

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

МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ

УДК 577.1:615.099:591:546.56

**ВІК-ЗАЛЕЖНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОЯВУ ГОРМЕЗИСУ ДО
ІОНІВ МІДІ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата
біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Божков Анатолій Іванович
НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України, м. Харків
директор,
завідувач кафедри молекулярної біології та біотехнології

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 медичних наук, професор
Наконечна Оксана Анатоліївна
Харківський національний медичний університет
Міністерства охорони здоров'я України,
м. Харків
завідувач кафедри біологічної хімії

Захист відбудеться «07» листопада 2019 року 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 «04» 10 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Збільшення тривалості життя є однією з найбільш актуальних соціальних проблем. Вирішення цієї глобальної проблеми можливо лише на основі знань механізмів і закономірностей виникнення вік-залежних патологій. Фахівці вважають, що збільшення кількості патологій зі збільшенням віку пов'язано зі зменшенням надійності функціонування метаболічних систем, що проявляється у втраті здатності старого організму адаптуватися до величезної кількості негативних факторів середовища (Walker G. et al., 2005; Testa R. et al., 2017). Як відомо, одними з найпоширеніших токсичних чинників навколишнього середовища є іони важких металів, зокрема, міді (Thornalley P. J. et al., 1985; Voronova V. et al., 2017). Іони міді належать до есенціальних компонентів, але у великих концентраціях вони мають високу токсичність. У зв'язку з цим, дослідження механізмів адаптації молодих і старих тварин до багаторазових послідовних введень сірчанокислої міді є вдалим експериментальним підходом для досліджень механізмів надійності функціонування метаболічних систем організму в процесі старіння і особливостей виникнення вік-залежних патологій.

Раніше було показано, що багаторазові послідовні введення сірчанокислої міді в організм супроводжується формуванням гормезису – ефекту індукованої стійкості до токсичного або фізичного впливу (Кузин А. М., 1991; Ковалева М. К. et al., 2011). Дослідження механізмів гормезису до іонів міді, в залежності від віку тварин, є актуальним для розуміння як вік-залежних механізмів адаптації, так причин формування вік-залежних патологій. Явище «гормезису» є центральною проблемою адаптації організму до негативних/токсичних чинників середовища. В результаті багаточисельних досліджень механізмів гормезису було показано, що в результаті гормезису відбувається індукція синтезу стрес-білків, глибока перебудова всього метаболізму. Але віддалені наслідки ефекту гормезису залишаються недослідженими, зокрема до іонів міді і ймовірний взаємозв'язок з формуванням вік-залежних патологій.

Однією з найбільш обговорюваних гіпотез в геронтології є вільнорадикальна гіпотеза старіння (Lapointe J. et al., 2009; Fedarko N. S., 2017). У зв'язку з цим, актуальним і перспективним є дослідження механізмів індукованої резистентності до сірчанокислої міді у молодих і старих тварин, ролі прооксидантно-антиоксидантної системи в цих процесах і можливих наслідків такої резистентності для організму, тобто виникнення вік-залежних патологій.

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

Мета та завдання досліджень. Метою даної роботи було вивчення ролі мідь зв'язуючих білків у механізмах індукованої резистентності до іонів міді, зв'язку гормезису з активністю про- та антиоксидантної системи, а також можливого взаємозв'язку між індукованою резистентністю та ймовірністю виникнення вік-залежних патологій (фіброзу печінки).

Для реалізації поставленої мети були визначені такі **завдання:**

1. Дослідити залежність прояву гормезису від кількості попередніх введень сірчаноокислої міді та від часового інтервалу між введенням малих та летальних доз CuSO_4 у тварин різного віку.

2. Дослідити роль мідь-зв'язуючих білків у характері внутрішньоклітинного (клітини печінки) розподілу іонів міді.

3. Дослідити деякі показники про-/антиоксидантної системи організму (вміст гідроперекисів ліпідів активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази тощо) та деякі біохімічні показники (вміст холестерину, тригліцеридів, церуплазміну, колагену тощо) після індукції резистентності до сірчаноокислої міді.

4. Дослідити певні соматометричні показники та морфологію печінки щурів після індукованої резистентності до іонів міді.

5. Дослідити деякі показники імунної системи (вміст гаптоглобіну, пептидів середньої молекулярної маси, фагоцитарну активність нейтрофілів тощо) у тварин після індукції гормезису.

6. Дослідити показники про- та антиоксидантної системи у тварин різного віку, які перебували на циклічному режимі годування, що супроводжувалося збільшенням тривалості життя.

Об'єкт дослідження – мідь-зв'язуючі білки, продукти вільнорадикального окиснення ліпідів та ферментні системи антиоксидантного захисту у клітинах печінки тварин різного віку, імунологічні показники організму.

Предмет дослідження – вік-залежний характер внутрішньоклітинного розподілу іонів міді та активність антиоксидантних ферментів у печінці та сироватці тварин у нормі, за умов довгострокового періоду інтоксикації іонами міді тварин різного віку.

Методи дослідження. Біохімічні (визначення вмісту колагену, гідроперекисів ліпідів, активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, аконітатгідратази, глутаредоксину, вміст гаптоглобіну, церулоплазміну, пептидів середньої молекулярної маси, хроматографічні та електрофоретичні - для характеристики мідь-зв'язувальних білків, метод диференціального центрифугування), мікроскопічні (для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів), фізіологічні (маса тіла тварин, ректальна температура, працездатність), гістологічні (виготовлення гістологічних препаратів печінки щурів), статистична обробка даних з використанням параметричних та непараметричних методів статистики за допомогою програми Microsoft Excel та програмного пакета Statistica 6.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що попереднє введення експериментальним тваринам відносно малих доз сірчаноокислої міді, які становлять не більше 33% від летальної дози, індукує резистентність у цих тварин до летальних доз цього токсиканту. Ступінь резистентності залежить від кількості попередніх малих доз, а також від віку тварин. Такий ефект зберігався не менше 45 днів після останнього введення малої дози. Гормезисний ефект до сірчаноокислої міді мав U - подібний характер і залежав від кількості попередніх введень малих доз токсиканту. Ефект індукованої резистентності досягав найбільшого прояву після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді, після чого поступово зменшувався, а після шести послідовних введень з інтервалом 48 годин, ефект індукованої резистентності був відсутнім.

Вперше показано, що вік-залежний характер, який був індукований резистентністю до сірчанокиислої міді, визначається особливостями специфічних мідь-зв'язуючих білків печінки, що мають молекулярну масу близько до 12 000 Да, які здатні зв'язувати іони міді та впливати на характер внутрішньоклітинного розподілу іонів міді в клітинах печінки.

Показано, що старі тварини не поступаються молодим здатністю адаптуватися до токсичних концентрацій сірчанокиислої міді, вони використовували іншу від молодих тварин біохімічну стратегію адаптації. На початкових стадіях формування гормезису мало місце зміщення рівноваги в бік прооксидантів, тобто проявлявся окиснювальний стрес на тлі збереження функціональної активності печінки в межах норми.

Вперше показано, що при прояві гормезису до сірчанокиислої міді при збереженні функціональної активності печінки мав місце розвиток фібротичних змін в печінці, тобто розвиток фіброзу, який може трактуватися як адаптивна реакція організму до дії іонів міді.

На моделі циклічного режиму годування тварин показано, що в першому циклі втрати маси тіла мало місце дворазове збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів в мітохондріях печінки. Це відбувалося з одночасним збільшенням активності антиоксидантних ферментів і, перш за все, глутатіонпероксидази. У наступних циклах втрати маси тіла показники про-антиоксидантної системи змінювалися незначно. Такі зміни свідчать про регуляторну роль редокс-системи організму в онтогенезі і прояві гормезису.

Вперше показано, що на початкових стадіях розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки мало місце пригнічення активності клітинної ланки імунітету організму.

Практичне значення отриманих результатів. У роботі розроблена модель індукованої резистентності до токсичних сполук. Ця модель використовується не тільки у геронтологічних дослідженнях при вивченні вік-залежної відповіді на багаторазово повторюваний екзогенний вплив, але й фармакологічних роботах, у яких досліджують механізми резистентності до лікарських засобів, у тому числі, до антибіотиків, що має важливе значення в онкології. Зокрема, ця модель використовується у практичній медицині при вивченні й розробці засобу лікування захворювання Вільсона-Коновалова (Волошин-Гапонов І. К., 2013). Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці лабораторних робіт з дисциплін «Біохімія» та «Біотехнологія» для студентів біологічного факультету, які навчаються за освітньо-професійною програмою «Біологія» на першому (бакалаврському) рівні освіти, а також при розробці програм нормативних дисциплін «Молекулярна біологія» та «Біотехнологія».

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 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. Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертації, виконані експериментальні дослідження з визначення біохімічних, імунологічних та фізіологічних показників, проведено статистичні розрахунки, оформленні тези та написані статті, написано та оформлено розділи дисертації. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф., Божковим А. І.

Апробація результатів дослідження. Основні результати дисертації були представлені на науково-практичних конференціях: XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017); науково-практична конференція «Здоров'я, харчування, довголіття» присвячена 85-річчю від дня народження проф. Ю. Г. Григорова (Київ, 2016).

Публікації. Основні положення й результати дослідження висвітлено у 8 наукових працях, серед яких 6 статей у зарубіжних наукових фахових виданнях і 2 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 146 сторінки, з них основного тексту 104 сторінки. Робота ілюстрована 5 таблицями та 23 рисунками. Список використаних джерел містить 211 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано вибір теми дослідження, вказано на зв'язок роботи з науковими темами; визначено об'єкт, предмет, мету і завдання дослідження; викладено методи, наукову новизну, практичне значення і достовірність результатів; є відомості про апробацію дисертаційних матеріалів, структуру й обсяг дисертації.

В огляді літератури розглянуто вік-залежні особливості формування резистентності до іонів важких металів і роль вільнорадикальних процесів в цьому. На підставі аналізу наукової літератури узагальнено відомості про механізми старіння і регуляції процесів адаптації організму до комплексу чинників середовища; фармакологічні характеристики лікарських препаратів і їхній вплив на молодий і старий організм; сучасну парадигму геронтології.

Відзначено, що парадигма сучасної геронтології будується на вік-залежному зниженні адаптивних можливостей організму. У зв'язку з цим дослідження ролі окиснювального стресу в регуляції балансу між фізіологічною адаптацією і формуванням патофізіологічних станів є найважливішим етапом розвитку вільнорадикальної теорії старіння.

Вказано, що, починаючи з 70-х років минулого століття, активно досліджують механізми гормезисного або U-ефекту, за якого малі дози викликають стимуляцію біологічних показників, тоді як великі дози інгібують ці ж показники. Подібна токсикодинаміка змін спостерігалася при вивченні токсичних ефектів широкого кола неорганічних і органічних сполук в експериментальних дослідженнях *in vivo* та *in vitro* для Sn-органічних сполук (Zhang B. et al., 2007; Smolders E. et al., 2009), хлориду ртуті (Calabrese E. J. et al., 2002; Kitchin K. T., 2002), компонентів

полімерних і лакофарбових матеріалів (Pickrell J. A. et al., 2002; Carelli G., 2002).

Гормезис, так само, як і парадоксальний ефект в цілому, в дійсності виявляється набагато частіше, ніж фіксується в науковій літературі. Одна з причин цього, на думку авторів роботи (Calabrese E. J et al., 2011; Arumugam T. V et al., 2006), пов'язана із загальною тенденцією досліджень в токсикології, коли при визначенні летальних доз токсичних речовин не враховуються концентрації, за яких можна виявити тільки явище гормезису.

Також в огляді літератури дисертації описано роль металотіонеїнів (MT) у регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи та можливу їх участь в інших функціях клітини. Автори доходять висновку, що MT активують проліферацію і пригнічують диференціювання в клітинах еритроїдного ряду, а у мегакаріоцитів активують процес диференціювання (Cohen H. Y. et al., 2004). Активація проліферації MT обумовлена підвищенням експресії протоонкогенів (C-myc), білки яких пригнічують апоптоз і підвищують синтез факторів росту (Calabrese E. J. et al., 2003)

Металотіонеїни, які вперше були виділені в 1957 році, їх роль в різних функціях клітини активно досліджується. Проте їхню роль у формуванні індукованої стійкості організму до іонів міді досліджено не достатньо. Встановлення ролі мідь-зв'язуючих білків у внутрішньоклітинному обміні міді має першорядне значення в розумінні механізмів гормезису та вік-залежних особливостей його прояву. Дослідження металотіонеїнів у аспекті гормезисного ефекту до іонів міді є цікавим ще й тому, що вони регулюють активність прооксидантно-антиоксидантної системи й інші функції організму.

Матеріали та методи дослідження. Роботу проведено на лабораторних білих щурах-самцях лінії Wistar віком 3 місяці (міс.) (молоді) і 20 міс. (старі), наявних у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

При індукуванні гормезисного ефекту до іонів міді використовували триразові послідовні внутрішньочеревні введення сірчанокислої міді (1 мг / 100 г) маса тіла, що складає 33 % від летальної дози (2,5-3мг / 100 г) маси тіла. Через різний час і після різних кількостей введення летальних доз цього токсиканту визначали час смерті тварин.

У дослідях використовували біохімічні методи для визначення активності ферментів (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глуторедоксинів тощо) та показників про- системи (гідроперекисів ліпідів, активність аконітатгідратази тощо). Визначали концентрацію гаптоглобіну за методом Равина (Ravin H. A., 1956), вміст церулоплазміну за методом Габриель (Gabrielja, N. I. et al., 1985). В роботі використовували хроматографічний та електрофоретичний методи розділення білків. Визначення вмісту іонів міді в різних фракціях клітин проводили за методом атомно-абсорбційної спектрометрії. Також використовували фізіологічні методи: визначення маси тіла, температури тіла, тест плавання з вантажем.

Стан клітинної ланки імунітету оцінювали за допомогою таких показників: фагоцитарне число, фагоцитарний індекс, індекс завершеності фагоцитозу (Muniz-Junqueira M. et al., 2003). В роботі досліджували стан печінки експериментальних тварин. Після декапітації тваринні фрагменти печінки брали завжди з однієї і тієї ж

частки і фіксували в 10 % розчині формаліну 48 годин. Гістологічне дослідження фіксованих в парафіні зразків печінки проводили за стандартною методикою. Зрізки товщиною 5 мкм, отримані з використанням мікротома, фарбували за Ван-Гизоном.

Аналіз отриманих даних проведено за допомогою непараметричних та параметричних методів аналізу за допомогою комп'ютерної програми "Statistica V.6".

Результати та їх обговорення

Дослідження залежності прояву гормезису до іонів міді від схеми попереднього введення малих доз цього токсину та роль мідь-зв'язуючих білків у цьому. Раніше було висловлено гіпотезу, що старіння – це неспецифічний інтегральний процес, який реалізується як наслідок формування епігенетичної – метаболічної пам'яті в результаті безперервного процесу адаптації до ендо- і екзогенних факторів (Bozhkov et al., 2011; Божков А. І. та ін., 2012). Накопичений «адаптивний досвід – метаболічна пам'ять», з одного боку, мінімізує майбутні адаптивні процеси, а з іншого – звужує подальший стратегічний вибір і призводить до формування хибних циклів метаболізму (Божков А. І. та ін., 2012).

Молоді і старі тварини, піддавалися однаковим токсичним багаторазовим послідовним впливам сірчаноокислої міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла. Було виявлено, що ці впливи індукують резистентність до летальних концентрацій CuSO_4 , як у молодих, так і у старих тварин, тобто у них формується гормезис.

Одноразове внутрішньочеревне введення сірчаноокислої міді в дозі 3 мг на 100 г маси тіла призводило до загибелі всіх експериментальних тварин через 1,5-2 години після введення. Отже, доза 3 мг на 100 г була летальною для щурів (рис. 1).

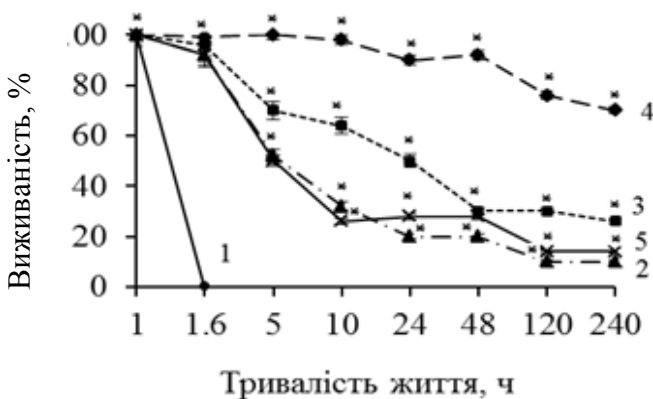


Рис. 1 Час життя експериментальних тварин після одноразового внутрішньочеревного введення сірчаноокислої міді з розрахунку 3 мг / 100 г маси тіла (1, контроль), після багаторазових введення сірчаноокислої міді з розрахунку 1 мг / 100 г маси тіла і фінального введення 3 мг / 100 г маси тіла (2 - одне введення малої дози, 3 - два введення, 4 - три введення, 5 – шість введення сірчаноокислої міді). В кожній експериментальній групі було не менше 10 тварин

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем

Так, доза сірчаноокислої міді в 1 мг на 100 г не викликала гострого токсичного ефекту. У цих випадках експериментальні тварини (40 щурів) виживали, і їхня тривалість життя достовірно не відрізнялася від контрольних тварин. Для перевірки можливості формування гормезису, тобто відносного збільшення індивідуальної

стійкості організму до летальних доз після попереднього введення їм малих доз сірчаноокислої міді, використовували спеціальну схему введення сірчаноокислої міді (рис. 1).

У наступній серії експериментів визначали тривалість збереження гормезису. Було встановлено, що цей ефект проявлявся щонайменше протягом 45 діб після останнього введення сірчаноокислої міді, тобто він «запам'ятовувався».

Прояв гормезису залежав від кількості попередніх ін'єкцій сірчаноокислої міді (рис. 1). Цей ефект мав U-подібний характер, тобто збільшувався від однієї до трьох ін'єкцій і різко знижувався при шести введеннях токсиканту (рис. 1). Такий дозочасовий характер гормезису може пояснюватися проявом кумулятивного ефекту для сірчаноокислої міді при інтервалі між ін'єкціями 48 год. У наступній серії експериментів визначали час настання загибелі експериментальних тварин після введення летальної дози для молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) щурів. Було виявлено, що якщо час загибелі молодих тварин в середньому становив 83 ± 5 хв. після введення летальної дози сірчаноокислої міді, то старі тварини гинули вже через 25 ± 6 хв., тобто в 3 рази швидше порівняно з молодими (рис. 2).

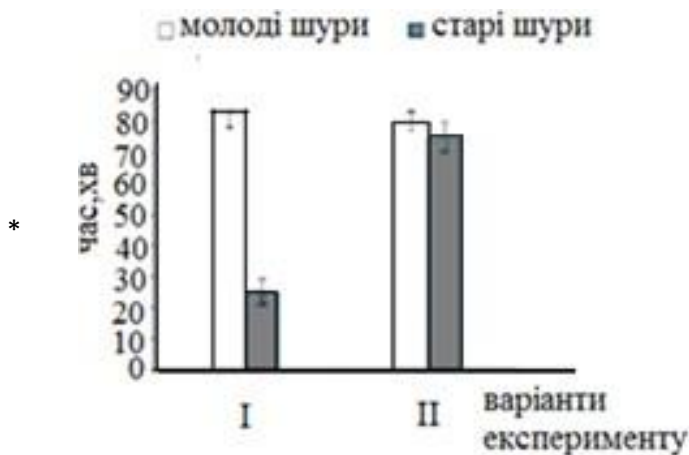


Рис. 2 Час настання загибелі молодих і старих щурів після введення 3 мг на 100 г маси тіла тварини сірчаноокислої міді (I) і після введення сірчаноокислої міді з розрахунку на 1 г маси печінки (II), (n=8)

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з молодими щурами

Отже, старі тварини менш стійкі до токсичних доз сірчаноокислої міді в порівнянні з молодими, якщо її вводити в розрахунку на одиницю маси тіла тварини. Настільки велика різниця в детоксикаційній функції печінки на тлі токсичних доз сірчаноокислої міді може вказувати на те, що печінка старих тварин зв'язує більшу кількість іонів міді порівняно з молодими тваринами після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді в дозі 1 мг на 100 г маси тварини (рис. 3).

Можна стверджувати, що більша чутливість до сірчаноокислої міді у старих тварин пов'язана з тим, що при введенні ксенобіотиків у розрахунку на масу тіла старі тварини отримували більшу дозу сірчаноокислої міді на одиницю маси печінки. Якщо розраховувати дози сірчаноокислої міді на одиницю маси печінки, які зменшувалися в онтогенезі то при введенні 1 мг на 100 г маси тіла молодим, старим необхідно вводити 0,57 мг на 100 г маси тіла, а не 1 мг на 100 г маси тіла, що і пояснює більшу кількість міді в печінці у старих тварин. На користь цього свідчать експериментальні дані з прояву токсичності у старих і молодих тварин після введення сірчаноокислої міді в розрахунку на 1 г маси печінки (рис. 3).

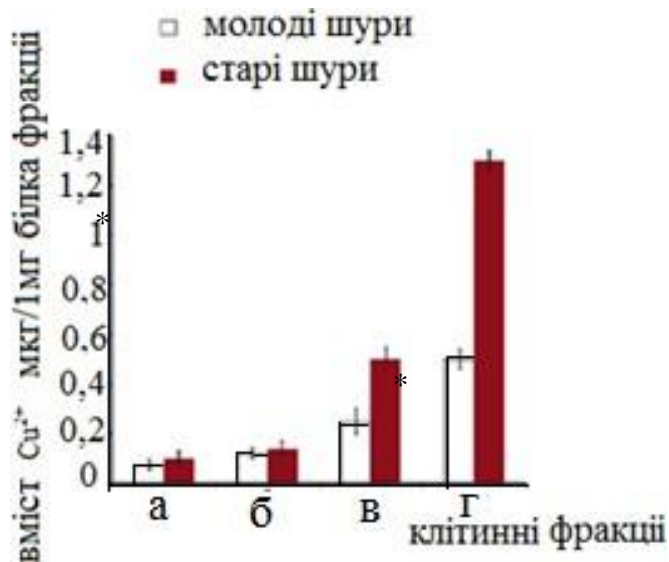


Рис. 3 Вміст іонів міді в ядрах (а), мікросомах (б), мітохондріях (в) і термостабільних білках цитозолу (г) клітин печінки молодих і старих щурів після трьох послідовних введенень сірчаноокислої міді в дозі 1 мг на 100 г маси тіла кожні 48 годин; останні введення – за 12 годин до забою

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з молодими щурами, (n=5-6)

Отже, вік-залежні відмінності в стійкості до токсикантів зумовлені не пригніченням з віком антитоксичної функції печінки, а, швидше з відносним відставанням росту печінки від зростання маси тіла у старих тварин.

Дослідження ролі мідь-зв'язуючих білків (МЗБ) у формуванні гормезису до іонів міді. З цитозолу клітин печінки були виділені білки з молекулярною масою близько до 12 кДа (рис. 4), які зв'язували в 27 разів більше іонів міді порівняно з іншими білками цитозолу (табл. 1).

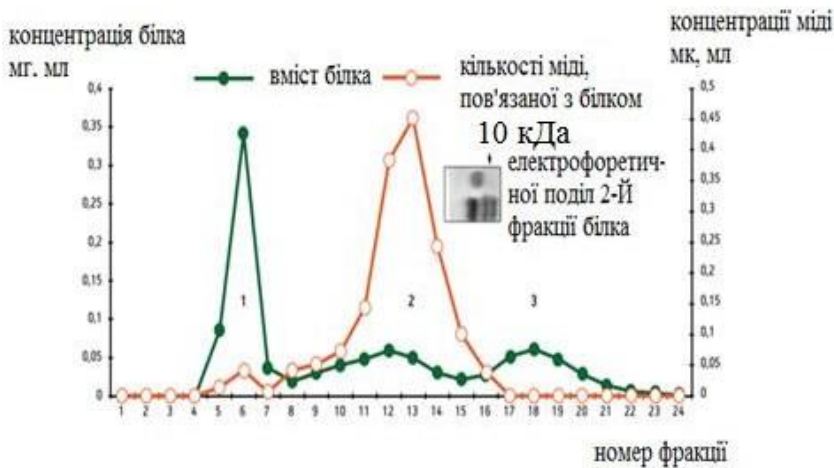


Рис.4 Фракціонування термостабільних білків цитозолу на колонці з сефадексом G-75. 1, 2, 3 - фракції білків(—●—), а вміст іонів міді в різних фракціях білків (—○—)

Через те, що мідь є есенціальним елементом, вона наявна в клітинах і контрольних тварин. Визначення природного, а бо контрольного, внутрішньоклітинного патерну розподілу іонів міді показало, що з 1 мг МЗБ зв'язано 0,62-0,66 мкг Cu^{2+} , а з білками цитозолу, мікросом і мітохондрій – 0,05-0,06 мкг/1мг білка, тобто МЗБ містили в 12 разів більше Cu^{2+} порівняно з іншими компартментами клітини у контрольних тварин (табл. 1). Якщо цим тваринам тричі вводили малі дози сірчаноокислої міді (1 мг / 100 г), то мідь зв'язувалася з усіма компартментами клітин печінки, проте найбільше її було в МСБ – 5,3 мкг на 1 мг. Однак вміст міді збільшувався також і в цитозолі в 8,4 раза, в мікросомах – в 5,6

раза, а в мітохондріях – в 21 раз. Отже, при введенні сірчаноокислої міді за схемою 1 + 1 + 1 мг на 100 г маси тіла формується новий патерн внутрішньоклітинного розподілу іонів міді. При цьому МЗБ, хоча і зв'язували значно більшу кількість іонів міді порівняно з іншими дослідженими компартментами клітини, не забезпечували «захист» цих компартментів від токсичної дії іонів міді.

Таблиця 1

Кількість іонів Cu^{2+} , зв'язаних з МЗБ, білками цитозоля, мікросом і мітохондрій (мкг Cu^{2+} на 1 мг білка) молодих (знаменник) і старих (чисельник) щурів, яким вводили сірчаноокислу мідь за різними схемами, n=5-8

Схема введення	Фракції клітин печінки			
	МЗБ	цитозоль	мікросоми	мітохондрії
Контрольна група (базовий рівень) молоді та старі	0,62±0,16	0,05±	0,05±0,02	0,04±0,006
	0,64±0,15	0,017	0,03±0,02	0,046±0,005
		0,060±0,015		0
Перше введення 1+1+1 на 100г	5,34±3,33*	0,42±0,25	0,28±0,04*	0,84±0,47*
Вміст Cu^{2+} через 1 місяць після введення за схемою 1+1+1 на 100 г	0,63±0,12	0,039±0,013	0,05±0,01	0,044±0,008
	0,69±0,10	0,034±0,012	0,040±0,01	0,037±0,009
Друге введення за схемою 1+1+1 на 100 г через 1 місяць після першого введення	15,35±0,91*	0,205±0,08*	0,25±0,08*	0,475±0,07*
	30,00±0,85*	0,877±0,09*	0,61±0,09*	1,764±0,10*

* - $P \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою

У цій моделі іони міді можуть розподілятися в клітині по-різному залежно від дози, віку та інших неврахованих функціональних навантажень. У тому випадку, якщо в організм вводиться летальна доза, то іони міді зв'язуються у великих кількостях з клітинними ядрами, мембранами ендоплазматичного ретикулуму, мітохондріями, і це супроводжується пригніченням життєво важливих процесів. У тому ж разі, якщо в організм вводяться послідовно малі дози, то реалізується альтернативний адаптивний патерн внутрішньоклітинного розподілу з переважанням зв'язування іонів міді зі специфічним МЗБ, що знижує летальний ефект і формує резистентність до подальшого введення летальної дози міді (рис. 5). Однак якщо молодим і старим тваринам вводили сірчаноокислу мідь в розрахунку на масу тіла, то виявляється вік-залежний характер внутрішньоклітинного патерну розподілу. Так, поряд з великою кількістю іонів міді в МЗБ, у них досить багато іонів міді порівняно з молодими тваринами зв'язується з мітохондріями і мікросомами, що і дозволяє пояснити їх меншу стійкість до цього токсиканту.

Можна вважати що, якщо тривалий час в клітині буде функціонувати індукований альтернативний варіант внутрішньоклітинного розподілу іонів міді, то він стане «базовим», тому що на нього будуть «замкнені» інші метаболічні системи, тобто формується специфічний епігенотип, який підтримується самостійно й буде зберігатися до нового стрес-стану.

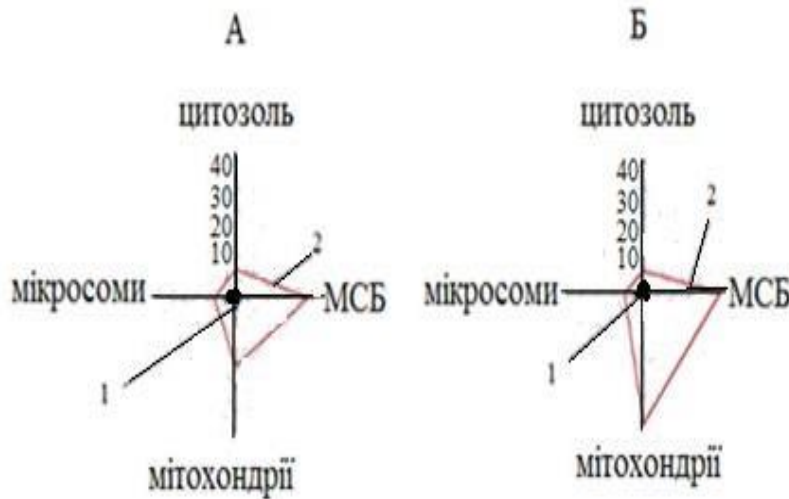


Рис.5 Внутрішньоклітинний патерн розподілу іонів міді у молодих (А) і старих (Б) тварин, в контрольній групі (1), через місяць після формування адаптивного патерну повторним введенням сірчаноокислої міді (2); МЗБ мідь-зв'язуючі білки, (n=5-7).

На осях позначена кількість іонів міді в різних компартментах у відсотках від загальної кількості іонів міді в печінці

На користь цього свідчить збереження індукованого патерну внутрішньоклітинного розподілу іонів міді через місяць після першого введення, і навіть значного збільшення кількості іонів міді, зв'язаних зі специфічними МЗБ, що проявляється в посиленні гормезису особливо у старих тварин (рис. 5). Отримані результати підтверджують роль метаболічної пам'яті у формуванні гормезису і вибору різних стратегій адаптації у молодих і старих тварин.

Біохімічні та імунологічні наслідки гормезису до сірчаноокислої міді. Багаторазове послідовне введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді, яка індукувала резистентність до цього токсиканту супроводжувалася формуванням фіброзу печінки. Це проявлялося у втраті маси тіла, зниженні температури тіла, втраті працездатності цими тваринами в тесті плаванням з вантажем. При цьому між лопатями печінки розросталася сполучна тканина, що призводило до зрощування лопатей, зменшення маси печінки і збільшення вмісту колагену в ній (рис. 6).

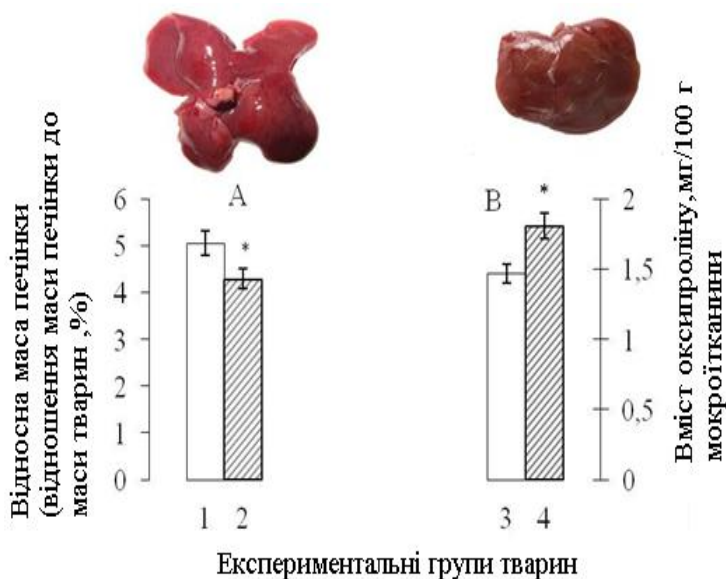


Рис. 6 Форма печінки у тварини групи контрольних щурів (А) та групи щурів, яким три рази послідовно вводили сульфат міді в дозі 1 мг/ 100 г маси тіла кожні 48 годин між введеннями (Б). Відносна питома вага контрольних щурів (1) та печінки щурів, які отримували сульфат міді (2), вміст колагену в контролі (3) та після отримання іонів міді (4) щурам. Параметри визначали через 24 години після останнього введення сульфату міді (n=5)

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з

На морфологічному рівні виявлялися ознаки фіброзу печінки (рис. 7). У контрольних тварин печінкова капсула тонка, компактна, щільно прилягає до паренхіми (рис. 7a). Навколо центральної вени дольки між балками є тонкий колагеновий матрикс (рис. 7b). Портальні тракти представлені класичної тріадою (рис. 7c). Гепатоцити мали типову морфологію (рис. 7d).

Через 24 години після останнього ведення сульфату міді спостерігали венозне повнокров'я (рис. 7e), в судинах спостерігали осадження клітин крові (рис. 7f), а капсула печінки була сильно збільшена і у ній було багато клітин, тобто скупчення клітин, які ділилися (рис. 7 g).

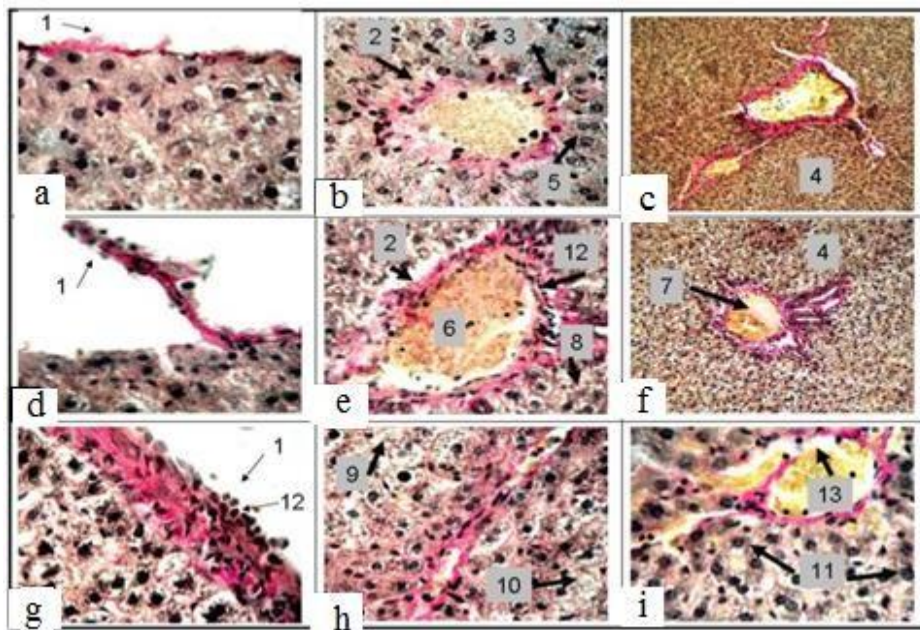


Рис. 7 Мікрофотографії препаратів печінки контрольних (a-c) і піддослідних тварин (d-i). Забарвлення за Ван-Гизоном.

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 «пінистою» цитоплазмою. 9. «Тіні» ядер. 10. Клітини, що втратили ядра. 11. «Багатоядерцеві» клітини. 12. Інфільтрація мононуклеарних елементів. 13. Пошкодження ендотелію судини

Визначення вмісту гідроперекисів ліпідів в сироватці крові тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки показало, що їх вміст був збільшений на 90 % порівняно з інтактним контролем. У той же час, активність одного з антиоксидантних ферментів – глутатіонпероксидази була меншою на 36 % порівняно з інтактним контролем (рис. 8).

Нами було розроблено схему, яка продемонструвала послідовність розвитку фіброзу печінки на тлі формування гормезису до іонів міді. Можна стверджувати, що всі молекулярно-клітинні процеси, що відбуваються в цей час в печінці, мають адаптивний характер. Доказом адаптивної, а не лише патогенетичної функції описаних змін є прояв вираженого гормезису до летальних доз сірчаноокислої міді у цих тварин.

Ми вважаємо, що формування «центрів тяжіння» метаболічних патернів є інтегральною характеристикою біологічної системи в момент настання максимально можливої для системи варіабельності домінуючих показників. Однією з найважливіших інтегральних характеристик, що впливає на зниження варіабельності метаболічних показників, є час існування біологічної системи, або її вік.

Певні показники про- та антиоксидантної системи при Cu-індукованому фіброзі печінки. Через 24 години після останнього введення сірчаноокислої міді вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) у сироватці крові молодих і старих тварин був вищим від відповідних контрольних значень у два рази (рис. 8).

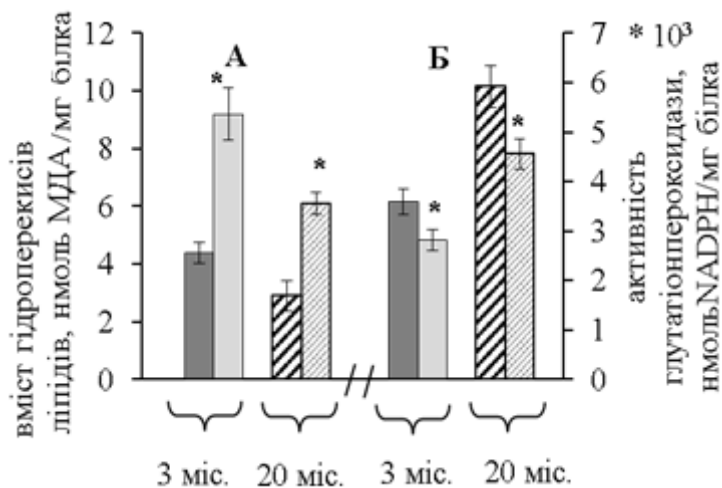


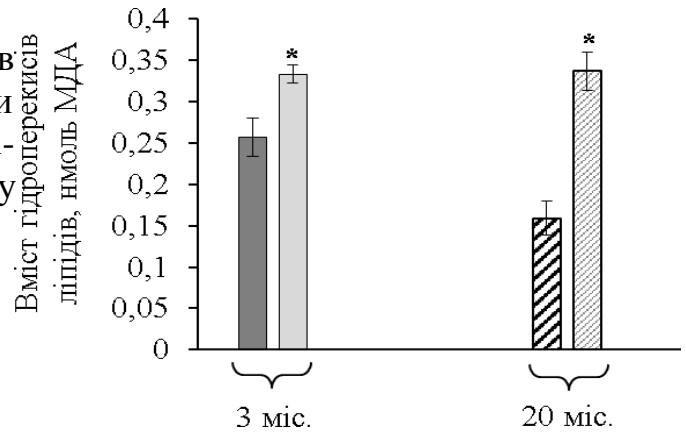
Рис. 8 Вміст гідроперекисів ліпідів у 3-х міс. контрольних () і у тварин з Cu-індукованим фіброзом (), то ж у 20 міс. контрольних () і у тварин з Cu-індукованим фіброзом () у сироватці крові (А), а також активність глутатіонпероксидази у цих же тварин (Б), (n=5-7)
* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з відповідним віковим контролем

Необхідно зазначити, що вміст гідроперексидів ліпідів у старих тварин контрольної групи був на 44 % меншим ніж у молодих і ці відмінності залишалися незмінними і на тлі фіброзу (рис. 8А).

Отже, на тлі багаторазового введення сірчаноокислої міді спостерігали окислювальний стрес, і він проявлявся однаково у молодих і старих тварин. Збільшення вмісту гідроперексидів ліпідів відбувалося на тлі зниження активності глутатіонпероксидази однаковою мірою у молодих і старих тварин на 22-23 % (рис. 8Б). Можна вважати, що окислювальний стрес був зумовлений інгібуванням антиоксидантних ферментів.

Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) в мітохондріях при Cu-індукованому фіброзі збільшувався у молодих тварин на 30 % порівняно з контролем, у той час як у старих він збільшувався в два рази (рис. 9).

Рис. 9 Вміст гідропероксидів ліпідів в мітохондріях печінки контрольної групи 3 міс. (■) і 20 міс. (■), груп з Cu-індукованим фіброзом у 3 міс. (▨) і у 20 міс. (▨) (гістограма), (n=6-8)
* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з відповідним віковим контролем



Можна вважати, що вік-залежні відмінності в редокс-системі можуть бути основою вікових відмінностей в адаптивних процесах. Як відомо, прооксиданти і антиоксиданти беруть участь в регуляції фагоцитозу та інших реакцій імунної системи, яка і забезпечує механізм адаптації до екстремальних факторів середовища. З метою перевірки цих припущень на наступному етапі роботи визначали певні показники імунної системи.

Певні показники клітинного та гуморального імунітету після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді у молодих і старих тварин. Кількість фагоцитуючих клітин, здатних захоплювати мікробні клітини (фагоцитарний індекс – ФІ), у тварин після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді була зменшеною порівняно з контрольним рівнем в два рази, як у молодих, так і у старих тварин (рис. 10 А). Це вказує на прояв імунодефіциту у тварин з Cu-індукованим фіброзом незалежно від віку.

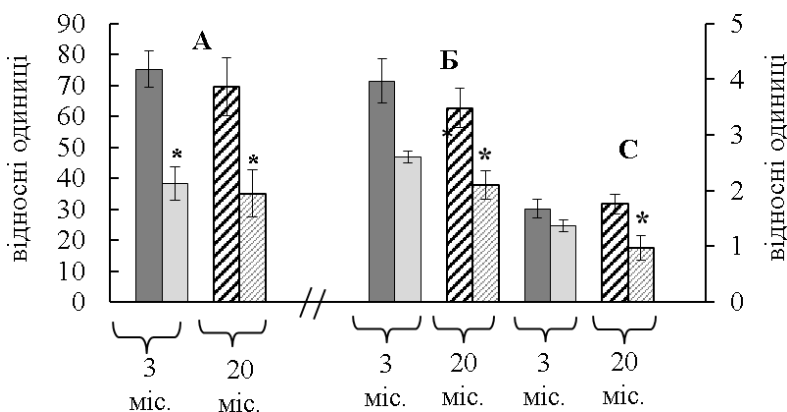


Рис. 10 Фагоцитарний індекс (А), фагоцитарне число (Б) й індекс завершеності фагоцитозу (С) у контрольних тварин 3 міс. (■) та 20 міс. (■); групи з Cu-індукованим фіброзом у 3 міс. (▨) і у 20 міс. (▨), (n=6-8)
* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з відповідним віковим контролем

Поглинаюча здатність гранулоцитарних нейтрофілів, тобто середня кількість мікробних клітин поглинутих однією фагоцитуючою клітиною (фагоцитарне число) було на 35 % меншим від контрольного рівня у молодих і на 40 % у старих тварин з Cu-індукованим фіброзом (рис. 10Б).

Індекс завершеності фагоцитозу у молодих тварин з Cu-індукованим фіброзом не відрізнявся від контрольного рівня, а у старих тварин він був на 45 % нижчим

щодо відповідного контролю (рис. 10С).

Отже, розвиток Cu-індукованого фіброзу печінки навіть на найбільш ранніх стадіях супроводжувався формуванням імунодефіциту в клітинній ланці імунітету схожим чином у молодих і старих тварин, з тією різницею, що у старих тварин завершеність фагоцитозу була достовірно нижчою від контролю.

Результати переконливо свідчать про те, що ключовою метаболічною ланкою у розвитку гормезису і подальшому формуванні фіброзу печінки, є функціональна активність прооксидантно-антиоксидантної та імунної систем. Ми вважаємо, що «взаємодія» або патерн між численними елементами цих систем і визначає вибір стратегії формування адаптивної відповіді не тільки на іони міді, а й на інші ксенобіотики. Зі збільшенням віку також можуть формуватися специфічні патерни в цих системах, що і буде впливати на майбутні характеристики адаптивної відповіді організму. Або іншими словами, вік накладає «відбиток» на деякі з елементів прооксидантно-антиоксидантної та імунної систем. Для експериментальної перевірки цих положень, нами спільно з співробітниками Інституту біології були проведені дослідження показників про-/антиоксидантної системи на моделі циклічного режиму годування, яка забезпечувала збільшення тривалості життя тварин.

Певні показники прооксидантно-антиоксидантної та імунної систем при циклічному режимі годування як моделі збільшення тривалості життя. Вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки молодих тварин був збільшений на 105 % на тлі першого циклу втрати маси тіла (рис. 11).

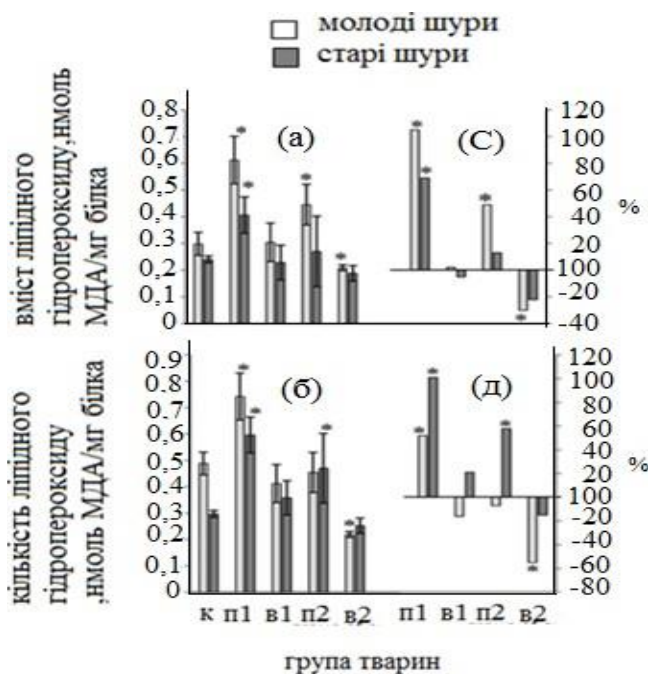


Рис. 11 Вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондрії (а) та фракції мікросом (б) у молодих (3 місяців) та старих (20 місяців) тварин. Зміна цих параметрів показана у відсотках до рівня контролю в мітохондріях (с) та мікросомах (д).

Примітка: К – контроль, П1 – втрата маси тіла молодих тварин у першому циклі, П2- втрата маси тіла старих тварин у другому циклі, В1 – відновлення маси тіла молодих тварин, В2 – відновлення маси тіла старих тварин у другому циклі

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з відповідним віковим контролем, (n=8)

У той же час у старих тварин вони були збільшені лише на 69 % порівняно з контролем (рис. 11А, С).

Переведення цих тварин на звичайне годування з відновленням маси тіла супроводжувався зменшенням вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки, як у молодих, так і у старих тварин і досягала базового контрольного

рівня (рис. 11А, С).

Отримані результати вказують, що втрата маси тіла індукує окиснювальний стрес. Послідовний вплив ЦРК, так само як і послідовне введення токсиканту (сірчаноокислої міді), формує у тварин імпринтинг, що проявляється у відмінностях метаболічної відповіді на первинні та наступні дії цього фактора, при цьому вік тварин впливає на метаболічну відповідь на такі дії.

Якщо виходити з того, що зміна характеристики про-/антиоксидантної відповіді має регуляторні наслідки, то можна очікувати, що це буде впливати і на характеристики імунної системи.

Втрата маси тіла в другому циклі ЦРК супроводжувалася значно меншим збільшенням вмісту ГПЛ в мітохондріях печінки молодих тварин (на 50 % порівняно з контролем) (рис. 11А, С). Вміст ГПЛ в мітохондріях печінки у старих тварин не змінювався.

Вміст ГПЛ в мітохондріях печінки тримісячних і 20-ти місячних тварин після другого циклу відновлення маси тіла був нижчим від контрольного рівня (рис. 11А, С).

Отже, втрата і відновлення маси тіла виявлялися в збільшенні вмісту ГПЛ в мітохондріях печінки. Перший цикл втрати маси тіла супроводжувався вираженим окиснювальним стресом у молодих і меншою мірою у старих тварин. Другий цикл втрати маси тіла супроводжувався у два рази меншим збільшенням ГПЛ в мітохондріях, як у молодих, так і у старих тварин. Повне відновлення маси тіла у молодих і старих тварин у другому циклі ЦРК не супроводжувалося відновленням вмісту ГПЛ до базового рівня в мітохондріях, як у молодих, так і у старих тварин (рис. 11).

Як відомо, другим джерелом продукції ГПЛ в печінці, є мембрани ЕПР (мікросоми). Динаміка вмісту ГПЛ в мікросомах при ЦРК була такою ж, як і в мітохондріях. При цьому виявлялися кількісні відмінності між віковими групами. Так, вміст ГПЛ в мікросомах тримісячних тварин в першому циклі втрати маси тіла збільшувався на 52 % порівняно з контролем, а у 20-ти місячних, навпаки, на 100 % (рис. 11).

Після відновлення маси тіла в першому циклі вміст ГПЛ не відрізнявся від контрольного рівня (рис. 11).

Другий цикл втрати маси тіла не впливав на вміст ГПЛ в мікросомах молодих тварин і призводив до їх незначного збільшення у 20-ти місячних тварин. У той же час після другого циклу відновлення маси тіла вміст ГПЛ в мікросомах тримісячних тварин на 56 % був нижчим від контролю, а у старих достовірно не відрізнявся від контрольного рівня (рис. 11).

Отже, між змінами активності ГП та вмістом ГПЛ в мітохондріях на тлі втрати-відновлення маси тіла, як результат циклічного режиму годування, відсутній кореляційний зв'язок між цими показниками. При цьому індукція ГП багаторазово перевищує збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів, тобто вона залишається на високому рівні і після завершення ЦРК.

Отже, ЦРК індукував окислювальний стрес, який проявлявся в значному збільшенні вмісту ГПЛ в мітохондріях і мікросомах, при першому циклі втрати маси тіла. Надалі при повторних втратах маси тіла відмінності між контролем і дослідом

або зменшувалися або не виявлялися. Можна вважати, що подібні ритмічні зміни в про-/антиоксидантній системі ведуть до «формування» нового для мітохондрій і мікросом рівня ГПЛ. Важливу роль в цьому відіграє метаболічна пам'ять, яка формувалася при багатьох послідовних впливах того самого чинника, як у випадку іонів міді, ЦРК, і це впливало на вибір стратегії адаптації у молодих та старих тварин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішене актуальне наукове завдання – з'ясований механізм формування індукованої резистентності до токсичних концентрацій іонів міді у тварин різного віку. Показано, що в механізмах гормезису важливу роль відіграють мідь-зв'язуючі білки, які забезпечують внутрішньоклітинний характер розподілу іонів міді, вони формували специфічний патерн біохімічних показників, який здатний до імпринтингу. Індукована малими дозами сірчаноокислої міді резистентність розвивається на тлі окиснювального стресу і формування фіброзу печінки. Старі тварини не поступалися молодим тваринам здатністю адаптуватися до токсичних концентрацій сірчаноокислої міді та циклічного режиму годування. Вони використовували іншу від молодих тварин стратегію біохімічної адаптації, суть якої полягає в тому, що у них змінені співвідношення між біохімічними показниками, які забезпечували механізми адаптації до токсичних сполук.

1. Прояв гормезису до сірчаноокислої міді залежить від кількості попередніх введення малих доз токсиканту. Ця залежність має U-образний характер з максимумом після трьох попередніх введення малих доз. Гормезис, що формувався, зберігався не менше 45 діб після останнього введення малих доз сірчаноокислої міді.

2. Старі тварини поступалися молодим тваринам за здатністю адаптуватися до сірчаноокислої міді, якщо сірчаноокислу мідь вводили тваринам різного віку у розрахунку на масу тіла та не відрізнялися від молодих, якщо сірчаноокислу мідь вводили у розрахунку на масу печінки.

3. Білки цитозолу клітин печінки з молекулярною масою близькою до 12 кДа мали мідь-зв'язуючу здатність і забезпечували специфічний внутрішньоклітинний характер розподілу іонів міді в печінці. Повторне введення сірчаноокислої міді в організм через 30 діб після першого введення забезпечувало збільшення мідь- зв'язуючої здатності МЗБ і це проявлялося більшою мірою у старих тварин.

4. Введення іонів міді тваринам в адаптивних дозах 1 мг/100 г маси тіла (триразове введення з інтервалом 48 годин), супроводжувалося інгібуванням антиоксидантних ферментів і це проявлялося найбільшою мірою для глутатіонпероксидази. Це призводило до збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів у мітохондріях та мембранах ендоплазматичного ретикулу та сироватки крові, при

цьому основні біохімічні показники (активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази), вміст альбуміну та холестерину та ін.) залишались у

межах норми.

5. Індукція резистентності до токсичних доз сірчаноокислої міді супроводжувалася формуванням окиснювального стресу та розвитком фіброзу печінки, який мав вік-залежний характер. На початкових стадіях розвитку фіброзу печінки найбільшою мірою змінювалися показники про-/антиоксидантної системи, для якої було характерно зміщення у бік прооксидантів.

6. Розвиток Cu-індукованого фіброзу печінки супроводжувався пригніченням клітинної ланки імунітету, і ці показники залежали від віку.

7. При циклічному режимі годування, який супроводжувався збільшенням тривалості життя, спостерігалось періодичне збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів в мітохондріях, мембрані ендоплазматичного ретикулуму та сировотці крові на тлі збільшення активності глутатіонпероксидази, а не зменшення її, як при окислювальному стресі.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:

1. 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. (GoogleScholar, CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: визначення працездатності, температури тіла та маси тіла щурів, визначення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, вмісту холестерину, триглицеридів, альбуміну, участь у підготовці статті до друку).*

2. Bozhkov Anatoliy I., Klimova Olena M., Nikitchenko Yuriy V., Kurguzova Natalia 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. Vol. 6. P. 39-54. (GoogleScholar, CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: визначення температури тіла експериментальних тварин, їх працездатність, визначення вмісту колагену у тварин різного віку, участь у підготовці статті до друку).*

3. 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. and **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: моделювання фіброзу печінки,*

визначення вмісту оксидантів та прооксидантів у тварин з фіброзом, участь у підготовці статті до друку).

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. Vol. 5. P. 151-165. (GoogleScholar, CrossRef). *(Особистий внесок здобувача: визначення оксидантного та прооксидантного потенціалу експериментальних тварин різного віку, які мали циклічний режим годування, участь у підготовці статті до друку).*

5. Bozhkov A. I., Linkevych O. S., Ivanov E. G., Klimova O. M. and **Al Begai Mohammad 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 // *International Journal of Current Research*. 2016. Vol. 8, N 12. P. 44129-44137. *(Особистий внесок здобувача: визначення вмісту холестерину, триглицеридів, креатиніну, альбуміну, активності аланінамінотрансферази, аспаратамінотрансферази, участь в написанні статті).*

6. Kurguzova Natalia Igorevna, Bozhkov Anatoliy Ivanovich, Nikitchenko Yuriy Viktorovich, **Al Begai Mohammad Ali Yousef**, Goltvyansky Anatoliy Vladimirovich, Alsardia Mohammad Morshed Ayed, BozhkovAndrewAnatoliyovich 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: визначення вмісту глутатіонпероксидази та фізіологічних показників щурів, участь в написанні статті).*

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

7. **Аль Бегаі Мохаммад Алі Юсеф**. Показники функціональної активності і морфології печінки за терапії Cu-індукованого фіброзу низькомолекулярними компонентами молозива // Молодь і поступ біології : XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 25-27 квітня 2017 р. : тези доп. Львів, 2017. С. 23-24.

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: участь в проведенні експерименту, моделювання циклічного режиму годування, участь в написанні тез)*

АНОТАЦІЯ

МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ Вік-залежні особливості прояву гормезису до іонів міді.– Кваліфікаційна наукова праця 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, 2019.

У дисертації досліджено віддалені наслідки гормезису до сірчаноокислої міді залежно від віку тварин.

Виявилося, що на фоні послідовного введення сірчаноокислої міді експериментальним тваринам спостерігали втрату маси тіла, зниження температури тіла та втрату здатності здійснювати роботу – плавання з вантажем. Ці результати переконливо засвідчують інгібування значними концентраціями іонів міді загального метаболізму та порушення функції печінки. Було виявлено, що за 24 години після останнього введення сірчаноокислої міді у тварин виявляються ознаки фіброзу печінки. Спостерігалось значне збільшення капсули печінки венозний застій і навіть «сепарація» формових елементів від плазми крові. Ці зміни можуть бути кваліфіковані як початкова стадія розвитку фіброзу.

Також подано дані про певні характеристики імунної системи. Виявилося, що фагоцитарний індекс у молодих і старих тварин був знижений 45 – 50 %. У той же час, індекс завершеності фагоцитозу в молодих тварин із фіброзом печінки не відрізнявся від контрольного рівня, у той час як у старих він достовірно був знижений порівняно з контролем.

Дослідження різних біохімічних показників після індукції резистентності організму до сірчаноокислої міді показало, що найбільш вираженою та швидкою в часі відповіддю були зміни в про-/антиоксидантній системі як у молодих, так і у старих тварин. Для перевірки специфічної або неспецифічної реакції про-/антиоксидантної системи на дію сірчаноокислої міді було використано експериментальну модель, яка забезпечувала збільшення тривалості життя – циклічний режим годування.

Одержані результати показали, що при циклічному режимі годування показники про-/антиоксидантної системи змінювалися. Спрямованість змін у цій системі з індукованим фіброзом печінки та ЦРК були різними. Це може вказувати на регулярну роль редокс-системи, яка виконує різні функції під час різних експериментальних впливів.

Ключові слова: механізми старіння, механізми адаптації, гормезисний ефект, мідь-зв'язуючі білки, металлотіонеїни, токсичність, фіброз печінки.

АННОТАЦИЯ

МОХАММАД АЛИ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАИ Возрастзависимые особенности проявления гормезиса к ионам меди. - Квалификационная научная работа 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, 2019.

В диссертации исследованы отдаленные последствия гормезиса к серноокислой меди в зависимости от возраста животных.

Оказалось, что на фоне последовательного ввода серноокислой меди экспериментальным животным наблюдали потерю массы тела, снижение температуры тела и потерю способности осуществлять работу - плавание с грузом. Эти результаты убедительно свидетельствуют о ингибировании значительными концентрациями ионов меди общего метаболизма и нарушения функции печени. Было обнаружено, что через 24 часа после последнего введения серноокислой меди у животных обнаруживаются признаки фиброза печени. Наблюдалось значительное увеличение капсулы печени венозный застой и даже «сепарация» формовых элементов от плазмы крови. Эти изменения могут быть квалифицированы как начальная стадия развития фиброза.

Также представлены данные об определенных характеристики иммунной системы. Оказалось, что фагоцитарный индекс у молодых и старых животных был снижен 45 - 50%. В то же время, индекс завершенности фагоцитоза у молодых животных с фиброзом печени не отличается от контрольного уровня, в то время как в старых он достоверно был снижен по сравнению с контролем.

Исследование различных биохимических показателей после индукции резистентности организма к серноокислой меди наиболее выраженной и быстрой во времени ответом проявлялись на уровне про-антиоксидантной системы как у молодых, так и у старых животных. Для проверки специфической или неспецифической действия про- антиоксидантной системы на действие серноокислой меди были использованы экспериментальную модель, которая характеризовалась увеличением продолжительности жизни - циклический режим кормления.

Полученные результаты показали, что при циклическом режиме кормления показатели про-антиоксидантной системы менялись. Однако, направленность изменений в системе о-антиоксиданта с индуцированным фиброзом печени и ЦРК были разными. Это может указывать на регулярную роль окислительно-сисемы, которая выполняет различные функции при различных экспериментальных воздействий.

Ключевые слова: механизмы старения, механизмы адаптации, гормезисный эффект, медь-связывающие белки, металлотионеины, токсичность, фиброз печени.

ABSTRACT

MOHAMMAD ALI YOUSEF AL BEGAI Age-dependent features of the manifestation of the hormone effect on copper ions. - Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology, Speciality: 03.00.04 – biochemistry. – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

In the thesis, the long-term effects of the hormesis effect in copper sulfate, which has been formed, are investigated depending on the age of the animals.

It turned out that, against the background of the sequential input of copper sulfate, experimental animals observed a loss of body weight, a decrease in body temperature and a loss of ability to perform work – swimming with a load. These results convincingly indicate inhibition of significant concentrations of copper ions of the general metabolism and abnormal liver function. It was found that 24 hours after the last injection of copper sulphate or 5 days of the first injection of the toxicant, they show signs of liver fibrosis. In particular, the relative weight of the stitch was reduced, the content of collagen increased, and the lobes of the liver germinated with connective tissue. There was a significant increase in the liver capsule venous congestion and even the "separation" of molded elements from the blood plasma. In addition, these changes can be qualified as the initial stage of fibrosis. This is supported by data on the invariance of the content of globulin, cholesterol, creatinine, AcT i AsT in blood serum in such animals.

However, tested animals with a hormesis effect on copper ions, had the doubled amount of lipid hydrogen dioxide in blood serum, and this did not depend on the age of the animals. The amount of lipid hydrogen dioxide in the blood serum of the control group of older tested animals was lower in comparison to young animals. The amount of lipid hydrogen dioxide in blood serum in older animals remained lower than in young animals, and after induction of liver fibrosis. The obtained results do not confirm the information on the increase of the content of products of free radical reactions in the process of aging and may indicate the participation of products of free radical reactions in metabolic reactions. Such a significant increase of free radical reactions products in the formation of the hermesis effect and as a consequence of the initial stages of liver fibrosis occurred on the background of reliable inhibition of antioxidant enzymes, in particular glutathione peroxidase, one of the enzymes glutathione cycle. However, this was more shown in older tested animals than young ones. Also, an increase in the amount of lipid hydrogen dioxide in mitochondria was carried out against the background of changes in the activity of glutathione peroxidase, aconitase, glutaredoxin. The obtained results indicate the possible regulatory role of products of free radical reactions and, in particular, the activity of the cellular level of immunity

Also presented are data on some characteristics of the immune system. It turned out that the phagocytic index in young and old animals was reduced by 45 – 50 %. At the same time, the index of completeness of phagocytosis in young animals with liver fibrosis does not differ from the control level, while in the old it was significantly reduced compared to the control.

The study of various physiological, biochemical and immunological parameters after the induction of body resistance to copper sulphate was the most pronounced and rapid in time. The answer was changes in the pro-antioxidant system in both young and old animals. To test the specificity or non-specificity of the o-antioxidant system on the effect of copper sulphate, an experimental model was used, which is an experimental increase in life expectancy, a cyclical feeding regimen.

The results showed that with the cyclic feeding regime the indicators of the pro-antioxidant system were changed. The direction of changes in the system of pro-antioxidant with induced fibrosis of the liver and CRC were different. This may indicate a regular role of the oxidation system, which performs various functions under various experimental effects.

Another important finding of our results on the CRC model is the difference in the content of lipid hydroperoxides in mitochondria and microsomes between the first and subsequent cycles. These differences may indicate the formation of metabolic memory to such factors as successive loss and recovery of body weight, shows similarities in adaptive responses to such different influences as the hormesis effect to copper ions and the feeding regimen. At the same time, the activity of phagocytosis remained unchanged.

However, old animals do not lose the ability to adapt to the toxic effects of sulfuric acid, or CFR, they use different metabolic changes, or different strategies for adaptation, studies obtained on a large experimental material preliminary injections into the body of small doses of copper sulfate induce resistance (hormesis effect) to the subsequent introduction of a lethal dose of this toxicant.

Key words: mechanisms of aging, mechanisms of adaptation, hormesis effect, copper binding proteins, metallothioneins, toxicity, fibrosis of the liver.