму після введення НКМ (табл. 3.3). Такі результати вказують на

те, що досліджувані біологічно-активні речовини не мають негативного впливу на функцію печінки.

3.3.3 Вплив «мікс-фактора» та НКМ на вміст гідроперекисів ліпідів і активність глутатіонпероксидази в мітохондріях і мікросомах печінки після інтоксикації міддю

Як було показано в нашій лабораторії, після триразових послідовних введень сірчаноокислої міді іони міді локалізуються переважно в печінці, вони виявляються у великій кількості в мітохондріях і зв'язуються з мембранами ендоплазматичного реікулуму (ЕПР) [96]. Можна вважати, що терапевтична дія «мікс-фактора» і НКМ, описані в попередньому розділі роботи, пов'язана з їхнім впливом на клітини печінки і зокрема на мітохондрії та мембрани ЕПР.

З метою дослідження можливого механізму дії низькомолекулярних компонентів «мікс-фактора» і НКМ досліджували вміст гідроперекисів ліпідів і активність глутатіонпероксидази в мітохондріях і ЕПР печінки щурів після інтоксикації тварин сірчаноокислої міддю. Вміст ГПЛ в мітохондріях печінки щурів після триразового введення сірчаноокислої міді було збільшено на 50 % у порівнянні з мітохондріями печінки інтактних тварин (Рис. 3.18 А).

Якщо тварини отримували «мікс-фактор» в дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла, то вміст ГПЛ в мітохондріях знижувався на 45 %, а після введення таким тваринам НКМ в дозі 0,1 мг / 100г на 48 % в порівнянні з групою тварин після інтоксикації (Рис. 3.18 А).

Отже, досліджувані біологічні субстанції мають виражений антиоксидантний ефект на мітохондрії печінки щурів, які отримували сірчаноокислу мідь. Необхідно відзначити, що подібний ефект щодо зниження вмісту гідроперекисів ліпідів після введення «мікс-фактора» і НКМ спостерігали і в сироватці крові. Ці дані можуть вказувати на те, що досліджувані субстанції надавали захисний ефект на тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю.

З огляду на те, що «мікс-фактор» і НКМ вводилися *per os* в досить малих дозах, і настільки виражений біологічний ефект може пояснюватися не прямою дією компонентів, що вводяться до біологічно активних сполук, а їхньою регулярною дією на антиоксидантну систему клітин печінки, то в наступній серії експериментів визначали їх вплив на антиоксидантні ферменти.

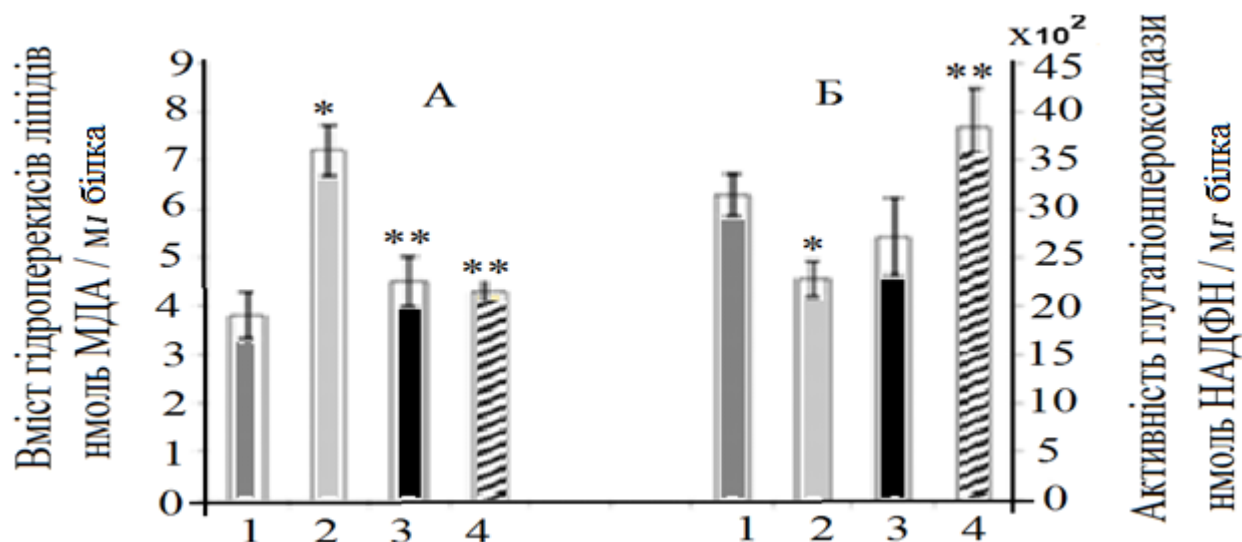


Рис. 3.18 Вміст ГПЛ у мітохондріях печінки (А) і активність глутатінопероксидази в мітохондріях (Б) у групі з інтактним контролем (1), з Cu-індукованим токсикозом (2), з токсикозом і 3-х разовим введенням «мікс-фактора» (3) і також після 3-х разового введення НКМ (4).

Примітка.* - $P < 0,05$ у порівнянні з інтактним контролем; ** - $P < 0,05$ порівняно з тваринами з Cu-індукованим токсикозом

Як було показано раніше, глутатіонпероксидаза є одним з найбільш реактивних ферментів глутатіонового циклу на моделі інтоксикації організму іонами міді. Активність ГП у тварин, які отримували «мікс-фактор» і НКМ відновлювалася до рівня інтактних контрольних тварин (Рис. 3.18 Б).

Якщо оцінювати активність антиоксидантної системи мітохондрій печінки за співвідношенням ГП / ГПЛ, то введення тваринам після інтоксикації «мікс-фактора» супроводжувалося збільшенням цього показника в 2,1 рази, а після

введення НКМ – в 2,8 рази порівняно з групою після інтоксикації, що відповідало такому і в сироватці крові інтактних тварин.

У той же час «мікс-фактор» і НКМ не чинили впливу на активність іншого антиоксидантного ферменту – глутатіонредуктази мітохондрій (ГР) (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Активність глутатіонредуктази в мітохондріях печінки у тварин з Cu-індукованим токсикозом, з індукованим токсикозом, які отримували «мікс-фактор» і з індукованим токсикозом, які отримували НКМ.

Представлені середні значення з 8-10 повторюваностей

Варіант експерименту	Активність глутатіонредуктази, нмоль NADPH / хв на мг білку мітохондрій
Інтоксикація сірчаною кислотою міддю	$34,7 \pm 5,9$
Введення «мікс-фактора» на тлі інтоксикації	$32,1 \pm 5,0$
Введення НКМ на тлі інтоксикації	$31,2 \pm 2,7$

Ці результати можуть вказувати на те, що досліджувані низькомолекулярні субстанції молізіва і «мікс-фактор» справляють вибіркoву дію на елементи антиоксидантного захисту і формують специфічний патерн її чисельних елементів [3, 152].

Зміна показників прооксидантів і антиоксидантів у мітохондріях при інтоксикації сірчаною кислотою міддю і після введення таким тваринам біологічно активних субстанцій може вказувати на те, що однією з мішеней їхньої дії можуть бути мітохондрії. Якщо це так, то можна очікувати, що «мікс-фактор» і НКМ впливатимуть на активність циклу Кребса.

Відомо, що аконітаза є ключовим ферментом циклу Кребса. Раніше було показано, що при Cu-індукованому токсикозі печінки її активність достовірно зменшувалася в порівнянні з інтактним рівнем [9].

Оскільки функція мітохондрій пригнічувалась на тлі Cu-інтоксикації, було цікаво визначити вплив біологічних субстанцій на активність аконітази мітохондрій на тлі інтоксикації. Було виявлено, що активність аконітази в мітохондріях пригнічувалась на 45 % у порівнянні з її активністю в групі інтактного контролю (Рис. 3.19).

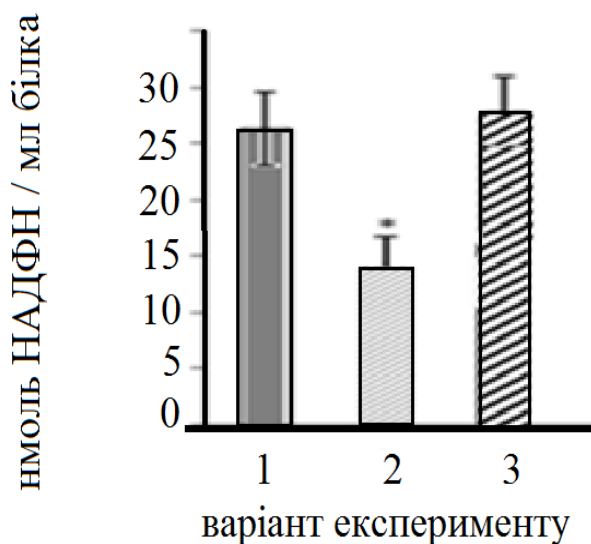


Рис. 3.19 Активність аконітази мітохондрій печінки у інтактних тварин (1), в печінці тварин після інтоксикації сірчаною міддю (2) і після інтоксикації і введення НКМ (3) в дозі 0,1 мг / 100г маси тіла.

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

У тому випадку, якщо тварини на тлі інтоксикації сірчаною міддю отримували НКМ у дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла, то її активність не відрізнялася від контрольних інтактних значень (Рис. 3.19).

Отже, НКМ забезпечував збереження активності аконітази на рівні контрольних значень при інтоксикації організму іонами міді. У наступній серії експериментів вивчали активність ГП і ГР у фракції цитозоля печінки (Рис. 3.20). Зараз відомі кілька ізоформ ГП, які локалізуються в різних компартментах клітини. Ці ізоформи розрізняються за активністю і ступенем відгуку на різні впливи [54]. Виявилося, що після введення «мікс-фактора» і НКМ тваринам на тлі інтоксикації сірчаною міддю активність ГП в цитоплазмі була

збільшена однаковою мірою на 38 і 36 %, а активність ГР в цитоплазмі залишалася незмінною в порівнянні з групою тварин після інтоксикації (Рис. 3.20 Б), що збігалось з їхньою активністю в мітохондріях. Хоча підвищення активності ГП у фракції цитозоля проявлялося в меншій мірі, ніж в сироватці і мітохондріях, воно також мало місце, в той час як активність ГР залишалася незмінною [3, 152].

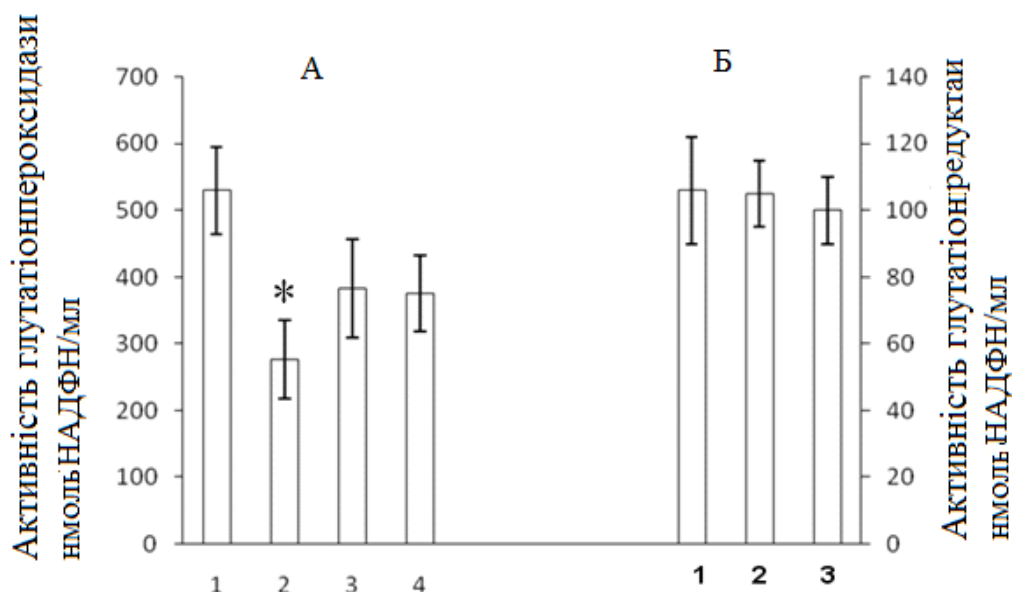


Рис. 3.20 Активність глутатіонпероксидази у фракції цитозолю клітин печінки (А) і у тварин інтактної групи (1), після інтоксикації сірчаною міддю (2), після інтоксикації і введення їм «мікс-фактора» в дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла (3), а також після введення НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г (4) і глутатіонредуктази (Б) у тварин інтактної групи (1) після інтоксикації сірчаною міддю (2), після інтоксикації і введення їм «мікс-фактора» в дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла (3)

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

Отже, невеликі дози (0,1 мг / 100 г маси тіла) «мікс-фактора» і НКМ збільшували активність глутатіонпероксидази, локалізованої в сироватці крові, мітохондріях і фракції цитозоля печінки і не впливали на активність глутатіонредуктази, а також знижували вміст гідроперекисів ліпідів, що

відбувалось на тлі відновлення маси і температури тіла тварин після інтоксикації сірчаною кислотою.

Було цікаво визначити активність цих ферментів і вміст гідроперекисів ліпідів у тварин після інтоксикації і введення «мікс-фактора» цим тваринам у фракції мікросом печінки, тому що вони забезпечують трансформацію ксенобіотиків і є мішенню для багатьох біологічно активних сполук. Виявилося, що активність ГП у мікросомах печінки щурів після введення «мікс-фактора» збільшувалася в 1,7 рази порівняно з контролем (Рис. 3.21).

Активність глутатіонтрансферази (ГТ) також збільшувалася після введення «мікс-фактора» – у фракції мікросом на 33 % (Рис. 3.21). Отже, «мікс-фактор» стимулював активність ГП і ГТ у фракції мікросом клітин печінки, що може вказувати на прояв антиоксидативних властивостей «мікс-фактора».

Вміст гідроперекисів ліпідів у спонтанному і аскорбат-індукованому перекисному окисленні ліпідів у тварин, які отримували «мікс-фактор», був нижчим порівняно з контролем.

Для аскорбат-індукованого перекисного окислення ліпідів до інкубаційної суміші, яка містить 0,4 мг білку мікросомальної фракції, вносили 0,8 мл аскорбінової кислоти 1,2 мМ солі мору. Пробу інтенсивно перемішували й інкубували при температурі 37 °C 30 хв.

Як відомо, в системі аскорбат-індукованого переокислення піддаються ненасичені зв'язки, які не були схильні до вільнорадикального окислення за відсутності індуктора, тобто так званого спонтанного окислення ліпідів. Було виявлено, що індукція ПОЛ аскорбат супроводжувалася збільшенням вмісту ПОЛ в мікросомах на 50 % у порівнянні з початковим рівнем (Рис. 3.21).

Отже, «мікс-фактор» зменшував вміст продуктів вільнорадикальних реакцій у фракції мікросом. Такий антиоксидантний ефект може пояснитися активацією глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази (Рис. 3.21) і, можливо, інших антиоксидантних компонентів. Той факт, що «мікс-фактор» пригнічував ПОЛ при аскорбат-індукованому окисленні, вказує на те, що в цьому приймають участь і ліпофільні антиоксиданти, що містяться у фракції мікросом печінки.

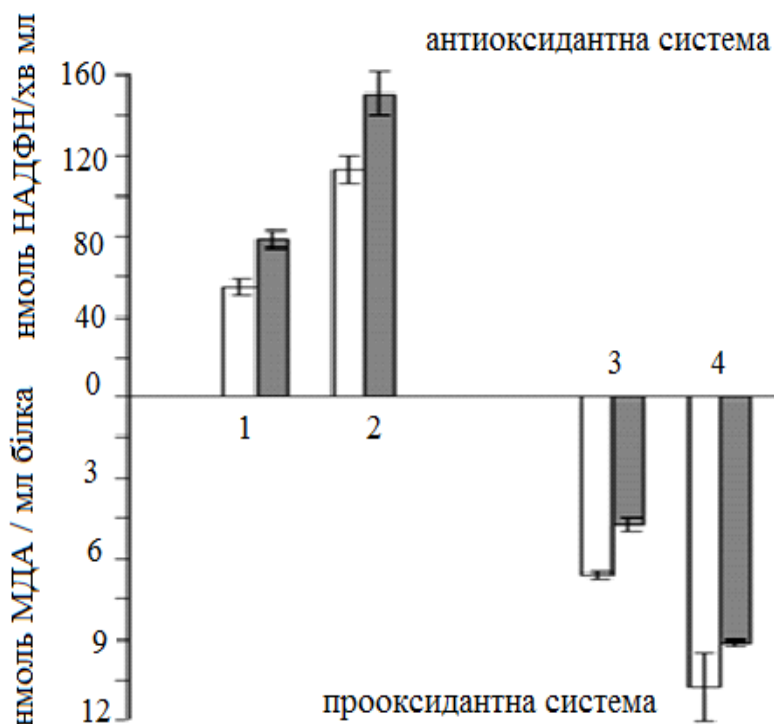


Рис. 3.21 Активність глутатіонпероксидази (1) і глутатіонтрансферази (2) в мікросомах печінки щурів контрольної групи (□), і тварин, які отримували «мікс-фактор» (■). Вміст гідроперекисів ліпідів при спонтанному ПОЛ (3) і аскорбатіндукованому ПОЛ (4) у фракції мікросом печінки тварин, які уотримували «мікс-фактор» в дозі 0,1 мл / 100 г маси тіла

Введення тваринам «мікс-фактора» на тлі інтоксикації сірчаною кислотою міддю, супроводжувалося зменшенням вмісту ПОЛ при спонтанному рівні на 32 %, а при аскорбат-індукованому – на 25 % (Рис. 3.21). Отже, «мікс-фактор», активуючи антиоксидантну систему, забезпечував зменшення продуктів вільно-радикальних реакцій, і це узгоджувалося зі зростанням стійкості організму до подальшої токсичної дії сірчаною кислотою міді [46, 152].

3.3.4 Вплив «мікс-фактора» на деякі показники про-антиоксидантної системи при їх тривалому застосуванні, починаючи з 22 і 30,5 місяців до кінця життя

Отримані результати щодо впливу «мікс-фактора» і НКМ на показники про-антиоксидантної системи на моделі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю дозволяють зробити висновок, що вони здатні усувати прояв окисного стресу. Однак не зрозуміло, така їхня дія буде проявлятися лише в разі прооксидантної дії іонів важких металів, або ж і при індукції прооксидантних показників іншими факторами, зокрема при старінні організму.

Найбільш цікавою і перспективною для геріатрії моделлю є онтогенетична модель зміни в системі про-антиоксидантів. Згідно вільнорадикальної гіпотези старіння, багато вікозалежних змін можуть бути викликані збільшенням продукції вільнорадикальних реакцій на тлі зниження активності антиоксидантів, тобто зміщенням рівноваги в системі про-антиоксиданти в бік прооксидантів.

У зв'язку з цим, можна очікувати, що якщо на пізніх етапах онтогенезу (тобто після 20-міс. віку для щурів) склад гідроперекисів та інших продуктів вільно-радикальних реакцій буде збільшено, і такі тварини будуть отримувати мікс-фактор, то можемо очікувати, що цей показник буде відновлено до рівня дорослих 12-міс. тварин. Більш за те, якщо у таких тварин буде збільшена тривалість життя, то можна стверджувати, що вільнорадикальні процеси приймають участь у регуляції тривалості життя, а «мікс-фактор» може розглядатися як потенційний геропротектор, а не лише антидот.

Виявилося, що кількість гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки у 33-міс. щурів збільшувалася на 25 % (Рис. 3.22 А) у порівнянні з 12-міс. тваринами при утриманні тварин у стандартних умовах віварію. Вміст гідроперекисів ліпідів у цих тварин у сироватці крові може служити показником інтегральних характеристик вільнорадикальних процесів в організмі. Виявилося,

що вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові 33-міс. тварин був на 41 % більше порівняно з 12- міс. тваринами (Рис. 3. 22 Б).

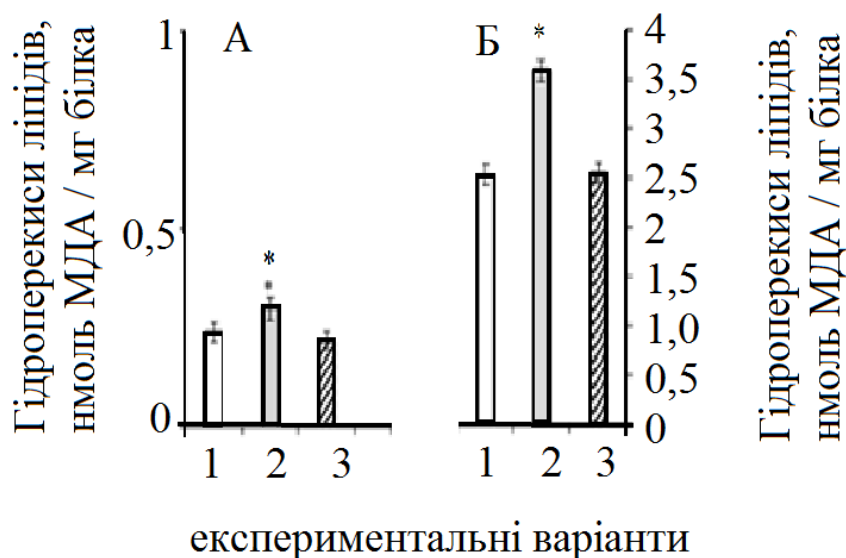


Рис. 3.22 Вміст гідроперекисів ліпідів у фракції мітохондрій печінки (А) і сироватці крові (Б) у 12-міс. тварин (1) і 33-міс. тварин (2), які містилися в стандартних умовах і тварин, які отримували «мікс-фактор» щодня з питною водою, починаючи з 22-міс. віку, в дозі 0,05 - 0,06 мг / 100 г маси тіла (3)

Примітка. * - $P < 0,05$ у порівнянні з контрольними тваринами 12 міс. віку

Отже, з 12-міс. по 33-міс. у тварин, що утримувалися в стандартних умовах віварію, збільшувався вміст продуктів вільнорадикальних реакцій. Між вмістом гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки і існує добре виражений взаємозв'язок, що дає можливість використовувати мітохондрії печінки як «маркер» вік-залежних змін організму.

У тому випадку, якщо тварини, починаючи з 22-міс. віку, щодня з питною водою приймали «мікс-фактор» у дозі 0,05 - 0,06 мл / 100 г маси тіла, то вміст гідроперекисів ліпідів як у мітохондріях, так і в сироватці крові у них не відрізнявся від вмісту гідроперекисів ліпідів у 12-місячних інтактних тварин (Рис. 3.22 А, Б).

Процес підтримки кількості гідроперекисів ліпідів на стабільному рівні може бути реалізований двома шляхами. По-перше, компоненти «мікс-фактора» можуть активувати антиоксидантну систему захисту дорослого організму і, по-друге, самі компоненти «мікс-фактора» можуть виступати як антиоксиданти і запобігати утворенню продуктів вільнорадикальних реакцій, а, можливо, іони мали поліфункційну дію.

Як ми вже відзначали, глутатіонпероксидаза є однією з антиоксидантних ферментів глутатіонового циклу, активно реагує на різні екзогенні впливи [46, 103]. Виявилося, що активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки 33-міс. щурів була на 25 % нижче активності порівняно з 12-місячними тваринами у стандартних умовах їх утримання (Рис. 3.23 А).

У тому випадку, якщо тварини, починаючи з 22-міс. віку, щодня з питною водою отримували мікс-фактор, то її активність у 33-міс. тварин у всіх дослідженнях фракцій еритроцитів і сироватки крові не відрізнялася від 12-місячних інтактних тварин (Рис. 3.23А).

Досить висока активність глутатіонпероксидази виявлялася в постмітохондріальній фракції печінки. Це може пояснюватися тим, що в цій фракції присутні, як мінімум, дві ізоформи цього ферменту: мікросомальна і цитозольна. Таким чином, компоненти «мікс-фактора» активують різні ізоформи глутатіонпероксидази, локалізованої в різних компартментах клітин печінки, еритроцитів і сироватці крові.

Отже, підтримання рівня гідроперекисів ліпідів у 33-місячних тварин на рівні 12-місячних тварин забезпечувалася збільшенням активності глутатіонпероксидази на постійному рівні на тлі введення «мікс-фактора».

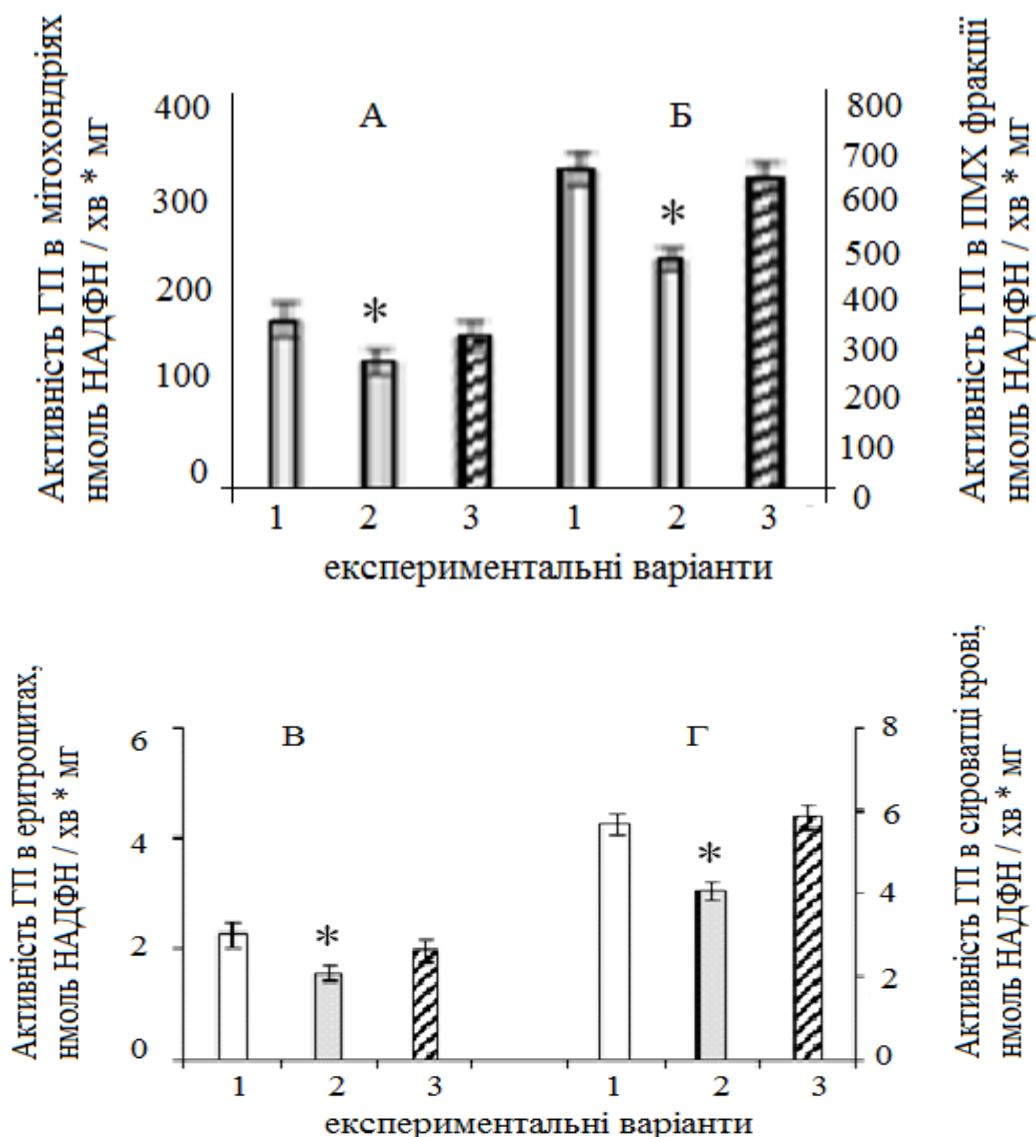


Рис. 3.23 Активність глутатіонпероксидази у фракції мітохондрій печінки (А), постмітохондріальній фракції (Б), еритроцитах (В) і сироватці крові (Г) у 12-міс. тварин (1) і 33-міс. тварин (2), які утримувалася в стандартних умовах і тварин, які отримували щодня «мікс-фактор» з питною водою, починаючи з 22-міс віку, в дозі 0,05 - 0,06 мг / 100 г маси тіла (3)

Примітка. Представлені середні значення для 6 тварин; * - $P < 0,05$ у порівнянні з контрольними тваринами 12 міс. віку

Було цікаво дослідити активність інших антиоксидантних ферментів. У зв'язку з цим, була досліджена активність глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази і малатдегідрогенази в мітохондріях і постмітохондріальній фракції печінки у 12- і 33- місячних тварин (Рис. 3.24 А).

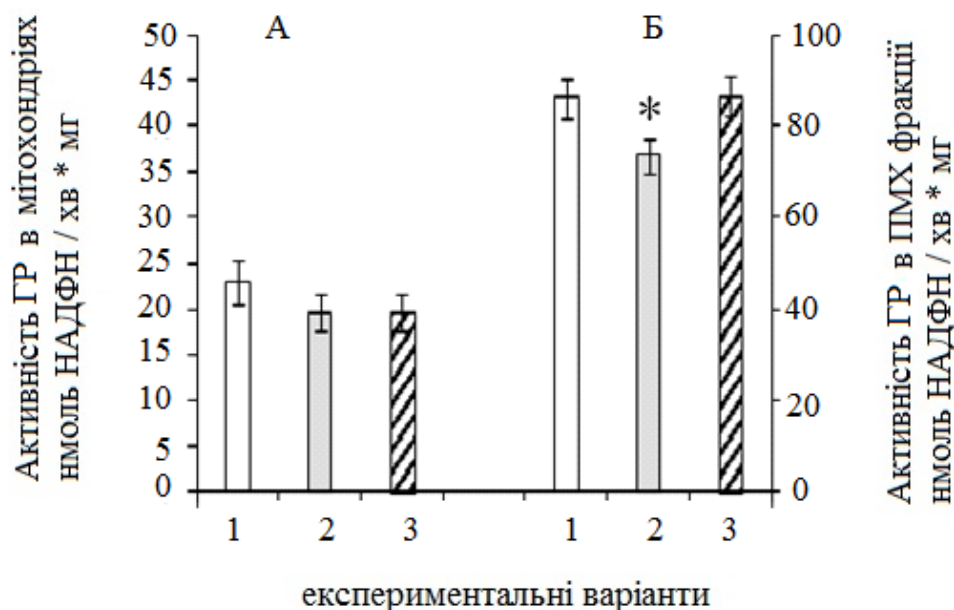


Рис. 3.24 Активність глутатіонредуктази у фракції мітохондрій печінки (А) і постмітохондріальній фракції (Б) у 12-міс. тварин (1) і 33-міс. тварин (2), які містилися в стандартних умовах і тварин, які отримували щодня «мікс-фактор» з питною водою, починаючи з 22-міс віку (3), в дозі 0,05 - 0,06 мл / 100 г маси тіла (n = 6).

Примітка. * - позначені відмінності, для яких $P < 0,05$ у порівнянні з інтактним контролем 12-міс віку

Виявилося, що глутатіонредуктазна активність у мітохондріях печінки щурів з 12 по 33 міс. віку залишалася незмінною (Рис. 3.24 А).

У той же час, у постмітохондріальній фракції її активність достовірно зменшувалася на 25 % у 33-міс. тварин в порівнянні з 12-міс. тваринами, а тривалий прийом «мікс-фактора» приводив до збільшення її рівня до рівня 12-міс. тварин (Рис. 3.24 Б).

Активність ферментів у мітохондріях і постмітохондріальній фракції печінки щурів 12-міс. і 33-міс., які утримувалися в стандартних умовах, і тварин, які отримували «мікс-фактор» щодня з питною водою, починаючи з 22-міс віку, в дозі 0,05 - 0,06 мл / 100 г маси тіла до кінця життя, мало відрізнялися між собою.

Таблиця 3.5

**Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази і
малатдегідрогенази у тварин різного віку**

Активність ферментів (нмоль НАДФН /хв·мг білку)	Фракції			
	мітохондрії		постмітохондріальна	
	вік, міс.		вік, міс.	
	12	33 (контроль «мікс- фактор»)	12	33 (контроль «мікс- фактор»)
Глюкозо – 6 – фосфатдегідрогеназа	31,8 ± 7,4	<u>31,1 ± 3,8</u> 25,5 ± 4,1	72,3 ± 15,6	<u>77,1 ± 7,6</u> 72,6 ± 18,4
Ізоцитратдегідрогеназа	306,0 ± 29,0	<u>325,5 ± 20,6</u> 308,1 ± 28,1	252,0 ± 34,9	<u>263,4 ± 22,2</u> 233,8 ± 50,9
Малатдегідрогеназа	4,03 ± 0,67	<u>3,61 ± 0,74</u> 3,93 ± 1,05	69,1 ± 9,6	<u>40,4 ± 5,8*</u> 37,3 ± 8,7*

Примітка. Для 33-місячних тварин в чисельнику – тварини, які не отримували «мікс-фактор» (контроль), в знаменнику – тварини, які одержували «мікс-фактор»

* - $P < 0,05$ у порівнянні з 12- міс. тваринами

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази і малатдегідрогенази у 33-міс. тварин не відрізнялися від такої 12-міс. тварин (табл. 3.5) [3, 94].

3.3.5 Вплив «мікс-фактора» на тривалість життя в експерименті

Із групи тварин 22-х місячного віку були сформовані дві експериментальні групи: контрольна (31 тварина) і дослідна (30 тварин), які отримували щодня з питною водою «мікс-фактор», у середньому, по 0,05 мл на 100 г маси тіла до кінця життя.

Тривалий прийом «мікс-фактора» з 22-х місячного віку уповільнював загибель тварин у період з 740 днів (25,6 міс.) до 860 днів (28,6 міс.) спостережень (Рис. 3. 25). Однак, починаючи з 940 дня (31,3 міс.) контрольна і дослідна групи не розрізнялися між собою за тривалістю життя (Рис. 3.25). Максимальна тривалість життя (загибель останньої тварини) наступила на 1100 день (36,6 міс.).

Можна припустити, що вплив «мікс-фактора» на організм буде залежати не лише від дози і його характеристик, але і від функціональних особливостей самого організму в цей час [51, 98].

У зв'язку з цим, у другій серії експериментів також було сформовано дві групи: контрольну (40 щурів) і дослідну (26 щурів) з тварин у віці 920 днів (30,6 міс. віку). Дослідна група щодня отримувала з питною водою «мікс-фактор» в тій же дозі (0,05 мл / 100 г маси тіла) до кінця життя.

Підтвердився той факт, що контрольна група тварин мала так само максимальну тривалість життя в 1100 днів, як і в першій серії експериментів (Рис. 3.25).

У той же час, крива дожиття в дослідній групі відрізнялася від контрольної тим, що у частини тварин природна загибель наступала значно пізніше, а частина тварин доживала до 1220 днів (40,6 міс.) (Рис. 3.25).

Отже, «мікс-фактор» справляв більш виражений ефект на збільшення тривалості життя, якщо його застосовували на пізніх етапах онтогенезу [152].

Як відомо, основне положення парадигми геронтології зводиться до того, що зі збільшенням віку знижується здатність тварин адекватно реагувати на чисельні екзогенні чинники, тобто знижується їхня здатність до адаптації [5].

Мабуть, найбільш виражені ефекти вікових змін виявлялися у втраті здатності тварин робити фізичні навантаження [9].

Якщо компоненти «мікс-фактора» покращують якість життя старих тварин, то можна очікувати, що вони вплинуть і на здатність таких тварин адаптуватися до стресових навантажень, зокрема, здатності здійснювати роботу.

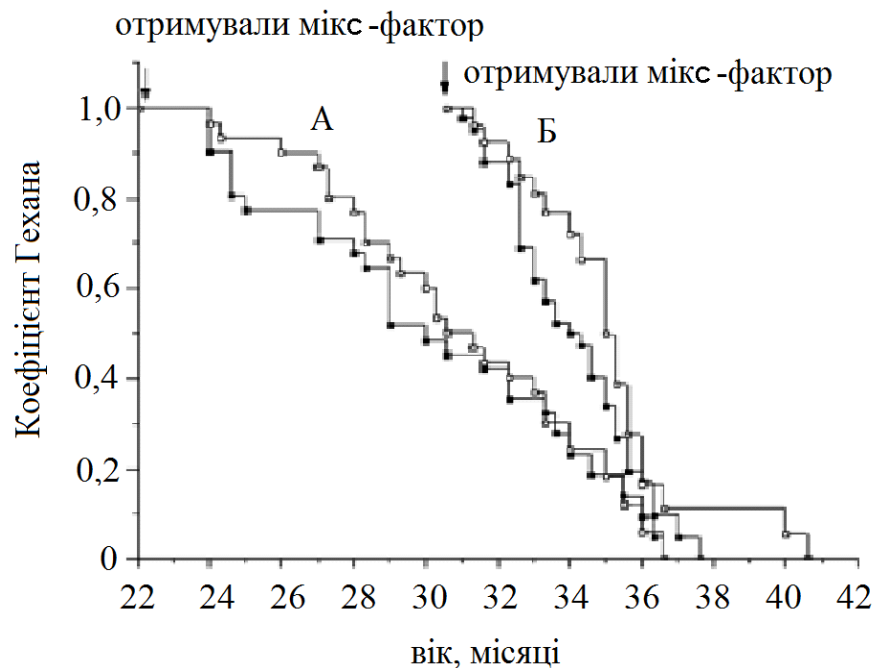


Рис. 3. 25 Криві дожиття для контрольної групи тварин (■—) і тварин, які отримували щодня «мікс-фактор» (□—), починаючи з 22 -міс. віку до кінця життя (А) і отримували «мікс-фактор» з 30,6 – міс. віку до кінця життя (Б).

* - позначені початкові і кінцеві достовірні відмінності в порівнянні з контролем при $P < 0,05$

Для перевірки цього була визначена здатність 22-міс. щурів здійснювати максимально можливе фізичне навантаження – біг в тредбані до вітказу. Цей час було прийнято за 100 %. Після цього було сформовано дві експериментальні групи – контрольну та дослідну, що склалися з 6 тварин у кожній групі. Експериментальні тварини щодня отримували «мікс-фактор» в дозі 0,05 - 0,06 мл / 100 г маси тіла. Ці дві групи піддавалися тренуванню (адаптації) в тредбані. Для тренувань здійснювали біг з навантаженням, що становить 10 % від максимально

можливого часу бігу в тредбані. Через 7 тренувань, визначали максимально можливий час бігу.

Виявилося, що такі фізичні тренування супроводжувалися втратою маси тіла в однаковій мірі у контрольних і дослідних тварин, що особливо було виражено на 8 день тренувань, після чого їх маса тіла відновлювалася, незважаючи на тривалі фізичні навантаження (Рис. 3.26 А).

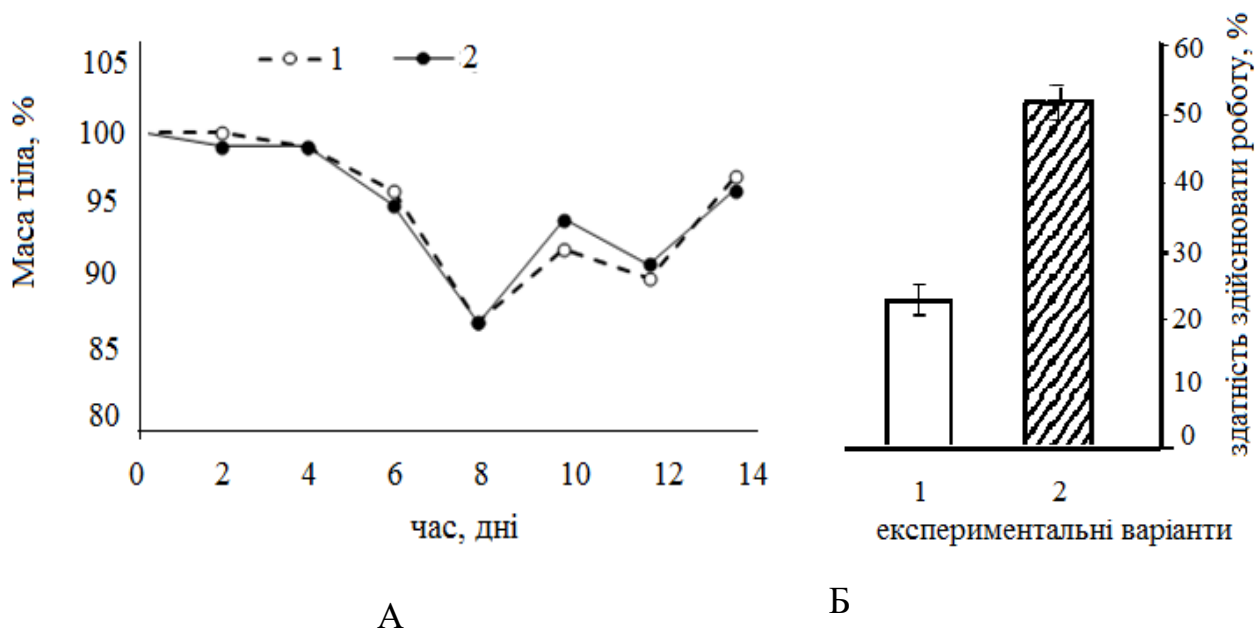


Рис. 3.26 Зміна маси тіла від вихідної (А) у тварин контрольної групи (1) і тварин, які отримували щодня «мікс-фактор» під час тренування в тредбані протягом 14 днів (2); Б - збільшення часу бігу в тредбані після 14 днів тренувань для тварин контрольної групи (1) і групи, яка отримувала «мікс-фактор» (2) до тренування

Отримані результати вказують на те, що тварини відчували стрес і досить добре адаптувалися до нього. У контрольній групі час бігу збільшувався на 22 % в порівнянні з першим забігом, в той час, як в групі тварин, які отримували «мікс-фактор», це час збільшувалася на 55 % від вихідного (Рис. 3.26 Б).

Отже, ««мікс-фактор»» поліпшував адаптивну здатність організму до фізичних навантажень у старих тварин і сповільнював процес їхньої природної смерті, хоча і на відносно короткий період [46].

За даними Організації Об'єднаних Націй до 2025 року кількість літніх людей досягне 1 мільярда чоловік, що складе 13,7 % населення планети. Проблема поліпшення якості життя літніх людей, зокрема, їхня здатність здійснювати фізичну роботу є найважливішою медико-соціальною проблемою. Незважаючи на те, що отримані в даній роботі дані поки не дають підстав віднести «мікс-фактор» до геропротектору, він заслуговує на увагу як фактор, який впливає на працездатність і адаптивність організму до стресових факторів. Моделі інтоксикації організму іонами міді, яка супроводжувалася розвитком фіброзу печінки так само показали, що «мікс-фактор» збільшував у таких тварин здатність здійснювати роботу й усував цілу низку біохімічних показників, які характерні для фіброзу [10].

Тривалий прийом «мікс-фактора» старими тваринами (22-міс.) забезпечував підтримку кількості гідроперекисів ліпідів у сироватці крові на рівні 12- місячних тварин, і це могло бути пов'язано як з активацією антиоксидантних ферментів – глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази, так і з проявом самими компонентами «мікс-фактора» антиоксидантних властивостей. Ми не можемо стверджувати, що тільки зміною про-антиоксидантної системи, яка викликана дією «мікс-фактора», відбувалося забезпечення у старих тварин деякого збільшення тривалості життя і їхньої здатністю виконувати роботу. Ми вважаємо, що про-антиоксидантна система, як саморегульована система, є провідною (базовою) системою регуляції багатьох систем організму. Відомо, що фагоцитарні клітини використовують окислювальний вибух для руйнування захоплених ними бактерій, функція редокс-системи організму тісно пов'язана з активністю імунної системи [118].

Раніше нами було показано, що «мікс-фактор» активував клітинну ланку імунітету при фіброзі печінки [99]. Визначальним фактором регуляції самої редокс-системи є вміст активних форм кисню (АФК) [51].

Із цього випливає, що збільшення або зменшення АФК з будь-яких причин буде зміщувати рівновагу в бік про- чи антиоксидантів. Такий класичний принцип регуляції забезпечує підтримку багатьох, якщо не всіх, систем регуляції. Однак, залишаються незрозумілими ті правила, за якими функціонує такий принцип регуляції, тобто залишається нез'ясованим, що і як визначає вихід за межі гомеостазу, чи можна забезпечити тривале збереження гомеостазу на пізніх етапах онтогенезу, і як цього можна досягти.

У зв'язку з цим, необхідно звернути увагу на те, що «мікс-фактор» справляв регуляторний вплив на ті показники редокс-системи, які «виходили» за межі «попередніх станів». Так, якщо попередні стани – це характеристики редокс-системи 12- міс. тварин, то збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів у 33- міс. тварин є умовним виходом за межі попередніх станів. Компоненти «мікс-фактора» зберігали у 33-міс. тварин ці показники в попередніх межах. У той же час, «мікс-фактор» не впливав на глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, малат-ізоцитратдегідрогеназу, які залишалися незмінними у 33-міс. тварин у порівнянні з 12-міс. тваринами. Крім того, «мікс-фактор» чинив більш виражений ефект у збільшенні тривалості життя, коли його починали давати дуже старим тваринам (з 30,6 міс. віку), тобто тим, у яких гомеостатичні показники змінені більшою мірою, ніж у 22-міс. тварин. Складається враження, що компоненти «мікс-фактора» забезпечують підтримку показників редокс-системи в організмі в межі попередніх станів, тобто вони «забезпечують» дотримання якихось правил функціонування систем авторегуляції.

«Мікс-фактор» – багатокомпонентний природний комплекс і він, в залежності від дози та характеристик функціонального стану самого організму, може виступати як прооксидант, так і як антиоксидант. Це було показано на прикладі низькомолекулярних компонентів молозива, які викликали подібні фізіологічні ефекти, як і «мікс-фактор» [94, 95, 101, 152].

Можна припустити, що компоненти «мікс-фактора» впливають не тільки на показники про-антиоксидантної системи, а й регулюють роботу імунної системи, що і забезпечує авторегуляцію змінених гомеостатичних

показників [103]. Ми вважаємо, що ці ефекти регулюються за схожими механізмам з явищем гормезису. На користь цього свідчать дані, отримані нами раніше на моделі індукції гормезісного ефекту на токсичні дії сірчаноокислої міді [39].

Звичайно, ця уможлядна гіпотеза не має експериментальних підтверджень, але те, що «мікс-фактор» бере участь в регуляції функцій редокс-системи організму, сумнівів не викликає.

Важливо відзначити особливості тимчасових характеристик кривих дожиття у тварин, які отримували «мікс-фактор». Зміщення кривих дожиття в разі прийому «мікс-фактоа» з 22-міс. віку вправо мало місце в період з 25-30 міс. віку. У разі прийому «мікс-фактора» з 30,5 міс. віку ефект збільшення тривалості життя проявлявся з 33 по 36 міс. життя, а останні тварини гинули в 41 міс., а не в 37,5 міс., як в контрольному варіанті. Отже, ефект затримки смертності був відносно короткочасний, що дозволяє віднести його до явища гормезису, тобто неспецифічної стимуляції резистентності організму.

3.4 Обговорення отриманих результатів

Результати роботи показали:

1: а) вже через 24 години після останнього тричі поспіль введення сірчаноокислої міді в дозі 33 % від летальної індукується окислювальний стрес на рівні печінки й організму в цілому;

б) при цьому пригнічується ріст тварин і знижується температура їхнього тіла на 1°C , знижується здатність таких тварин виконувати роботу;

в) збільшується вміст колагену і змінюється морфологія печінки, що характерно для початкових стадій розвитку фіброзу;

г) при цьому основні функціональні характеристики печінки зберігаються на рівні контрольних тварин, що може вказувати на початкові стадії розвитку фіброзу печінки.

2: введення тваринам *per os* НКМ і «мікс-фактора» в дозах 0,1 мг / 100 і 0,1 мл / 100 г маси тіла триразово з інтервалом між введеннями 24 години тваринам після токсикозу супроводжувалося:

а) збільшенням активності антиоксидантного ферменту – глутатіонпероксидази в сироватці, мітохондріях печінки, і меншою мірою - у фракції цитозоля печінки;

б) усуненням окисного стресу (вміст гідроперекисів не відрізнявся від контролю);

в) нормалізацією показників підвищеної температури тіла і частково працездатності тварин.

3: низькомолекулярні компоненти, отримані з різних джерел (з коров'ячого молозива або з грибів *Pleurotus ostreatus* і дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*) забезпечують зсув рівноваги в системі прооксиданти ↔ антиоксиданти в бік антиоксидантів, і усуває морфофізіологічні прояви, характерні для фіброзу печінки, який індукований інтоксикацією організму сірчаною кислотою міддю.

Довгі роки вважали, що фіброз є незворотнім патологічним станом, який супроводжується продукцією сполучної тканини, втратою функціональної активності органу і розвитком цирозу печінки.

Зараз є роботи, в яких було показано можливість лікування фіброзу, тобто він може бути зворотнім станом [98, 101]. Однак, успішне лікування цієї патології досягається не завжди. Ми вважаємо, що це залежить від термінів індукції стадій розвитку фіброзу. Як відомо, клініцисти виділяють 4 стадії у розвитку фіброзу [178]. Розроблена нами модель Си-індукованого фіброзу, судячи з функціональної активності печінки, морфологічних характеристик цього органу, і активності про-антиоксидантної системи може бути віднесена до початкових стадій розвитку цієї патології.

Отримані результати дозволяють вважати, що інтоксикація організму іонами міді супроводжується вираженою системною відповіддю, яка проявляється на різних рівнях організації. Взаємозв'язок між цими рівнями досить складний і різноманітний. Зокрема, між проявом окисного стресу і

пригніченням інтенсивності зростання маси тіла і температурою тіла немає прямого зв'язку. Оскільки інгібування загального метаболізму, про що свідчить зниження температури тіла, має супроводжуватися зниженням інтенсивності дихання, то, як наслідок, повинна зменшуватися продукція вільних радикалів, а в даному випадку мало місце значне збільшення (до 90 %) гідроперекисів ліпідів на тлі пригнічення загального метаболізму. Така ситуація може пояснюватися вираженим пригніченням іонами міді не тільки загального метаболізму, але і активності антиоксидантних ферментів, що і супроводжувалося значним збільшенням продуктів вільнорадикальних реакцій на тлі зниження інтенсивності дихання і загального метаболізму.

Така метаболічна і фізіологічна ситуація може пояснюватися ще й тим, що іони міді відразу після введення, зв'язуючись з білками, інгібують активність не тільки антиоксидантних ферментів, але й дію широкого спектру інших білків, результатом чого може бути й інгібування білкового синтезу [196]. Це пов'язано з «відмовою» від прийому їжі, порушенням функції травної системи, скорочувальної здатності м'язів та ін.

Надалі спостерігається формування нового метаболічного патерну, який «спрямований» на виживання організму в таких екстремальних умовах, тобто має місце адаптивний характер відповідної реакції організму на дію сірчаноокислої міді.

По-перше, це пояснюється різноманітною регуляторною роллю вільнорадикальних продуктів. Так, збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій супроводжується не тільки оксидативним стресом, а й активацією клітинної ланки імунітету, що має важливе значення для виживання організму в таких умовах.

Як відомо, фагоцитувальні клітини, зокрема нейтрофіли, «використовують» окислювальний стрес як спосіб інактивації бактеріальних клітин. На тлі Cu-індукованого фіброзу печінки спостерігали збільшення фагоцитувальної активності нейтрофілів, що було показано в роботі [98].

По-друге, продукти вільнорадикальних реакцій активують зірчасті клітини, які відіграють центральну роль не тільки в розвитку фіброзу, а й у подальшому виборі стратегії реакцій на запалення. Саме зірчасті клітини продукують сполучнотканинний матрикс у печінці при фіброзі, і вони ж продукують матриксні металлопротеїнази, здатні забезпечити гідроліз сполучної тканини після гострої фази запалення [10].

Наявні дані дозволяють вважати, що, регулюючи функцію зірчастих клітин, можна забезпечити той чи інший вибір напрямку розвитку запальних процесів.

Звичайно, зірчасті клітини чутливі до великої кількості прозапальних цитокінів (IL-1, TNF2, NO, TgFg3-1, тромбоцитарного активуючого фактору та ін.) та інших регуляторних молекул.

Однак описані дані дозволяють вважати, що одним з пускових факторів у каскадних механізмах регуляції активності зірчастих клітин є продукти вільнорадикальних реакцій.

І, нарешті, на користь адаптивного окисного стресу, що виникає у відповідь на введення сірчаноокислої міді, можуть свідчити і результати про формування гормезисного ефекту до сірчаноокислої міді [101].

Так, якщо експериментальним тваринам послідовно триразово з інтервалами 48 годин вводили сірчаноокислу мідь у дозі 33 % від летальної, то у них розвивається фіброз печінки [6, 101]. Якщо цим тваринам на тлі фіброзу печінки вводили летальну дозу сірчаноокислої міді, то всі тварини успішно виживають, тоді як у контрольній групі фіксували 100 % смертність протягом 1 години після введення цього токсиканту [101]. Отже, формування фіброзу печінки супроводжувалося такою перебудовою в системі депонування іонів міді за участю мідьзв'язуючих білків і посиленням функції детоксикації, що наступні введення навіть летальних доз не приводили до загибелі тварин.

Отримані результати і дані, наявні в літературі, дозволяють вважати, що найбільш виражені зміни в цьому ряду були пов'язані з активацією

прооксидантної системи і така реакція має виражений адаптивний характер [152].

Отже, багаторазові послідовні введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді супроводжувалися зв'язуванням її з різноманітними білками в організмі і в клітинах печінки, що було показано в нашій роботі [10], формуванням специфічного фізіолого-метаболического патерну, який має адаптивний характер. Однак, незважаючи на адаптивний характер цих змін, така метаболическа система надзвичайно нестійка і надалі вона буде «вибирати» одну з можливих стратегій адаптивної відповіді.

На вибір стратегії подальшої відповіді впливатиме комплекс факторів. Ми вважаємо, що в тому випадку, якщо через якийсь час буде знижуватися кількість продуктів вільно-радикальних реакцій, то метаболізм буде подібний до метаболізму інтактних тварин. У тому випадку, якщо окислювальний стрес буде зберігатися досить довго (поки що нам невідомий цей інтервал часу), то буде обрана стратегія фіброгенезу. На користь цього свідчать результати даної роботи.

У тому випадку, якщо в цей час (приблизно через 24 години після останнього введення сірчаноокислої міді) тваринам починали вводити низькомолекулярні компоненти молозива або ж низькомолекулярні компоненти грибів і дріжджів, то це супроводжувалося активацією антиоксидантного ферменту – глутатіонпероксидази, зниженням до рівня контролю вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях і сироватці крові, на цьому тлі відновлювалася температура тіла та їх маси і частково працездатність. Отже, фізіолого-метаболический патерн мало відрізняється від такого у контрольних тварин [3, 46, 94, 101, 152].

Такий вплив НКМ і «мікс-фактора», які отримані з різних природних джерел, на про-антиоксидантну систему може пояснюватися декількома механізмами.

По-перше, до складу НКМ і «мікс-фактора» входять компоненти, що мають антиоксидативні властивості, однак, визначити їхній внесок в усунення

окисного стресу в системі *in vivo* вкрай складно. Раніше було показано, що компоненти «мікс-фактора» виявляють антиоксидантну активність, яку можна порівняти з токоферолом в середовищі *in vitro* [18].

По-друге, серед компонентів молозива містяться й імуностимулятори, які можуть чинити пряму дію на імунну систему [103].

І нарешті, низькомолекулярні компоненти як молозива, так і «мікс-фактора» здатні справляти регуляторні ефекти, як і різні фактори росту [3,152]. Як було показано в даній роботі, після введення НКМ у різних дозах мала місце виражена мономодальна дозо-залежна відповідь в активності антиоксидантного ферменту – глутатіонпероксидази і вмісту гідроперекисів ліпідів .

Окислювальний стрес є однією з центральних ланок індукції патогенезу печінки. Низькомолекулярні компоненти молозива і «мікс-фактор» є перспективними речовинами в розробці природних систем регуляції активності печінки при запальних і фібротичних змінах.

Обговорюючи отримані дані, слід зазначити, що 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 з цією класифікацією сірчаноокисла мідь відноситься до високотоксичних сполук (152).

Прояв токсичності може залежати: 1 – від структури і концентрації речовини; 2 – метаболічних характеристик біооб'єкту (вихідна стійкість). Виходячи з цього, при розробці антидотів можна використовувати як мінімум два підходи, які 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. Так, одним з найбільш поширених антидотів до іонів важких металів є різноманітні солі етилендіамінтетраацетату (ЕДТА), який є добрим хелатоутворювачем [29].

Біологічний підхід може бути заснований на використанні таких біологічно активних сполук, які, діючи на регуляторні системи метаболізму, так його змінюють, що він здатний забезпечувати прояв гормезісного, а не токсичного ефекту.

Раніше було показано, що гормезісний ефект до іонів міді визначається кооперативними змінами багатьох, якщо не всіх, захисних систем організму, для яких характерна емерджентність [39].

Можна вважати, що кооперативні зміни або модуляція таких метаболічних елементів, які забезпечують прояви антитоксичних, антиканцерогенних, навіть антимуtagenних властивостей, пов'язаних із антиоксидантною, імунною та нейроендокринною системами організму.

Ми вважаємо, що антитоксичний ефект до високих концентрацій міді буде проявлятися найбільшою мірою в тому випадку, якщо в організмі будуть кооперативно змінені кілька регуляторних систем, що забезпечують захист організму: 1 - зв'язування і інактивації токсичних продуктів і їхніх метаболітів; 2 - забезпечення їхньої біотрансформації і 3 - депонування або виведення з організму продуктів детоксикації.

Для досягнення цього, нами був розроблений комплекс низькомолекулярних компонентів природного походження, який може забезпечити ці функції.

Як було відзначено, основні компоненти «мікс-фактора» представлені олігоцукрами (66 %), низькомолекулярними білками (ММ не більше 20 кДа, 23 %) і ліпідами (10 %). Крім цього, він містить вільні амінокислоти (валін становить 13, цистеїн – 16, метіонін – 11, лейцин – 10, аргінін – 4, ізолейцин – 4, треонін – 3 і лізин – 1 % від суми всіх амінокислот і вітаміни (В1 – 0,38 мг / л, В2 – 3,24 мг / л і РР – 8,3 мг / л).

Настільки широкий спектр біологічно активних природних сполук може забезпечувати м'яку комплексну дію на цілу низку регуляторних систем організму.

Так, введення летальної дози сірчаноокислої міді тваринам, які попередньо отримували «мікс-фактор», забезпечувало виживання до 60 % тварин, тоді як в контролі мала місце 100 % летальність. Крім того, введення малих доз сірчаноокислої міді (LD_{30}) на тлі «мікс-фактора» забезпечувало не лише виживання після наступної летальної дози, але і збільшення працездатності, температури тіла та їх маси тварин.

Безсумнівний інтерес представляють механізми антитоксичної дії мікс-фактора. Як відомо, гостра токсичність сірчаноокислої міді пов'язана з пригніченням функції дихання, функціонуванням кровоносної і видільної системи. Ступінь порушення цих життєво важливих функцій корелює з функціональною активністю еритроцитів крові.

Було виявлено, що після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді в дозах LD_{33} кількість еритроцитів зменшувалася на 30 %, що вказує на зміну їх функціональної активності. Можна вважати, що після введення сірчаноокислої міді в великих дозах (LD_{50} - LD_{100}) ці зміни будуть виражені більшою мірою і можуть бути летальними [101].

Як відомо, гемоліз еритроцитів у разі введення іонів міді індукує пероксидації ліпідних компонентів мембран.

У тому випадку, якщо до введення сірчаноокислої міді тваринам вводили «мікс-фактор», то вміст і функціональна активність еритроцитів навіть після введення сірчаноокислої міді не відрізнялася від контрольного варіанту. Це пояснюється тим, що компоненти «мікс-фактора», володіючи антирадикальними і антиоксидантними властивостями, та індукуючи збільшення активності ГП та ГТ, призводять до кооперативних перебудов усього метаболізму, які проявляються в підвищенні стійкості тварин до летальних доз сірчаноокислої міді [101].

Так, у тварин, які отримували «мікс-фактор», була значно збільшена активність ГП і ГТ і на цьому тлі зменшений вміст гідроперекисів, як в мітохондріях, так і в мікросомах. Якщо припустити, що кількість гідроперекисів визначається активністю ГП, ГТ й інших антиоксидантних ферментів і визначити

співвідношення між цими показниками, то можна судити про умовний коефіцієнт ефективності антиоксидантного захисту в експериментальних тварин [3, 94].

Виявилося, що «мікс-фактор» особливо ефективно збільшував захисну антиоксидантну систему на рівні мітохондрій. Так, відношення глутатіонпероксидази (ГП) до гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) у групі дослідних тварин, які отримували «мікс-фактор», було в 5-8 разів вище в порівнянні з контролем (Рис. 3.27).

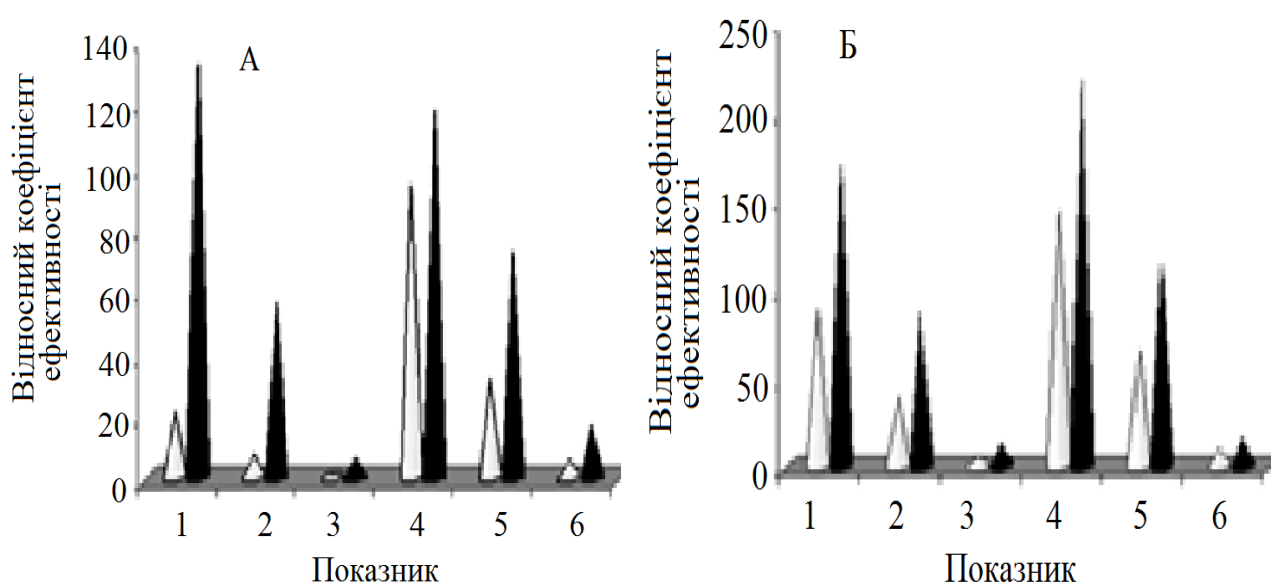


Рис. 3.27 Відносний коефіцієнт ефективності антиоксидантної системи, представлений як відношення ГП / ГПЛ (1), ГП / СПОЛ (2), ГП / АПОЛ (3), ГТ / ГПЛ (4), ГТ/АПОЛ (5), ГТ / АПОЛ (6) для мітохондрій (А) і для мікросом (Б)

ГП – глутатіонпероксидаза; ГТ – глутатіонпероксидаза; СПОЛ – спонтанне перекисне окиснення ліпідів; АПОЛ – аспаратзалежне перекисне окиснення ліпідів

Необхідно відзначити, що всі досліджувані показники ефективності антиоксидантного захисту в мітохондріях і мікросомах печінки у тварин, які

отримували «мікс-фактор», були вищими в порівнянні з контролем – від 50 до 78 % (Рис. 3.27).

Настільки виражені відмінності між контрольними та експериментальними тваринами щодо активності прооксидантних ферментів глутатіонового циклу можуть вказувати на кооперативні зміни всього метаболізму, що й лежить в основі підвищення стійкості еритроцитів та інших типів клітинних мембран і, в кінцевому підсумку, стійкості всього організму [152].

Як відомо, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза і глутатіонредуктаза є основними ферментами глутатіонового циклу. Глутатіон – один з основних антиоксидантних компонентів біологічних систем. Його вміст у клітині дуже високий і може досягати 5 мМ в клітині. Мабуть, це єдиний неферментативний антиоксидант, який циклічно переходить з основної в окислену форму і його рівень змінюється у всіх випадках при зміщенні співвідношень в про / антиоксидантній системі (Рис. 3.28).

Більш того, зміщення рівноваги $GSH \rightarrow GS-SG$ в одну зі сторін визначає редокс-стан всієї клітини, яке може бути однією з інтеграційних систем регуляції загального метаболізму. Це дозволяє вважати, що редокс-система може розглядатися як фізико-хімічний фон, на якому реалізується метаболічний патерн і цим фоном забезпечується загальна реакція метаболізму клітини на фактори середовища, що динамічно змінюються.

Ми вважаємо, що такий неспецифічний фактор регуляції як редокс-стан клітини, що відображає особливості взаємодії з факторами середовища, перетворюється на специфічний фактор регуляції, завдяки такій фундаментальній властивості біологічних макромолекул (ферментів), як їхня поліфункціональність. Так, глутатіонтрансфераза, крім 4-х відомих нам ферментативних реакцій, бере участь у метаболізмі лейкотрієнів, простагландинів, гормонів, естрогенів та інших сполук (Рис. 3. 28). Вони ж, у свою чергу, приймають участь у великій кількості інших метаболічних процесів і формують специфічний метаболічний патерн [94,101].

Не менш різноманітні функції і глутатіонпероксидази. Відзначимо лише деякі з них. Крім добре відомих і загальноприйнятих, наприклад, відновлення гідроперекисів, вона виконує цілу низьку специфічних функцій. Показано, що глутатіонпероксидаза підтримує рівень відновленого глутатіону, пригнічує запальні процеси за рахунок зниження біосинтезу простагландинів, гальмує розвиток атеросклерозу, попереджає розвиток онкозахворювань, виконує важливу роль в сигнальній трансдукції, знижуючи тим самим ризик переходу фізіологічної сигнальної трансдукції в патологічну (Рис. 3.28).

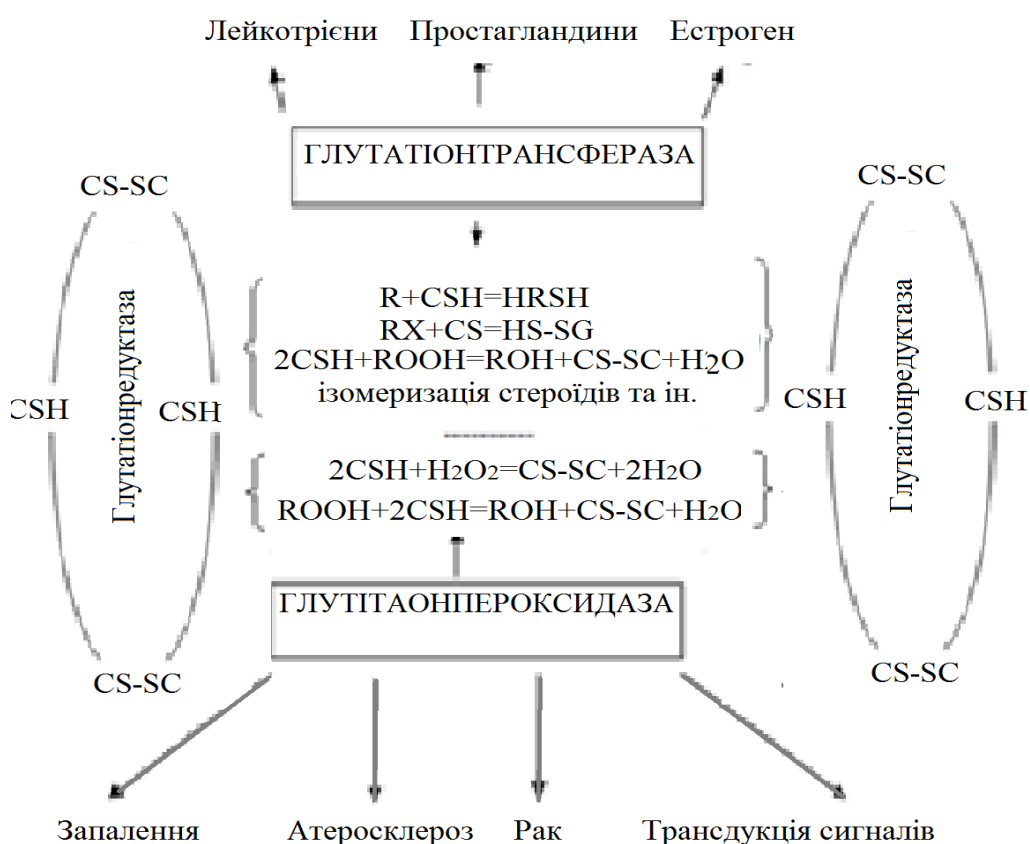


Рис. 3.28 Схема, що демонструє основні типи реакцій глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази, а також їхню участь в інших метаболічних процесах і роль глутатіонового циклу в підтримці редокс-системи клітини

Наявні дані в літературі і результати цього дослідження дозволяють висловити гіпотезу про механізм переходу неспецифічної реакції антиоксидантно-прооксидантної системи до формування специфічних

адаптивних метаболічних патернів і прояву антитоксичних функцій [3, 94, 95, 101, 103].

Суть гіпотези можна звести до кількох спільних позицій:

1 - фізико-хімічна система клітини – комплекс з таких параметрів, як редокс-система, осмотичність, рН, температура і ін., які динамічно змінюються як результат зміни екзогенних і ендогенних факторів;

2 - незважаючи на нескінченно можливе поєднання (комбінаторики) фізико-хімічних показників клітинного середовища, вони можуть бути згрупованими в дискретний набір варіантів;

3 - кожен з можливих фізико-хімічних варіантів буде забезпечувати (індукувати) прояв однієї або декількох метаболічних реакцій поліфункціональних ферментних систем у межах їхніх структурно-функціональних можливостей;

4 - активовані ферменти будуть формувати специфічний метаболічний патерн, при цьому «вмикаються» специфічні регуляторні сигнали, які закріплюють адаптивний метаболічний патерн;

5 - ймовірно, існує набір універсальних варіантів, який може забезпечити адаптивність до відносно широких умов фізико-хімічних факторів середовища, тобто формування буферності метаболічної системи;

6 - сформовані метаболічні патерни в конкретних фізико-хімічних умовах клітини можуть забезпечити тривалу стабільність функціонування системи, а можуть бути більш «спеціалізованими» і приводити до патології, тобто істотно звужувати адаптивні можливості системи в разі виникнення нових фізико-хімічних умов в клітині.

Виходячи з гіпотези, можна вважати, що антиокислювальні і антитоксичні властивості «мікс-фактора» і НКМ формують один загальний адаптивний метаболічний патерн.

Отримані результати подібних ефектів впливу двох різних біологічно активних сполук («мікс-фактора» і НКМ) на організм експериментальних тварин після інтоксикації організму сірчаною кислотою можуть пояснюватися їхньою

здатністю відновлювати (модулювати) стан метаболізму, який був характерним до розвитку запального процесу. Необхідно зазначити, що в умовах тривалої підтримки тих чи інших метаболічних патернів, вони підтримуються не одним, а декількома регулярними системами, вони формують метаболічну пам'ять, здатну зберігатися (самопідтримуватися) тривалий час.

У тих випадках, коли має місце зміна (відхилення) від гомеостатичного рівня (збільшення вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій, зниження активності ряду ферментів і ін.), метаболічна система переходить у квазістабільний стан. Такий квазістабільний стан може в подальшому супроводжуватися переходом у стабільний стан, тобто формуються хронічні патологічні стани або ж відновлюються метаболічні патерни, близькі або ідентичні до вихідного метаболічного стану.

Квазістабільний стан є нестійким і відносно легко зміщується в попередній стан, оскільки цьому сприяють регулярні гомеостатичні системи.

Ефективність модуляції минулих станів залежить від низки умов, зокрема:

- 1) від часу збереження змінених станів;
- 2) механізмів дії біологічних модуляторів.

Найбільш оптимальними модуляторами при запальних процесах можуть бути такі комплекси біологічно активних сполук, до складу яких входять як прооксиданти, так і антиоксиданти.

Як зазначалося в роботі, «мікс-фактор» і НКМ мають як антиоксидантні, так і прооксидантні властивості. Введення в організм таких біологічно активних сполук, коли метаболізм знаходиться у квазістабільному стані, відносно швидко може увійти «назад» у вихідний метаболічний стан.

Висновки до розділу 3

Інтوكсикація організму багаторазовим послідовним введенням сірчаної кислоти міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла супроводжувалася пригніченням швидкості росту, зниженням температури тіла на 0,8-1 °C і 2-3-х разовим

зниженням працездатності таких тварин. На тлі Cu-індукованого токсикозу активність аланінтрансферази і вміст триацилгліцеридів, креатиніну, альбуміну не змінилися в порівнянні з контрольними тваринами. Однак разом із тим активність гама-глутамілтрансферази після Cu-індукованої інтоксикації збільшилася на 263 %, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці збільшувалася на 36-40 %, а активність глутатіонпероксидази зменшилася на 28-35 % у відношенні до контролю. Ці результати свідчать про те, що у разі інтоксикації сірчаноокислою міддю має місце початкова стадія запального процесу в печінці. Найбільш виражені зміни виявлені в показниках редокс-системи організму.

Ця модель може бути використана для дослідження механізмів дії протизапальних біологічно-активних субстанцій та антидотів і визначення ролі редокс-систем у цих процесах. Як антидоти використовували низькомолекулярні компоненти, отримані з різних джерел, із харчових грибів і дріжджів, а також низькомолекулярні компоненти коров'ячого молозива («мікс-фактор» і НКМ). Показано, що до складу «мікс-фактора» та НКМ входять різні низькомолекулярні компоненти (цукор, білки, амінокислоти, ліпіди, вітаміни), а їх співвідношення і склад були різними в «мікс-факторі» та НКМ.

Показано, що компоненти «мікс-фактора», якщо їх вводили тваринам на фоні введення сірчаноокислої міді, усували втрату маси тіла тварин у порівнянні з інтоксикацією сірчаноокислою міддю і навіть перевершували контрольну групу тварин за швидкістю зростання маси тіла, нормалізували температуру тіла до контрольних значень.

Компоненти «мікс-фактора», якщо ж їх вводили регулярно до введення токсичних доз сірчаноокислої міді, то це супроводжувалося значним підвищенням стійкості до летальної дози токсиканту (60 % тварин виживали).

Такий захисний ефект на рівні організму компонентами «мікс-фактора» проявлявся і на вмісті еритроцитів в сироватці крові.

Низькомолекулярні компоненти молозива справляли дуже подібні фізіологічні ефекти на моделі Cu-індукованого токсикозу, як і «мікс-фактор». НКМ усували затримку росту щурів з інтоксикацією іонами міді, нормалізували

температуру тіла, проте, як і в разі «мікс-фактора», не повністю відновлювали працездатність тварин у тесті плавання з вантажем.

Отже, низькомолекулярні компоненти з різних джерел викликали подібні фізіологічні відповіді на моделі Cu-інтоксикації організму.

Триразове послідовне введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла супроводжувалося інгібуванням активності глутатіонпероксидази в сироватці крові і мітросомах на 25-35 %, збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки, сироватці і мембранах ЕПР на 40-50 %, при цьому активність глутатіонпероксидази залишалася незмінною.

Введення експериментальним тваринам на тлі інтоксикації іонами міді «мікс-фактора» або низькомолекулярних компонентів молозива усували окислювальний стрес. Так, спостерігалось збільшення активності глутатіонпероксидази до рівня контролю та зменшення вмісту гідроперекисів ліпідів як у печінці, так і в сироватці крові.

Компоненти «мікс-фактора» усували окислювальний стрес, який був викликаний не лише підвищенням вмісту іонів міді в організмі, але і в процесі природного старіння. Прийом «мікс-фактора» старими тваринами зменшував вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові і мітохондріях печінки, збільшував активність глутатіонпероксидази, здатність тварин виконувати роботу і незначно збільшував їх тривалість життя. Ці результати свідчать про роль вільнорадикальних процесів у тривалості життя.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [3, 46, 94, 95, 99, 101, 103, 152].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз та експериментальне рішення актуального завдання біохімії щодо регуляції елементів прооксидантно-антиоксидантних систем організму комплексом низькомолекулярних сполук біологічного походження, виявлено взаємозв'язок між показниками про-антиоксидантної системи та фізіологічною активністю тварин, а також здатність «мікс-фактора» і низькомолекулярних компонентів молозива регулювати активність редокс-системи організму та поліпшувати якість і тривалість життя після їх прийому на пізніх етапах онтогенеза.

1. Триразові послідовні введення сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла з інтервалами між введеннями 48 годин супроводжувалося збільшенням активності гамма-глутамілтрансферази на 263 %, проявом окисного стресу та пригніченням активності аконітази мітохондрій (вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях, мікросомах печінки і сироватці крові збільшувалася на 36 – 40 %, а активність глутатіонпероксидази зменшилася на 28 – 35 %). При цьому, основні параметри функції печінки (активність трансферази, вміст креатину, альбуміну, триацилгліцеридів у сироватці крові залишалися в межах норми).

2. Прояв окисного стресу на тлі інтоксикації організму сірчаноокислою міддю супроводжувався втратою маси тіла, зниженням температури тіла, зменшенням кількості еритроцитів на 32 % в крові і зниженням здатності таких тварин здійснювати роботу.

3. Триразове введення «мікс-фактора» на тлі інтоксикації організму сірчаноокислою міддю усувало окислювальний стрес, що проявлялося у зменшенні вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях і мембранах ендоплазматичного ретикулюму, а також в сироватці крові і збільшення активності глутатіонпероксидази та інших антиоксидантних ферментів. Вміст холестерину, триацилгліцеридів, креатиніну та альбуміну залишався в межах норми, що вказує на відсутність будь-яких побічних ефектів дії «мікс-фактора» на функції печінки. Попереднє введення експериментальним тваринам «мікс-фактора» з наступним

введенням токсичних доз сірчаноокислої міді забезпечувало виживання 70 % тварин, у той час, як в контрольній групі всі тварини гинули, тобто «мікс-фактор» є природним антидотом.

4. Низькомолекулярні компоненти молозива так само, як і «мікс-фактор», зменшували вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях і мембранах ендоплазматичного ретикулюма, і в сироватці крові. У великих дозах низькомолекулярні компоненти молозива (1 мг – 3 мкг / 100 г білка) проявляли прооксидантні властивості, а в малих дозах (0,05 - 0,1 мг / 100 г) - антиоксидантні властивості.

5. Усунення окисного стресу «мікс-фактором» і низькомолекулярними компонентами молозива на тлі інтоксикації організму нормалізувало вміст еритроцитів у крові до рівня контролю, відновлювало температуру тіла, прискорювало збільшення маси тіла і частково відновлювало працездатність у таких тварин.

6. Щоденний прийом «мікс-фактора» з питною водою в дозі 0,05 - 0,06 мл / 100 г протягом життя з 22 міс. або 30 міс. віку супроводжувався нормалізацією показників про-антиоксидантної системи до показників тварин 12 міс. віку. Тривалість життя у таких тварин незначно збільшувалась, і це корелювало зі збільшенням здатності у таких тварин здійснювати роботу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абатуров А. Е. , Волосовец А. П., Худяков А. Е. Антиоксидатная система респираторного тракта. Антиоксидантные эффекторы в надэпителиальном и экстрацеллюлярном пространстве (часть 1) // Теоретична медицина. 2016. № 3. С. 161-171.
2. Александрова Л. А. Новые перспективы использования гамма-глутамил-транспептидазы в энзимодиагностике // Ученые записки СПбГМУ им. И. П. Павлова. 2016. № 2. С. 6-11.
3. Алсардіа М. М. А. Дослідження гепатопротекторних властивостей препарату (фунгідол) при Си-індукованому фіброзі // Молодь і поступ біології : XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 25-27 квітня 2017 р. : тези доп. Львів, 2017. С. 22.
4. Баранов В. С., Иващенко Т. Э., Баранова Е. В., Асеев М. В. Глотов А.С., Глотов О.С., Беспалова О.Н., Демин Г.С., Москаленко М.В., Швед Н.Ю. Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины. Санкт-Петербург, 2009. 528 с.
5. Безруких М. М., Сонькин В. Д., Фарбер Д. А. Возрастная физиология: учеб. пособие для студ. вузов. Москва, 2005. 446 с.
6. Бикбулатова С. М., Чемерис Д. А., Никоноров Ю. М. и др. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башк. ун-та. 2012. Т. 17, № 1. С. 50-67.
7. Билалова А. Р., Макашова В. В., Шипулин Г. А. Клинико-биохимические особенности циррозов печени различного генеза // Архив внутренней медицины. 2016. № 3 (29). С. 59 - 67.
8. Блум С. Г., Вебстер Д. В. Справочник по гастроэнтерологии и гепатологии. Москва, 2010. 592 с.
9. Божков А. И. Эпигеном и метаболическая память в формировании стратегий возрастзависимых адаптаций // Биологические механизмы старения :

материалы IX Международного симпозиума, 6-29 мая 2010 г. Харьков, 2010. С. 10.

10. 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 серноокислой меди // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56, № 2. С. 195-208.
11. Бондарева А. В., Стеценко С. О. Активність процесів ліпопероксидації у мікросомальній фракції печінки щурів при дії олігоефірів багатоатомних спиртів // Світ медицини та біології. 2016. № 3 (57). С. 98-101.
12. Будников Г. К., Гармонов С. Ю., Медянцева Э. П., Евтюгин Г. Л. Химическая безопасность и мониторинг живых систем на принципах биомиметики : учеб, пособие. Москва, 2013. 320 с.
13. Вавилин В. А., Часовникова О. Б., Ляхович В. В., Гавалов С. М. Генетический полиморфизм глутатион-S-трансферазы m1 и t1 у детей, больных бронхиальной астмой // Вопросы медицинской химии. 2000. № 4. С. 8-10.
14. Вартанян Ф. Е. Взаимосвязь генетических и средовых факторов с фармакотерапией // Клиническая фармакология и терапия. 2006. Т. 15, № 2. С. 86-88.
15. Витковский Ю. А., Кузник Б. И., Солпов А. В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // Иммунология. 2006. Т. 8, № 5-6. С. 745 - 753.
16. Гаврилова О. А. Особенности процесса перекисного окисления липидов в норме и при некоторых патологических состояниях у детей // Acta Biomedica Scientifica. 2017. № 4 (116). С. 15-22.
17. Гельдымамедова Э. А. Тяжелые металлы в почвах и овощных культурах г. Павлодара Республики Казахстан : дисс.... кандидата биол. наук : 03.00.16. Павлодар , 2007. 141 с.
18. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение : Москва, 2002. 589 с.

19. Горожанская Э. Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 6. С. 28 - 44.
20. Григорьева Т. И. Влияние удобрений на накопление и доступность тяжелых металлов в дерново-подзолистой почве : автореф. дис. на соискание научной степени кандидата с.-х. наук : спец. 06.01.04. «Агрохимия». Кемерово, 2007. 22 с.
21. Гуляева Л. Ф., Вавилин В. А., Ляхович В. В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. Новосибирск, 2000. 90 с.
22. Давыдов В. В., Божков А. И. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза (обзор литературы и собственных исследований) // Журн. НАМН України. 2014. Т. 20, № 1. С. 25-34.
23. Джувеликян Х. А., Щеглов Д. И., Горбунова Н. С. Загрязнение почв тяжелыми металлами. Способы контроля и нормирования загрязненных почв. Воронеж, 2009. 22 с.
24. Дячук Т. И. Экологическая оценка безопасности пищевых продуктов животного происхождения в Новосибирской области : дис...кандидата биол. наук: 03.00.16. Новосибирск, 2004. 36 с.
25. Жестяников А. Л. Дисбаланс некоторых макро- и микроэлементов как фактор риска заболеваний сердечно-сосудистой системы на севере // Экология человека. 2005. Т. 2, № 3. С. 19 - 25.
26. Зайцева О. Е. Особенности накопления микроэлементов в плаценте и пуповине при нормальной и осложненной гестозом беременности – автореф. дис. на соискание научной степени кандидата мед. наук : специальность 14.00.01 «Акушерство и гинекология». Москва, 2006. 24 с.
27. Затуловская Ю. А. Роль надпочечников в регуляции метаболизма меди в печени: дис... кандидата биол. наук: 03.03.01, 03.01.04. Санкт-Петербург, 2014. 147 с.

28. Землянова М. А., Звездин В. Н., Кольдибекова Ю. В. Установление количественных параметров метаболизма бензола в организме для задач гигиенической диагностики // Здоровье семьи 21 век : материалы XV Междунар. науч. конф., 30 апреля – 7 мая 2011. Пермь, 2011. С. 184-185.
29. Землянова М. А., Кольдибекова Ю. В. Современные подходы к оценке нарушений метаболизма ксенобиотиков при поступлении в организм из внешней среды // Экология человека. 2012. № 8. С.8-14.
30. Зоров Д. Б., Банникова С. Ю. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. 2005. Т. 70, Вып. 2. С. 265-272.
31. Зубкова В.М. Особенности накопления и распределения тяжелых металлов в сельскохозяйственных культурах и влияние удобрений на их поведение в системе почва - растение : автореф. дис. на соискание научной степени д-ра. биол. наук : спец. 06.01.04. «Агрохимия». Москва, 40 с.
32. Закон України " Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006, № 3447-IV. 2006. URL.: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
33. Израэль Ю. А. Экология и контроль состояния природной среды. Ленинград, 1979. 376 с.
34. Информационный бюллетень Центра теоретического анализа экологических проблем. 2002. № 10. 7 с.
35. Казимирко В. К., Мальцева В. И. Антиоксидантная система и ее функционирование в организме человека // Здоровье Украины. 2004. № 98. С. 160-172.
36. Казимирко В. К., Иваницкая Л. Н., Кутовой В. В., Дубкова А. Г., Силантьева Т. С. Перекисное окисление липидов: противоречия проблемы // Український ревматологічний журнал. 2014. № 57(3). С. 13-17.
37. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. 3-е изд. Москва, 2009. 896 с.

38. Карегина Ж. М. Содержание тяжелых металлов в биосфере центральной зоны Амурской области и методы снижения их уровня в молоке : дисс... кандидата с.-х. наук: 06.02.02. Великий Новгород, 2000. 144 с.
39. Ковалева М. К., Мензянова Н. Г. Эффект гормезиса у *Dunaliella viridis* teodor. (chlorophyta) под действием сернокислой меди // Альгология. 2011. Т. 21, № 3. С. 33-39.
40. Козинец Г. И., Погорелов В. М., Шмаров Д. А., Боев С. Ф., Сазонов В. В. Клетки крови - современные технологии их анализа. Москва, 2002. 200 с.
41. Колесникова Е. В. Экологическая оценка содержания тяжелых металлов в пищевом сырье и продуктах питания Томской области : дисс... кандидата биол. наук: 03.00.04. Новосибирск, 2002. 177 с.
42. Колосова И. И. Влияние ацетата свинца, солей тяжелых металлов на репродуктивную функцию // Вісник проблем біології і медицини. 2013. № 3. С. 13-18.
43. Коркушко О. В., Хавинсон В. Х., Бутенко Г. М., Шатило В. Б. Пептидные препараты тимуса и эпифиза в профилактике ускоренного старения. Санкт-Петербург, 2002. 202 с.
44. Кудряшов А. М. Исследование роли глутатионовой системы в естественном старении эритроцитов, продуцированных в условиях нормального и напряженного эритропоэза : автореф. дис. на соискание научной степени кандидата биол. наук : спец.03.00.04 «Биохимия». Тюмень, 2002. 21 с.
45. Курашвили Л. В., Косой Г. А., Захарова И. Р. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях : метод. пособие. Пенза, 2003. 32 с.
46. 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 // Проблемы старения и долголетия : матеріали науково-практичної конференції «Здоров'я, харчування, довголіття» пам'яті проф. Ю. Г. Григорова (до 85-річчя від дня народження), 16-17 травня 2016 р. : тези доп. Київ, 2016. Т. 25, № 2. С. 345.

47. Кутлунина Н. А., Ермошин А. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие. Урал, 2017. 42 с.
48. Куценко С. А. Основы токсикологии. Санкт-Петербург, 2004. 720 с.
49. Лавришин Ю. Ю., Вархоляк І. С., Мартишук Т. В., Гута З. А., Іванків Л. Б., Паладійчук О. І. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2016. Т. 18, № 2 (66). С. 100-111.
50. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra. Москва, 2003. 83 с.
51. Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках : монография. Минск, 2008. 159 с.
52. Масленников П. В., Чупахина Г. Н., Дедков В. П., Куркина М. В., Садовников П. В., Мельник А. С. Аккумуляция цинка в растениях урбоэкосистем Калининграда // Растительные ресурсы. 2014. Т. 50, № 4. С. 83-98.
53. Масленникова А. И. Миграция тяжелых металлов в системе "почва - корм - продукция (молоко)" в условиях Средне-Волжского региона : дис... кандидата с-х. наук : 06.02.02. Ульяновск, 2006. 124 с.
54. Матейкович П. А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток // Международный научный журнал. 2016. Т. 3, № 6. С. 21-24.
55. Медицинская токсикология: национальное руководство / под ред. Е. А. Лужникова. Москва, 2012. 928 с.
56. Мирошниченко И. И., Птицина С. Н. Генетический полиморфизм и фармакокинетика лекарственных средств // Прил. к журн. «Качественная клиническая практика» - «Клиническая фармакокинетика». 2005. № 2(3). С. 35-39.
57. Могиленкова Л. А., Рембовский В. Р. Роль генетического полиморфизма и различия в детоксикации химических веществ в организме человека // Гигиена и санитария. 2016. № 3. С. 255 - 262.

58. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). Санкт-Петербург, 1996. 74 с.
59. Нефьодова О. О., Задесенец И. П., Гальперин А. И Влияние соединений кадмия и свинца на морфогенез внутренних органов в онтогенезе // Вісник проблем біології і медицини. 2017. № 4. С. 61 - 66.
60. Новиков В. Е., Левченкова О. С., Пожилова Е. В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014. Т. 12, № 4. С. 13-21.
61. Нотова С. В., Мирошников С. А., Лебедев С. В., Дубровина Г. В. Изучение уровня тяжелых металлов в организме при различных патологических состояниях, связанных с нарушением функционирования иммунной системы // Вестник ОГУ. 2009. № 6. С. 496-498.
62. Онищенко Г. Г., Зайцева Н. В., Землянова М. А. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов / под ред. Г. Г. Онищенко. Пермь, 2011. 532 с.
63. Панова Е. В. Особенности поступления тяжелых металлов и микроэлементов в систему "почвы-сельскохозяйственная продукция-человек" по природно-почвенным зонам Алтайского края : дисс... кандидата с.-х. наук : 03.00.16. Барнаул, 2007. 200 с.
64. Парахонский А. П. Роль меди в организме и значение ее дисбаланса // Естественно-гуманитарные исследования. 2015. № 4 (10). С.72-83.
65. Протокол по тяжелым металлам к конвенции 1979 года о трансграничном загрязнении воздуха на большие расстояния . Организация объединенных наций. URL.: <https://www.unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/full%20text/1998.Heavy.Metals.r.pdf> (дата звернения 04.04.2018).
66. Райс Р. Х., Гуляева Л. Ф. Биологические эффекты токсических соединений : курс лекций. Новосибирск, 2003. 122 с.
67. Реймерс Н. Ф. Природопользование. Москва, 1990. 638 с.

68. Савельев С. И., Морозов В. Н., Свиридова Н. А., Харламов А. П., Шепелева О. А. Гигиеническая оценка выполненных мероприятий по организации санитарно-защитных зон предприятиями Липецкой области // Социально-гигиенический мониторинг здоровья населения. Рязань. 2008. Вып. 12. С. 110 - 112.
69. Сироткина М. В. Тяжелые металлы у детей в норме и при нарушении функции пищеварения : дис..... кандидата биол. наук: 03.00.13. Нижний Новгород, 2000. 147 с.
70. Соболев В. В., Саутин М. Е., Пирузян А. Л., Соболева А. Г., Корсунская И. М. Общие механизмы и медиаторы воспаления в развитии атеросклероза и псориаза // Эффективная фармакотерапия. 2017. № 15. С.16 - 19.
71. Сорокина Т.С. История медицины. Москва, 2008. 96 с.
72. Сульдина Т. И. Содержание тяжелых металлов в продуктах питания и их влияние на организм // Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. 2016. № 1. С. 136-140.
73. Теплая Г. А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды // Астраханский вестник экологического образования. 2013. №1 (23). С. 182-192.
74. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология : учеб. / под. ред. Р. У. Хабриева, Н. И. Калетиной. Москва, 2010. 752 с.
75. Улахович Н. А., Кутырева М. П., Медянцева Э. П., Бабкина С. С. Экотоксиканты. Казань, 2010. 56 с.
76. Федосеенко С. В. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на свойства чернозема обыкновенного и качество сельскохозяйственной продукции: автореф. дис. на соискание научной степени кандидата биол. наук: 03.00.27 «Почвоведение». Ростов- на- Дону, 2004. 24 с.
77. Фрейдлин И. С. Современные представления о фагоцитарной теории // Иммунология. 2008. № 5. С. 4 - 10.

78. Хавинсон В. Х., Анисимов В. Н. Пептидные биорегуляторы и старение. Санкт-Петербург, 2003. 223 с.
79. Чеснокова Н. П., Невважай Т. А., Морозова О. Л., Моррисон В. В., Барсуков В. Ю. Воспаление: этиология, патогенез, патогенетическое обоснование принципов терапии : учеб-метод. пособие. Саратов, 2008. 120 с.
80. Ямковая Е. В. Генетические факторы адаптогенеза человека к токсическому действию нефтехимических веществ // Естествознание и гуманизм. 2011. Т. 7, № 1. С. 15-18.
81. Янбаева Д. Г. Полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты и предрасположенность к хронической обструктивной болезни легких // Молекулярная медицина. 2005. № 2. С. 58-63.
82. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. 1980. N 15. P. 137-140.
83. 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 // ArchBiochem Biophys. 1970. N 140. P. 237-244.
84. Carlberg I., Mannerviek B. Glutathione reductase levels in rat brain // J. Biol. Chem. 1975. N 250. P. 5475-5480.
85. Alexander J. S., Granger D. N., Harris N. R. Inflammation: The Role of Endothelial Cells // Inducers and Sensors of Inflammation. 2017. Vol. 19. P. 457-476.
86. Angelova M. I., Asenova S. S., Nedkova V. N., Koleva-Kolarova R. G. Copper in the human organism // Trakia Journal of Sciences. 2011. Vol. 9, N 1. P. 88 -98.
87. Arnal N. T., Morel G. R., de Alaniz M. J., Castillo O.Y., Marra C. A. Role of Copper and Cholesterol Association in the Neurodegenerative Process // International Journal of Alzheimer's Disease. 2013. N 3. P. 15-39.
88. Baloch S. R., Memon A. R., Hayat A. S., Masood N. V. Evaluation of Serum Copper and Zinc in Hypothyroidism Patients // ARPN Journal of Science and Technology. 2013. Vol. 3, N 3. P. 316-318.

89. Barbara Kosowska B.L. Changes in copper and zinc ion concentrations and serum insulin level in rats affected by inbreeding and stress // *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 1992. Vol. 109. P. 394-400.
90. Bartsch Y. O., Nair U. H., Risch A. J. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancer // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2000. Vol. 9. P. 3 -28.
91. Bell B. P., Manos M. M., Zaman A. Y. The epidemiology of newly diagnosed chronic liver disease in gastroenterology practices in the United States: results from population-based surveillance // *Am. J. Gastroenterol.* 2008. Vol. 103, N 11. P. 2727-2736.
92. Blasig S. Y., Peter Kühnen P. T., Schuette A. T., Blankenstein O. Y., Mittag J. S., Schomburg L. J. Positive correlation of thyroid hormones and serum copper in children with congenital hypothyroidism. 2016. Vol. 37. P. 90 - 95.
93. Boren J. S., Brindle K M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation // *Cell Death Differ.* 2012. Vol. 19(9). P. 1561-1570.
94. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Al Begai Mohammad A.Y., Alsardia Mohammad M. A. and Kurguzova N. I. Low-molecular weight cow colostrum components in functional nutrition // *Journal of Nutritional Therapeutics*. 2017. Vol. 6. P. 11-17.
95. Bozhkov A. I., Ivanov E.G., Kurguzova N.I., Alsardia M.M.A, Akzhigitov R.A., Baranikova S.Ya., Potapova V.I., Chuprikova A.S. The toxic Effects of low Molecular Weight Components of Cow Colostrums: The Short-Term and Long-Term Effects // *Journal of Nutritional Therapeutics*. 2017. N 6. P.84-91.
96. Bozhkov A. I., Klimova E. M., Nikitchenko Yu.V. Stem cells take part in regulation of prooxidant activity and immunity at liver fibrosis // *Amer. J. Biomed. Life Sci. Spec. Iss.: «Mechanisms of protection against oxidative stress»*. 2014. Vol. 2, N 6–1. P. 5-12.
97. Bozhkov A. I., Klimova O. M., Nikitchenko Yu. V., Kurguzova N. I., Linkevych O. S., Lebid K. M., Protsenko O. S., Remneva N. A., Al-Bahadly A.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.
98. Bozhkov A. I., Linkevych O. S., Ivanov E. G., Klimova O. M., Al Begai M. A. Y. Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis // *Int J Curr Res*. 2016. N 8 P. 44129-44137.
 99. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Klimova E. M., Linkevych O. S., Lebid K. M., Al-Bahadli A. M. M. and 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.
 100. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V. Thermogenesis and longevity in mammals. Thyroxin model of accelerated aging // *Experimental Gerontology*. 2014. N 60. P. 173-182.
 101. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Lebid K. M., Ivanov E. G., Kurguzova N. I., Gayevoy S. S., Sharko M. O., Alsardia M. M. A, Al Begai M. 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.
 102. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu.V., Sheremet A. A., Bozhkov A. A. The prooxidant-antioxidant system is the primary stage of the answer of organism on unbalanced diet // *Journal of Harmonized Research in Pharmacy*. 2014. N 3(3). P. 78-90.
 103. 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. Vol. 5, N 6. P. 151-165.
 104. Bozhkov A. I., Ohiienko S. L., Kuznetsova Y. A., Bondar' A. Y., Marchenko V. P., Gumennaya M. S. Donor age affects on the «behavior» and the sensibility bone

- marrow cells in on copper ion of the primary culture // *Adv Gerontol.* 2017. N 30(3). P. 457-467.
105. Brian J. Y. Catalase and glutathione peroxidase mimics // *Biochem. Pharmacol.* 2009. Vol. 3. P. 285-96.
 106. Burkhead J. L., Lutsenko S. V. The Role of Copper as a Modifier of Lipid Metabolism // *INTECH.* 2013.P.41-63.
 107. Cavaillon J. M., Singer M. M. *Inflammation: From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic.* New York, 2018. 340 p.
 108. Chen S. X., Schopfer P. A. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase // *Eur J Biochem.* 1999. Vol. 260(3). P. 726 - 735.
 109. Claassen C. D. *Toxicology. The basic Science of poisons. I* : New York, Chicago, Toronto, London. 6th ed. 2001. 1236 p.
 110. Cloez-Tayarani I. A., Changeux J. P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective // *J. Leukoc. Biol.* 2007. N 3. P. 599-606.
 111. Cloëz-Tayarani I., Cardona A., Rousselle J. C., et al. Autoradiographic characterization of [3H]-5-HT-moduline binding sites in rodent brain and their relationship to 5-HT_{1B} receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997. Vol. 94(18). P. 9899-9904.
 112. Conforti A. A., Franco L. N., Milanino R. A., Totorizzo A. N. Copper metabolism during acute inflammation: studies on liver and serum copper concentrations in normal and inflamed rats // *Br. J. Pharmacol.* 1983. Vol. 79 (1). P. 45-52.
 113. Council Directive on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // *Official Journal.* 1986. N 358. P. 0001 - 0028.
 114. Cox D. W., Tumer Z. Y., Roberts E. A. *Copper transport disorders: Wilson's disease and Menkes disease* : New York : Springer-Verlag, 2000. P. 385-391.

115. Cumpstey A.I., Feelisch M. N. Free Radicals in Inflammation // Inducers and Sensors of Inflammation. 2017. Vol. 27. P. 695-726.
116. Cuzzocrea S. Neutrophils // Inducers and Sensors of Inflammation. 2017. Vol. 8. P. 253-272.
117. Estrada-Camarena E., Fernández-Guasti A., López-Rubalcava C. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test // Neuropsychopharmacology. 2003. N 28(5). P. 830-838.
118. Dadu R. T., Dodge R.W., Nambi V. J. Virani S. S., Hoogeveen R. C., Smith N. L., Chen F., Pankow J. S., Guild C., Tang W. H, Boerwinkle E., Hazen S. L., Ballantyne C. M. Ceruloplasmin and heart failure in the Atherosclerosis Risk in Communities study // Circ. Heart Fail. 2013. Vol. 6. P. 936-943.
119. Dale D. C., Boxer L. M., Liles W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes // Blood. 2008. Vol. 112(4). P. 935 – 945.
120. Danielle K. Y., Pelkonen O. J., Ahokas T. N. Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012. Vol. 44. P. 257-265.
121. Delavary B. M, van der Veer W. M, van Egmond M., Niessen F. B, Beelen R. H. Macrophages in skin injury and repair // Immunobiology. 2011. N 216. P. 753-762.
122. Deraison C. M., Bonnart C. N., Vergnolle N. A. Proteases // Inducers and Sensors of Inflammation. 2017. Vol. 27. P. 727 - 766.
123. Durdi Q. P., Rezvani T. J. Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozotocin–induced diabetic rats // Int. J. Diabetes & Metabolism. 2007. Vol. 15. P. 22-24.
124. Elton R. C., Garle M. J., Fry J. R. Glutathione depletion in a liver microsomal assay as an *in vitro* biomarker for reactive metabolite formation // Biomarkers. 2000. N 5(4). P. 285-294.
125. Eve A. R., Bibudhendra S. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper // Am J Clin Nutr. 2008. Vol. 88, N 3. P. 851-854.

126. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species // JCB. 2011. Vol. 194, N 1. P. 7-15.
127. Finkel T.R., Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // Nature. 2000. Vol. 408. P. 239-247.
128. Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow Ch. K. Copper: Toxicological relevance and mechanisms // Arch Toxicol. 2014. N 88(11). P. 1929-1938.
129. Ganaraja B., Pavithran P., Ghosh S. Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress // Indian J Med Sci. 2004. Vol. 58(4). P. 150-154.
130. Garbaraviciene J, Diehl S., Varwig D., Bylaite M., Ackermann H., Ludwig R.J., Boehncke W.H. Platelet P-selectin reflects a state of cutaneous inflammation: possible application to monitor treatment efficacy in psoriasis // Exp. Dermatol. 2010. Vol. 19, N 8. P. 736-741.
131. Gárriz A. J., Fresno P.S., Carriquiriborde P.R., Miranda L.A. Effects of heavy metals identified in Chascomús shallow lake on the endocrine-reproductive axis of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*) // General and Comparative Endocrinology. 2018. N 6. P. 1-11.
132. Gilfillan A. M., Austin S. J., Metcalfe D. R. Mast Cell Biology: Introduction and Overview // Adv Exp Med Biol. 2011. Vol. 716. P. 2-12.
133. Gladys W. X., Soman N. M., Abraham S. N. Mast Cells: Master Drivers of Immune Responses against Pathogens // Inducers and Sensors of Inflammation. 2017. Vol. 13. P. 273-288.
134. González M. L., Reyes-Jara A. Y., Suazo M. A., Jo W. J., Vulpe Ch. Y. Expression of copper-related genes in response to copper load // Am J Clin Nutr. 2008. Vol. 88, N 3. P.830 - 834.
135. Gordon S. Y., Martinez F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. // Immunity. 2010. Vol. 32. P. 593-604.
136. Graves D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology // J. Phys. D : Appl. Phys. 2012. Vol. 45. P. 26-30.

137. Guengerich P. F. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity // The AAPS Journal. 2006. N 8(1). P. 101-111.
138. Hatzimanikatis V., Chunhui Li, Ionita J., Broadbelt L. Metabolic networks: enzyme function and metabolite structure // Current Opinion in Structural Biology. 2004. Vol. 14. P. 300-306.
139. Hellman N. E., Gitlin J. D. Ceruloplasmin metabolism and function // Annu Rev Nutr. 2002. Vol. 22. P. 439 - 458.
140. Hellman N. E., Kono S. J., Mancini G. M., Hoogeboom A. J., de Jong G. J., Gitlin J. D. Mechanisms of Copper Incorporation into Human Ceruloplasmin // The Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277. P. 46632-46638.
141. Holland S. M., Freeman A., Bellanti J. A. Immunity to bacteria // Immunology. Clinical applications in health and disease. 2012. P. 429-456.
142. Homma-Takeda S., Nishimura Y., Watanabe Y., Imaseki H., Yukawa M. Stage-specific and age-dependent profiles of zinc, copper, manganese, and selenium in rat seminiferous tubules // Journal of Radioanalytical & Nuclear Chemistry. 2004. Vol. 259. P. 521-525.
143. Horn D., Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase // IUBMB Life. 2008. Vol. 60(7). P. 421-429.
144. Jaishankar M. J., Tseten T. Y., Anbalagan N. M., Blessy B. Y., Mathew B. B., Beeregowda K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals // Interdiscip Toxicol. 2014. N 7(2). P. 60-72.
145. Jingwen W., Jing J., Yang Z., Gajalakshmi V. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: A case-control study in an Indian population // Cancer Epidemiology. 2011. Vol. 35. P. 66-72.
146. Jones D. P. Redox theory of aging // Redox Biol. 2015. Vol. 5. P. 71-79.
147. Jones D. P. Radical-free biology of oxidative stress // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2008. Vol. 295. P. 849-868.

148. Kamatch S. A., Narayan K. A. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmatic reticulum of rat liver: a standart procedure for the isolation of microsomes // *Anal. Biochem.* 1972. N 48. P. 53-61.
149. Kelada S. N., Eaton D. L., Wang S. S. et al. The role of genetic polymorphisms in environmental health // *Environmental Health Perspectives.* 2003. Vol. 111 (81). P. 1055 - 1064.
150. Kim H. S., Kim Y. J., Seo R. Y. An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention // *J Cancer Prev.* 2015. Vol. 20 (4). P. 232-240.
151. Krishnamurthy P., Wadhwani A. Antioxidant Enzymes and Human Health // *Intech.* 2012. P. 13 - 25.
152. Kurguzova N. I., Bozhkov A. I., Nikitchenko Y. V. Al Begai M., Goltvyansky A. V., Alsardia M. M. A. and Bozhkov A. A. 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. 25-32.
153. Kwiecien S., Jasnos K., Magierowski M., Sliwowski Z., Pajdo R., Brzozowski B., Mach T., Wojcik D., Brzozowski T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury // *J. Physiol Pharmacol.* 2014. Vol. 65(5). P. 613 - 622.
154. Lazarchick J. R. Update on anemia and neutropenia in copper deficiency // *Curr Opin Hematol.* 2012. Vol. 19(1). P. 58 - 60.
155. Libby P., Ridker P. M., Hansson G. K. Inflammation in athero-sclerosis: from pathophysiology to practice // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009. Vol. 54, N 23. P. 2129–2138.
156. Litvinenko G. I., Shurlygina A. V., Dergacheva T. I., Mel'nikova E. V., Trufakin V. A. Chrono- and Immunocorrection of Inflammatory Disorders of Internal Reproductive Organs in Women of Reproductive Age // *Bull Exp Biol Med.* 2015 Vol.159. P.62 - 65

157. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J Biol Chem. 1951. Vol. 193(1). P. 265–75.
158. Lutsenko S. A., Barnes N. L., Bartee M. Y., Dmitriev O. Y. Function and regulation of human copper-transporting ATPases // Physiol Rev. 2007. Vol. 87. P. 1011-1046.
159. Mai H. J., Cachot J. Y., Brune J. K., Geffard O. T. et al. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) // Marine Pollution Bulletin. 2012. Vol. 64. P. 2663-2670.
160. Massie H. R., Aiello V. R., Banziger V. Iron accumulation and lipid peroxidation in aging C57BL/6J mice // Exp. Gerontol. 1983. N 18. P. 277-285.
161. McDonald B., Kubes P. Leukocyte Trafficking. Inflammatory Diseases of Blood Vessels. Canada, 2012. 28 p.
162. Murray P. J, Wynn T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nat. Rev. Immunol. 2011. N 11. P.723 - 737.
163. Nakagomi A., Seino Y., Endoh Y. et al. Upregulation of monocyte proinflammatory cytokine production by C-reactive protein is significantly related to ongoing myocardial damage and future cardiac events in patients with chronic heart failure // J. Card. Fail. 2010. Vol. 16, N 7. P. 562 - 571.
164. Netea M.G, Mantovani A. M. Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases. Adaptive characteristics of innate immune responses in macrophages. New York, 2014. P. 339-348.
165. Nimse S. B., Pal D. K. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms // The Royal Society of Chemistry. 2015. P. 27986-2006.
166. Nourshargh S. R., Hordijk P. L, Sixt M. N. Breaching multiple barriers: Leukocyte motility through venular walls and the interstitium // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. Vol. 11. P. 366 - 378.
167. Ohkawa H., Ohahi H. N., Jadi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal Biochem. 1979. Vol. 95. P. 351-358.

168. Persky E. E., Nikitina N. A., Naglov A. V., Kot J. G. Age features of induction and synthesis of intensity of certain processing steps of collagen in the connective tissue under the influence of mechanical loading // *Biologicheskii Vestnik*. 2006. Vol. 10. P. 126-129.
169. Quinn P. J. Is the Distribution of α -Tocopherol in Membranes Consistent with Its Putative Functions? // *Biokhimiya*. 2004. Vol. 69, N 1. P. 74-84.
170. Repetto F. F., Boveris A. T. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation // *Arch Toxicol*. 2010. Vol. 84(4). P. 255-262.
171. Reutova N. V. Mutagenic potential of some heavy metals // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2017. Vol. 7. P. 175-179.
172. Romanov A., Kratnov E., Romanova N. V., Patrunov N. Redox Regulation of Neutrophils and Monocytes in Different Types of Myocardial Infarction // *Russ J Immunol*. 2000. Vol. 5(4). P. 413-420.
173. Schumann G. H., Bonora R. A., Ceriotti F. E., Férard G. G., Ferrero A. et al. IFCC Primary reference Procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of γ -Glutamyltransferase // *Clin Chem Lab Med*. 2002. N 40. P. 734 - 738.
174. Serhan C.N, Dalli J.Y., Colas R. A, Winkler J. W, Chiang N. R. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids*. 2015. N 18(51). P. 397 - 413.
175. Shirley T. N., Bearda K. J., Pourahmada J. M., Moridania M. E., Eassonb E. J. et al. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes // *Chemico-Biological Interactions*. 2001. Vol. 130-132. P. 285-296.
176. Simon H. U., Haj-Yehia A. J., Levi-Schaffer F. R. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction // *Apoptosis*. 2000. Vol. 5 P. 415 - 418.

177. Singh K. B. Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: An update // Indian Journal of Medical Sciences. 2007. Vol. 61 (2). P. 102-116.
178. Stejskal V. N., Ockert K. J., Bjørklund G. G. Metal-induced inflammation triggers fibromyalgia in metal-allergic patients // Neuro Endocrinol Lett. 2013. N 34(6). P. 559 - 565.
179. Suzuki K. T., Someya A. Y., Komada Y. G., Ogra Y. N. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice // J Inorg Biochem. 2002. Vol. 88(2). P. 173-182.
180. Takashi I. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification // International Review of Cytology. 2007. Vol. 260. P. 35-112.
181. Tang L., Zhang Y., Qian Z., Shen X. The mechanism of Fe(2+)-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical // Biochem J. 2000. Vol. 352(1). P. 27-36.
182. Tang W. H., Wu Y. J., Hartiala J. W. et al: Clinical and genetic association of serum ceruloplasmin with cardiovascular risk // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012. Vol. 32. P. 516-522.
183. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology // Pathol Int. 1999. Vol. 49(2). P. 91-102.
184. Twomey P.J., Adie Viljoen A.W., House I.M., Reynolds T. M., Wierzbicki A. S. Relationship between Serum Copper, Ceruloplasmin, and Non-Ceruloplasmin-Bound Copper in Routine Clinical Practice. Clinical Chemistry August, 2005. Vol. 51, N 8. P. 1558-1559.
185. Usatenko M. S., Tsoncheva A. B. Effect of insulin deficit and hydrocortisone on the activity of NADP and NAD-dependent malate dehydrogenase in the liver and kidney cortex of rats // Voprosy meditsinskoy himii. 1974. N 20. P. 401-406.

186. Uttara B. T., Singh A. V, Zamboni P. D., Mahajan R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options // *Curr. Neuropharmacol.* 2009. N 7. P. 65-74.
187. 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.
188. Vivoli G. R., Bergomi M. A., Rovesti S. B., Pinotti M. D., Caselgrandi E. A. Zinc, copper, and zinc- or copper-dependent enzymes in human hypertension // *Biological Trace Element Research.* 1995. Vol. 49. P. 97 -106.
189. Walther D. J., Peter J. U., Bashammakh S. T. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform // *Science.* 2003. Vol. 299. P. 76.-78.
190. Wenjing Zh. G., Pengfei J. Y., Wei Ch.T. Genotoxicity of Copper Oxide Nanoparticles with Different Surface Chemistry on Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2016. Vol. 16, N 6. P. 5489-5497.
191. Wilson D. The Critical Role of Iodothyronine Deiodinase Enzymes in the Regulation of the Thyroid System // *Anti-Aging Therapeutics.* 2015. Vol. XVII. N 17. P. 225-229.
192. Winkler I. G, Sims N. A, Pettit A. R, Barbier V., Nowlan B., Helwani F., Lévesque J. P. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs // *Blood.* 2010. Vol. 116. P. 4815-4828.
193. World Health Organization 2014. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 : World Health Organization. Geneva, 2013. 78 p.
194. Wynn T. A, Chawla A. Y., Pollard J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease // *Nature.* 2013. Vol. 496. P. 445-455.
195. Zaheer N., Tewary K. K., Krishnan P. S. Mitochondrial forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase in rat liver // *Arch. Biochem. Biophys.* 1967. Vol. 120. P. 22-34.

196. Zhu B. Zh., Kalyanaraman B. K., Jiang G. B. Molecular mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals by hydrogen peroxide and halogenated quinones // PNAS. 2007. Vol. 104, N 45. P. 17575-17578.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у зарубіжних спеціалізованих виданнях:

1. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Al Begai Mohammad A.Y., **Alsardia Mohammad M. A.**, Kurguzova N. I. Low-molecular weight cow colostrum components in functional nutrition // Journal of Nutritional Therapeutics. 2017. Vol. 6, N 1. P. 11-17. (GoogleScholar, CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: визначенні активності показників антиоксидантної системи, визначення активності глутатіонпероксидази, статистична обробка даних).*
2. 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. (CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: виготовлення зразків для гістології, аналіз морфології печінки, визначення вмісту альбуміну, креатиніну, триглицеридів, холестеролів).*
3. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Kurguzova N. I., **Alsardia Muhammad M. A.**, Akzhigitov R.A., Baranikova S. Ya., Potapova V. I., Chuprikova A. S. The toxic effects of low molecular weight components of cow colostrums: the short-term and long-term effects // Journal of Nutritional Therapeutics. 2017. Vol. 6, N 4. P. 84-91. (CrossRef) *(Особистий внесок здобувача: визначення зміни маси органів (печінка, селезінки, нирок) в динаміці, статистична обробка даних).*
4. Божков А. И., Никитченко Ю. В., Климова Е. М., Ленъкевич Е. С., Лебедь Е. Н., Аль-Бахадли А. М. М., **Алсардиа М. М. А.** Молодые и старые животные используют различные метаболические стратегии адаптации к Cu-

індуцированному фіброзу печени // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. № 4. С. 555–566. (Pubmed). (Перевидана в: 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)). (*Особистий внесок здобувача: оцінка працездатності тварин, моделювання фіброзу печінки, визначення фагоцитарного індексу*).

5. 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. Vol. 5, N 6. P. 151-165. (Google Scholar, CrossRef). (*Особистий внесок здобувача: визначення фагоцитарного індексу, активності нейтрофілів, статистична обробка даних*).

6. Kurguzova Natalia Igorevna, Bozhkov Anatoliy Ivanovich, Nikitchenko Yuriy Viktorovich, Al Begai Mohammad Ali Yousef, Goltvyansky Anatoliy Vladimirovich, **Alsardia Mohammad Morshed Ayed**, Bozhkov Andrew Anatoliyovich. 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 6-1. P. 25-32. (CrossRef). (*Особистий внесок здобувача: вимірювання температури тіла тварин, виділення мітохондрій, визначення активності ферментів антиоксидантної системи, визначення кількості еритроцитів*).

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

7. **Алсардіа Мохаммад Моршед Айед** Дослідження гепатопротекторних властивостей препарату (фунгідол) при Cu-індукованому

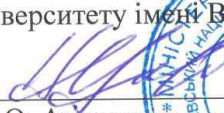
фіброзі // Молодь і поступ біології : XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 25-27 квітня 2017 р. : тези доп. Львів, 2017. С. 22-23.

8. 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 // Проблемы старения и долголетия : матеріали науково-практичної конференції «Здоров'я, харчування, довголіття» пам'яті проф. Ю. Г. Григорова (до 85-річчя від дня народження), 16—17 травня 2016 р. : тези доп. Київ, 2016. Т. 25, № 2. С. 345. (*Особистий внесок здобувача: визначення тривалості життя тварин після циклічного режиму харчування, фракціонування печінки, статистична обробка даних*).

ДОДАТОК 2

ЗАТВЕРДЖУЮ

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


М. О. Азаренков

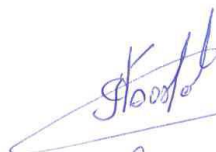


АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи МОХАММАД МОРШЕД АЕЙД АЛСАРДІА «Дослідження механізмів «відновлення» певних біохімічних показників біологічно активними сполуками після дії токсичних доз іонів міді» 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 навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Волкової Н. Є. та голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації МОХАММАД МОРШЕД АЕЙД АЛСАРДІА, а саме: взаємозв'язок показників про-антиоксидантної системи з фізіологічними особливостями та тривалістю життя експериментальних тварин (щурів) та механізми регуляції деяких показників про-антиоксидантної системи у тварин після інтоксикації сірчаною кислотою міддю біологічно активними речовинами впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті при розробці робочих програм нормативних дисциплін «Біохімія» та «Біотехнологія» для студентів, які навчаються за освітньою програмою «Біологія», та при розробці методичних вказівок для виконання лабораторних робіт з дисциплін «Біологія клітин» та «Біохімія» для студентів, які навчаються за освітньою програмою «Біотехнологія та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні освіти

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



А. І. Божков

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



Н. Є. Волкова

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



В. В. Мартиненко