

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

**ЛЕБІДЬ КАТЕРИНА МИКОЛАЇВНА**

УДК 577.24.:577.352.38

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

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового  
ступеня кандидата біологічних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Нікітченко Юрій Вікторович,**  
НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна  
Міністерства освіти і науки України,  
м. Харків  
завідувач відділу біофізики мембран

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Ушакова Галина Олександрівна**  
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара Міністерства освіти і науки України, м. Дніпро  
завідувач кафедри біофізики та біохімії

доктор біологічних наук, професор  
**Столяр Оксана Борисівна**  
Тернопільський національний університет імені Володимира Гнатюка  
Міністерства освіти і науки України, м. Тернопіль  
керівник науково-дослідної лабораторії порівняльної хімії та молекулярної біології

Захист відбудеться «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 р. о \_\_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-26

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

Автореферат розісланий \_\_.\_\_\_\_. \_\_\_\_\_ р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними фахівців, в останні роки спостерігається збільшення середньої тривалості життя людей в економічно розвинених країнах (Анісімов В. Н. та ін., 2017). Поряд з цією позитивною тенденцією проявився новий феномен збільшення числа вікзалежних патологій. Тому одним з актуальних завдань сучасної геронтології та геріатрії є дослідження механізмів цих патологій і розробка способів їх усунення. Розв'язання цього завдання сприятиме розумінню самих механізмів старіння, маючи не лише практичне, але й фундаментальне значення.

В ряді таких вік-залежних патологій як паркінсонізм, хвороба Альцгеймера, серцево-судинні та онкопатології, патології печінки займають досить велику частку, посилюючи також протікання інших захворювань. Як правило, ураження печінки, які виникають на пізніх етапах онтогенезу можуть індукуватися вірусними інфекціями, лікарськими препаратами, токсичними сполуками, що містяться в продуктах харчування та воді.

Одним з найбільш поширених токсичних чинників довкілля є іони міді (Valko M. et al., 2005; Halliwell B. et al., 2015). Показано, що інтоксикація організму іонами міді супроводжується розвитком фіброзу печінки (Божков А. І. та ін., 2017). Відомо, що ураження печінки різноманітними ксенобіотиками проявляються здебільшого у дорослих і старих організмів (Kuntz E., 2006; Indo H. P. et al., 2015). Тому дослідження біохімічних механізмів розвитку уражень печінки іонами міді у молодих і старих тварин може бути вдалим експериментальним підходом у вирішенні проблем виникнення вік-залежних патологій і механізмів старіння.

Відомо, що однією з «первинних» відповідей на токсичну дію ксенобіотиків є зміна рівноваги в прооксидантно-антиоксидантної системи (Li et al., 2015; Cichoż-Lach H. et al., 2014). Крім того, велика кількість експериментальних досліджень показує, що розвиток патологій печінки, пов'язане з проявом оксидативного стресу (Hernandez-Gea V. et al., 2011; Kim Y. W. et al., 2015). Однією з найбільш верифікованих гіпотез геронтології залишається вільнорадикальна гіпотеза старіння (Barja G. et al., 2016). У зв'язку з цим, дослідження показників про-антиоксидантної системи при вік-залежних ураженнях печінки іонами сірчаноокислої міді дозволяє вирішувати кілька важливих питань: встановлення механізмів розвитку вікзалежних патологій, ролі окисного стресу в цих процесах і його ролі в механізмах старіння.

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

Розробка та вивчення антидотів представляє великий інтерес як для перевірки ролі окисного стресу у розвитку патологій печінки, так і механізмів старіння. У якості можливих антидотів використовували низькомолекулярні компоненти з грибів видів *Pleurotus ostreatus* і *Sacharomyces cerevisiae* і коров'ячого молозива. Раніше було показано, що ці низькомолекулярні компоненти мають виражену біологічну дію (Kurguzova N. I. et al., 2015). Дослідження дії біологічно активних сполук у молодих і старих тварин є перспективним підходом у дослідженні механізмів старіння.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційні наукові дослідження проводились протягом 2014 – 2017 років у рамках тем планової наукової роботи НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Вживаність і стійкість тварин до дії стресових факторів за експериментального прискореного та уповільненого старіння» № 0115U000490; «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей» № 0115U000502.

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

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. З'ясувати вікові відмінності інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів, активності аконітази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, GSH-редуктаз та NADP-дегідрогеназ у печінці та крові тварин за умов інтоксикації сульфатом міді.
2. Дослідити динаміку змін інтенсивності процесів ПОЛ, активності аконітази, та активності антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки через 24 години, 1 місяць, 2 місяці після інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих тварин.
3. Провести порівняльний аналіз змін інтенсивності ПОЛ, активності аконітази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, GSH-редуктаз та NADP-дегідрогеназ у печінці та крові молодих і старих тварин при Cu- та CCl<sub>4</sub> –індукованому ушкодженні печінки.
4. Дослідити вплив циклічного режиму годування (ЦРГ) на показники про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов Cu- індукованого ушкодження печінки у молодих та старих тварин.
5. Дослідити вплив комплексу «Мікс-фактор» та комплексу низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива на інтенсивність процесів ПОЛ, активності аконітази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, GSH-редуктаз та NADP-дегідрогеназ у печінці та крові тварин різного віку в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді.

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

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

**Методи дослідження** – спектрофотометричні (для визначення вмісту

малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, ізоцитратдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, та малатдегідрогенази), метод диференціального центрифугування, статистична обробка даних за допомогою програми Microsoft Excel та програмного пакета Statistica 6.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Показано, що триразове введення експериментальним тваринам сірчаної кислоти міді в LD<sub>33</sub> з інтервалом 48 годин супроводжується ураженням печінки (фіброз), формування якого відбувається на фоні окисного стресу.

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

Вперше показано, що трикратне введення як сублетальних доз сірчаної кислоти міді так і тетрахлорметану індукує однотипні зміни вивчених показників про-антиоксидантного потенціалу.

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

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

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

**Практичне значення одержаних результатів.** У роботі з'ясовано деякі вікові закономірності змін показників прооксидантно-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді та перевірено способи корегування виявлених змін у печінці та крові тварин за умов гепатоінтоксикації сульфатом міді і при вік-залежних перебудовах. Ці дослідження можуть бути використані для вибору способів корегування порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу з урахуванням вікових особливостей організму та розробки методичних рекомендацій. Методичні та аналітичні підходи до вивчення вік-залежних відповідей показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу на гепатотоксичну дію ксенобіотиків та розробка способів корегування встановлених патологічних змін прооксидантно-антиоксидантного балансу впроваджені в навчальний процес біологічного факультету у рамках спеціального курсу:

«Молекулярна біологія» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загальних курсів біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Молекулярна біологія» та «Біотехнологія» згідно навчального плану (впровадження підтверджено відповідним актом).

**Біоетична експертиза.** Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних Законів України. Комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол №8 від 19.10.2017 р.).

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

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

**Публікації.** За результатами досліджень, наведених у дисертаційній роботі, опубліковано 10 наукових робіт, з яких: 5 статей у зарубіжних наукових фахових виданнях (з них 2 у виданні, що входить до наукометричної бази Scopus) та 5 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

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

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету і задачі дослідження, наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, наведено відомості про впровадження результатів роботи, наукові публікації та особистий внесок автора.

В огляді літератури проводиться аналіз сучасного стану знань щодо змін прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у печінці та крові тварин за умов природного, прискореного та уповільненого старіння, а також при індукованому дією ксенобіотиків ураженні печінки. Проаналізовано спектр існуючих способів корегування метаболічних порушень у печінці за допомогою антидотів прямої та функціональної дії, гепатопротекторів, аліментарних чинників та режимів харчування.

**Матеріали та методи дослідження.** Основні серії експериментів були проведені на щурах-самцях лінії Wistar. Щурів вирощували і утримували у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Дослідження виконані з дотриманням правил Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986) та вимог «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2011). Дослідження проводились у чотири етапи. У дослідженнях використовували білих щурів-самців лінії Wistar 3 місячного віку – («молоді») масою 270–290 г та 20 місячні («старі») масою 390–410 г. На першому етапі експериментальної роботи моделювали гепатоінтоксикацію дією  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{CCl}_4$ . При дослідженні змін інтенсивності ПОЛ та активності антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки тварини були розділені на контрольну та 3 піддослідні групи: 1 група (далі гр.) - контрольні інтактні тварини; 2 гр.- тварини, яким внутрішньобрюшинно вводили розчин сірчанокислої міді вранці до годування в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг/ 1 г печінки), що відповідає  $\text{LD}_{33}$  тричі з інтервалом 48 годин. Тварин декапітували під ефірним наркозом, отримували сироватку крові (3000 об/хв, 15 хв), мітохондріальну (10000 г 30 хв), цитозольну та мікросомальну фракції (100000 г 1 год.) клітин печінки методом диференціального центрифугування (Meddi E., 1979) і вимірювали ряд показників про-антиоксидантного балансу через 24 години, 1 місяць та 2 місяці після трикратного введення сірчанокислої міді. При моделюванні ураження печінки дією тетрахлорметану ( $\text{CCl}_4$ ) трикратно вводили *per os* 0,1 мг на 100 г маси тіла ( $\text{LD}_{33}$ ) 50 % масляного розчину 1 раз на день з інтервалом 48 годин. Декапітацію тварин та вимірювання показників про-антиоксидантного балансу проводили через 24 години після останнього введення токсиканту. На другому етапі досліджень перевіряли вплив циклічного режиму годування (ЦРГ) на стан показників про-антиоксидантного потенціалу в нормі та після Cu-індукованого пошкодження печінки. Тварини «контрольних груп» знаходилися на ЦРГ (режим годування, що включає два цикли 30 % втрати (за 14 днів) та відновлення маси тіла (за 14 днів) між якими є 30 денний період стандартного харчування віварію). Експериментальні групи – групи, що після інтоксикації сульфатом міді (3кратно  $\cdot \text{LD}_{33}$ ) переводились на ЦРГ. Третій етап досліджень включав вивчення дії комплексу низькомолекулярних компонентів з грибів видів *S. cerevisiae* та *P. ostreatus* «Мікс-фактор» (або Фунгідол) на показники про-антиоксидантного балансу. Тварини були розділені на 5 груп: 1 гр. контроль – інтактні тварини, 2 гр. – тварини з інтоксикацією сульфатом міді (розчин сірчанокислої міді вводили в дозі 1 мг / 100 г маси тіла (0,23 мг/ 1 г печінки), що відповідає  $\text{LD}_{33}$  тричі з інтервалом в 48 годин), 3 гр. – щури, що отримували «Мікс-

фактор» тричі *per os* з інтервалом в 24 години в дозі 4 мг / 100 г (або 0,5 мл розчину на 100 г м.т.), 4 гр. – отримували «Мікс-фактор» превентивно до трикратного введення сірчаноокислої міді, 5 гр. – отримували «Мікс-фактор» через 24 години після індукції інтоксикації сульфатом міді. Через 24 години після останньої маніпуляції проводили декапітацію тварин та вимірювання показників про-антиоксидантного балансу. На четвертому етапі експериментів досліджували вплив комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива (НКМ) на показники про-антиоксидантного потенціалу в нормі та при Cu – індукованому пошкодженні печінки. Тварини 3 та 20 місячного віку були розділені на 4 групи: 1 гр. – контрольна (інтактні тварини), 2 гр. – тварини, яким вводили тричі розчин сірчаноокислої міді у LD<sub>33</sub>, 3 гр. – тварини, яким вводили лише НКМ *per os* послідовно тричі з інтервалом 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мг / 100 г м. т., 4 гр. – тварини, яким триразово вводили розчин розчин сірчаноокислої міді (LD<sub>33</sub>), а потім через 24 години після третього введення розчину сірчаноокислої міді тричі НКМ *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г м.т. Через 24 години після останнього введення проводили декапітацію тварин та вимірювання показників про-антиоксидантного балансу. Стан прооксидантного потенціалу оцінювали за вмістом малонового діальдегіду у субклітинних фракціях клітин печінки за методом (Ohkawa H. et al., 1979) і сироватці крові за методом (Asakawa T., 1980) та активністю (далі акт.) аконітази у мітохондріях (Gardner J. et al., 1994). Антиоксидантний потенціал оцінювали за глутатіонпероксидазною акт. (Paglia D. et al., 1967) у сироватці крові, мітохондріях та цитозольній фракціях печінки; глутатіонредуктазною (Carlberg I. et al., 1975), ізоцитратдегідрогеназною (Bauman H., 1970), глюкозо-6-фосфатдегідрогеназною (Zaheer N., 1967), малатдегідрогеназною (Усатенко М. С., 1974) акт. у мітохондріях та цитозолі клітин печінки та акт. глутаредоксину (Raghavachari N., 1996) у мітохондріях клітин печінки. Визначення вмісту білка виконували за методом (Lowry O. et al., 1951), у модифікації (Miller G., 1959). Одержані результати обробляли статистично, розраховуючи t-критерій Ст'юдента за допомогою пакету програм Statistika 6. Аналіз достовірності виду розподілу признаку закону нормального розподілу проводили за допомогою критерія Шапіро-Уїлкі. Кореляційний аналіз здійснювали за Пірсоном. Достовірними різними вважалися результати при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

**I етап досліджень. Вік-залежні зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу у печінці та крові щурів при інтоксикації сульфатом міді та тетрахлорметаном.** Перший етап експерименту був присвячений дослідженню змін інтенсивності переокисного окиснення ліпідів та акт. антиоксидантних ферментів при Cu-індукованому ураженні печінки. Отримані дані показують, що інтоксикація сульфатом міді супроводжується дисрегуляцією про-антиоксидантного балансу і розвитком оксидативного стресу у мітохондріях клітин печінки (далі мх.) та сироватці крові (далі сир.) тварин обох вікових груп. Так, вміст малонового діальдегіду (далі МДА), що є маркерним показником вмісту гідроперекисів ліпідів, у сироватці крові 20 місячних контрольних

інтактних тварин був на 34 % ( $p < 0,05$ ) нижчим, ніж у 3 місячних (табл. 1), через 24 години після трикратного, з інтервалом 48 годин, введення  $LD_{33}$  сірчаноокислої міді підвищувався на 107 % як у молодих так і у старих щурів. Через 1 та 2 місяці після інтоксикації вміст МДА залишався підвищеним (на 40 %) у старих тварин, а у молодих не відрізнявся від рівня контролю (табл. 1).

Таблиця 1

**Вміст МДА (нмоль МДА/мл сир.) та активність глутатіонпероксидази (нмоль NADPH/хв/ мл сир.) у сироватці крові після інтоксикації сульфатом міді (n = 10- 12)**

П-к	вік	контроль	CuSO <sub>4</sub> (24год.)	CuSO <sub>4</sub> (1міс.)	CuSO <sub>4</sub> (2міс.)
МДА	3 міс	4,43 ±0,40	9,19±0,94*	4,77±0,32**	4,60±0,32
	20міс	2,93±0,51 <sup>a</sup>	6,08±0,43*	4,15±0,25*,**	4,03±0,14*,**
ГП	3 міс	3587,4±258,4	2808,1±211,6*	2684,7±321,2	2908±112,5
	20міс	5925,6±423,3 <sup>a</sup>	4565,6±303,7*	3437,3±523,0**	3389±265,9

Примітки: тут і далі \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні з гр. CuSO<sub>4</sub> (24год.), <sup>a</sup> -  $P < 0,05$  між контрольною групою 3 та 20 місячних тварин

При дослідженні акт. основного ферменту, який утилізує МДА у крові тварин – Se-глутатіонпероксидази (далі ГП), виявлено, що ГП-акт. у сир. старих контрольних тварин була істотно вище, ніж у молодих щурів (на 65 %), демонструючи зворотну кореляцію до вмісту МДА (МДА/ГП в сир.  $r = -0,521$ ;  $r = -0,542$ ;  $p < 0,001$  у молодих та старих щурів відповідно). У відповідь на введення доз сірчаноокислої міді ГП акт. знижувалась на 22 % та 23 % у обох вікових групах. Впродовж 1 та 2 місяців акт. ГП у сир. не досягла контрольного рівня і залишалась зниженою на 26 % та 20 % відносно контрольної групи відповідно (табл. 1). Вміст МДА у мх. молодих контрольних тварин був на 38 % вище, ніж у старих (табл. 2). Через 24 години після інтоксикації сульфатом міді вміст МДА у мх. зростав на 30 % у молодих і на 112 % у старих щурів. Через 1 та 2 місяці після впливу сульфату міді показники ПОЛ залишались підвищеними на 54 % та 61 % лише у старих тварин.

Аконітазна акт. (далі Асо) у мх., що за даними літератури знижується при окисному стресі (Матасова Л. В. и др., 2008), була на одному рівні у щурів обох вікових груп (табл. 2). У відповідь на дію сірчаноокислої міді через 24 години відбувалось зниження акт. аконітатгідратази у мх. печінки однаковою мірою у молодих і старих тварин на 45 % та 46 % (МДА/Асо в мх.  $r = -0,58$ ;  $r = -0,57$ ;  $p < 0,003$ ). Через 1 та 2 місяці відбувалось подальше зниження акт. аконітази відносно контрольної гр. на 59 % та 56 % у молодих та 71 % і 65 % у старих тварин (табл. 2). Збільшення вмісту МДА на фоні зниження акт. Асо може свідчити про руйнування  $[4Fe-4S]^{2+}$  кластеру мітохондріальної аконітази, виходу йонів заліза та індукції процесів ліпопероксидації.

**Вміст малонового діальдегіду (нмоль МДА/мг білку мх.) та активність аконітатгідратази (нмоль аконітату/хв/ мг білку мх.) у мітохондріях клітин печінки після інтоксикації сульфатом міді (n = 10-12)**

П-к.	вік	контроль	CuSO <sub>4</sub> (24 год.)	CuSO <sub>4</sub> (1місяць)	CuSO <sub>4</sub> (2місяці)
МДА	3 міс	0,257 ±0,023	0,333 ±0,021*	0,287±0,023**	0,298±0,031**
	20 міс	0,159 ±0,011 <sup>a</sup>	0,337 ±0,023*	0,246±0,008**	0,257±0,012*,**
Асо	3 міс	27,93±0,68	14,62±1,76*	11,39±0,62*	12,34±1,00*
	20 міс	28,47±3,20	15,81±2,90*	8,16±0,49*	10,21±0,90*

Акт. ГП у мх. печінки тварин контрольної групи була у 4 рази вище у старих тварин, порівняно з молодими. Через 24 години після впливу сірчаноокислої міді акт. цього ферменту знижувалась на 20 % у молодих та на 21 % у старих щурів (МДА/ГП в мх.  $r = -0,42$ ;  $r = -0,45$ ;  $p < 0,001$ ). Через 1 та 2 місяці показники залишалися сталими у 3 та 20-міс. щурів (табл. 3). Подібні зміни були зафіксовані і для акт. глутаредоксину (Grx), що наряду з ГП може виконувати функцію відновлення окислених продуктів ПОЛ. Акт. цього ферменту була у 2,7 рази вищою у старих тварин. Введення розчину сірчаноокислої міді через 24 години призводило до зниження акт. Grx<sub>2</sub> у молодих та старих щурів на 23 % та 36 % відповідно (МДА/Grx в мх.  $r = -0,50$ ;  $r = -0,54$ ;  $p < 0,011$ ). Через 2 місяці акт. Grx<sub>2</sub> у старих тварин залишалася достовірно нижчою за рівень інтактних тварин (на 17 %) (табл. 3). Зниження акт. ГП та Grx<sub>2</sub> свідчить про здатність йонів сульфату міді до прямого, чи опосередкованого інгібування акт. цих ферментів.

Таблиця 3

**Активність глутатіонпероксидази, глутаредоксину та глутатіонредуктази у мх. (нмоль NADPH/ мг білку мх.) після інтоксикації сульфатом міді (n = 10- 12)**

П-к.	вік	контроль	CuSO <sub>4</sub> (24 год.)	CuSO <sub>4</sub> (1міс.)	CuSO <sub>4</sub> (2міс.)
ГП	3 міс	94,3±4,5	75,9±5,2*	73,5±12,2*	69,6±11,1*
	20 міс	391,7±27,2 <sup>a</sup>	308,8±28,2*	304,0±10,8*	310,1±9,8*
Grx	3 міс	3,01 ±0,26	2,33±0,16*	2,86±0,32	2,59±0,12
	20 міс	8,30±0,50 <sup>a</sup>	5,36±0,58*	7,78±0,16	6,90±0,34*
ГР	3 міс	33,1±2,5	26,9±1,4*	31,6±1,8	30,5±1,5
	20 міс	21,1±2,1 <sup>a</sup>	20,4±1,0	21,6±1,2	20,2±1,2

Акт. ферменту, що забезпечує ГП та Grx<sub>2</sub> у мх. клітин печінки відновленим глутатіоном – глутатіонредуктази (далі ГР), показало, що її акт. у мх. старих контрольних щурів була на 36 % нижчою, ніж у молодих тварин. Під дією сульфату міді акт. ГР знижалась на 19 % лише у молодих щурів. Через 1 та 2 місяці цей показник сягав контрольного рівня ( $p < 0,05$ ) (табл. 3).

При дослідженні акт. NADP- ізоцитратдегідрогенази (далі ІЦДГ) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (далі Г6ФДГ) - ферментів, що забезпечують відновленим NADPH глутатіонредуктазу, встановлено, що у мх. клітин печінки старих

контрольних тварин акт. ЩДГ була на 39 % вище, ніж у молодих щурів, а акт. Г6ФДГ у мх. печінки контрольних молодих і старих щурів достовірних відмінностей не мала. У відповідь на дію сірчаноокислої міді через 24 години відбувалось зниження акт. ЩДГ на 28 % та 47 % у 3- та 20 міс. щурів відповідно. Наряду з цим, акт. Г6ФД у мх. навпаки зростала на 53 % у молодих та на 29 % у старих тварин, що свідчить про здатність іонів сульфату міді до інгібування ЩДГ та провідну роль Г6ФД у забезпеченні мітохондрій відновленням NADP за умов інтоксикації сульфатом міді. У цт. клітин печінки (далі цт.) вміст МДА під впливом LD<sub>33</sub> сірчаноокислої міді збільшувався і у молодих і у старих тварин на 79 % та 51 % відповідно (табл. 4). Акт. ГП у цт. старих тварин була вище на 80 %. Під дією LD<sub>33</sub> сірчаноокислої міді спостерігалось зниження акт. на 13 % у молодих та на 21 % у старих. Через 1 та 2 місяці акт. ГП залишалась зниженою на 10-15 % у обох піддослідних групах. Акт. ГР у цт. клітин печінки у молодих тварин була вище на 38 %. Після інтоксикації акт. знизилася на 16 % у молодих та на 15 % у старих. Після 1 та 2 місяців у молодих тварин акт. сягнула контролю, а у старих залишалась нижчою на 15 % до кінця експерименту. Акт. ЩДГ у цт. є вищою на 29 % у щурів 20-місячного віку. Після введення доз сірчаноокислої міді відбувалось зниження акт. цього ферменту на 26 % у молодих та на 18 % у старих тварин. Акт. Г6ФДГ у цт. змінювалась аналогічним чином з акт. цього ферменту у мх. Під дією сірчаноокислої міді акт. Г6ФДГ у цт. зростала на 37 % у молодих та на 29 % у старих.

Встановлене у дослідженні підвищення вмісту МДА у сир. крові та мх. клітин печінки, а також зниження акт. Асо, ГП, ЩДГ у щурів обох вікових груп після інтоксикації сульфатом міді свідчить про наявність окисного стресу у організмі тварин, що не нівелюється впродовж 2 місяців після інтоксикації та потребує екзогенного корегування.

Для визначення ступеню прооксидантної дії сірчаноокислої міді було проведено порівняльний аналіз дії досліджуваної речовини з дією CCl<sub>4</sub> (речовини з відомою гепатотоксичною дією) на стан показників про-антиоксидантного балансу молодих та старих щурів. Введення як сірчаноокислої міді так і тетрахлорметану призводило до активації процесів ПОЛ, про що свідчить підвищення вмісту малонового діальдегіду у сироватці крові у обох досліджуваних вікових групах тварин. У молодих на 107 % при інтоксикації сульфатом міді і на 100 % при CCl<sub>4</sub> -індукованій. У старих на 107 % при інтоксикації сульфатом міді і на 141 % при інтоксикації CCl<sub>4</sub> (p<0,05).

Акт. ГП у сироватці крові навпаки знижувалась під дією як доз сірчаноокислої міді так і тетрахлорметану. На 22 % та 26 % відповідно у 3 місячних та на 23 % і 28 % у 20 місячних тварин (p<0,05). Акт. у мх. під дією сульфату міді, знижувалась на 20 % у молодих, а також на 22 % у старих тварин, а під впливом CCl<sub>4</sub> на 23 % у 3 місячних і 25 % у 20-місячних щурів (p<0,05). У цт. клітин печінки молодих щурів акт. ГП під дією сульфату міді знижувалась на 13 % у молодих та на 21 % у старих (p<0,05). У відповідь на інтоксикацію CCl<sub>4</sub> відбувалось 15 % інгібування ГП акт. у 3-місячних та 18 % у 20 місячних (p<0,05). Часткового інгібування акт. зазнала також мітохондріальна ізоформа глутатіонредуктази (ГР). У молодих тварин встановлено зниження цієї акт. на 19 % під дією сульфату міді, а у старих на 17 %. Під дією CCl<sub>4</sub> у 3 місячних тварин відбувалось інгібування акт. ГР на 24 %, у 20-місячних на 19 % у

мх. ( $p < 0,05$ ). Акт. цитозольної ізоформи ГР достовірних змін не зазнала.

Тож, введення як сірчаноокислої міді так і  $CCl_4$  вуглецю активує процеси вільнорадикального окислення ліпідів у печінці експериментальних тварин. Так Су-індуковане пошкодження печінки щурів може розглядатися як приклад вільнорадикальної патології і використовуватися в якості моделі *in vivo* для відбору речовин і субстанцій з потенційною антиокисною акт. у тварин різних вікових груп.

**II етап досліджень. Вік-залежний вплив циклічного режиму харчування на стан про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді.**

Обмеження калорійності харчування в рамках калорійно обмеженої дієти (далі КОД) є одним з найбільш верифікованих методів збільшення тривалості життя тварин у експерименті. Одним з головних чинників впливу КОД на рівні клітини є здатність до ослаблення окисного стресу. Однак ефективність дії КОД на тривалість життя спостерігається при переведенні на цю дієту лише молодих тварин. У НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна була розроблена схема циклічного режиму годування (далі ЦРГ) (що включає 2 цикли 30 % втрати і відновлення маси тіла), та у попередньому експерименті впливала на вивчені при КОД параметри про-антиоксидантного балансу як у молодих, так і у старих тварин і збільшувала їх тривалість життя (Bozhkov A. I. et al., 2014). У молодих та старих тварин при переведенні на ЦРГ при першій 30% втраті м. т. відбувалося підвищення вмісту МДА у сир. крові, мх, мс. та цт. клітин печінки; підвищення глутатіонпероксидазної акт. у сир., мх. та цт. клітин печінки у тварин обох вікових груп; підвищення глутатіонредуктазної акт. та зниження акт. NADP-дегідрогеназ у цитозольній фракції. При відновленні маси тіла піддослідних тварин майже всі визначені показники сягали значень 3 міс. контролю. При другому циклі 30% втрати маси тіла відповідна реакція визначених показників про-антиоксидантного балансу у молодих тварин була аналогічною з першим циклом. Натомість за більшістю показників у старих тварин достовірної варіабельності не спостерігалось, окрім глутатіонпероксидазної акт. у мх., яка достовірно підвищувалася на всіх етапах експерименту, що може свідчити про есеціальну роль цього фермента у підтримці гомеостазу клітин печінки старих тварин при стресових умовах, викликаних аліментарними чинниками. Після проходження двох циклів ЦРГ всі вивчені показники крім ГП в мх. та МДГ в цт. сягали рівня 3 міс. контролю. Тож встановлено, що зміни показників про-антиоксидантного балансу при ЦРГ носять вік-залежний характер. Адаптивні реакції, що відбуваються впродовж 2 циклів втрати та відновлення маси тіла призводять до активації показників системи антиоксидантного захисту і цей механізм може бути застосований як спосіб активації захистних механізмів при корегуванні пошкоджень печінки, що спричинені активацією окисних механізмів, зокрема ПОЛ, що як показано на першому етапі експериментів супроводжує Су-індуковане ураження печінки.

При інтоксикації сульфатом міді через 24 год. вміст МДА в мх. збільшувався на 30 % у молодих та на 112 % у старих щурів (табл. 1, 2). Переведення тварин з інтоксикацією на ЦРГ супроводжувалося нормалізацією вмісту МДА у мх. та цт. печінки молодих щурів (рис. 3 А, Б). Акт. аконітази у мх. молодих тварин, при інтоксикації сульфатом міді через 24 години знижувалася у молодих і старих тварин

на 45 % та 46 % відповідно (табл. 1, 2). Після проходження ЦРГ активність Асо у молодих тварин з інтоксикацією призводить до нормалізації значень у тварин обох вікових груп (рис. 3А, Б).

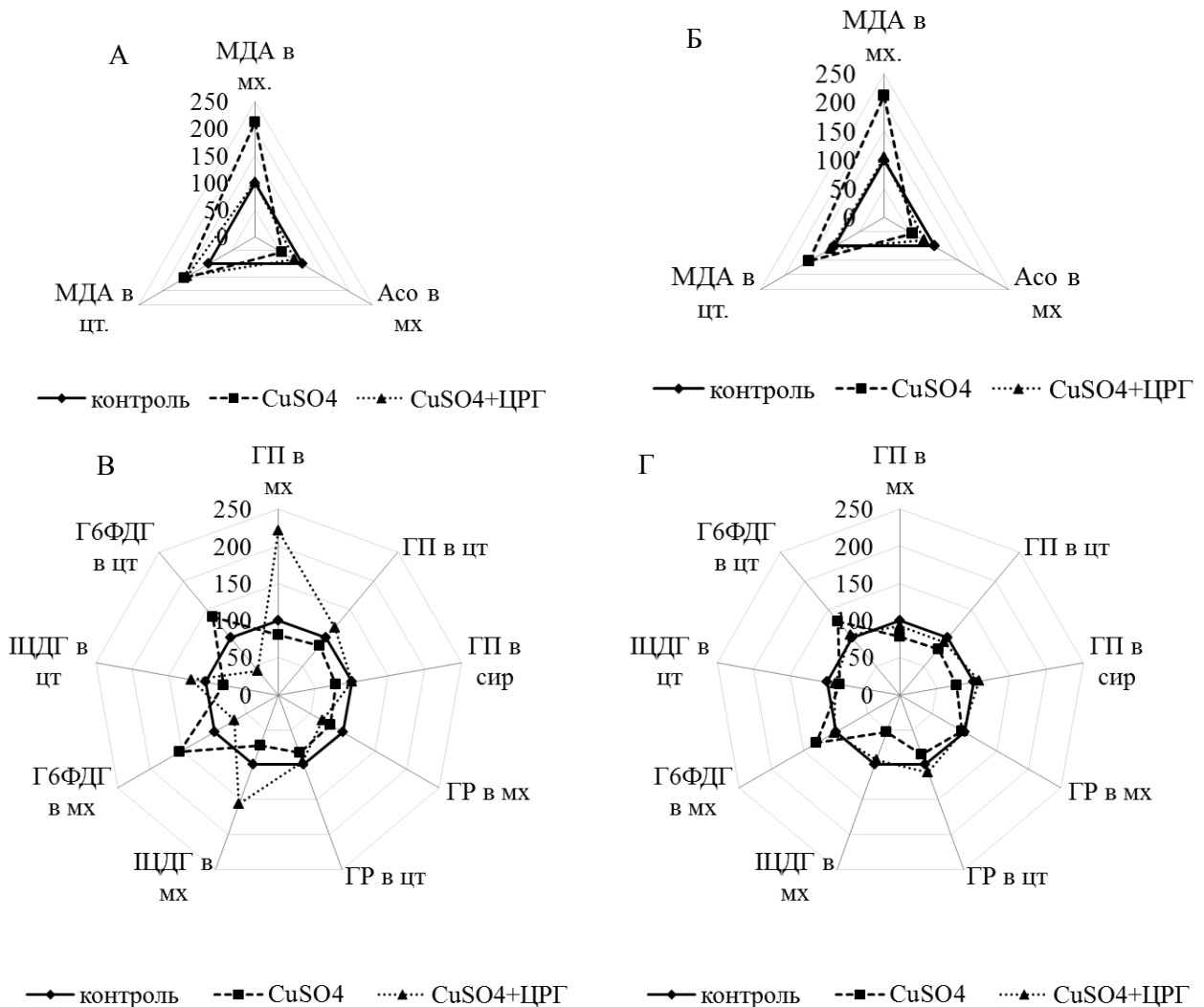


Рис. 3 Відносний вміст продуктів ПОЛ у мх. та цт. клітин печінки і сир крові та аконітазна акт. у мх. печінки молодих (А) і старих (Б) тварин та акт. АО ферментів при застосуванні ЦРГ 3- (В) та 20-міс. (Г) щурам при після інтоксикації сульфатом міді

ГП акт. у мх. печінки через 24 години після впливу сульфату міді знижувалась на 20 % у молодих та на 21 % у старих. Після проходження 2х циклів ЦРГ у старих тварин показник сягав значень контрольної групи, а у молодих акт. залишалась у 2 рази вищою від значень контролю. Виявлене збільшення ГП акт., обумовлене втратою м. т. у щурів, з попереднім введенням сірчанокислої міді, узгоджується з даними про зміни вмісту МДА. Тож можна припустити, що ЦРГ має стимулюючу дію на глутатіонпероксидазну акт. у мх. клітин печінки, та здатен нівелювати інгібування ГП акт., що відбувається при Cu – індукованому пошкодженні печінки. Акт. глутатіонредуктази, що під дією сульфату міді знижувалась на 19 % у молодих, а у старих достовірних змін не зазнавала, також сягала значень контролю після

проходження 2х циклів ЦРГ. Акт. ЩДГ у мх. у відповідь на дію сульфату міді через 24 години знижувалась на 28 % та 47 % (табл. 4). Після проходження ЦРГ у 3-міс. щурів ця активність зростала в 1,5 рази, а у старих тварин нормалізувалася (рис. 3Б). При дослідженні ГП акт., що зазнавала інгібування у сир. крові та цт. печінки після введення сірчаноокислої міді встановлено, що переведення на ЦРГ приводило до нормалізації ГП акт. у тварин обох вікових груп. ЩДГ акт. у цт. печінки молодих тварин після переведення на ЦРГ нормалізувалася, а у старих не досягала рівня інтактної групи. Г-6-ФДГ акт. у цт. та мх. молодих тварин після проходження ЦРГ була нижчою за контрольні значення та нормалізувалася у старих тварин.

Так, встановлено, що зміни про-антиоксидантного балансу, що виникають під дією ЦРГ виступають у ролі адаптивного процесу, який, завдяки своєму регуляторному впливу на інтенсивність процесів ПОЛ, стан мембранної проникності і модуляцію ферментативної акт., забезпечує можливість більш ефективної адаптації клітин до інтоксикації сульфатом міді та після проходження двох циклів ЦРГ нормалізує більшість вивчених показників про-антиоксидантного потенціалу у старих тварин, а у молодих після проходження ЦРГ з попереднім введенням сірчаноокислої міді стан прооксидантно-антиоксидантного балансу залишається дещо зрушеним у бік антиоксидантного потенціалу (підвищена глутатіонпероксидазна акт. у мх, цт. печінки та сир. крові та ізоциторадегідрогеназна акт. у мх клітин печінки; вміст МДА в мс. та мх. печінки нижче рівня контролю), що дає змогу припустити властивості ЦРГ як способу для усунення низки вивчених ефектів при інтоксикації сірчаноокислою міддю.

### **III етап досліджень. Вік-залежний вплив комплексів «Мікс-фактор» та НКМ на стан про-антиоксидантного балансу в нормі та за умов інтоксикації сульфатом міді**

У дослідженнях, проведених у 2012-2013 р. у НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна було встановлено, що комплекс низькомолекулярних речовин «Мікс-фактор» (або Фунгідол) з грибів роду *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* має антирадикальні та антитоксичні властивості у системі *in vitro* (Божков А. І. та ін., 2013). Проведені *in vivo* дослідження стану прооксидантного потенціалу в мх. печінки молодих щурів дозволили встановити, що трикратне введення комплексу «Мікс-фактор» у дозі 4 мг / 100 г за 24 години до інтоксикації сірчаноокислою міддю сповільнювало збільшення вмісту МДА у мх. молодих і старих тварин (на 19 % і 38 % відповідно) ( $p < 0,05$ ) (рис. 4А, Б).

Подібні зміни вмісту цих продуктів ПОЛ виявлено і у тварин, що 3 разово з інтервалом 24 години отримували «Мікс-фактор» після 3х-кратного введення LD<sub>33</sub> сірчаноокислої міді. Так у молодих щурів при введенні комплексу «Мікс-фактор» після інтоксикації сульфатом міді, вмісту МДА у мх. печінки нормалізувався, а у старих тварин залишався дещо вище рівня контролю (рис. 4А, Б). Виявлене уповільнення накопичення продуктів ПОЛ при застосуванні «Мікс-фактора» після інтоксикації може пояснюватися здатністю цього біологічно-активного комплексу проявляти властивості стимулювання антиоксидантного потенціалу, встановлене у підготовчому експерименті (виявлено, що 3х-кратне введення «Мікс-фактора» щурам знижувало вміст МДА у мх. печінки молодих тварин на 25 % та устарих на

25 % у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ). Трикратне введення «Мікс-фактора» після 3х-кратного введення розчину сірчаною кислотою міді нівелювало достовірне зниження ГП акт. у мх. молодих тварин, що отримували дози сірчаною кислотою міді (рис. 4В, Г), ГП акт. у 20 місячних щурів залишалась нижчою від рівня контролю ( $p < 0,05$ ).

Інтоксикація сульфатом міді приводила до зниження акт. Gtx у мх. молодих щурів на 23 %, а у старих на 35 % у порівнянні з контролем. Введення «Мікс-фактора» після 3х-кратного введення доз сірчаною кислотою міді у молодих щурів нормалізувало досліджувану активність, а у старих достовірних змін встановлено не було.

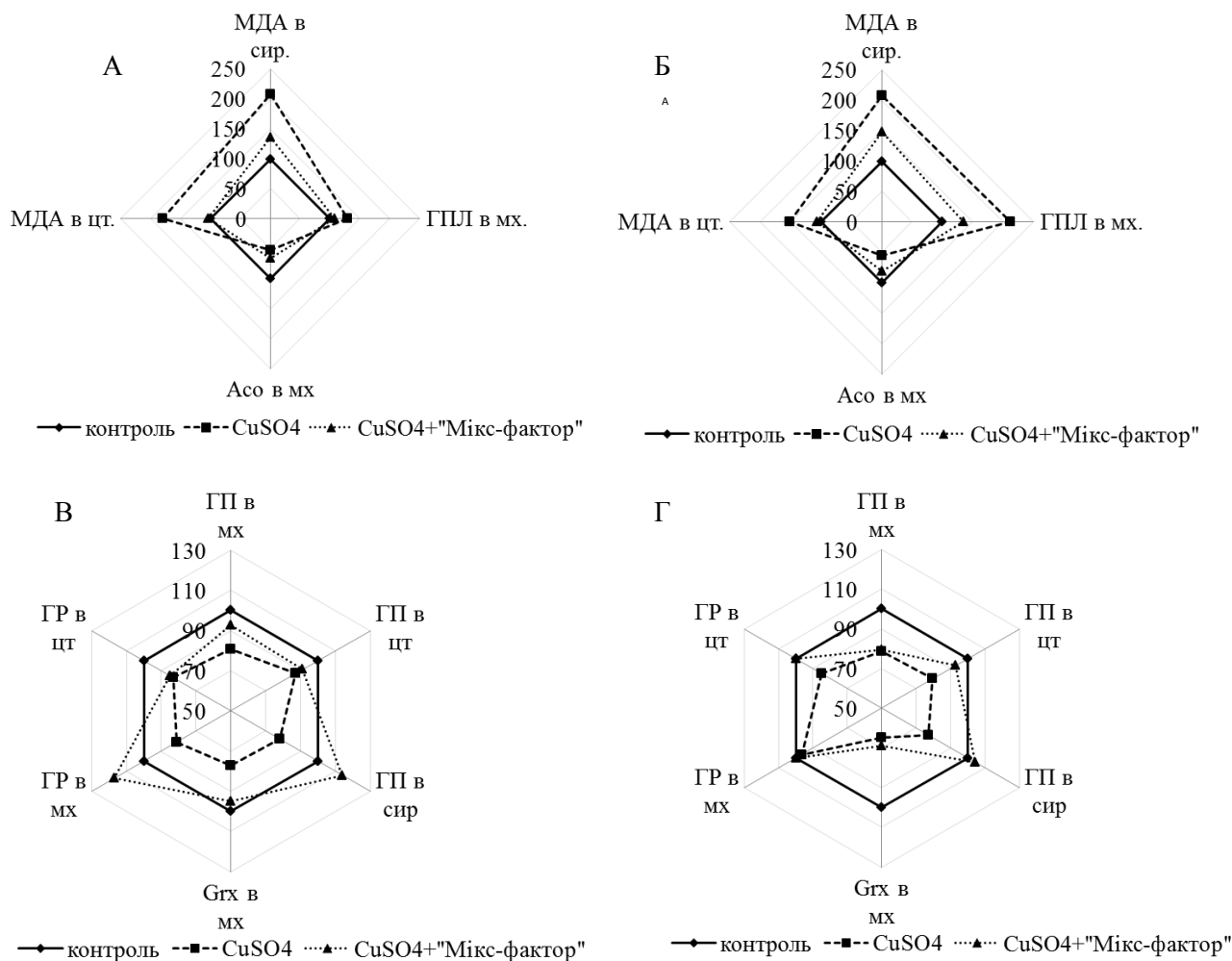


Рис. 4 Відносний вміст МДА у мх. та цт. клітин печінки і сир. крові та аконітазна акт. у мх. печінки 3 м (А) і старих (Б) тварин та акт. антиоксидантних ферментів при застосуванні «Мікс-фактора» 3- (В) та 20-місячним (Г) щурам після інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

У сироватці крові щурів обох вікових груп вміст МДА після трикратного введення LD<sub>33</sub> доз сірчаною кислотою міді підвищувався на 107 %. При застосуванні «Мікс-фактора» після інтоксикації вміст МДА був нижчим на 65 % від групи що отримувала сульфат міді (рис. 4А, Б). У старих тварин вміст МДА знижувався на 29 % (при введенні «Мікс-фактора» після дії сульфату міді) у порівнянні з групою, що отримувала ураження сульфатом міді ( $p < 0,05$ ).

ГП акт. у сир., що у відповідь на введення доз сульфату міді знижувалася на 22 % та 23 % у обох вікових групах щурів, при застосуванні «Мікс-фактора» зростала акт. як відносно групи, що отримувала сірчаноокислу мідь так і відносно групи контролю, що може слугувати адаптивною реакцією у даному випадку гепатоінтоксикації. У старих тварин було встановлено ефект нормалізації ГП акт. у сир. крові при застосуванні після інтоксикації сульфатом купруму. Так, можна зазначити, що застосування «Мікс-фактора» після інтоксикації проявляє протекторний ефект щодо змін індукованих введенням сірчаноокислої міді.

У цт. печінки вміст МДА під дією LD<sub>33</sub> сульфату міді збільшувався у молодих та старих тварин на 79 % та 51 % відповідно (рис. 4А, Б). При застосуванні «Мікс-фактора» після інтоксикації цей показник зменшувався на 12 % та 30% у молодих та старих щурів відповідно відносно групи з CuSO<sub>4</sub> (p<0,05).

Акт. Se-ГП у цт. у під дією LD<sub>33</sub> сірчаноокислої міді через 24 години після останнього введення знижувалася на 13 % у молодих та на 21 % у старих (рис. 4В, Г). При застосуванні «Мікс-фактора» після інтоксикації достовірних змін акт. відносно контролю не було виявлено у обох вікових групах тварин. При застосуванні комплексу «Мікс-фактор» після інтоксикації достовірних змін ГР акт. у цт. відносно контролю не було виявлено у обох вікових групах тварин (рис. 4В, Г).

Так встановлено, що комплекс «Мікс-фактор» здатний знижувати інтенсифікацію ПОЛ та інгібування акт. вивчених антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді. Більш виражений протекторний ефект «Мікс-фактор» виявляв щодо прооксидантного потенціалу (вміст МДА і аконітазна акт.), що може пояснюватися його антиокисним та антирадикальним ефектом, встановленим раніше у НДІ біології в умовах *in vitro*.

При дослідженні здатності до корегування порушень про-антиоксидантного балансу при інтоксикації сульфатом міді у молодих та старих тварин за допомогою комплексу *низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива (НКМ)*, що у експериментах *in vitro* виявляв антирадикальну та антитоксичну дію (Божков А. І. та ін., 2015) встановлено, що застосування НКМ призводить до нормалізації вмісту МДА та ГП акт. у сироватці крові, МДА та Асо акт. у мх. печінки до рівня контрольної групи у 3- та 20-місячних щурів при інтоксикації сульфатом міді (рис. 5А, Б).

У молодих тварин вживання НКМ призводило до нормалізації акт. Асо у мх. печінки до рівня контрольної групи. У старих тварин після застосування НКМ після введення сірчаноокислої міді аконітатгідратазна акт. залишалась на 17 % нижчою від рівня контролю (але була достовірно вище відносно групи з інтоксикацією). Застосування НКМ призвело до зростання ГП акт. у мх. на 96 % та 37 % відносно групи тварин, що отримували сульфат міді, та на 58 % (p<0,05) у молодих та 8 % (p>0,05) у старих тварин відносно контрольної групи. Нормалізація порушень, що спостерігались при інтоксикації сульфатом міді зниження акт. на 19 % у молодих тварин спостерігалась і для акт. ГР (рис. 5В, Г).

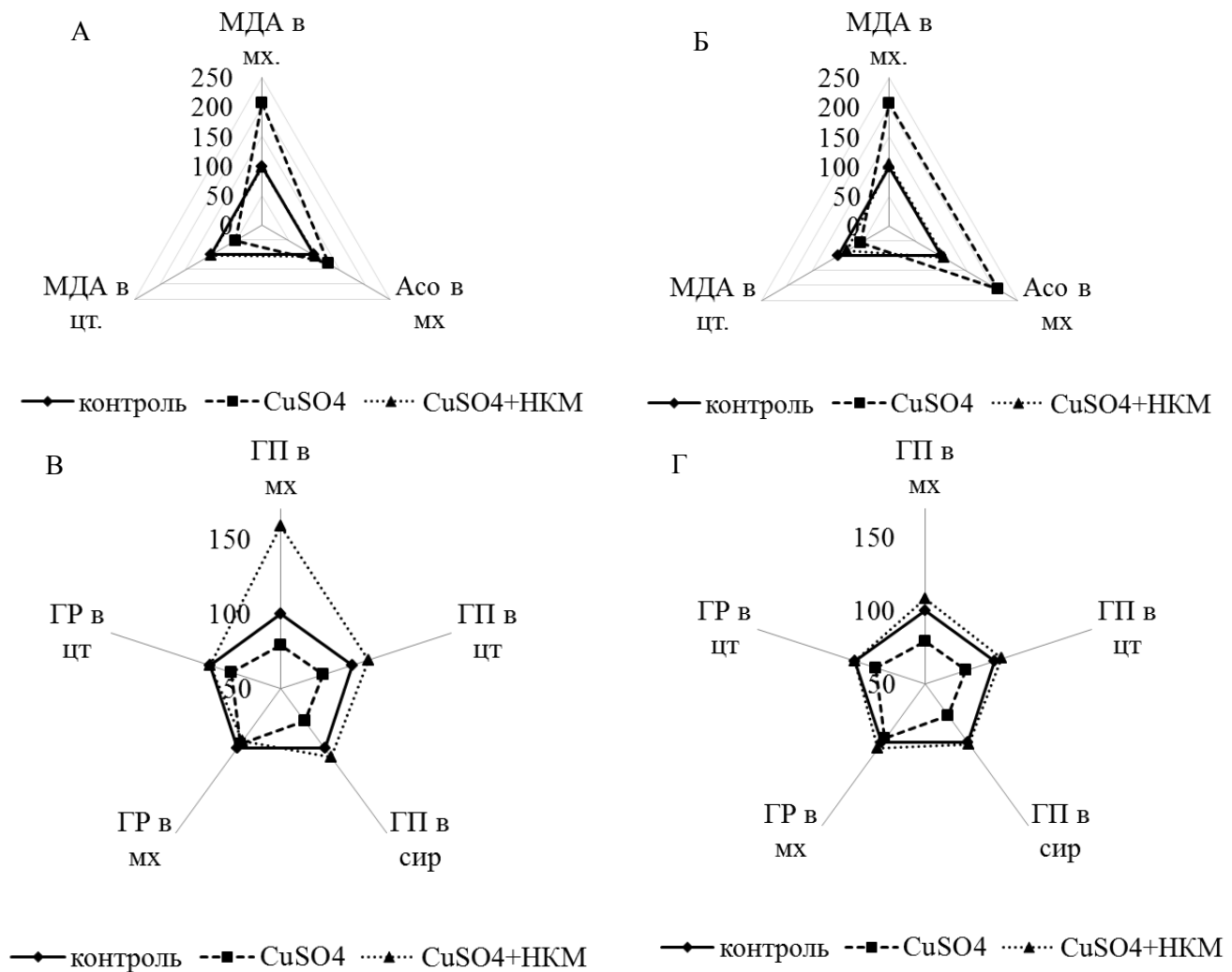


Рис. 5 Відносний вміст продуктів ПОЛ у мх. та цт. клітин печінки і сиворотці крові та аконітазна акт. у мх. печінки молодих (А) і старих (Б) тварин та акт. антиоксидантних ферментів при застосуванні НКМ 3- (В) та 20-місячним (Г) щурам після інтоксикації сульфатом міді (n=10-12)

Під час вивчення змін акт. антиоксидантних ферментів у цт. клітин печінки встановлено, що під дією  $LD_{33}$  сірчаноокислої міді спостерігалось зниження акт. на 13 % у молодих та на 21 % у старих, а акт. глутатіонредуктази на 16 % та 15 % у 3- та 20-місячних щурів. Застосування комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива призводило до нормалізації цих змін відносно контролю за обома показниками у обох вікових групах тварин.

Так, виявлено, що комплекс комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива здатний чинити корегуючу дію при патологічних змінах досліджених показників прооксидантно-антиоксидантного балансу, які відбуваються при  $Cu$ -індукованому ураженні печінки як у молодих так і у старих тварин, та розглядатися у ролі субстанції - антидоту функціональної дії у відношенні змін, що супроводжують інтоксикацію сульфатом міді.

## ВИСНОВКИ

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

Основні результати дисертаційних досліджень:

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

2. Інтоксикація трикратним введенням LD<sub>33</sub> сірчаноокислої міді через 24 години у молодих та старих щурів супроводжується аналогічними змінами показників про-антиоксидантного балансу: інтенсифікацією процесів ПОЛ на фоні інгібування активності глутатіонпероксидази, глутаредоксину і ізоцитратдегідрогенази, а також підвищенням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у мітохондріях та цитозолі клітин печінки.

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

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

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

6. Показано, що переведення тварин з Cu-індукованим пошкодженням печінки на циклічний режим годування після проходження двох циклів циклічного режиму

годування нормалізує більшість вивчених показників про-антиоксидантного потенціалу у старих тварин, а у молодих індукує зрушення у бік антиоксидантного потенціалу.

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

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:*

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

Decaying Age-Dependent Oxidative Stress and Regulates the Cell Chain of the Immunity // *Advances in Aging Research*. 2016. N 5. P. 151–165. *“Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експерименту (вимірюванні фізіологічних показників, вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази та глутатіонпероксидази), участь у обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті”*.

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

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

6. **Лебедь Е. Н.**, Афанасьева А. В. Влияние комплекса «Фунгидол» на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса у животных с избыточным питанием в раннем периоде постнатального онтогенеза // *Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів XI міжнародної конференції молодих вчених, 29 листопада–2 грудня 2016 р. Харків, 2016. С. 11. “Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, написання тез”*.
7. Кургузова Н. И., Бондарь В. В., **Лебедь Е. Н.**, Аль Бегаи М. А. Ю., Алсардиа М. М. А. Возрастзависимый характер проявления оксидативного стресса при циклическом режиме кормления // *Здоров'я, харчування, довголіття: збірник матеріалів науково-практичної конференції, 16–17 травня 2016 р. Київ, 2016. С. 345. “Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів”*.
8. **Лебедь Е. Н.**, Афанасьева А. В., Гаевой С. С. Низкомолекулярные компоненты молозива регулируют активность показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса крови крыс // *Біологія: від молекули до біосфери: збірник матеріалів міжнародної конференції молодих вчених, 2–4 грудня 2015 р. Харків, 2015. С. 15–16. “Особистий внесок здобувача: вимірювання вмісту малонового діальдегіду, активності аконітатгідратази, глутатіонпероксидази, глутаредоксину, глутатіонредуктази, обговоренні та інтерпретації результатів, написання тез”*.
9. Никитченко И., Боцула И., **Лебедь Е.**, Никитченко Ю. Изменение активности глутаредоксинов и глутатионпероксидаз в митохондриях печени крыс в процессе постнатального онтогенеза // *Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: збірник тез міжнародної наукової конференції, 24–25 вересня 2015 р. Дніпро, 2015. С. 134–135. “Особистий внесок здобувача: вимірювання активності глутатіонпероксидази та глутаредоксину, обговоренні та інтерпретації результатів”*.

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

#### АНОТАЦІЯ

**Лебідь К. М.** Дослідження біохімічної відповіді молодих і старих тварин на гепатотоксичну дію сірчаноокислої міді та вплив біологічних антидотів. - На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, Харків, 2018.

Встановлено, що триразове введення LD<sub>33</sub> сірчаноокислої міді та тетрахлорметану в LD<sub>33</sub> з інтервалом 48 годин супроводжується розвитком ураження печінки, формування якого відбувається на фоні прояву окисного стресу, що включає інтенсифікацію перекисного окиснення ліпідів, зниженням активності ряду глутатіон та NADP – залежних антиоксидантних ферментів. Для молодих та старих тварин зареєстровано однотипні зміни показників прооксидантно-антиоксидантного балансу через 24 години після інтоксикації. Відмінності у метаболічних реакціях виявлені у період корегування організмом патологічних змін (як тих, що відбуваються у організмі в нормі впродовж 1 та 2 місяців після інтоксикації, так і при застосуванні протекторних засобів). Переведення тварин з Cu-індукованим пошкодженням печінки на циклічний режим годування після проходження двох циклів ЦРГ нормалізує більшість вивчених показників прооксидантно-антиоксидантного потенціалу у старих тварин, а у молодих індукує зрушення балансу у бік антиоксидантного потенціалу. Встановлено, що комплекс «Мікс-фактор» здатний знижувати інтенсифікацію ПОЛ та інгібування активності вивчених антиоксидантних ферментів при інтоксикації сульфатом міді. Досліджено, що комплекс низькомолекулярних речовин з коров'ячого молозива здатний до корегування патологічних змін прооксидантно-антиоксидантного балансу у мітохондріях та цт. клітин печінки як 3- так і 20-місячних щурів.

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

#### АННОТАЦИЯ

**Лебедь Е. Н.** Исследование биохимического ответа молодых и старых животных на гепатотоксическое действие сульфата меди и влияние биологических антидотов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. - Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины, Харьков, 2018.

Установлено, что трехкратное введение экспериментальным животным сернистой меди и тетрахлорметана в LD<sub>33</sub> с интервалом 48 часов сопровождается развитием повреждения печени, формирование которого происходит на фоне интенсификации ПОЛ, снижения активности ряда GSH и NADP - зависимых антиоксидантных ферментов. Перевод животных с Cu-индуцированным

повреждением печени на циклический режим кормления после прохождения двух циклов ЦРК нормализует большинство изученных показателей про-антиоксидантного потенциала у старых животных, а у молодых индуцирует сдвиг баланса в сторону антиоксидантного потенциала. Установлено, что комплекс «Фунгидол» способен снижать интенсификацию ПОЛ и ингибирование активности изученных антиоксидантных ферментов при интоксикации сульфатом меди. Доказано, что субстанция НКМ способна корректировать изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса в мх. и цт. клеток печени как 3 так и 20-месячных крыс при интоксикации организма серноокислой медью.

**Ключевые слова:** прооксидантно-антиоксидантный баланс, возраст, серноокислая медь, гепатотоксичность, циклический режим кормления, Фунгидол, молозиво.

### SUMMARY

**Lebid K. M. Investigation of the biochemical response of young and old animals to the hepatotoxic action of copper sulfate and the effect of biological antidotes. – Manuscript.**

Dissertation for a Candidate's of Biological Sciences degree by speciality: 03.00.04 – biochemistry. – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2018.

It has been established that three times administration of LD<sub>33</sub> copper sulfate and carbon tetrachloride in LD<sub>33</sub> with an interval of 48 hours is accompanied by the development of liver damage, which takes place against the backdrop of oxidative stress, which includes the intensification of lipid peroxidation, a decrease in the activity of a number of glutathione and NADP - dependent antioxidant enzymes. For young and old animals, the same changes in the prooxidant-antioxidant balance are recorded 24 hours after intoxication. Differences in metabolic reactions are detected during the period of the body's correction of pathological changes (as those occurring in the body in the normal course of 1 and 2 months after intoxication and with the application of protective agents). The transfer of animals with Cu-induced liver damage to cyclic feeding regimen after two cycles of cyclic feeding regimes normalizes most of the studied prooxidant-antioxidant potential in older animals, and induces a shift in the balance of the antioxidant potential in young ones. It was established that the complex "Fungidol" is able to reduce the intensification of lipid peroxidation and inhibition of the activity of the antioxidant enzymes studied in case of intoxication with copper sulfate. It was investigated that a complex of low molecular weight substances from cow colostrum is capable of correction of pathological changes of prooxidant-antioxidant balance in mitochondria and cytosol of liver cells in both 3 and 20-month rats.

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