

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ**

УДК 577.1:615.099:591:546.56

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**«ВІК-ЗАЛЕЖНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОЯВУ ГОРМЕЗИСУ ДО ІОНІВ**  
**МІДІ»**

Спеціальність 03.00.04 – «Біохімія»  
(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

\_\_\_\_\_ **МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ**

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

Харків – 2019

## 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 (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2019.

Фундаментальна властивість біологічних систем – це їхні структурно-функціональні зміни, що має прояв або визначається як старіння. Механізмам старіння присвячено багато наукових робіт, але проблема ще далека від вирішення. Основним методологічним прийомом геронтологічних досліджень є порівняльні дослідження на тваринах різного віку. Такий прийом дозволив сформулювати сучасну парадигму геронтології, суть якої полягає в тому, що зі збільшенням віку зменшується можливість організму адекватно (порівняно з молодим) реагувати на дію негативних факторів, тобто з віком зменшується здатність до адаптації. Разом з тим остаточні експериментальні докази втрати адаптивності старих тварин до екстремальних факторів середовища відсутні. У зв'язку з цим дослідження вік-залежних механізмів адаптації є важливим етапом у вирішенні проблем геронтології.

Одним із найважливіших та негативних (токсичних) факторів середовища є іони міді, оскільки вони частіше за інші токсичні метали зустрічаються у воді, ґрунті, рослинних об'єктах та мають високу токсичність. Відомо, що біологічні системи здатні адаптуватися до токсичних факторів середовища. Дослідження адаптивних можливостей старих і молодих тварин до іонів міді може мати значення для вирішення питання щодо адаптивних можливостей

в онтогенезі. Найважливішим механізмом адаптації до іонів міді може бути гормезисний ефект. Результати роботи показали, що багаторазові послідовні введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді у відносно невеликих дозах 1 мг / 100 гр маси, що становило 33 % від летальної дози, індукували резистентність у щурів до великих летальних доз 2.5-3.0мг / 100 гр маса тіла іонів міді. Індукована стійкість до великих або летальних доз визначається як гормезисний ефект. Дослідження впливу кількості попередніх введенень малих доз та інтервалу між введеннями малих доз показали, що існує «оптимальна» кількість попередніх введенень малих доз у формуванні гормезисного ефекту та існує «оптимальний» час збереження цього ефекту від часового інтервалу введення малих доз. Більшою мірою він проявлявся, якщо летальну дозу сірчаноокислої міді вводили через 24 години після останнього введення малих доз, але ефект гормезису зберігається не менш 45 днів після останнього введення малих доз. Отже, індукована малою дозою резистентність мала пролонгування дії, тобто є запам'ятовування цього ефекту на метаболічному рівні.

Дослідження стійкості до токсичної дії сірчаноокислої міді у старих тварин показало, що вони поступалися в цьому молодим. Після дослідження вмісту іонів міді в клітинах печінки молодих і старих тварин після введення цим тваринам сірчаноокислої міді в дозі розрахованої на масу тіла, як прийнято в геронтології, показало, що в цьому випадку вміст іонів міді в печінці був майже вдвічі більше у старих тварини в порівнянні з молодими. Дослідження групи таких вік-залежних відмінностей маса тіла та маса печінки показало, що збільшення маси тіла з віком значно перевищувало швидкість збільшення маси печінки. У зв'язку із цим під час дослідження вік-залежних ефектів дії ксенобіотиків, які метаболізуються в печінці, необхідність вводити їх у дозах розрахованих не на одиницю маси

тіла, а на одиницю маси печінки. Введення старим тваринам сірчаноокислої міді в розрахунку на масу печінки показали, що старі тварини не поступалися молодим у резистентності до іонів міді.

У тварин з індукованою резистентністю до сірчаноокислої міді були виділені білки з молекулярною масою близько 12 кДа, здатні специфічно зв'язувати іони міді в клітині. Показана роль мідьзв'язувальних білків (МЗБ) у зв'язуванні іонів міді та їхнього розподілу в клітинах печінки. Між внутрішньоклітинним характером розподілу іонів міді в печінці та прояву токсичності виявлено взаємозв'язок. Показано, що МЗБ є термостабільними білками як і металотеніни. Виявлено вік-залежний характер розподілу іонів міді в клітинах печінки. Для адаптивного характеру розподілу іонів міді властива вибіркова локалізація екзогенних іонів міді во фракцію МЗБ. Показано, що найбільша кількість іонів міді накопичувалася в фракції МЗБ старих тварин при формуванні гормезисного ефекту до сірчаноокислої міді та складало  $30 \text{ мг/г Cu}^{2+}$  на мг білка, у той час як у молодих лише  $15 \text{ мкг}$  у таких саме умовах, тобто вдвічі більше.

Формування індукованої резистентності до сірчаноокислої міді забезпечує виживання тварин у таких екстремальних умовах. В літературі відсутні данні щодо наслідків такої адаптивної відповіді, а це питання має важливе значення не лише для вирішення проблем геронтології, але й для розуміння біологічних проблем адаптації.

У зв'язку із цим досліджували віддалені наслідки гормезисного ефекту до сірчаноокислої міді у молодих та старих тварин.

Виявилося, що на фоні послідовного введення сірчаноокислої міді експериментальним тваринам, яке веде до формування гормезисного ефекту, спостерігали втрату маси тіла, зниження температури тіла та втрату здатності здійснювати роботу в тесті плавання з вантажем. Ці результати переконливо свідчать про інгібування значними концентраціями іонів міді загального

метаболізму та порушення функції печінки. Було виявлено, що за 24 години після останнього введення сірчанокислої міді або за 5 діб після першого введення токсиканта у цих тварин виявляються ознаки фіброзу печінки. Зокрема відносна маса печінки була зменшена, вміст колагену збільшено та лопаті печінки проростали сполучною тканиною. Спостерігалось значне збільшення капсули печінки, венозний застій і навіть «сепарація» формових елементів від плазми крові. До того ж ці зміни можуть бути кваліфіковані як початкова стадія розвитку фіброзу. На користь початкового стану фіброзу свідчать дані про незмінність у таких тварин вмісту альбумину, холестерину, тригліцеридів, креатиніну і активності аланінамінотрансферази (АлТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ) у сироватці крові.

Однак у тварин із гормезісним ефектом до іонів міді було збільшено вдвічі вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові й це мало залежало від віку тварин. Разом з тим, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові контрольної групи старих тварин було меншим порівняно з молодими тваринами. Меншим залишався вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові у старих тварин порівняно з молодими тваринами й після індукування фіброзу печінки. Одержані результати не підтверджують дані про збільшення вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій у процесі старіння. і можуть вказувати на участь продуктів вільнорадикальних реакцій у реакціях метаболізму. Таке значне збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій у формуванні гормезісного ефекту та як наслідок початкових стадій фіброзу печінки відбувалися на фоні достовірного інгібування антиоксидантних ферментів, зокрема глутатіонпероксидази, одного з ферментів глутатіонового циклу. Але це було виражено більшою мірою у старих тварин порівняно з молодими. Також збільшення вмісту гідроперекисей ліпідів у мітохондріях здійснювалось на фоні зміни

активності глутатіонпероксидази, аконітази, глутаредоксину. Одержані результати вказують на можливу регуляторну роль продуктів вільнорадикальних реакцій і, зокрема, активності клітинної ланки імунітету.

У третьому розділі результатів власних досліджень подано дані про деякі характеристики імунної системи у молодих і старих тварин з індукованим фіброзом.

Виявилося, що фагоцитарний індекс у молодих і старих тварин був знижений на 45 – 50 % порівняно з контрольним рівнем відповідних груп тварин. У молодих і старих тварин була знижена перетравлююча здатність фагоцитів. У той же час, індекс завершеності фагоцитозу в молодих тварин із фіброзом печінки не відрізнявся від контрольного рівня, у той час як у старих тварин він достовірно був знижений порівняно з контролем.

Вміст церулоплазміну у сироватці крові та молекул середньої молекулярної маси у тварин із фіброзом печінки залишався незмінним незалежно від віку тварин. При цьому вміст гаптоглобіна залишався незмінним у молодих тварин, у той час як у старих тварин він збільшувався вдвічі порівняно з контрольними тваринами. Отже, у молодих і старих тварин на фоні фіброзу печінки формувалися різноманітні паттерни імунологічних і біохімічних показників, що вказує на те, що молоді та старі тварини застосовують різні стратегії адаптації до дії сірчанокиислої міді.

Дослідження різних фізіологічних, біохімічних та імунологічних показників після індукції резистентності організму до сірчанокиислої міді показали, що найбільш вираженою та швидкою в часі відповіддю були зміни в прооксидантно-антиоксидантній системі як у молодих, так і в старих тварин. Для перевірки специфічності або неспецифічності прооксидантно-антиоксидантній системи на дію сірчанокиислої міді було використано ще одну експериментальну

модель, яка забезпечувала експериментальне збільшення тривалості життя – циклічний режим годування (ЦРГ).

Було встановлено, що втрата маси тіла, яка була викликана не надлишком іонів міді, а обмеженням у кількості їжі, також супроводжувалася дворазовим збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях як молодих, так і старих тварин. Однак при цьому, активність глутатіонпероксидази не зменшувалась як при фіброзі печінки, а збільшувалась на 142 % у молодих та на 33 % у старих тварин. Відновлення маси тіла супроводжувалося відновленням до контрольного рівня вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях як молодих, так і старих тварин. При цьому рівень активності глутатіонпероксидази залишався підвищеним порівняно з контрольним рівнем у молодих на 33 %, а у старих на 88 % це свідчить про різні взаємовідносини у про- і антиоксидантної системи при різних впливах на організмі.

У другому циклі втрата маси тіла супроводжувалась менш вираженим збільшенням вмісту гідроперекисів у мітохондріях і фракції мікросом печінки. У той час як активність глутатіонпероксидази збільшувалась на 25 % у молодих тварин порівняно з контрольним рівнем, а у старих тварин на 142 % від ісходного рівня.

Одержані результати показали, що при ЦРГ показники прооксидантно-антиоксидантної системи змінювалися, проте спрямованість змін у системі прооксидантно-антиоксидантній 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.

Ще одним важливим висновком отриманих результатів на моделі ЦРК є різниця у вмісті гідроперекисів ліпідів у мітохондріях і мікросомах між першим та наступними циклами. Ці відмінності

можуть вказувати на формування метаболічної пам'яті до таких факторів, як послідовні втрати та відновлення маси тіла, що показує подібності в адаптивній відповіді на настільки різні впливи, як гормезисний ефект до іонів міді та режим годування. При цьому активність фагоцитозу залишалася незмінною.

Одже старі тварини не втрачають здібності адаптуватися до токсичної дії сернокислої міді, або ЦРГ, вони використовують різні метаболічні зміни, або різні стратегії адаптації.

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

## 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 (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

Structural and functional changes, which have display or are defined as aging process, are the fundamental principle of biological systems. There are a lot of scientific research concerning aging issues, but the problem is still far from its solvation. The main methodological method of gerontological studies is comparative analysis on animals of all ages. The aforementioned technique allowed formulating the modern paradigm of gerontology, the essence of which is that, with the age increasing, the ability of the organism (in comparison with the young) to react adequately to the effect of negative factors. In this aspect, the ability to adapt – decreases. At the same time, there are no final experimental evidence of the loss of adaptability of old animals to extreme environmental factors. Due to this fact, the study of age-dependent adaptation mechanisms is an important stage in solving the problems of gerontology.



Copper ions are one of the most important and negative (toxic) factors of the environment, since they are more common in other water sources, soils, plant objects and are highly toxic. It is known that biological systems are able to adapt to toxic environmental factors. The adaptive capacities research of old and young animals to copper ions may be important for solving the problem of adaptive possibilities in ontogenesis. The most important mechanism of adaptation to copper ions can be a hormesis effect. The results of the work have shown that repeated multiple consecutive injection of sulfurous copper into experimental animals at relatively small doses at a range of 1 mg/100 g of mass, which was 33% of the lethal dose, induced resistance in rats to high lethal doses of 2.5-3.0 mg/100g body mass of copper ions. Induced resistance to large or lethal doses is defined as a hormesis effect. The study of the effect of the number of previous injections of small doses and the interval between low-dose injections has shown that there is an "effective" number of previous injections of small doses in the formation of the hormesis effect and there is an "effective" time of preservation of the hormesis effect from the time interval of small doses injections. In a greater degree this effect was demonstrated when the lethal dose of sulfate copper was injected 24 hours after the last injection of small doses, but the effect of hormesis remained at least 45 days after the last injection of small doses. Therefore, the low-dose induced resistibility had a prolongation of action, thus is memorizing of this effect at the metabolic level.

Investigation of the resistance to toxic action of sulfurous copper in old animals showed that they caved on comparing to young animals. After studying the content of copper ions in the liver cells of young and old animals after the injection of sulfurous copper in a dose-based on body weight, as adopted in gerontology, it was shown that in this case, the copper ion level in the liver was almost twice high with old animals compared to young ones. A study of a group of such age-related contrasts of body weight and liver mass showed that an increase of body weight with age, significantly exceeded the rate of liver mass increase. In connection with this, during the study of the age-dependent effects of

xenobiotic activity, which are metabolized in the liver, it is necessary to inject them in doses not calculated per unit of body weight, but per unit mass of the liver. Injection of sulfur dioxide copper to old animals in terms of the liver mass showed that the old animals were not inferior comparing to the young animals in the connection of resistance to copper ions.

Animals with induced resistance to sulfuric acid, proteins with a molecular weight of about 12 kDa were isolated, capable to bind specifically the ions of copper in the cell. There was shown the role of copper binding proteins (CBP) in binding of copper ions and their distribution in liver cells. There were shown the interaction between the intracellular nature of the distribution of copper ions in the liver and the toxicity display. It was shown that CBP are thermostable proteins like metallothionine. The age-dependent distribution pattern of copper ions in liver cells are relieved. For the adaptive nature of the distribution of copper ions, the selective localization of exogenous copper ions is characteristic of the CBP fraction. It was shown that the largest number of copper ions is accumulated in the fraction of CBP of old animals during the formation of the hormesis effect before sulfuric acid copper and consists of 30mg/g of  $\text{Cu}^{2+}$  per mg of protein, whereas in young only 15 micrograms under the same conditions, that is, twice more.

The formulation of induced resistance to sulfuric acid copper provides the survival of animals in such extreme conditions. The literature does not contain information on the consequences of such an adaptive response, and this issue is important not only for solving problems of gerontology, but also for understanding the biological problems of adaptation.

In this case, the distant effects of the hormesis effect on sulfurous copper in young and old animals were investigated.

It appeared that on the at a time when of the sequential introduction of sulfate copper to experimental animals, which led to the formation of the hormone effect, we observed a loss in body weight, a decrease of body temperature and the loss of the ability to perform work in the case of the experimental test of “swimming with cargo”. These results convincingly indicate the inhibition by

significant concentrations of copper ions of general metabolism and liver function dyspraxia. It was found that 24 hours after the last injection of sulfurous copper, or 5 days after the first injection of the toxicant, tested animals showed signs of liver fibrosis. In particular, the relative weight of the liver was reduced, the collagen content was increased and the blade of the liver spired with a connective tissue. There was a significant increase of the liver capsule, venous stasis, and even the "separation" of the organizing elements from blood plasma. In addition, these changes can be qualified as the initial stage of development of fibrosis. The approval of initial state of fibrosis is shown by evidence of immutability of tested animals of the content of globulin, cholesterol, triglycerides, creatinine and alanine-aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase in blood serum.

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.

In the third section of the results of our own studies, the following data is provided on certain characteristics of the immune system in young and old tested animals with induced fibrosis.

It turned out that the phagocytic index in young and old tested animals was reduced by 45 – 50 % in comparison with the control level of the corresponding groups of animals. In young and old animals, the digestive capacity of phagocytes was reduced. At the same time, the index of completeness of phagocytosis in young animals having liver fibrosis did not differ from the control level, while older animals having was reliably lowered compared with control.

The content of caeruloplasmin in blood serum and molecules of average molecule weight of the animals with liver fibrosis remained unchanged regardless of the age of the animals. In this aspect, young animals had the unchanged content of haptoglobin, while older animals had it increased twice as compared with control animals. Thus, young and old animals with liver fibrosis, had various patterns of immunological and biochemical parameters, indicating that young and old animals use different strategies for adapting to the action of sulfuric copper.

Studies of various physiological, biochemical and immunological parameters after induction of resistance of the organism to sulfurous copper showed that the most evident response was the change in the prooxidant-antioxidant system of young animals as well as old ones. Another experimental model was used to test the specificity or non-specificity of the antioxidant system, the effect of sulfuric acid on copper, which provided an experimental increase of life expectancy - cyclic feeding regime (CFR).

It was understood that the loss of the body mass, which was caused not by the excess copper ions, but by the limitations in the amount of food, was also accompanied by a double increase in the content of lipid hydro peroxide in mitochondria, both young and old animals. However, the activity of glutathione peroxidase did not decrease as with liver fibrosis, but increased by 142 % for young and in 33% for older animals. Both old and young animals had the process of the recovery of the body mass which was accompanied by the restoration to the

reference level of the content of lipids hydroperoxides in mitochondria. At the same time, the level of activity of glutathione peroxidase remained increased compared to the control level for the young tested animals by 33%, while the old tested animals had at 88 %, it proves different interactions in the pro-oxidant and antioxidant system with various effects on the organism.

In the second cycle, the body weight loss was accompanied by a less obvious increase in the content of hydroperoxides in mitochondria and fractions of liver microsomes. While the activity of glutathione peroxidase increased by 25 % for young animals compared with the control level, and for older animals by 142 % of the reference level.

The obtained results showed that the parameters of the pro-oxidant-antioxidant system changed under the CFR, but the direction of change in the system of pro-oxidant-antioxidant with induced liver fibrosis and CFR was different. This may indicate the regular role of the reduction-oxidation system, which performs various functions during various experimental influences.

Another important conclusion of the results obtained on the model of the CFR is the difference in the content of lipids hydroperoxides in mitochondria and microsomes between the first and subsequent cycles. These differences may indicate the formation of metabolic memory to such factors as consistent loss and recovery of body weight, which shows similarities in the adaptive response to such varied influences as the hormone effect on copper ions and the feeding regime. In this case, 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.

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

## 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, тригліциридів, 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 Бегаї Мохаммад Алі Юсеф.** Показники функціональної активності і морфології печінки за терапії Си-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).*



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ВІК-ЗАЛЕЖНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В ЦЬОМУ (літературний огляд).....	26
1. 1 Можлива роль вільних радикалів у механізмах старіння.....	26
1.2 Розробка експериментальної моделі в дослідженні вільнорадикальних процесів у механізмах вік-залежних адаптацій.....	31
1. 3 Роль гормезису в механізмах вік-залежної адаптації.....	33
1. 4 Сучасні підходи і проблеми у вивченні гормезису до токсичних сполук.....	34
1. 5 Прояв гормезису до іонів важких металів.....	36
1. 6 Калорійно обмежена дієта і уповільнення старіння.....	38
1. 7 Роль металотіонеїнів у механізмах стійкості до іонів важких металів та інших стрес-факторів.....	43
1. 8 Можлива роль металотіонеїнів у регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи.....	47
Висновки до розділу 1.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	51
2.1 Експериментальні тварини.....	51
2. 1. 1 Групи тварин в експериментах з вивчення ефекту гормезису.....	51
2. 1. 2 Модель циклічного режиму годування.....	52
2. 1. 3 Виведення тварин з експерименту.....	53
2. 2 Фізіологічні методи дослідження.....	53
2. 3 Препаративні методи дослідження.....	54
2. 3. 1 Отримання сироватки для дослідження.....	54
2. 3. 2 Гістологічні дослідження печінки.....	54
2. 3. 3 Виділення мітохондрій з печінки.....	54

	17
2. 4 Аналітичні методи дослідження.....	55
2.4. 1 Визначення вмісту колагену.....	55
2. 4. 2 Визначення концентрації гідроперекисів ліпідів.....	56
2. 4. 3 Визначення активності глутатіонпероксидази.....	56
2. 4. 4 Визначення активності глутатіонредуктази.....	57
2.4. 5 Визначення активності аконітатгідратази.....	57
2.4. 6 Визначення активності глутаредоксинів.....	57
2. 4. 7 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів.....	58
2. 4. 8 Визначення концентрації гаптоглобіну і церулоплазміну.....	58
2. 4. 9 Визначення концентрації пептидів середньої молекулярної маси.....	59
2. 5 Статистична обробка результатів дослідження.....	59
Висновки до розділу 2.....	59
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	60
3. 1 Дослідження залежності прояву гормезису до іонів міді від схеми попереднього введення малих доз цього токсину та роль мідь-зв'язуючих білків у цьому процесі.....	60
3. 1. 1 Дослідження залежності прояву гормезису від кількості попередніх введень сірчаноокислої міді.....	60
3. 1. 2 Залежність прояву гормезису від тимчасового інтервалу між введеннями малих і летальних доз сірчаноокислої міді.....	64
3. 1. 3 Дослідження ролі мідь-зв'язуючих білків у формуванні гормезису до іонів міді.....	70
Заклучення до підрозділу 3. 1.....	78
3. 2 Біохімічні та імунологічні наслідки гормезису до сірчаноокислої міді.....	79
3. 2. 1 Динаміка маси тіла і працездатність молодих і старих тварин після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді.....	79
3. 2. 2 Морфологічні зміни в печінці після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді.....	83

3. 2. 3 Певні показники про- та антиоксидантної системи при Cu-індукованому фіброзі печінки.....	86
3. 2. 4 Певні показники клітинного та гуморального імунітету після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді у молодих і старих тварин.....	90
Заклучення до підрозділу 3. 2.....	99
3. 3 Певні показники прооксидантно-антиоксидантної та імунної систем при циклічному режимі годування, як моделі збільшення тривалості життя.....	100
3. 3. 1 Показники про-антиоксидантної системи у молодих і старих тварин, що знаходяться на двох послідовних режимах ЦРК.....	100
3. 3. 2 Показники клітинної ланки імунітету при циклічному режимі годування .....	107
3. 4 Обговорення результатів.....	117
Висновки до розділу 3.....	116
ВИСНОВКИ.....	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	120
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	143
ДОДАТОК 2 АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ .....	146

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

ПОЛ – перекісне окиснення ліпідів  
і.в.м. - іонів важких металів  
КОД- калорійно обмежена дієта  
ТЖ- тривалість життя  
МТ -металотіонеїни  
НГ - нейтрофільні гранулоцити  
ФІ -фагоцитарний індекс  
ФЧ -фагоцитарне число  
ІЗФ-індекс завершеності фагоцитоза  
ПААГ - поліакриламидний гель  
МЗБ- мідьзв'язуючі білки  
ГПЛ- гідроперекиси ліпідів  
ПСММ- пептиди середньої молекулярної маси  
ЦРГ- циклічний режим годування  
ГП- глутатіонпероксидаза  
АФК- активні форми кислорода

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** 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 [189, 199]. Як відомо, одними з найпоширеніших токсичних чинників навколишнього середовища є іони важких металів, зокрема, міді [191, 198]. 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 сірчаноокислої 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 сірчаноокислої міді в організм супроводжується формуванням гормезису – ефекту індукованої стійкості до токсичного або фізичного впливу [21, 22]. 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 вільнорадикальних гіпотеза старіння [87, 125]. У зв'язку з цим, актуальним і перспективним є дослідження механізмів індукованої резистентності до сірчаноокислої 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 і завдання дослідження.** 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 введенень сірчаноокислої міді та від часового інтервалу між введенням малих та летальних доз  $\text{CuSO}_4$  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, гідропероксидів 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 отриманих 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 сірчаноокислої 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 сірчаноокислої 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 сірчаноокислої 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.

**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 дисертації.** 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).

**Структура та 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.

**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 И. 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».

## РОЗДІЛ 1

### **ВІК-ЗАЛЕЖНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ІОНИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І РОЛЬ СВОБОДНІРОДІКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В ЦЬОМУ (літературний огляд)**

#### **1. 1 Можлива роль вільних радикалів у механізмах старіння**

Старіння є однією з фундаментальних властивостей біологічних систем. Дослідженню механізмів старіння присвячена велика кількість робіт, і зацікавленість цим явищем інтенсивно зростає. У теперішній час функціонують десятки науково-дослідних інститутів і сотні лабораторій, які спеціалізуються на сучасних геронтологічних і геріатричних дослідженнях, видаються сотні наукових журналів і щорічно проходять міжнародні та регіональні форуми фахівців. Висловлено сотні гіпотез про можливі механізми цього фундаментального біологічного явища.

Однак, механізми старіння залишаються не дослідженими повною мірою і забезпечити ефективну регуляцію темпів старіння в експерименті, що було б доказом істинності висловлених гіпотез, поки не вдається.

Існуюча оцінка всесвітньої демографічної ситуації свідчить про те, що за останні 200 років середня тривалість життя людини істотно збільшилася. За даними національного інституту старіння США, статистичного бюро Європейських співтовариств, в останній чверті XX століття в економічно розвинених країнах різко збільшується частка людей віком 65–85 років [188].

Ситуація, що складається, вказує на кілька важливих соціальних і біологічних аспектів проблеми старіння. Фахівці вважають, що збільшення середньої тривалості життя в економічно розвинених країнах пов'язане з розумінням ролі гігієни, раціональним харчуванням, розвитком профілактичної медицини та значним зменшенням дитячої смертності та

смертності в середньому віці [125, 187]. Із цього випливає, що тривалість життя «піддається» регуляції, принаймні, у межах максимальної тривалості життя біологічного виду.

Другий аспект збільшення середньої тривалості життя пов'язаний з корекцією так званих вік-залежних патологій: онкопатологій, нейродегенеративних захворювань і патологій серцево-судинної системи [122, 176]. Факт «прихильності» тих чи інших патологій до пізніх етапів онтогенезу свідчить про наявність складного зв'язку між часом існування (темпоральність онтогенезу) і регуляцією процесів адаптації організму до комплексу факторів середовища.

У зв'язку з цим, збільшення частки старих людей, які потребують соціального забезпечення та догляду, переростає в глобальну соціальну проблему. Єдино вірним підходом у вирішенні цієї проблеми є дослідження механізмів формування та перебігу вік-залежних патологій і особливостей механізмів адаптації до негативних факторів середовища на пізніх етапах онтогенезу.

Рішення проблеми старіння можливе лише на підґрунті фундаментальних знань про вік-залежні механізми, які і ведуть до втрати адаптивних можливостей організму і як наслідок пояснення причин дегенеративних змін на пізніх етапах онтогенезу [1, 23, 45, 46, 48, 49, 50, 123].

Необхідно відзначити, що дослідження механізмів старіння становить інтерес не тільки для вирішення проблем геріатрії, а й розвитку сучасної персоніфікованої медицини, тому що на різних етапах онтогенезу не лише формуються різні патології, але їх перебіг і вибір тактики лікування визначається вік-залежними особливостями метаболізму. Добре відомо, що фармакологічні характеристики лікарських препаратів для молодого і старого організму можуть сильно відрізнятися [42, 87]. Наявна статистика свідчить про те, що щорічно в США помирає понад 300 тис. старих людей від передозування і неправильного використання лікарських препаратів [87]. Ці

дані можуть вказувати на різницю у фармакології лікарських препаратів у старих і молодих організмів.

Крім того, знання вік-залежних особливостей продуктивності та адаптивності різних біологічних об'єктів надзвичайно важливе в сучасних біотехнологіях і сільському господарстві. Немає сумнівів, фундаментальні знання механізмів старіння, темпоральних особливостей адаптації організму до комплексу негативних факторів середовища є актуальними завданнями сучасної біології, медицини та біотехнології.

Слово «старіння» у нас асоціюється з образом старої, немічної і хворої людини. В цьому відношенні доречно згадати вислів Цицерона, який більше 2000 років тому писав: «Ми боїмося старості тому, що вона пов'язана з хворобами і стражданнями».

Суворі послідовність онтогенетичних подій, яка має місце: народження → дорослішання → зрілість → старість → смерть, легко асоціюється з машиною і механізмом. Настільки явна аналогія не могла не вплинути на трактування і саму методологію дослідження старіння.

Парадигма геронтології заснована на концепції «ізносу», втрати надійності функціонування метаболізму, що проявляється у втраті адаптивності, збільшенні ймовірності розвитку патологій і настання смерті [40, 42].

Практично всі існуючі гіпотези старіння спрямовані на підтвердження цієї парадигми.

Життєздатність клітини й організму в цілому визначається особливістю їх енергетичного обміну. Як відомо, перенесення електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій супроводжується синтезом АТФ у процесі окисного фосфорилування. Поряд із синтезом АТФ утворюються продукти неповного відновлення кисню, тобто молекули з неспареним електроном, або вільні радикали. Отже, вільні радикали є наслідком енергетичного метаболізму організму [40, 46, 48, 49].

Поряд із мітохондріями вільні радикали активно утворюються в процесі функціонування мікосомальних оксигеназних ланцюгів, а також у численних дегідрогеназних реакціях у цитоплазмі клітин [40, 99]. Перекисна теорія біологічного окислення була сформульована ще в 1897 році російським ученим А. Н. Бахом. [24, 40].

Наявність неспареного електрона в структурі вільних радикалів обумовлює їхню високу реакційну здатність, і вони можуть окисляти білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, забезпечуючи ковалентну модифікацію окислених макромолекул. Так, окислені білки набувають здатності взаємодіяти один з одним і з утворенням агрегатів, утворенням карбонільних продуктів та продуктів окислення.

Дія вільних радикалів веде до зміни ферментативної активності білків, утворення альдегідів і кетонів, окислення ліпідів в структурі мембран [99, 119].

Відомо, що окислення ліпідів у складі мембран супроводжується збільшенням їхньої полярності, наслідком чого відбуваються зміни фізичних властивостей гідрофобного шару мембран, а це позначається на мембранній проникності, функціонуванні мембранотранспортних систем і активності мембранозв'язаних ферментів [48, 49, 50, 123, 99, 139].

Отже, вільні радикали, які утворюються як "побічний" продукт енергетичного обміну в клітині і представлені різними молекулами. Вони змінюють активність ферментних систем, модулюють функцію генетичного апарату і біологічних мембран, що веде до зміщення рівноваги прооксиданти↔антиоксиданти в бік прооксидантів і утворення такого стану як "окислювальний стрес" [205].

Увага біологів до утворення і функцій вільних радикалів у механізмах старіння виникла в середині 50-х років минулого століття, коли незалежно два вчених –Харман Д. і Эмануэль Н. висловили вільнорадикальну гіпотезу старіння [30, 102].

Відповідно до цієї гіпотези, з віком відбувається збільшення кількості вільнорадикальних пошкоджень в організмі. Накопичення таких ушкоджень макромолекул і клітинних структур веде до виникнення вік-залежних патологій і скорочення тривалості життя [87, 95, 114].

Вільнорадикальна гіпотеза настільки логічна та переконлива, що вона швидко привернула увагу фахівців. За більш півстолітній період інтенсивних досліджень механізмів вільнорадикальних реакцій, характеристик продуктів, що утворюються в цих реакціях і їх ролі в процесах старіння і формуванні різноманітних патологій, не тільки стимулювало розвиток геронтології, але й привело до нового наукового напрямку сучасної біології, яка отримала назву – вільнорадикальної біології [159]. Звичайно, численні дослідження вільнорадикальних процесів показали, що процес старіння пов'язаний не лише і не стільки з простим кількісним збільшенням продуктів вільнорадикальних реакцій, але зі складною ієрархічною системою регуляції метаболізму [103].

Ймовірно, першими експериментальними даними, які не вкладалися в просте трактування вільнорадикальної гіпотези старіння, були дані по відсутності суттєвого впливу антиоксидантів на тривалість життя експериментальних тварин [93, 125].

Ще одним аргументом проти однозначного трактування вільнорадикальної гіпотези стали сучасні результати з характеристики антиоксидантної системи організму. Виявилось, що організм має багаторівневу систему захисту від вільних радикалів, які постійно утворюються в організмі [90, 115].

У результаті вільнорадикальна гіпотеза отримала свій розвиток у "теорії окислювального стресу". Термін "окислювальний стрес" уперше був уведений Helmut Sies і визначений як зміщення рівноваги в системі прооксиданти ↔ антиоксиданти в бік прооксидантів [174].

Необхідно відзначити, що, хоча положення "теорії окислювального стресу" і оригінальної "вільнорадикальної гіпотези старіння" не мають

принципових відмінностей, вони базуються на різних методологічних підходах.

Якщо у вільнорадикальній гіпотезі використовується механістичний підхід, або передбачається наявність прямої кореляції між кількістю вільнорадикальних продуктів і тривалістю життя, то в теорії окисного стресу виходять з багатфакторності регуляції співвідношень між протилежно діючими факторами редокс-системи.

У цьому сенсі необхідно відзначити, що для функціонування біологічних систем важливою є не кількість тієї чи іншої сполуки, а співвідношення (баланс) між різними біологічно активними сполуками. [133].

У 2012 році Sohal R. S та інші автори сформулювали єдину концепцію «структурних пошкоджень, обумовлених окислювальним стресом», яка об'єднала існуючі гіпотези про роль вільних радикалів у старінні [179].

Дослідження показали, що вільні радикали і їхні різноманітні продукти, серед яких не лише гідроперекиси, але й стабільні, альдегіди і кетони з тривалим життям, є компонентами численних сигнальних шляхів, які беруть участь у регуляції обмінних процесів у клітині [36, 37].

У цьому відношенні залишаються мало дослідженими взаємозв'язок окисного стресу і запуск і регулювання циклу адаптивних реакцій організму. Як зазначалося, основна парадигма сучасної геронтології будується на вік-залежному зниженні адаптивних можливостей організму. У зв'язку з цим дослідження окисативного стресу в регуляції балансу між фізіологічною адаптацією і формуванням патофізіологічних станів є найважливішим етапом розвитку вільнорадикальної теорії старіння [77].

Дослідженню деяких аспектів можливого впливу продуктів вільнорадикальних реакцій у формі патофізіологічних процесів присвячена ця робота.



## 1. 2 Розробка експериментальної моделі в дослідженні вільнорадикальних процесів у механізмах вік-залежних адаптацій

Ефективність експериментальної перевірки тих чи інших наукових гіпотез залежить від використовуваних експериментальних моделей. Під час розробки експериментальної моделі для дослідження ролі продуктів вільнорадикальних реакцій у механізмах адаптації виходили з того, що у модельних тварин необхідно індукувати утворення вільних радикалів і на тлі окисного стресу «повинні» змінюватися адаптивні процеси до негативних факторів середовища. Тривалість досліджень повинна бути такою, щоб на тлі адаптивних процесів почали проявлятися патологічні ефекти.

Для вирішення цієї складної, але важливої задачі геронтології в якості індуктора вільнорадикальних реакцій, нами були обрані іони міді.

Як відомо, іони міді посідають особливе місце серед іонів інших важких металів за відношенням їх до дії на біологічні системи, серед яких найважливішими є такі: 1 – вони є есенціальними елементами і входять до складу коферментів не менше, ніж 40 ферментів; 2 – вони є надзвичайно токсичними в разі перевищення фізіологічних концентрацій, проявляючи прооксидантну активність; 3 – іони міді є одними з найпоширеніших токсинів у водному середовищі серед іонів важких металів [11, 180, 208]. У наших роботах було показано, що багаторазове послідовне введення іонів міді в середовище культивування мікроводорості *Dunaliella viridis* супроводжується формуванням стійкості навіть до летальних доз сірчаноокислої міді [5, 12]. Всі ці факти дозволяють уважати, що іони міді є вдалим токсичним біогенним елементом, який може індукувати окислювальний стрес і формувати комплекс адаптивних реакцій в організмі, що може забезпечити моделювання взаємовідношень окисного стресу в розвитку адаптивних і / або патофізіологічних реакцій у тварин різного віку.

Піддаючи однотипному впливу токсичними дозами іонів міді молодий і старий організм, можна виявити особливості адаптивної відповіді тварин

різного віку. Виходячи з існуючої парадигми геронтології про вік-залежні зниженні адаптивні можливості старих тварин у порівнянні з молодими, можна виробити стратегію усунення вік-залежних патологій старих організмів.

Необхідно відзначити, що найважливішою методичною особливістю при дослідженні впливу токсичних сполук (негативних факторів середовища на біологічні системи) є визначення залежності доза – ефект [1, 49, 50, 132]. Дослідження дозо-залежності ефекту іонів міді, яке було проведено на різних об'єктах у системах як *in vivo*, так і *in vitro*, показало наявність так званого U - ефекту [8]. Для такого ефекту є характерною двофазна дія хімічних сполук, при якій мала доза стимулює досліджувані показники, а більша доза пригнічує ці показники.

Такий характер відповіді, при якому присутні фази стимуляції низки метаболічних систем організму з формуванням в подальшому стійкості і до токсичних доз того ж токсиканту отримала назву гормезис.

### **1. 3 Роль гормезису в механізмах вік-залежної адаптації**

"Гормезис" від грецького "hormaeih", що в перекладі означає "збуджувати". Через рік після відкриття рентгенівського випромінювання (1885 – Рентген) професор університету штату Міссурі ShraderB., виявив, що попереднє опромінення морських свинок забезпечувало їм виживання після щеплень бацилами дифтерії, тобто невеликі дози опромінення мали стимулюючим ефектом стійкості до токсичного впливу. Але оскільки увагу дослідників у той час в більшій мірі привертала механізми дії та інгібуючі ефекти рентгенівського випромінювання, ця важлива робота залишилася без особливої уваги.

У 1977 році професор Кузін А. М. опублікував монографію "Стимулююча дія іонізуючого випромінювання на біологічні процеси". У 1977 році у своїх роботах він описав явище радіаційного гормезису і

зазначив, що стимулююча дія радіації в малих дозах є не випадковим явищем, а має спільні закономірності [22, 164]. Незалежно від біологічного об'єкта, починаючи з вірусів і одноклітинних організмів і закінчуючи вищими рослинами, ссавцями і людиною, існують такі умови опромінення, при яких з'являється стимулююча дія, що прискорює зростання та розвиток, підвищує опірність організму до несприятливих умов зовнішнього середовища. Вже через кілька років, в 1979 році проф. Luskey склав список публікацій про стимулюючий ефект малих доз радіації на різні об'єкти, цей список містив 1200 посилань.

Починаючи з 70-х років минулого століття стартує активне дослідження гормезисного або U-ефекту. Подібна токсикодинаміка змін простежувалася під час вивчення токсичних ефектів широкого кола неорганічних і органічних з'єднань в експериментальних дослідженнях та *in vitro* для оловоорганічних сполук [177, 204, 207], хлориду ртуті [53, 117], компонентів полімерних і лакофарбових матеріалів [70, 155]. При цьому виявлення токсичних ефектів у дослідженнях із дозами хімічних речовин нижче порога хронічної дії отримали назву "парадоксальної токсичності" [73, 196]. І хоча в літературі накопичений великий матеріал з теоретичних і прикладних аспектів цієї актуальної проблеми гормезису в біології, медицині та фармакології, багато з них залишаються недостатньо вивченими.

#### **1. 4 Сучасні підходи і проблеми у вивченні гормезису до токсичних сполук**

Виявлення механізму U-подібного ефекту для різноманітних токсичних речовин у широкому діапазоні доз призвело всередині 80-х років XX століття до несподіваних результатів при вивченні закономірностей біоефектів фізіологічно активних речовин у галузі малих і надмалих доз або концентрацій (в інтервалі  $10^{-5}$ - $10^{-17}$  М і нижче) [1, 23, 35, 45, 46, 48, 49, 50, 53, 54, 63, 123,]. При зменшенні концентрації речовини (на 1–2 порядки) ефект

закономірно знижується, потім настає «зона мовчання» (при більш низьких концентраціях ефект не спостерігається), а далі при ще більш низьких концентраціях, відмінних від початкових на 4–6 порядків, ефект виникає знову. Це явище отримало назву ефекту надмалих доз (НМД) або надмалих концентрацій (НМК). Такий ефект спостерігався при дослідженні різноманітних хімічних агентів: регуляторів росту, протипухлинних препаратів, нейропептидів і гормонів, імуномодуляторів, антиоксидантів та інших як білкових, так і небілкових з'єднань [64].

У той же час була опублікована робота, в якій описано вплив фізіологічно активних речовин у концентраціях від  $10^{-9}$  М аж до мізерно малих значень [65]. В цьому випадку біоефектів проявляються при концентраціях нижче навіть тих, які використовуються в гомеопатії – системі лікування мізерно малими дозами, запропонованої в 1796 році німецьким лікарем С. Ганеманом. В опублікованому в 1988 р. огляді узагальнені дані, також незрозумілі в межах прийнятих в токсикології уявлень [44]. Зокрема, ефект, що спостерігається в зоні середніх доз, в деяких випадках може бути нижче в порівнянні з дією менших доз. Такий ефект було названо «парадоксальним». Парадоксальні ефекти виглядають провалами на кривих «доза–ефект».

Іноді криві, що описують парадоксальну залежність, мають два провали. Автори роботи вважають, що парадоксальні ефекти реалізуються набагато частіше, ніж фіксуються в науковій літературі. Їх не завжди вдається спостерігати тільки тому, що вони з'являються нижче або вище меж досліджуваних концентрацій ксенобіотиків або в області проміжних концентрацій, які не розглядалися. В інших випадках, коли парадоксальні ефекти здавалися абсолютно очевидними за експериментальними даними, їх просто не враховували. Крім того, парадоксальні ефекти можуть виявлятися в більш віддалений час, ніж це визначено межами конкретного експерименту. У результаті вони можуть бути просто втрачені. Однак, якщо збільшити час

спостереження за біооб'єктами, який можна порівняти, ефект може бути досягнутий під дією значно нижчих концентрацій ксенобіотиків.

Гормезис, так само, як і парадоксальний ефект у цілому, у дійсності виявляється набагато частіше, ніж фіксується в науковій літературі. Одна з причин того, на думку авторів роботи, пов'язана з загальною тенденцією досліджень у токсикології, а саме, при визначенні смертельних доз токсичних речовин не враховуються концентрації, при яких тільки й можна виявити явище гормезису [58].

Хоча парадоксальний ефект має місце при дії хімічних речовин на біологічні системи різних рівнів організації (організменний, клітинний, субклітинний), механізм його в більшості випадків незрозумілий, і на теперішній час чітке пояснення природи цього феномена відсутнє. В цілому таке явище, як зізнається сучасними дослідниками, дійсно існує. Однак не у всіх випадках вдається отримати достовірне відтворення спостережуваних ефектів під час роботи з НМД і НМК. Тому не випадково визначні дослідники, що працюють в цій галузі, дуже обережні в трактуванні цього явища [55, 143].

## **1. 5 Прояв гормезису до іонів важких металів**

Токсичність іонів важких металів (і.в.м.) залежить не тільки від їх концентрації в середовищі і фізико-хімічних характеристик, але і властивостей біологічних об'єктів зокрема віку. Так, токсичність іонів міді залежить від віку культури або організму функціонального стану біологічної системи в момент впливу [66, 165, 192, 203]. Крім того, на прояв токсичності і.в.м. впливатиме здатність організму адаптуватися до них. Механізми адаптації клітин до екстремальних умов різноманітні і складні. Саме вони забезпечують виживання організму в умовах мінливого середовища, і вони впливають на прояв гормезису. Найменш вивчений і найбільш важливий у процесах адаптації це гормезис [46, 48, 49, 50, 123].

Суть у тому, що попередня адаптація організму може забезпечити йому стійкість до великих доз або концентрацій, аж до летальних. Як зазначалося, вперше гормезис ефект був описаний на прикладі радіостійкості [22]. Пізніше було виявлено, що він спостерігається і при дії і.в.м. [165, 203], хімічних токсикантів, інших токсичних впливів і проявляється у різних об'єктів, тобто має загальнобіологічний характер [4, 5, 167]. Встановлено, що здатність організму до адаптації і, ймовірно, до гормезису ефекту визначається тимчасовими змінами концентрації і.в.м. в клітці або організмі [3]. Виходячи з цього можна очікувати, що, підбираючи концентрації і.в.м. та інтервал між поступовим збільшенням концентрацій у клітині, можна індукувати різні системи стійкості біооб'єктів, що може проявлятися і в «надстійкості» – гормезису.

У роботі досліджували стійкість культури *Dunaliella viridis*, попередньо адаптованої до зростання на середовищі, що містить 20 мг / л сірчаноокислої міді, до підвищення концентрації іонів міді до 75 мг / л сірчаноокислої міді [12, 21]. Показано, що така культура стійка до високих концентрацій іонів міді, тобто здатна проявляти гормезис. Виявлено, що клітини *D. viridis*, резистентні до іонів міді (75 мг / л), накопичують в 2000 разів більше іонів міді в порівнянні з контрольною культурою. При цьому зміст карбонілованих білків (продуктів вільно-радикальних процесів) у них збільшується всього в 2 рази. У процесі культивування в клітинах в кілька разів зменшувався вміст  $\text{Cu}^{2+}$ . У клітинах, які проявляють гормезис, достовірно зростала активність супероксиддисмутази і в 2 рази зменшувався вміст вільного проліну. Висловлено припущення, що гормезис проявляється в тому випадку, коли має місце спільний прояв усіх систем захисту клітини. Для такої поведінки характерно не просте підсумовування всіх елементів захисту, а прояв емерджентних властивостей системи [5, 21].

Дослідження механізмів гормезису до іонів міді у тварин різного віку є важливим і перспективним експериментальним підходом в дослідженні механізмів старіння. Адже основним критерієм старіючого організму є зміна

систем адаптації та, як наслідок, порушення функціональних систем організму, які проявляються у вигляді вік-залежних патологій.

Найбільш ефективним підходом у дослідженні цих складних біологічних об'єктів є використання моделей зміни тривалості життя, зокрема калорійно обмеженої дієти.

## **1. 6 Калорійно обмежена дієта і уповільнення старіння**

Однією з центральних проблем експериментальної геронтології та геріатрії є складність ідентифікації прискореного і природного старіння. Рішення проблеми ускладнюється ще й тим, що в експериментальній геронтології має місце не тільки прискорення, але і уповільнення процесів старіння – калорійно обмежена дієта (КОД), геропротектори та інше. Отже, межові значення середньої тривалості життя (ТЖ) одного виду організмів між прискореним і уповільненим старінням відображають біологічну пластичність ТЖ для цього виду. Розмах у пластичності ТЖ відображає можливості регуляції темпу старіння. Можна припустити, що темп старіння визначається реактивністю і пам'яттю метаболічних систем і має гормезисну природу.

У межах розвитку епігенетичної концепції старіння можна виходити з того, що старіння – це неспецифічний інтегральний процес, який реалізується як наслідок накопичення епігенетичної метаболічної пам'яті в результаті безперервного процесу адаптації до ендо- і екзогенних факторів [1, 23, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 67, 123, 193].

Прояв гормезису, напевне, обумовлено фундаментальними властивостями метаболізму – здатністю тривалий час самовідтворювати оптимальний за цих умов метаболічний варіант (патерн) з багатьох

альтернативних варіантів. Така "фіксація налагодження" даного метаболічного патерну, яка проявляється як пам'ять, забезпечує гормезисний ефект у разі зустрічі цього організму з таким саме фактором більшої "потужності". Однак наслідком гормезисної моделі метаболічної пам'яті може стати зниження адаптивної відповіді в разі частих змін нових експериментальних впливів, що проявиться в прискоренні процесів старіння, або, іншими словами, в основі біологічної пластичності видової ТЖ може лежати явище гормезису, прояв якого залежить від метаболічної пам'яті.

Для перевірки цієї гіпотези можна використовувати кілька експериментальних моделей: прискорене старіння тривалим впливом іонів міді і уповільнене старіння КОД.

Божков А. І. та інші автори показали, що багаторазові послідовні введення відносно малих доз сірчаної кислоти міді забезпечують прояв гормезису до летальних доз цього токсиканту для різноманітних біоб'єктів [7, 9]. Прояв гормезису залежить від внутрішньоклітинного характеру розподілу іонів міді. Специфічний внутрішньоклітинний патерн іонів міді зберігається навіть через місяць після первинних уведень, що може інтерпретуватись як формування метаболічної пам'яті. Уповільнення процесів старіння при переведенні тварин на калорійно обмежену дієту пов'язано з формуванням специфічного епігенотипа, який може запам'ятовуватися і, як наслідок, збільшувати тривалість життя [6, 12].

Найімовірніше, старіння виникло в одноклітинних організмах як адаптація до стаціонарної фази росту за умов нестачі поживних ресурсів. Дійсно, процеси утилізації енергії і метаболізму глюкози в клітині змінюються під час старіння за допомогою регуляторних механізмів, що беруть участь у глобальній відповіді на глюкозне голодування, на оксидативний стрес, а також відіграють роль у стаціонарній фазі виживання. Крім того, при «старінні» бактеріальних культур в умовах нестачі «палива» виявляються елементарні властивості клітин старіючого організму: гіпометаболізм, підвищений запас енергії, оксидативний стрес, експресія



білків теплового шоку і дефектна репарація ДНК, що призводить до мутагенезу [12].

Надмірне зниження споживання їжі (голодування) скорочує життя. Помірне обмеження дієти, навпаки, збільшує тривалість життя у різних видів організмів [130]. Ймовірно, нервова система тварин, сприймаю чи зовні сигнали про нестачу їжі, запускає адаптаційну програму стрес-відповіді, що приводить до підвищення економічності метаболізму та стресостійкості, і таким чином обумовлює тривале життя.

У ссавців сигнали про поточний стан харчування і про склад тіла, такі як лептин і резистин, інтегруються в гіпоталамусі, який модулює споживання їжі, ендокринну функцію і гомеостаз метаболітів. При цьому може придушуватися вироблення IGF-1 та інсуліну [187].

Обмеження калорійності харчування, що не приводить до голодування, може продовжувати життя щурів. Для досягнення такого ефекту калорійність знижують до 60-70 % від звичайної для певного виду тварин. З того часу подібні результати були отримані і в ядрах, досліджених на інших видах тварин [75]. Збільшення тривалості життя при обмеженій дієті досягає 50 % у різних організмів: приматів, собак, гризунів, риб, нематод, дрозофіл, дафнії, павуків і дріжджів. Деякі дані свідчать про оздоровчий ефект обмеження дієти у тварин [112, 127].

У ссавців обмеження калорійності їжі може не лише значно збільшувати тривалість життя, але й затримує початок великої кількості вік-залежних захворювань, у тому числі, рак, атеросклероз і діабет [118]. Зниження калорійності уповільнює темпи старіння, затримує вік-залежне зниження психомоторної функції просторової пам'яті, а також утрату дендритних відростків у мозку [188]. Обмеження рівня споживання калорій у скелетних м'язах гризунів уповільнює деякі вік-залежні фізіологічні та біохімічні зміни, включаючи стаціонарний рівень оксидативного пошкодження ліпідів, ДНК і білків [121]. У жировому тілі дрозофіли також

уповільнюється вік-залежне створення маркера перекисного окислення ліпідів - 4-гідрокси-2-нонена [211].

Зниження калорійності їжі затримує накопичення мутацій у ДНК і редукує опосередкований мітохондріями апоптоз [121].

В цілому з віком темп білкового обміну знижується, що може призводити до накопичення пошкоджених білків у старіючій клітині, однак у тварин, що перебувають на низькокалорійній дієті, білковий обмін підтримується на високому рівні [188]. Крім того, за цих умов пригнічується старіння імунної системи: посилюється фагоцитна активність макрофагів і нейтрофілів, підвищується активність природних кілерів, зростає проліферація лімфоїдних клітин у відповідь на стимуляцію митогенами [184]. Всі ці зміни тісно пов'язані з перебудовою патерну експресії генів [181].

У нематод обмежена дієта запускає скоординовану транскрипційну відповідь, пригнічуючи активність безлічі генів, що укорочують тривалість життя, наприклад, генів метилування макромолекул [100]. У самок дрозофіли обмеження калорійності дієти затримує початок старечої смертності та збільшує середню і максимальну тривалість життя приблизно в 2 рази, що супроводжується уповільненням розвитку нормальних вік-залежних змін на транскрипційному рівні, зниженням активності генів клітинного росту, метаболізму і репродукції, білків репарації і реплікації ДНК, генів контролю клітинного циклу, конденсації і сегрегації хромосом, а також гена старіння *methuselah* [157].

Таким чином, у той час як старіння пов'язане зі специфічними змінами транскрипції генів у багатьох тканинах, обмеження споживання калорій затримує більшість із цих вік-залежних змін.

Обмеження калорійності харчування ссавців у зрілому віці призводить до активації генів цитоскелету і до зниження експресії генів мітохондріальної біоенергетики [112]. Крім того, обмеження кількості споживаних калорій пригнічує гени запалення, відкладаючи початок аутоімунних і запальних

захворювань у мишей; при цьому знижується експресія деяких шаперонів і стимулюється детоксифікуюча функція печінки [69].

Зниження калорійності в середньому віці пригнічує 19 % вік-залежних змін експресії генів серцевого м'яза. Воно призводить до збереження метаболізму жирних кислот, до зниження ендогенного пошкодження ДНК (8-гідроксидеооксигуанозіна) і білка (дитірозинових перехресних зшивок), до придушення активності вродженого імунітету, модуляції апоптозу, реорганізації цитоскелету [126].

Існування «програми тривалості життя» в умовах голодування дозволяє організму перевищити його нормальну тривалість життя шляхом вступу в «режим підтримки», пов'язаний з такими змінами, як гіпометаболізм, висока стійкість до стресів і низька плодючість або її відсутність. Механізм такого способу подовження життя остаточно не з'ясований. Одна з гіпотез припускає уповільнення метаболізму і, як наслідок, зниження утворення токсичних активних форм кисню, що призводить до уповільнення старіння [200].

Відповідно до старої парадигми, обмеження дієти часто розглядають як обмеження калорійності, а не кількості певних поживних речовин. Таке припущення обґрунтовується такими спостереженнями, що обмеження надходження калорій без зниження надходження білків призводить до тривалого життя, при цьому подальшого збільшення тривалості життя не спостерігається, якщо харчуватися однаковою за калорійністю їжею, в якій мало або жирів, або мінеральних компонентів. Кількість спожитих калорій не є ключовим фактором зниження інтенсивності смертності [136]. Щури, які отримують збіднілу білком низькокалорійну дієту, також характеризуються збільшенням тривалості життя. Більш того, зниження вмісту однієї тільки амінокислоти метіоніну збільшує тривалість життя як мишей, так і щурів.

Обмеження калорійності харчування збільшує як хронологічну, так і реплікативну тривалість життя дріжджів [43, 85, 86]. Клітини дріжджів, що зростають на глюкозі, вступають у постдіауксичну фазу і підтримують

високий темп метаболізму більшу частину життя. Інкубація в воді, навпаки, викликає вступ в тривалу стаціонарну фазу з низьким метаболізмом. Цей ефект досягається простим зниженням рівня глюкози в середовищі. Перемикання з фази зростання на постдіауксичну або на стаціонарну фазу супроводжується індукцією багатьох генів стресостійкості [86]. Обмеження кількості калорій призводить до активізації NAD<sup>+</sup>-залежною деацетилази SIR2. При цьому дріжджові клітини переключаються з гліколізу на аеробну утилізацію глюкози в мітохондріях і збільшують споживання кисню [39]. Як відомо, SIR2 має відношення до енергетичного та окисного стану клітини завдяки NAD<sup>+</sup>-залежності. NAD<sup>+</sup> інгібує SIR2. Таким способом велика кількість їжі вимикає SIR2-залежний шлях стресостійкості [43].

Зниження калорійності харчування збільшує на 35–40 % тривалість життя гризунів. Воно супроводжується зниженням рівня інсуліну, глюкози і IGF-1, накопиченням жиру, підвищенням імунітету і антиоксидантного захисту [74]. У гризунів з обмеженою калорійністю дієти рівень інсуліну і IGF-1 відповідно в 8.0 і 1.4 рази нижче в порівнянні з контролем. У гризунів обмеження кількості калорій знижує вироблення активних форм кисню в ізольованих препаратах мітохондрій і накопичення оксидативних пошкоджень. Гризуни, які зазнали низькокалорійної дієти, зазвичай менш схильні до стрес-індукованого апоптозу [75]. Підводячи підсумки, слід зазначити, що обмеження дієти є найбільш універсальним стресом, що викликає збільшення тривалості життя (гормезис) і зниження накопичення біомаркерів старіння у всіх вивчених на цей предмет організмів [167]. У той же час, помірний його вплив не призводить до таких шкідливих ефектів як пошкодження ДНК (на відміну від радіації і окисного стресу) або денатурація білка (тепловий стрес), хоча трохи знижує імунну і репродуктивну функції. До молекулярних механізмів впливу низькокалорійної дієти на швидкість старіння слід віднести придушення інсулінового (зниження надходження вуглеводів) і TOR-сигналіngu (амінокислотне голодування), активацію

сіртуїнів і FOXO, зменшення інтенсивності метаболізму як наслідок (продукції вільних радикалів).

### **1. 7 Роль металотіонеїнів у механізмах стійкості до іонів важких металів та інших стрес-факторів**

Відомо, що токсичність іонів важких металів залежить від багатьох факторів. Найважливіші з них це ті, які забезпечують формування стійкості їх до гормезисного ефекту. У свою чергу, гормезис забезпечується інактивацією і видаленням з організму іонів важких металів й індукцією таких структурно-функціональних змін у клітині й організмі в цілому, які підвищують «чутливість» до інактивації ферментних і мембранних систем до їх токсичної дії.

У 1957 році Valee і Margoshe виділили з коркової речовини нирок коня білок з молекулярною масою 6-7 кДа [138]. Ці білки були названі металотіонеїнами, тому що містять у своєму складі достатньо великої кількості іонів металів [138].

За понад 30-річний період інтенсивного дослідження цих білків, а за даними PubMed, лише за останні десятиліття опубліковано більше 10000 тис. статей про це сімейство білків.

Перші пропозиції щодо функції цих специфічних білків були пов'язані з їхньою здатністю зв'язувати іони металів і таким чином імовірно «захищати» організм від їхньої токсичної дії [175].

Можлива роль металотіонеїнів (МТ) в адаптації організму до дій іонів важких металів (і.в.м.) ініціювала активні дослідження структури і функції цих білків, тому що і.в.м. є одними з найпоширеніших і токсичних сполук навколишнього середовища.

Раніше показано, що металотіонеїни – це сімейство низькомолекулярних білків (6-7 кДа) до складу яких, входить велика кількість ізоформів білка. Для білків цього сімейства характерний високий

(до 30 % від усіх амінокислот) зміст цистеїну. З-термінальний кінець металотіонеїнів містить аланін і N-метіонін. У складі цих білків відсутні ароматичні кислоти. Залишки цистеїну пов'язують іони металів завдяки SH-групам [149].

Металотіонеїни формують третинну структуру, яка має форму гантелі, утворену двома доменами, з'єднаними декількома тетраедричними Me II-CuS-одинацями.

C-термінальний кінець металотіонеїнів, який позначають як  $\alpha$ -домен, здатний зв'язувати 3 атоми металу, а N-термінальний домен ( $\beta$ -домен) 4 атоми металу [135]. Отже, одна молекула металотіонеїну може зв'язати до 7 атомів металу. Однак для цього потрібна «взаємодія»  $\alpha$ - і  $\beta$ -доменів цього білка, тобто певна конформація білка.

Численні дослідження зустрічних металотіонеїнів показали, що вони є в клітинах тварин, рослин, мікроорганізмів [190].

Показано, що в людини присутні кілька сімейств генів металотіонеїнів: MT-I, MT-II, MT-III і MT-IV. Ці гени розташовані на 16 хромосомах і кодують різні ізоформи: MT-IMT-II; MT-IA; MT-IA; IB; IE; IF; IGIN; IX; MT-IA [173, 209].

Виявилося, що гени металотіонеїнів можуть активуватися не тільки присутністю іонів металів у клітині [78, 84, 131], але і цілим рядом таких факторів як: окислювальний стрес [129, 169, 170, 207], ультра- і гамма-випромінювання [168, 186, 194], глюкокортикоїди [140], прозапальні цитокіни (інтерлейкіни, фактор некрозу пухлини, ліпополісахариди, тиреотропний гормони і навіть зниження калорійності їжі) [184].

Отже, вони не є білками, які виконують вузькоспеціалізовані функції в клітинах.

Ключову роль в регуляції транскрипції генів металотіонеїнів грають промотери MT-I і MT-II і фактор транскрипції -1 (metal transcription factor1 – MTF1). MTF1 активується після зв'язування з іонами цинку, після чого він зв'язується з чуйними елементами промотерів, які названі –metal response element

ment (MRE) [72]. Показано, що промоторна область гена металотіонеїнів може бути представлена як мозаїка регуляторних елементів, здатна впізнавати і пов'язувати різні регуляторні молекули: антиоксидант-чутливий елемент (AREs); глюкокортикоїд-чутливий елемент (GRE) [183]. Є дані, що транскрипція генів MT-I і MT-II можлива і з інших ділянок геному [88].

Дослідження клітинної локалізації металотіонеїнів показало, що вони присутні у всіх органелах клітини, однак в найбільшій кількості в цитоплазмі [190]. Нещодавно, Westendorp з співавторами показали, що металотіонеїни присутні в екстрацелюлярному просторі нервової тканини, в гліальних клітинах і навіть клітинах імунної системи [201].

Перелік факторів, які індукують синтез металотіонеїнів може вказувати, що ці білки виконують надзвичайно різноманітні функції в організмі. Остаточно всі функції цих білків ще не встановлені.

Хоча всі функції металотіонеїнів остаточно не встановлені, найбільша кількість досліджень вказують на їхню роль у транспорті і депонування іонів металів. Встановлено, що надходження в організм токсичного агента супроводжується зв'язуванням його із транспортними білками, як правило, це альбуміни і глобуліни. Ці комплекси транспортуються в печінку, де здійснюється перенесення іонів металів на металотіонеїни. Як було показано, одна молекула металотіонеїнів здатна зв'язувати до 7 молекул металу і в якомусь сенсі металотіонеїни концентрують токсичні іони і тим самим знімають або значно зменшують їх токсичний ефект. Надалі комплекси металотіонеїн↔ метал надходять в нирки, а в лізосомах епітеліально - проксимальних ниркових каналцях вони руйнуються [210].

Для розуміння фізіологічної ролі металотіонеїнів необхідно зрозуміти їхню спорідненість до іонів різних металів. Показано, що вони здатні зв'язувати есенціальні елементи (цинк, мідь, селен) і ксенобіотичні (токсичні для організму) іони (кадмій, ртуть, миш'як і інші) [27, 28]. Разом із тим, у фізіологічних умовах (відсутність високих концентрацій токсичних елементів) металотіонеїнів переважно зв'язують іони цинку, тобто має місце

«переважне» селективне зв'язування. У тому випадку, якщо має місце інтоксикація організму, іони цинку витісняються з молекул металотіонеїнів і вони здатні зв'язувати інші метали [89, 172].

З метою дослідження ролі металотіонеїнів у формуванні стійкості до токсичної дії іонів металів були отримані щури, позбавлені генів МТ (МТ-0). Показано, що у щурів, позбавлених генів МТ-I і МТ-II розвивається кадмій-індуковане пошкодження печінки [97]. У таких щурів більшою мірою проявляється токсичність цинку в разі його високих концентрацій [113].

З огляду на селективність зв'язування МТ цинку найбільша кількість досліджень присвячена вивченню ролі МТ у регуляції концентрації і функції цинку. МТ захищають клітини від високих (токсичних) концентрацій цинку, пов'язуючи його. Крім того, вони активують синтез цинк-залежних ферментів і цинк-регуляторних транскрипційних факторів [80, 105]. Металотіонеїни регулюють транспорт цинку в організмі та всередині клітини. Як відомо, в клітині функціонують так звані цинк-залежні сигнальні шляхи, які зокрема регулюють апоптоз [105]. Більш того, зв'язування і звільнення іонів цинку з металотіонеїнів регулює їхній окислювально-відновний цикл. Звільнення цинку від металотіонеїнів виникає при окисленні тіолових груп білкового домену як результат дії різноманітних окисників, зокрема  $H_2O_2$  [110].

Взаємодії інших іонів металів з металотіонеїнами вивчено недостатньо. Однак наявні дані свідчать про те, що ці специфічні низькомолекулярні білки функціонують в комплексах з іонами металів і ймовірно вони мають різницю, специфічну відносно до різних металів. І сьогодні стало абсолютно очевидним, що металотіонеїни виконують різні функції в клітині.

## **1. 8 Можлива роль металотіонеїнів у регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи**

Перше припущення про антиоксидантну роль металотіонеїнів було висловлено ще в 1982 році Vakka та іншими авторами [38]. Дещо пізніше в



експериментах на гепатоцитах кролів показали, що металотіонеїни в 300 разів активніше нейтралізують гідроксильні радикали в порівнянні з таким відомим антиоксидантом як глутатіон [191]. Було показано, що МТ здатний нейтралізувати і оксид азоту [120].

Переконливі дані про роль МТ в усуненні дії вільних радикалів було отримано на накаутних лініях мишей [91]. Так, обробка фібробластів мишей, позбавлених генів МТ денітрофенолом, супроводжувалася значним підвищенням вмісту  $H_2O_2$ . У тому випадку, коли іденітрофенол вводили звичайним мишам, у них підвищувалася концентрація МТ і це усунуло прояв окисного стресу в мітохондріях [91]. Аналогічні дані були отримані і Kang за дією доксирубіцином, який приводив до окислювального стресу кардіоміоцитів мишей, позбавлених генів металотіонеїнів, у той же час доксирубіцином не пошкоджується кардіоміоцити у мишей, що мають гени металотіонеїнів, які активно експресувалися [109, 110, 182].

Вважають, що антиоксидантні властивості МТ обумовлені великою кількістю тіолових груп у молекулі і здатні активувати COD [146]. Moonjoo та інші автори досліджували вплив металотіонеїнів на активність таких антиоксидантних ферментів як Cu / Zn – COD, каталази і пероксидази. Було показано, що в присутності МТ містить Zn, активність COD збільшувалася, в тому випадку, якщо МТ не містили іони Zn [146]. Подібні результати були отримані іншими авторами [209, 210]. Вони показали, що введення екзогенних МТ коровам підвищувало експресію генів COD. Автори вважають, що активація COD у присутності МТ може бути обумовлена звільненням іонів Zn від молекули МТ і активації COD. Відомо, що іони Zn забезпечують формування третинної структури молекули COD, що і лежить в основі її ферментативної активності. Або, іншими словами, молекули МТ у даному випадку забезпечують підтримку необхідного пулу іонів Zn у клітці і її регуляторні функції.

Здатність МТ пов'язувати і транспортувати іони міді, досліджено в меншій мірі, ніж Zn. У зв'язку з цим, дослідження ролі МТ у підтримці пулу

іонів Cu та інших есенціальних металів вимагає подальших досліджень. У зв'язку з цим в нашій роботі досліджені мідь-зв'язуючі білки і їхня роль у формуванні резистентності до токсичних концентрацій іонів міді.

## **Висновки до розділу 1**

Хоча вільнорадикальна гіпотеза та її модифікації як і раніше залишаються найбільш популярними, вона залишається однією з робочих гіпотез. Сьогодні стає очевидним, що продукти вільнорадикальних реакцій виконують різні функції, і в першу чергу, регуляцію метаболізму у випадку впливу різнобічних токсичних факторів екзогенної природи. Ці регуляторні процеси відіграють першорядну роль у механізмах адаптації. Наявні данні дозволяють припускати, що вони можуть мати вік-залежний характер. Подальше дослідження взаємозв'язку окислювального стресу з механізмами адаптації та розвитку патологічних процесів у тварин різного віку й особливо їхня роль у прояві гормезису мають велике значення для розуміння механізмів старіння.

У вирішенні таких важких задач вирішальним є підбір і розробка нових експериментальних моделей. Такою моделлю може бути індукована резистентність до токсичних доз сіркокислої міді – гормезис.

Гормезис до токсичних доз сіркокислої міді у тварин різного віку не досліджений, а наявні данні про це явище присвячені радіаційному гормезису. Механізми гормезису не досліджено, і для їх дослідження необхідно розуміти ефект малих та надмалих доз дії ксенобіотиків. У теперішній час запропоновано декілька гіпотез, які намагаються пояснити радіаційний ефект надмалих доз. Ми вважаємо, що ефект надмалих доз та ефект гормезису мають спільні механізми.

Збільшення тривалості життя при КОД також можуть мати гормезисну природу. Дослідження можливих механізмів збільшення тривалості життя при КОД з позиції гормезису може бути перспективним напрямом.

Металотіонеїни, які вперше були виділені в 1957 р. й зараз активно досліджується їхня роль в різних функціях клітини, беруть участь в обміні Zn в клітинах. Проте їхня роль у формуванні індукованої стійкості організму до іонів міді не досліджено. Дослідження ролі мідь-зв'язуючих білків у внутрішньоклітинному обміні міді має першорядне значення в розумінні механізмів гормезису та вік-залежних особливостей його прояву. Дослідження є цікавим ще й тому, що вони регулюють активність прооксидантно-антиоксидантної системи й інші функції організму.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [1, 23, 45, 46, 48, 49, 50, 123].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2. 1 Експериментальні тварини

Експериментальна робота була виконана на базі Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Робота проведена на лабораторних щурах-самцях лінії Wistar віком 3 місяце (молоді) і 20 місяців (старі), що містяться в віварії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Тварин для експерименту тримали в стандартних умовах з природною тривалістю день/ніч та відбирали без анатомічних патологій і порушень у поведінці. Експерименти починали завжди в один і той же час з 8:00 до 10:00 з дотриманням правил етичного відношення к тваринам.

##### 2. 1. 1 Групи тварин в експериментах з вивчення ефекту гормезису

В серії експериментів для визначення часу збереження гормезису експериментальні тварини були розбито на 4 групи:

Група 1. Тваринам вводили послідовно (через кожні 48 годин) триразово адаптаційну дозу сірчаноокислої міді (що становить  $\frac{1}{3}$  від летальної дози) 1 мг / 100гр маса тіла. Після цього тварини знаходилися в стандартних умовах протягом 1 суток. Тварини отримували летальну дозу сірчаноокислої міді (3 мг на 100 г маси тіла) та визначали час смерті.

Група 2. Тваринам вводили послідовно (через кожні 48 годин) триразово адаптаційну дозу сірчаноокислої міді. Після цього тварини знаходилися в стандартних умовах протягом 15 днів. Тварини отримували летальну дозу сірчаноокислої міді (3 мг на 100 г маси тіла).

Група 3. Тваринам вводили послідовно (через кожні 48 годин) триразово адаптаційну дозу сірчаноокислої міді. Після цього тварини знаходилися в стандартних умовах протягом 30 днів. Тварини отримували летальну дозу сірчаноокислої міді (3 мг на 100 г маси тіла).

Група 4. Тваринам вводили послідовно (через кожні 48 годин) триразово адаптаційну дозу сірчаноокислої міді. Після цього тварини знаходилися в стандартних умовах протягом 45 днів. Тварини отримували летальну дозу сірчаноокислої міді (3 мг на 100 г маси тіла).

З моменту початку експерименту проводили контроль за станом тварин (загальний стан, динаміка маси тіла). Після введення летальної дози фіксувався час смерті тварини [1, 23, 45, 46, 48, 49, 50, 123].

При визначенні зв'язку між кількістю попередніх введенень малих, адаптивних доз сірчаноокислої міді (1 мг / 100 г маси) до летальної дози використовували 1, 2, 3, 6 введенень малих доз з інтервалом між введеннями 48 годин з подальшим введенням летальної дози сірчаноокислої міді (3 мг / 100 г маси) і визначали час смерті.

## **2. 1. 2 Модель циклічного режиму годування**

В лабораторії науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна була розроблена модель циклічного режиму годування, яка забезпечувала збільшення тривалості життя експериментальних тварин [47]. Ця модель може бути використана в дослідженнях щодо ролі редокс-системи в механізмах формування метаболічної пам'яті в процесі старіння.

Експериментальних тварин різного віку – молоді (3 міс.) та старі (19-20 міс.) – переводили на годування через добу, а кількість їжі, яку вони отримували, була обмежена таким чином, щоб за 14 діб тварини втратили свою масу тіла на 30 % від ісходної маси тіла. У наступні 14 діб тварини отримували їжу такої кількості, що їх маса тіла відновлювалася до ісходної

маси тіла. Після цього тварин переводили на звичайний режим годування. Така схема годування була названа як перший цикл «втрата-відновлення» маси тіла.

Усі експериментальні тварини проходили 2 послідовних цикла.

В дослідженнях тварин брали в експеримент на різних етапах циклів, тобто формувалися такі експериментальні групи: 1 – ісходний стан; 2 – на піку втрати маси тіла в першому циклі; 3 – відновлення маси тіла в першому циклі; 4 – на піку втрати маси тіла у другому циклі; 5 – відновлення маси тіла у другому циклі ЦРГ [23, 47].

### **2. 1. 3 Виведення тварин з експерименту**

Забій тварин та експерименти проводили завжди в один і той же час доби (8.00 ранку), що дозволяло виключити особливості циркадних ритмів.

В експериментах дотримувалися рекомендацій проведення медико-біологічних досліджень згідно з дотриманням правил Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986).

Тварин виводили з експерименту ефірним наркозом.

### **2. 2 Фізіологічні методи дослідження**

Масу тіла контрольних і дослідних тварин визначали щодня до годування з 8 до 9 години ранку.

Ректальну температуру тіла визначали в один і той же час з 8 до 9 години ранку до прийому їжі термометром MicroTherma 2THandHeld.

Працездатність щурів визначили в тесті плавання з вантажем [79], при температурі води в басейні 12–14 °С.

## **2. 3 Препаративні методи дослідження**

### **2. 3. 1 Отримання сироватки для дослідження**

Під час декапітації експериментальних тварин збирали кров і використовували її для отримання сироватки. Кров збирали в сухі пробірки і зберігали 30 хвилин при 20 °С. Після закінчення зазначеного часу кров центрифугували 15 хвилин при 1000 g і відбирали сироватку.

### **2. 3. 2 Гістологічні дослідження печінки**

Печінку зважували і визначали співвідношення маси печінки до маси тіла тварин.

Після декапітації тварин фрагменти печінки брали завжди з однієї і тієї ж частки лопати і фіксували в 10 %-ому розчині формаліну 48 годин. Фіксовані в парафіні зразки печінки для гістологічного дослідження проводили за стандартною методикою. Зрізи товщиною 5 мкм, отримані з використанням мікротома фарбували за Ван-Гизоном.

Гістологічні препарати аналізували на мікроскопі марки Marka при 100- і 400-кратному збільшенні.

### **2. 3. 3 Виділення мітохондрій з гепатоцитів**

Печінку перфузували холодним (4 °С) 0,15 М розчином хлористого натрію. Наважку охолодженої тканини продавлювали через прес, додавали 100 мМ трис-НСl буфер, рН 7.4, що містить 250 мМ сахарози, 5 мМ KCl і 1 мМоль MgSO<sub>4</sub>. Гомогенизували протягом 1 хвилини при 8000 об / хв. і фільтрували через нейлонову тканину. Мітохондрії виділяли методом диференціального центрифугування [108].

Постмітохондріальну фракцію використовували для отримання фракцій мікосом [108]. Для цього її центрифугували при 80000 g на протязі 1,5 години при  $T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Супернатант використовували як фракцію цитозолу, а осад – як фракцію мікосом.

## **2. 4 Аналітичні методи дослідження**

### **2. 4. 1 Визначення вмісту колагену**

Печінку перфузували холодним ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 0,15 М розчином хлористого натрію. Наважку охолодженої тканини використовували для аналітичного визначення концентрації колагену.

Кількість колагену визначали за вмістом оксипроліну, який визначали методом [154, 156]. Перед аналітичним визначенням оксипроліну досліджувані зразки гідролізували.

Зразки печінки поміщали в скляні ампули і додавали 9 N HCl з розрахунку 1 мл на 10 мг тканини. Ампули запаювали і проводили гідроліз при температурі  $130^{\circ}\text{C}$  протягом 6 годин. Отримані гідролізати нейтралізували 1 N розчином NaOH, контролюючи рН. Проби доводили до кінцевого обсягу дистильованою водою і фільтрували. Отримані нейтралізати використовували для аналітичного визначення оксипроліну.

Метод аналітичного визначення оксипроліну заснований на принципі освіти червоного хромогену при конденсації продукту окиснення оксипроліна хлорамином Б з пара-диметиламінобензальдегідом.

Готували необхідні розчини з розрахунку:

- вихідний буфер – 5 г лимонної кислоти, 120 г оцтовокислого натрію, 3,4 г NaOH і  $\text{H}_2\text{O}$  до 100 мл;
- робочий буфер – до 50 мл вихідного буфера додавали 15 мл н-пропанолу, 8,4 мл 96 % етанолу і 10 мл  $\text{H}_2\text{O}$  (готували безпосередньо перед вимірами);



- розчин хлораміну Б – 0,14 г хлораміну Б розчинювали в суміші з 1 мл н-пропанолу, 8,4 мл розчину № 2 і 1 мл  $H_2O$ ;
- розчин барвника – 1,5 мг диметиламінобензальдегіду (ДАБУ) розчинювали в 2,6 мл 60% хлорної кислоти і доводили н-пропанол до 10 мл.

Для проведення кольорової реакції до 130 мкл досліджуваного розчину додавали 60 мкл розчину хлораміну Б, після чого суміш залишали на 20 хвилин при кімнатній температурі. За цей час до отриманої суміші додавали 30 мкл н-пропанолу і ретельно ресуспендували. Після 20 хвилин до суміші додавали 60 мкл розчину ДАБУ. Отриману суміш ретельно ресуспендували і нагрівали в повітряному термостаті протягом 20 хвилин при 60 °С.

Пофарбовані проби охолоджували до кімнатної температури і на спектрофотометрували (СФ-46) при довжині хвилі 540 нм. Попередньо робили вимірювання низки розведень L-оксипролина (Sigma-Aldrich) для побудови калібрувального графіка.

Кількість колагену виражали в мкг / 1 г печінки.

#### **2. 4. 2 Визначення концентрації гідроперекисів ліпідів**

Гідроперекиси ліпідів у гепатоцитах і субклітинних фракціях визначали методом, а в сироватці - за методом [150].

Вміст гідроперекисів ліпідів виражали в еквівалентних кількостях малонового діальдегіду (МДА) на 1 мл плазми або сироватки, або крові, мг білка в мітохондріях та мікросомах [49, 50, 123].

#### **2. 4. 3 Визначення активності глутатіонпероксидази**

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) визначали в цитозольних фракціях і мітохондріях печінки, а також сироватці крові спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм за методом [152]. В якості

реакційного буфера використовували 50 мМ К– фосфатний буфер (pH 7,4), який містить 1 мМ ЕДТА, 0,15 мМ NADPH, 1 одиницю в мл глутатіонредуктази дріжджів, 0,2% TritonX-100 і 3 мМ азида Na.

У реакційний буфер вносили 0,1 мл зразка, 1,2 мМ гідроксиду кумола і 0,4 мМ перекису водню. Інкубували суміш 30 хвилин при 37 °С. Активність ферменту виражали в нмоль NADPH / хв / мг білка.

Вміст білка в зразках, що досліджували, визначали за методом Lowry O. [23, 46,134].

#### **2. 4. 4 Визначення активності глутатіонредуктази**

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) у гомогенатах печінки і мітохондріях визначали спектрофотометрично за методам [71]. В експериментах використовували 50 мМК-фосфатний буфер (pH 7.4), 1 мМ ЕДТА, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ MGSSG, 0, 2% TritonX-100 [71].

Кількість внесеного зразка становила 0,1 мл.

Інкубували суміш 30 хвилин при 37 °С. Активність глутатіонредуктази виражали в нмоль NADPH / хв / мг білка .

#### **2. 4. 5 Визначення активності аконітатгідратази**

Активність аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3) визначали як описано у роботі [195] і виражали в нМ аконітата на мг білка, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції, який дорівнює  $3,6 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

#### **2. 4. 6 Визначення активності глутаредоксинів**

Визначення активності глутаредоксина (КФ 1.20.4.1) в мітохондріях печінки щурів проводили спектрофотметричним методом, як описано в [162] у модифікації [92] в 50 мМ К-фосфатному буфері (pH 8,0), що містить 0,5 мМ

відновленого глутатіону, 0,2 мм NADPH, 0,4 одиниці / мл глутатіонредуктази дріжджів, 1,25 mM цистину, 0,2 % тритон X-100. Температура реакційного середовища – 37°C. Активність глутаредоксина виражали в нмоль NADPH / хв на мг білка або мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції  $6,22 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **2. 4. 7 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів**

Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали за поглинанням та елімінацією мікроорганізмів *Saccharomyces cesceresiae* нейтрофільними гранулоцитами (НГ) із застосуванням методу світлової мікроскопії. Визначали фагоцитарний індекс (ФІ) як кількість НГ здібних, брати участь процесі фагоцитозу (у відсотках від загальної кількості НГ крові), і фагоцитарне число (ФЧ) як середня кількість клітин *S. cerevisiae*, які поглинуто одним НГ (в умовних одиницях). Для оцінки інтенсивності ендоцитозу інкубацію другий аналогічної проби проводили протягом 120 хвилин при 37 °C і розраховували індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) в умовних одиницях за співвідношенням ФЧ через 30 хвилин до ФЧ через 120 хвилин, визначаючи здатність травлення НГ в різні часові інтервали [147].

#### **2. 4. 8 Визначення концентрації гаптоглобіну і церулоплазміну**

Концентрацію гаптоглобіну визначали за методом [23, 161], концентрацію церулоплазміну за методом [46, 163].

## **2. 4. 9 Визначення концентрації пептидів середньої молекулярної маси**

Концентрацію пептидів середньої молекулярної маси визначали за методом [17]. Вміст білків в зразках визначали за методом Lowry O. [134].

## **2. 5 Статистична обробка результатів дослідження**

Статистичну обробку даних проводили з використанням непараметричних методів статистики за допомогою програми Microsoft Excel та програмного пакета Statistica 6. Достовірними різними вважалися результати при  $P < 0,05$  [29].

## **Висновки до розділу 2**

В даному розділі було охарактеризовано використані у дослідженні спектрофотометричні методи, фізіологічні методи дослідження та методи отримання сироватки для дослідження. Вказані гістологічні дослідження печінки, виділення мітохондрій з печінки, визначення вмісту колагену, визначення концентрації гідроперекисів ліпідів, визначення активності глутатіонпероксидази, визначення активності глутатіонредуктази, визначення активності аконітатгідратази, визначення активності глутаредоксинів, визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, визначення концентрації гаптоглобіну і церулоплазміну, визначення концентрації пептидів середньої молекулярної маси.

Дані методи були використані у власних дослідженнях, представлених у [1, 23, 45, 46, 48, 49, 50, 123].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

**3. 1 Дослідження залежності прояву гормезису до іонів міді від схеми попереднього введення малих доз цього токсину та роль мідь-зв'язуючих білків у цьому процесі**

**3. 1. 1 Дослідження залежності прояву гормезису від кількості попередніх введень сірчаноокислої міді**

Про процеси старіння найчастіше судять за проявом тих чи інших відмінностей між старими і молодими організмами на фізіологічному або біохімічному рівні. При цьому виявлені порівняльні відмінності інтерпретуються як вік-залежні зниження адаптаційного потенціалу, біонадійності, порушення процесів регуляції та збільшення ймовірності настання смерті [2, 101, 119]. Немає сумнівів, подібна інтерпретація абсолютно обґрунтована. Однак залишається поза увагою питання: чому з віком змінюються саме ці процеси регуляції метаболізму, чому у різних індивідуумів і видів це відбувається в різні періоди онтогенезу? Або, іншими словами, в чому причина вік-залежних змін і неймовірно широкої індивідуальної та видової варіабельності тривалості життя?

Раніше була висловлена гіпотеза, що старіння – це неспецифічний інтегральний процес, який реалізується як наслідок формування епігенетичної – метаболічної пам'яті в результаті безперервного процесу адаптації до ендо- й екзогенних факторів [9, 10, 13]. Накопичений «адаптивний досвід – це метаболічна пам'ять», з одного боку, мінімізує майбутні адаптивні процеси, а з іншого – звужує подальший стратегічний вибір адаптації і призводить до формування хибних кіл метаболізму [13].

Перевірка цієї гіпотези має значення в дослідженні не тільки індивідуальної «долі» онтогенезу, а й розуміння причин вікового зниження надійності функціонування старіючого організму, чому і присвячена цей розділ дисертації.

Для перевірки гіпотези формування метаболічної пам'яті нами була розроблена експериментальна модель, яка дозволяє сформувати стійкість організму до летальних доз сірчаноокислої міді і досліджувати вікові особливості цього явища [1, 23, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 123].

Досліджуючи індуковану стійкість організму до дії іонів міді у молодих і старих тварин, тобто їх «адаптивний досвід», можна визначити час його збереження, тобто метаболічну пам'ять і її характеристики.

У зв'язку з цим виявляли здатність молодих і старих тварин адаптуватися до летальних доз іонів міді після попередніх багаторазових послідовних введень сірчаноокислої міді, або проявляти 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 (Рис. 3.1). Отже, доза 3 мг на 100 г була летальною дозою для щурів лінії Wistar, молодих (3 місяці) тварин.

Необхідно відзначити, що летальна доза сірчаноокислої міді для тварин проявлялася у вузькому діапазоні концентрації. Так, доза 1 мг на 100 г не викликала гострого токсичного ефекту. У цих випадках експериментальні тварини (40 щурів) виживали, і тривалість їхнього 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, була використана спеціальна схема введення сірчаноокислої міді.

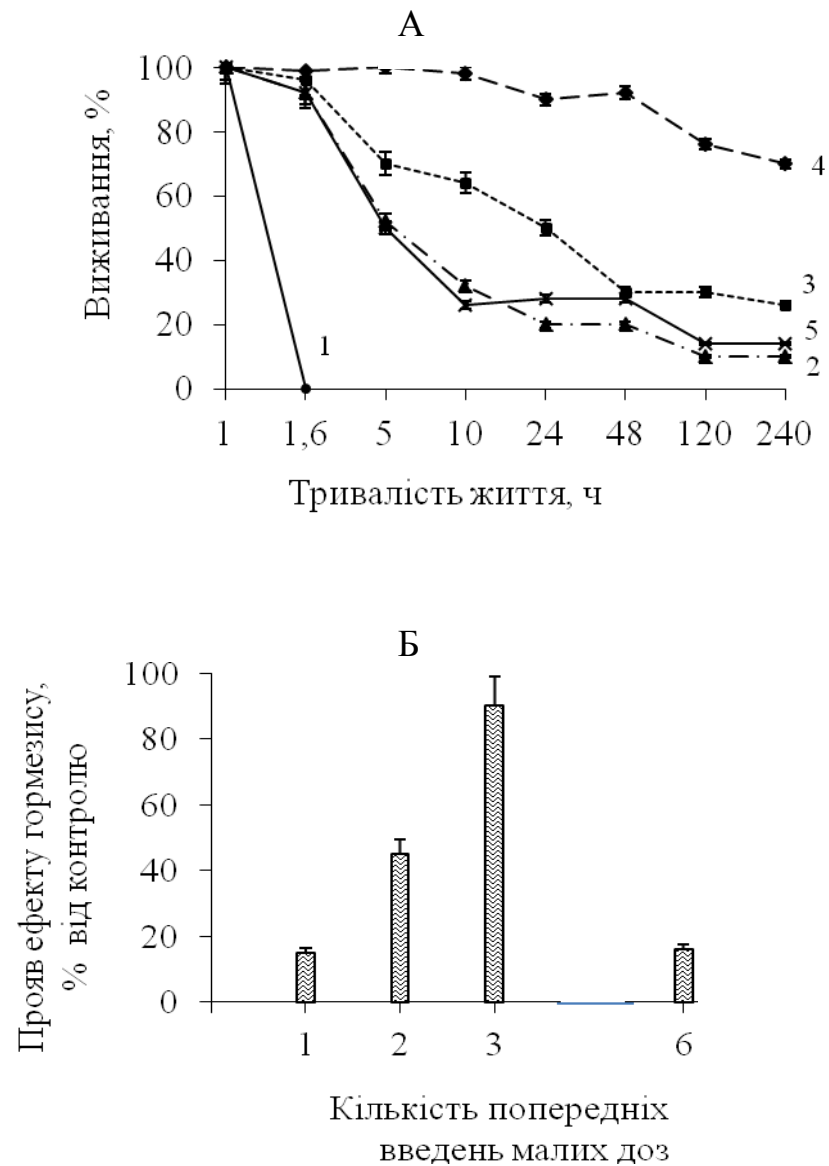


Рис. 3.1 Час життя експериментальних тварин після одноразового внутрішньочеревного введення сірчаноокислої міді з розрахунку 3 мг / 100 г маси тіла (1), після багаторазових введень сірчаноокислої міді з розрахунку 1 мг / 100 г маси тіла і фінального введення 3 мг / 100 г маси тіла ( 2 - одне введення малої дози, 3 - два введення, 4 - три введення, 5 - шість введення) (А) і залежність прояву гормезису через 48 годин після введення летальних доз сірчаноокислої міді від кількості попередніх введень малих (адаптивних) доз сірчаноокислої міді (Б). В кожній експериментальній групі було не менше 10 тварин

Експериментальним тваринам попередньо вводили одноразово або багаторазово дозу (1 мг на 100 г), що становило 33 % від летальної, а через 48 годин цим же тваринам вводили летальну дозу (3 мг на 100 г) і визначали час загибелі цих тварин. Було виявлено, що якщо тварини отримували дозу 1 мг на 100 г, а через 48 год. – 3 мг на 100 г, тобто летальну, то загибель 50 % тварин наступала тільки через 5 ч, 30 % тварин – через 10 годин, решта виживали (Рис. 3.1, крива 2). Необхідно відзначити, що тварини, які виживали більше 3-х діб, залишалися живими більше 3–4 тижнів і якщо загибель наставала у віддалений період, то їх смерть була викликана не гострим отруєнням, а розвитком хронічних патологій (фіброзів і цирозів печінки). Ефект гормезису значно збільшувався, якщо до введення летальної дози сірчаноокислої міді тваринам двічі вводили дозу 1 мг на 100 г з інтервалом між введеннями 48 годин. В цьому випадку виживало не менше 30 % експериментальних тварин, а загибель частини тварин наступала значно пізніше в порівнянні з тваринами, які отримували відразу летальну дозу (Рис. 3.1, крива 3). У разі, коли тваринам попередньо вводили дозу 1 мг на 100 г послідовно 3 рази з інтервалом 48 годин і після цього їм же вводили летальну дозу, то 80–90 % всіх тварин виживало (в кожному з цих експериментів було використано по 40 щурів), см. мал. 1, крива 4. Необхідно відзначити, що в цьому випадку загибель частини тварин після введення летальної дози сірчаноокислої міді наступала набагато пізніше – через 120–240 годин після введення летальної дози, а не через 1 годину, як при первинному введенні тільки летальної дози (Рис. 3.1, крива 4). Це вказує на те, що в цих випадках загибель експериментальних тварин могла бути викликана іншими причинами в порівнянні з гострим отруєнням, як при летальній дозі сірчаноокислої міді. Збільшення числа попередніх введень нетоксичних доз (1 мг на 100 г) до шести з тим же 48-годинним інтервалом між введеннями і подальшим введенням цим же тваринам летальних доз не збільшувало ефект стійкості, а, навпаки, знижувало його в порівнянні з трьома послідовними введеннями 1 мг на 100 г (Рис. 3.1, крива 5).



Отже, попереднє введення малих доз (33 % від летальних) (1 мг на 100 г) сірчаноокислої міді формує ефект гормезису до летальної дози цього токсиканту. Прояв гормезису залежить від числа попередніх ін'єкцій сірчаноокислої міді. Ця залежність мала S-подібний характер, тобто збільшувалася від однієї до трьох ін'єкцій і різко знижувався при шести введеннях. Такий дозочасовий характер гормезису може пояснюватися проявом кумулятивного ефекту для сірчаноокислої міді при інтервалі між ін'єкціями 48 годин.

### **3. 1. 2 Залежність прояву гормезису від тимчасового інтервалу між введеннями малих і летальних доз сірчаноокислої міді**

Експериментальним тваринам вводили сірчаноокислу мідь у малих дозах тричі, після цього тварини отримували летальну дозу сірчаноокислої міді через 1, 15, 30 і 45 діб і визначали кількість тварин, стійких до сірчаноокислої міді.

Результати експерименту представлені на рисунку 3.2 дозволяють зробити висновок: а) попередні введення тваринам малих доз сірчаноокислої міді (33 % від летальної) формували відносну резистентність до летальної дози у всіх експериментальних групах; б) гормезис зберігався навіть у тому випадку, якщо летальну дозу сірчаноокислої міді вводили через 45 діб після останнього введення малих доз; в) гормезис найбільшою мірою проявлявся, якщо летальну дозу сірчаноокислої міді вводили через 24 години після останнього введення малої дози; г) гормезис був подібним у тварин, яким вводили летальну дозу через 15, 30 і 45 діб після останнього введення малих доз (Рис. 3.2).

Можна стверджувати, що введення малих доз сірчаноокислої міді не тільки формує відносну резистентність у таких тварин до введення наступних летальних доз, а й формує імпринтинг (запам'ятовування)

збереження тих метаболічних станів, які забезпечують стійкість до наступних летальних доз на організм, зокрема, не менше, ніж на 45 добу після введення.

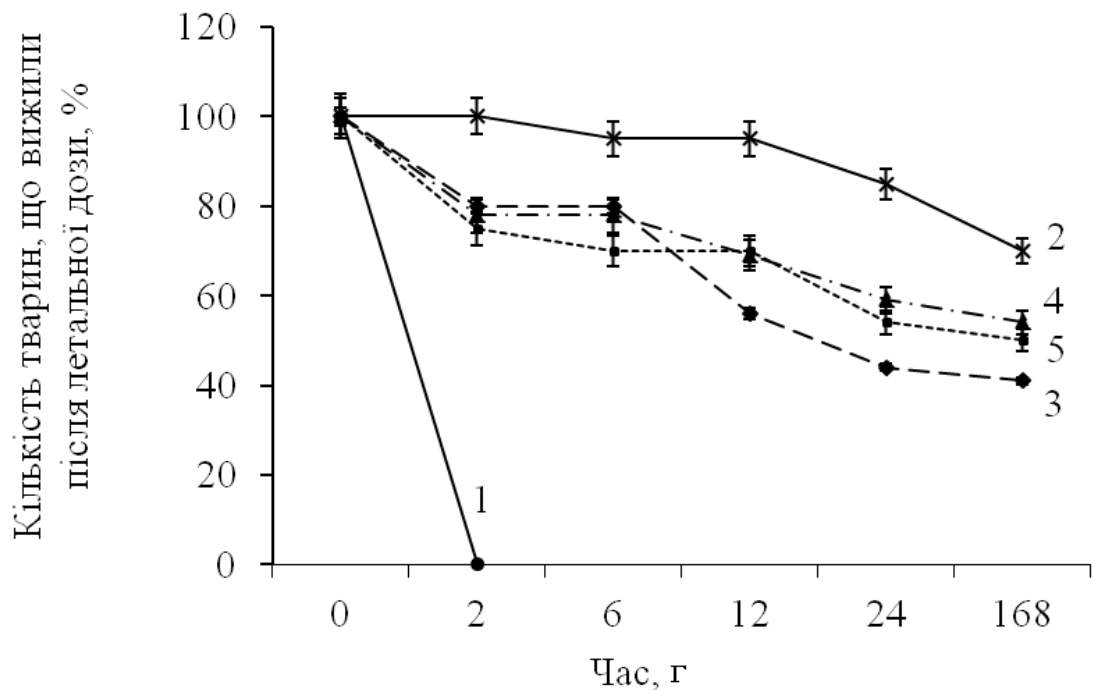


Рис. 3.2 Час загибелі тварин після введення летальної дози сірчаноокислої міді (3 мг / 100 г маси тіла) (1), після попереднього введення малих доз сірчаноокислої міді з подальшим введенням летальної концентрації сірчаноокислої міді через 1 добу (2), 15 діб (3), 30 діб (4) і через 45 діб (5). В експерименті було використано 125 тварин, 25 - в кожній експериментальній групі

Отже, попередні введення експериментальним тваринам малих нелетальних доз індукували стійкість до подальшого введення їм летальних доз токсикантів. Це дозволяє вважати, що малі дози індукували механізм індукованої до іонів міді стійкості. Такий механізм індукованої резистентності до токсичних доз або концентрацій проявлявся не тільки для сірчаноокислої міді, а й для інших токсикантів, тобто явище гормезису має загальнобіологічний характер [1, 23, 45, 49, 50, 123].

Як відомо, центральна парадигма геронтології заснована на постулаті: зниження адаптивності і стійкості з віком і веде до розвитку вік-залежних

патологій і настанню смерті. У зв'язку з цим, здавалося обґрунтованим дослідження стійкості молодих і старих тварин до дії сірчаноокислої міді. У наступній серії експериментів визначали час настання загибелі експериментальних тварин після введення летальної дози для молодих (3 місячні) і старих (20–24 місячні) щурів. Було виявлено, що коли час загибелі молодих тварин в середньому становило  $83 \pm 5$  хвилин (хв.) після введення летальної дози сірчаноокислої міді, то старі тварини гинули вже через  $25 \pm 6$  хвилин, тобто в 2-3 рази швидше порівняно з молодими (Рис. 3.3).

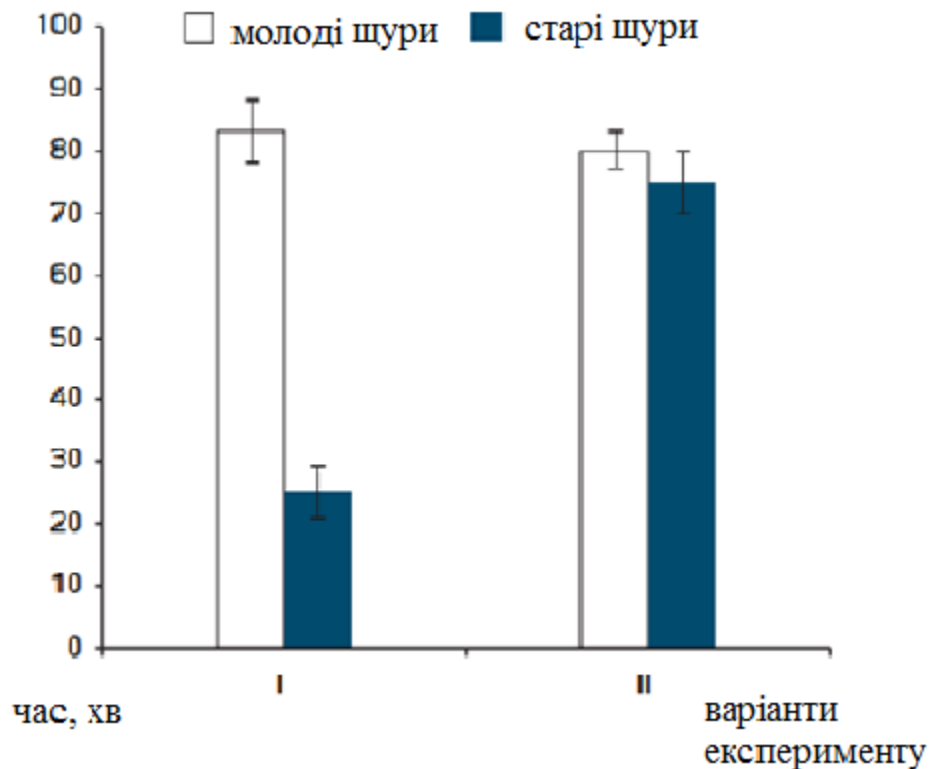


Рис. 3.3 Час настання загибелі молодих і старих щурів після введення 3 мг на 100 г маси тіла тварини сірчаноокислої міді (I) і після введення сірчаноокислої міді з розрахунку на 1 г маси печінки (II); \* -  $P \leq 0,05$  у порівнянні з молодими щурами ( $n=8$ )

Отже, старі тварини менш стійкі до токсичних доз сірчаноокислої міді порівняно з молодими, якщо їм вводили сірчаноокислу мідь у розрахунку на одиницю маси тварини. Отже, отримані результати підтверджують

положення про зниження стійкості старих тварин до токсичної дії сірчаноокислої міді. Однак такий висновок може бути результатом методичної помилки. Справа в тому, що основною мішенню для екзогенних іонів міді є печінка. Як правило, розрахунок доз, щовводяться здійснюють на масу тіла. Однак при цьому не враховуються вікові особливості зміни маси печінки по відношенню до маси тіла. У тому випадку, якщо з віком маса тіла збільшується з більшою швидкістю, ніж маса печінки, і при введенні тваринам ксенобіотиків з розрахунку на одиницю маси тіла, то в такому випадку кількість ксенобіотиків буде надходити в печінку старих тварин в більшій кількості, ніж у молодих тварин. Для перевірки цього припущення визначали вміст іонів міді в різних компартментах клітин печінки через 12 годин після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді в дозі 1 мг на 100 г маси тварини [1, 45, 46, 48, 50, 123].

Виявилося, що коли в клітинних ядрах і фракції мікросом вміст іонів міді у старих тварин достовірно не відрізнявся від молодих, то в мітохондріях старихтварин воно було майже в 2 рази більше, а у фракції термостабільних білків цитозолу, до складу якого входять металотіонеїни та інші мідьзв'язувальні білки – в 2,6 рази більше, ніж у молодих тварин (Рис. 3.4).

Якщо порівняти загальну кількість іонів міді в досліджених фракціях клітин печінки, то у старих тварин її кількість була в 2 рази більше в порівнянні з молодими тваринами. Старі тварини відрізнялися як за кількістю, так і за характером внутрішньоклітинного розподілу іонів міді. Більш виражений токсичний ефект сірчаноокислої міді у старих тварин може бути пов'язаний з тим, що з віком змінюється співвідношення маса тіла / маса печінки і, як наслідок, збільшується «навантаження» ксенобіотиків для старих тварин при введенні сірчаноокислої міді в розрахунку на масу тварини (Рис. 3.4).

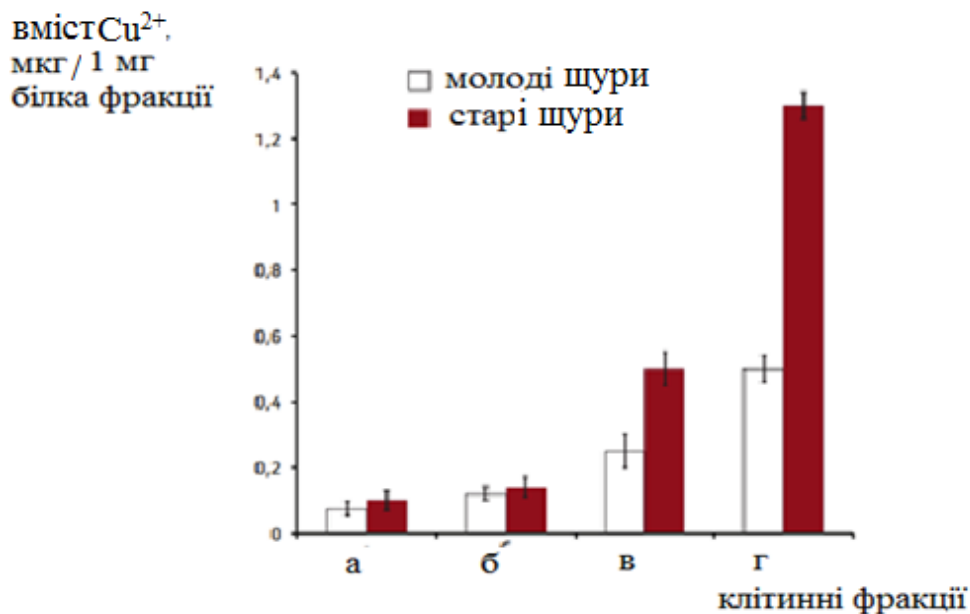


Рис. 3.4 Вміст іонів міді в ядрах (а), мікросомах (б), мітохондріях (в) і термостабільних білках цитозолі (г) клітин печінки молодих і старих щурів після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді в дозі 1 мг на 100 г маси тіла кожні 48 годин; останні введення – за 12 годин до забою; \* -  $P \leq 0,05$  у порівнянні з молодими щурами, (n=5-6)

Для вирішення цього питання на великому числі експериментальних тварин (не менше 50) визначали онтогенетичні зміни співвідношень маси тіла і маси печінки. Так, якщо у тримісячних щурів відношення маси тіла до маси печінки становило 5,5, то у чотиримісячних – 4,5, у шестимісячних – менше 4, в подальшому цей показник повільно зменшувався (Рис. 3.5).

Можна стверджувати, що велика токсичність сірчаноокислої міді для старих тварин пов'язана з тим, що при введенні ксенобіотиків в розрахунку на масу тіла старі тварини отримували велику дозу сірчаноокислої міді на одиницю маси печінки. Якщо розраховувати дози сірчаноокислої міді на одиницю маси печінки, то при введенні 1 мг на 100 г маси тіла молодим, старим необхідно вводити 0,57 мг на 100 г маси тіла, тобто майже в 2 рази менше, що і пояснює більшу кількість міді в їхній печінці, отже, більшу

токсичність. На користь цього свідчать експериментальні, отримані у нашій лабораторії, дані про прояв токсичності у старих і молодих тварин після введення сірчаноокислої міді в розрахунку на 1 г маси печінки.

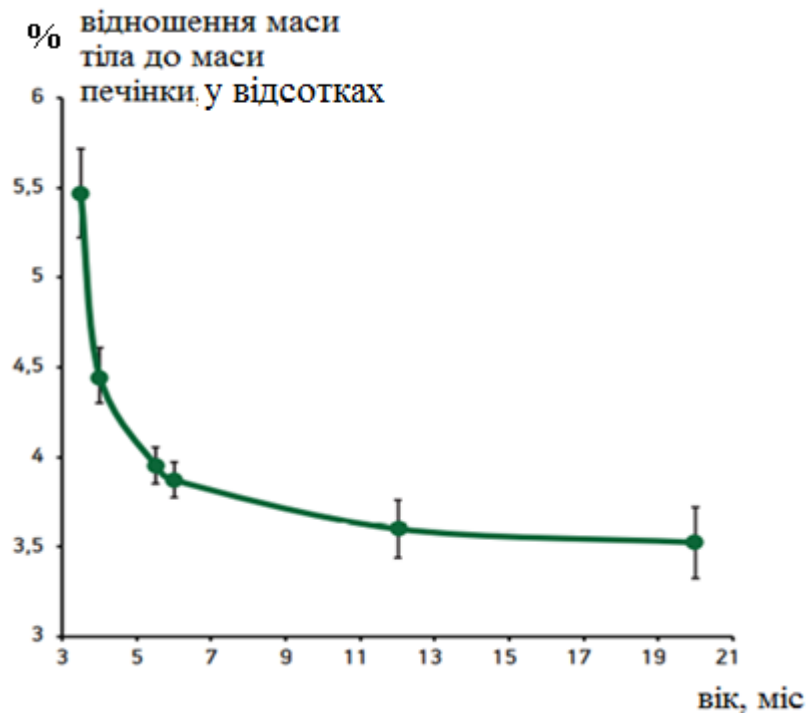


Рис. 3.5 Вікова динаміка відносної маси печінки щурів

Отже, вік-залежні відмінності в стійкості до токсикантів обумовлені не пригніченням з віком антитоксичної функції печінки, а, скоріше, відносним відставанням росту печінки від зростання маси тіла у старих тварин. Для коректної оцінки функціональних або адаптивних можливостей в онтогенезі необхідно вводити ксенобіотики з розрахунку на одиницю маси печінки, якщо метаболізм їх здійснюється в цьому органі.

Отже, старі тварини не поступалися молодим тваринам за стійкістю до токсичної дії іонів міді [23, 46, 48, 49].

### 3. 1. 3 Дослідження ролі мідь-зв'язуючих білків у формуванні гормезису до іонів міді

Відомо, що у формуванні резистентності до іонів важких металів велику роль відіграють металотіонеїни та велика група білків, здатних специфічно зв'язувати іони металів, зокрема цинку. Разом з тим, показано, що індукція синтезу металотіонеїнів можуть здійснюватися і під впливом цілої низки інших факторів [120]. У теперішній час механізм індукованої резистентності до іонів міді залишається не вирішеним.

Можна вважати, що мідьзв'язувальні білки забезпечують зв'язування, транспорт, перерозподіл іонів міді в різні компартменти клітини і, ймовірно, регулюють її виведення з організму. Дослідження механізмів обміну іонів міді в організмі і зокрема в компартментах клітин печінки має значення не тільки в розумінні механізму індукованої стійкості до іонів міді та в механізмах розвитку таких патологічних станів, як хвороба Вільсона-Коновалова та інші. У зв'язку з цим досліджували:

1) здатність молодих і старих тварин формувати «адаптивний» внутрішньоклітинний патерн розподілу іонів міді і роль в цьому білків, які специфічно зв'язують іони міді; 2) час збереження (формування метаболічної пам'яті) у вигляді «адаптивного» патерна внутрішньоклітинного розподілу іонів міді після переведення тварин в стандартні умови утримання, тобто формування метаболічної пам'яті до багаторазових уведень іонів міді в організм у молодих і старих тварин на рівні внутрішньочеревного характеру розподілення іонів міді.

Відомо, що металотіонеїни мають високу термостабільність, на цю властивість і заснований спосіб їх виділення. Нами була виділена фракція термостабільних білків цитозолю клітин печінки і показано, що вони в 5 разів більше пов'язували іонів міді в системі *in vivo* у порівнянні з загальними білками цитозоля (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Вміст іонів міді (мкг іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 мг білка) у фракціях білків загального цитозолу, фракції термостабільних білків цитозолу та медьзв'язувальних білків, виділених із печінки тримісячних тварин, які отримували сірчаноокислу мідь за схемою 1 + 1 + 1**

Фракція	Вміст іонів міді, мкг/мг белка
Загальні білки цитозолу	0,27 ±0,02
Термостабільна білкова фракція	1,40±0,18
Мідьзв'язувальні білки	7,31±1,54

Примітка: вміст іонів міді визначали через 24 години після останнього введення

Це вказує на те, що до складу термостабільних фракцій білків (ТБ 9) входять білки, що володіють більшою мірою спорідненістю до іонів міді в порівнянні з іншими білками цитозолу. У свою чергу, ТБЦ на хроматографії поділяються на три фракції, при цьому іони міді містяться в першій і другій фракціях, а в третій вони відсутні (Рис. 3.6).

Основна частина іонів міді локалізована в другій фракції ТБЦ. Вона мала молекулярну масу приблизно 12 кДа, яку визначили методом електрофорезу в ПААГ (Рис. 3.6) і яка була названа фракцією МСБ. У ній містилося в 27 разів більше іонів міді в порівнянні з білками цитозоля (Табл. 3.1).

Можна вважати, що МСБ беруть участь у депонуванні та формуванні специфічного внутрішньоклітинного патерна іонів міді і, тим самим, забезпечують індуковану стійкість організму до високих доз сірчаноокислої міді.



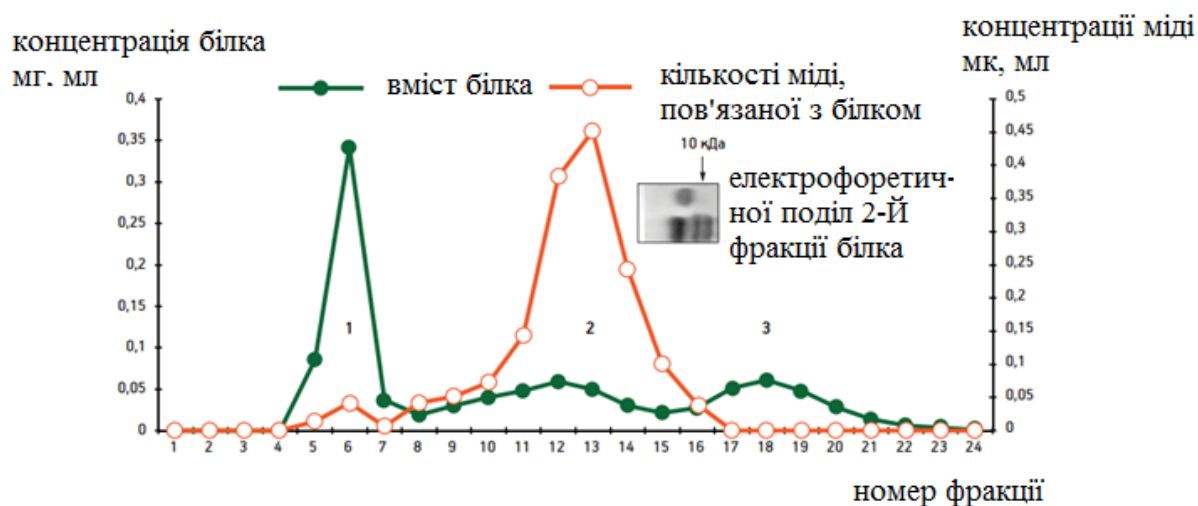


Рис. 3.6 Фракціонування термостабільних білків цитозолі на колонці з сефадексом G-75. 1, 2, 3 - фракції білків, а вміст іонів міді в різних фракціях білків

У зв'язку із тим, що іони міді є есенціальним елементом, вони присутні в клітині контрольних тварин. Визначення природного, або контрольного, внутрішньоклітинного паттерна іонів міді показало, що з 1 мг МСБ пов'язано 0,062 мкг  $\text{Cu}^{2+}$ , а з білками цитозолі, мікросом і мітохондрій – по 0,04-0,05 мкг, тобто МСБ містили в 12 разів більше  $\text{Cu}^{2+}$  в порівнянні з іншими компартментами клітини (Табл. 3.2).

Якщо цим тваринам тричі ввести малі дози сірчаноокислої міді, то мідь зв'язується з усіма компартментами, проте найбільше її було в МСБ – 5,3 мкг на 1 мг білку. Однак вміст міді збільшувалася також і в цитозолі в 8,4 рази, в мікросомах – в 5,6 разів, а в мітохондріях – в 21 рази (Табл. 3.2). Отже, при введенні сірчаноокислої міді за схемою 1 + 1 + 1 мг на 100 г формується новий патерн внутрішньоклітинного розподілу іонів міді. При цьому МСБ хоча і пов'язували значно більшу кількість іонів міді в порівнянні з іншими дослідженими компартментами клітини, це не забезпечувало «захист» цих компартментів від токсичної дії іонів міді [1, 45, 48, 49, 123].

**Кількість пов'язаних іонів  $\text{Cu}^{2+}$  (мкг  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 мг білка) з МЗБ, білками цитозолу, мікросом і мітохондрій молодих і старих щурів, яким вводили сірчанокислу мідь за різними схемами,  
n=8-10**

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 $\text{Cu}^{2+}$ 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*

Примітка: в чисельнику – значення для молодих тварин, у знаменнику – значення для старих.

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

Можна припустити, що багаторазові послідовні введення іонів міді тваринам формують адаптивний патерн розподілу іонів міді в клітинах печінки та інших органів. Наступне введення летальних доз може забезпечувати збереження (формування пам'яті) цього індукованого патерну

і, як результат, формування стійкості до наступних летальних доз токсикантів.

Для вирішення питання про вплив тимчасового інтервалу між введеннями сірчаноокислої міді на характер патерна внутрішньоклітинного розподілу іонів міді і здатності метаболічної системи зберігати індуковані патерни розподілу, молодим і старим тваринам вводили сірчаноокислу мідь за схемою  $1 + 1 + 1$  мг на 100 г маси тварини, а через 1 місяць знову повторювали ту ж схему введень і визначали розподіл іонів міді за різними компартментами клітин печінки. Було виявлено, що через місяць після введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді за схемою  $1 + 1 + 1$  мг на 100 г маси тіла, іони міді повністю виводилися з усіх компартментів печінки, і її зміст в досліджуваних фракціях повністю збігався з контрольним (базовим) рівнем, як у молодих, так і у старих тварин (Табл. 3.2).

У тому випадку, якщо експериментальним тваринам через місяць після першої серії експериментів знову вводили сірчаноокислу мідь по тій же схемі  $1 + 1 + 1$  мг на 100 г, то у цих тварин формувалася ще більш виражений «адаптивний» патерн розподілу іонів міді в клітинах печінки.

Так, МСБ печінки молодих щурів пов'язували до 15 мг  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 мг, при цьому у них зміст  $\text{Cu}^{2+}$  у фракції цитозоля, мікросом і мітохондрій було в 2,1; 4,3; 1,7 рази менше в порівнянні з першим введенням сірчаноокислої міді за схемою  $1 + 1 + 1$  на 100 г (Табл. 3.2).

Отже, повторне багаторазове введення сірчаноокислої міді молодим тваринам через місяць після першого введення супроводжувалося збільшенням ступеня зв'язування  $\text{Cu}^{2+}$  з МСБ в 2,9 рази із значним зменшенням її змісту в інших компартментах клітини, тобто мало місце формування адаптивного патерну розподілу, що супроводжувалося посиленням гормезису (Табл. 3.2).

Визначення вмісту іонів міді в компартментах клітин печінки старих тварин показало, що з МСБ у них пов'язувалося «рекордно» велику кількість

іонів міді – 30 мкг  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 мг белка, що було в 2 рази більше в порівнянні з молодими і в 43 рази більше контрольного рівня (Рис. 3.7).

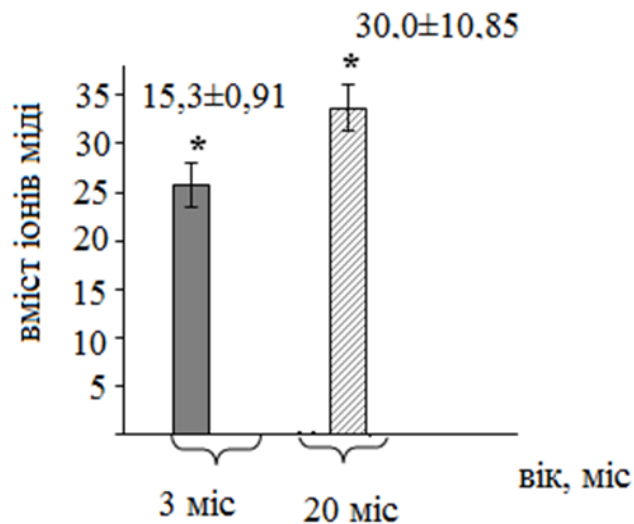


Рис. 3.7 Вміст іонів міді, пов'язаних з мідь-зв'язувальними білками у молодих і старих тварин після повторного введення сірчаноокислої міді 1 мг після першого введення сірчаноокислої міді за схемою 1 мг / 100 гр маса тіла з інтервалом 48 годин

Разом з тим, вміст іонів міді в мітохондріях і мікросомах старих тварин був більше в порівнянні з молодими в 3,7 і 2,4 рази відповідно (Табл. 3.2). Ці результати вказують на те, що повторне введення сірчаноокислої міді старим тваринам в розрахунку на масу тіла, а не печінки, супроводжувалося значним збільшенням зв'язує здібності МСБ, однак це не забезпечувало необхідний захист інших компонентів клітини, мікросом, мітохондрій і білків цитозолу через перебільшене навантаження на печінку в порівнянні з молодими тваринами [23, 46, 48].

Результати цього розділу роботи можуть бути зведені до декількох загальних положень. Попереднє послідовне введення тваринам сірчаноокислої міді в дозах, що становлять 33 % від летальної (малі дози), формували у них стійкість до летальних доз, тобто проявлявся гормезис до іонів міді. Гормезис

залежав від числа попередніх уведень, і ця залежність мала U-подібний характер. Він збільшувався від одного до трьох послідовних попередніх введень і зменшувався, якщо тварини отримували від 3 до 6 попередніх введень малих доз. Токсичний ефект до сірчаноокислої міді проявлявся переважно у старих тварин у порівнянні з молодими в тому випадку, якщо токсикант вводили з розрахунку на одиницю маси тіла, але не на масу печінки. При введенні їм токсикантів на одиницю маси печінки він не відрізнявся від молодих за стійкістю до цього токсиканту. Прояв гормезису до іонів міді залежить від внутрішньоклітинного патерну розподілу іонів міді, провідну роль в якому грають МСБ з молекулярною масою (ММ) 12 кДа. Повторне введення малих доз сірчаноокислої міді через місяць після першого введення малих доз супроводжувалося значним збільшенням кількості іонів міді, пов'язаної зі специфічними МСБ, при цьому виявлявся вік-залежний патерн внутрішньоклітинного розподілу іонів міді в клітинах печінки.

На перший погляд, отримані результати підтверджують одне з основних положень сучасної парадигми геронтології – зниження адаптивних можливостей (потенціалу) до токсичної дії іонів міді з віком. За наявними даними, в онтогенезі знижується регенераційна здатність тканин організму [116], стійкість до інфекцій [98], до різних видів радіації [164] і токсичних сполук [177, 204]. Раніше в нашій лабораторії проводилися дослідження регенераційної здатності печінки після часткової гепатектомії в молодих і старих тварин і показано, що з віком змінюється стратегія адаптації, і компенсаторні процеси у молодих і старих тварин забезпечуються різними механізмами [10]. У даній роботі на великій кількості тварин показано, що з віком зменшується відносна маса печінки. При введенні молодим і старим тваринам дози ксенобіотиків в розрахунку на одиницю маси тіла вони отримують не однакові з молодими тваринами, а великі дози – як мінімум на 40 %. Отже, такий підхід, який часто використовується в порівняльних геронтологічних дослідженнях, не завжди обґрунтований.

Таким чином, стверджувати, що старі тварини менш стійкі, некоректно, оскільки старі тварини використовують інші стратегії адаптації, що і пояснює наявність вік-залежних від характеру відповіді.

Необхідно зрозуміти, чому це так. Можна вважати, що одним з найважливіших факторів, що визначають відмінності реакцій у молодих і старих тварин на однакові експериментальні впливи, а отже, і на вибір різних стратегій адаптації, є метаболічна пам'ять, яка індукується біохімічною адаптацією. Метаболічна пам'ять може бути реалізованою завдяки наявності альтернативних метаболічних шляхів [90, 96]. Під метаболічною пам'яттю можна розуміти тривале збереження одного з обраних організмом метаболічних варіантів адаптивного рішення [13].

У нашій моделі іони міді можуть розподілятися в клітині по-різному, в залежності від дози, віку та інших неврахованих функціональних навантажень. У тому випадку, коли в організм вводиться летальна доза, то іони міді зв'язуються у великих кількостях з клітинними ядрами, ендоплазматичними мембранами, мітохондріями, і це супроводжується пригніченням життєво важливих процесів [8]. У тому ж випадку, якщо в організм вводяться послідовно малі дози, реалізується альтернативний адаптивний патерн внутрішньоклітинного розподілу з переважанням зв'язування іонів міді зі специфічним МСБ, що знижує летальний результат і формує резистентність до подальшого введення летальної дози. Однак якщо молодим і старим тваринам вводили сірчаноокислу мідь з розрахунку на масу тіла, то виявляється вік-залежний характер внутрішньоклітинного патерну розподілу. Так, поряд із великою кількістю іонів міді в МСБ, у них досить багато в порівнянні з молодими тваринами зв'язується іонів міді з мітохондріями та мікросомами (Рис. 3.8), що і дозволяє пояснити їхню меншу стійкість до токсиканту.

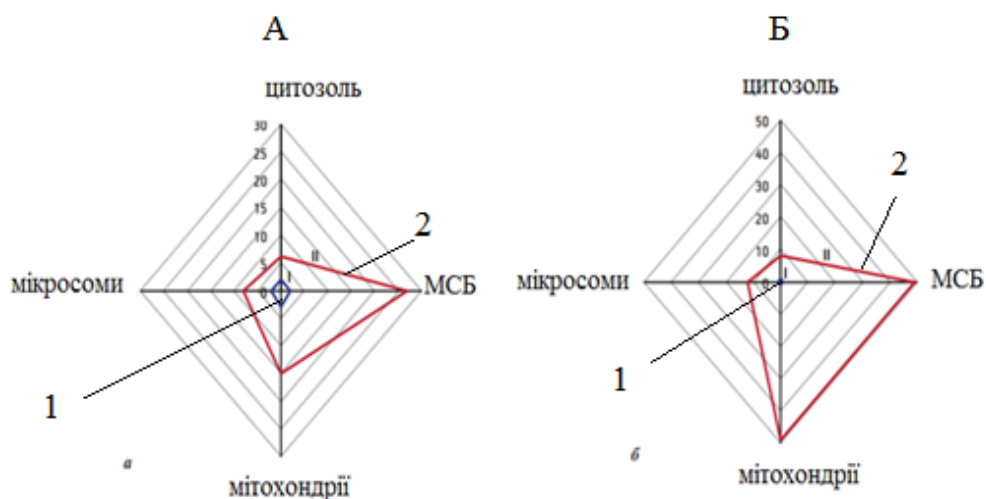


Рис. 3. 8 Внутрішньоклітинний патерн розподілу іонів міді у молодих (А) і старих (Б) тварин, в контрольній групі (1), через місяць після формування адаптивного патерну повторним введенням сірчаноокислої міді (2); МСБ – мідьзв'язувальні білки

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 «замкнуті» інші метаболічні системи, тобто формується специфічний власне підтримувальний епігенотип, який буде зберігатися до нового стрес-стану. На користь цього свідчить збереження індукованого патерна внутрішньоклітинного розподілу іонів міді через місяць після першого введення, і навіть значного збільшення кількості іонів міді, пов'язаного зі специфічними МСБ, що проявляється в посиленні гормезису (Рис. 3.8). Отримані результати підтверджують роль метаболічної пам'яті у формуванні гормезису і вибору різних стратегій адаптації у молодих і старих тварин.

### Заключення до підрозділу 3. 1

Отже, багаторазові послідовні введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в малих дозах (43 від летальних) забезпечили формування у таких тварин стійкість до подальшого введення летальних доз (3 мг / 100 г).

Ступінь такої адаптованої стійкості до сірчаноокислої міді має U-образний характер. Досягнення найвищого ефекту після 3-х послідовних введень малих доз з інтервалом 48 годин між введеннями – адаптований ефект стійкості (гормезис) зберігається (адаптується) як мінімум на протязі 45 діб після введення малих доз.

У формуванні гормезису важливу роль відіграють мідьзв'язуючі білки цитозоля печінки з молекулярної масою близько 12 кДа, які забезпечують внутрішньоклітинний характер розподілу іонів міді. Старі тварини не поступаються молодим по здатності проявляти Cu-індуковану стійкість до сірчаноокислої міді, якщо їм вводили токсикант розрахований на масу печінки. Більш того, МСБ тварин володіє великою зв'язувальною здатністю у порівнянні з молодими тваринами.

### **3. 2 Біохімічні та імунологічні наслідки гормезису до сірчаноокислої міді**

#### **3. 2. 1 Динаміка маси тіла і працездатність молодих і старих тварин після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді**

Як відомо, смерть після введення тваринам токсикантів, може наступати з двох причин: у результаті гострого отруєння і розвитку хронічних патологій. Уведення тваринам великих (летальних) доз сірчаноокислої міді супроводжувалося гострим отруєнням (для щурів воно становило 2,5 – 3 мг / 100 г маси тіла). У разі тривалих послідовних уведень невеликих доз, з одного боку, формувалася резистентність у таких тварин до наступних уведень великих доз, що знімало прояв у них гострої токсичності. З іншого боку, могли формуватися хронічні патології печінки. Мало велике значення, як в геронтологічному аспекті, так і в практичній медицині, дослідження наслідків гормезису на тлі адаптації до сірчаноокислої міді [9]. У зв'язку з цим на наступному етапі роботи досліджували вплив трьохразового



послідовного введення сірчаноокислої міді на деякі біохімічні показники у експериментальних тварин з метою оцінки «наслідків» гормезису і характер вік-залежних відповідей на ці дії [45, 46, 48, 49, 123].

У першій серії експериментів визначали деякі соматометричні показники молодих і старих тварин після послідовних введень сірчаноокислої міді.

Маса тіла трьохмісячних контрольних тварин збільшилася за час експерименту на 8 % від вихідної, тобто тварини росли також, як ростуть тварини в стандартних умовах утримання. За цей же період маса тіла двадцятимісячних контрольних тварин залишалася незмінною, що відповідає стандартній швидкості росту тварин у цьому віці (Рис. 3.9).

У тому випадку, якщо 3-х міс. тварини отримували внутрішньочеревно сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг / 100 г печінці, то вже після її першого введення спостерігалася втрата маси тіла, а до 10 діб від початку експерименту вони відставали по масі на 6-8 % від контролю (Рис. 3.9). Маса тіла 20-ти міс. тварин також знижувалася на 3-5 % в порівнянні з відповідним контролем (Рис. 3.9).

Отже, введення сірчаноокислої міді в дозах відповідних 33 % від летальної супроводжувалося втратою маси тіла і це проявлялося в більшій мірі у молодих тварин, що активно ростуть (Рис. 3.9).

Введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді супроводжувалося незначним зниженням температури тіла на 0,6-0,7 °C і це більшою мірою проявлялося у старих тварин (Рис. 3.9).

Відомо, що температура тіла з віком знижується [51]. Виявилося, що якщо між контрольними групами молодих і старих тварин ця різниця становить 0,6-0,7 °C, то після триразового введення сірчаноокислої міді ці вікові відмінності збільшувалися і становили 0,8-1,5 °C (Рис. 3.9).

Можна вважати, що на такі фізіологічні зміни будуть упливати і на адаптивні можливості цих тварин до подальших або нових стрес-факторів.

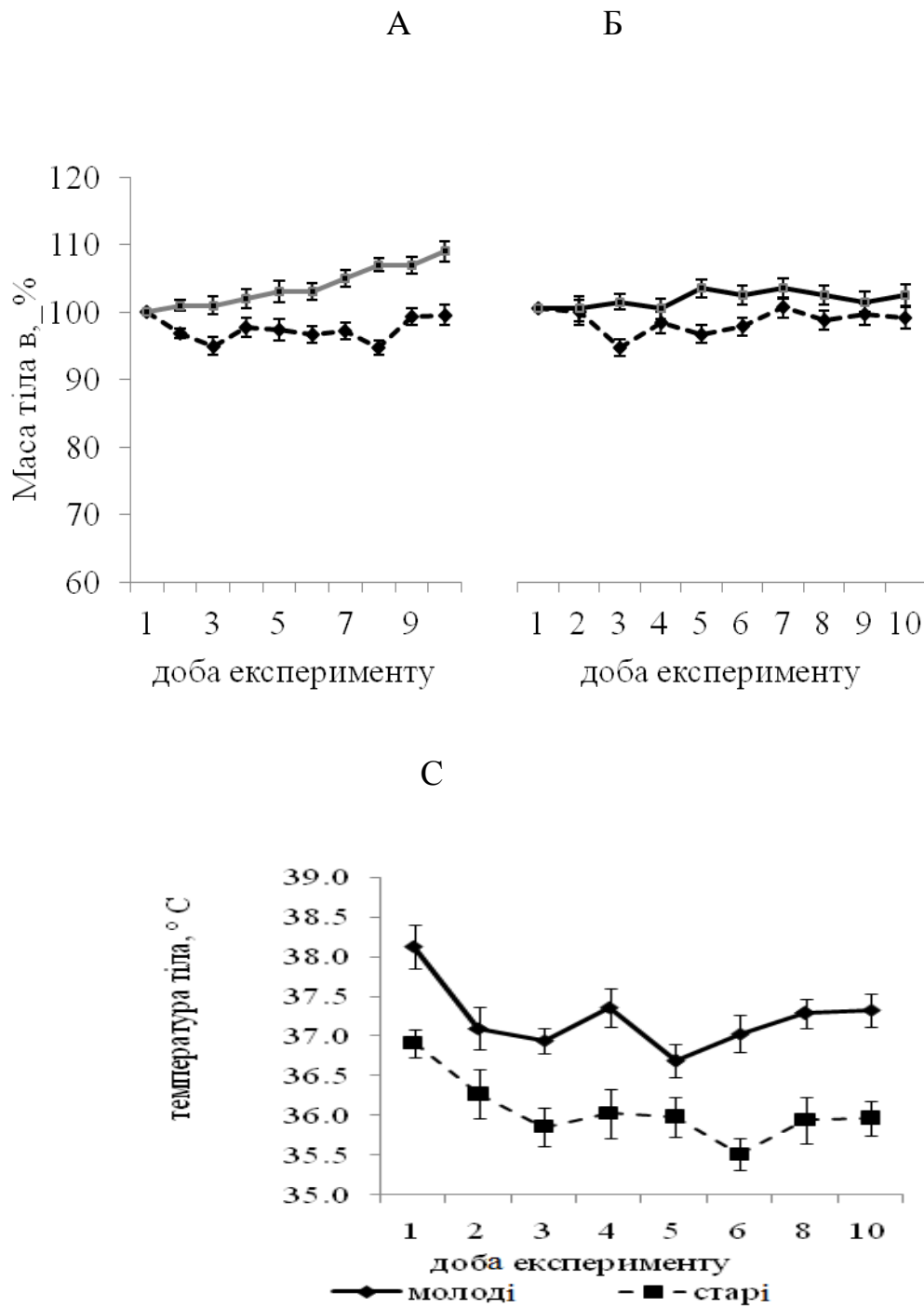


Рис. 3. 9 Динаміка маси тіла 3-х (А) і 20-міс (Б) тварин контрольної групи (—) і у тварин з Si-індукованим фіброзом (- -) і динаміка температури тіла у експериментальних тварин різного віку (С), у молодих і старих тварин

Для оцінки цього молодих і старих тварин з Cu – індукованим фіброзом піддавали емоційно-фізичному стресу – «плавання з вантажем» у холодній воді (12-14 °C). Старі тварини (20 міс.) контрольної групи в 6 разів швидше втрачали здатність утримуватися на воді (тест плавання з вантажем) у порівнянні з молодими тваринами контрольної групи (Рис. 3.10).

Якщо у 3-х місячних тварин розвивався фіброз, то їхня здатність виконувати фізичне навантаження зменшувалася в 3,7 рази в порівнянні з контрольною групою (Рис. 3.10), у той час як розвиток фіброзу у 20-ти місячних тварин не впливав на їхню здатність утримуватися на воді (Рис. 3.10).

Більш того, якщо через 24 години повторити експеримент з плаванням, то в групі молодих тварин час плавання не змінювалося, у той час як у старих тварин воно збільшувалося в 2 рази в порівнянні з першим плаванням (Рис. 3.10). Можна вважати, що старі тварини швидше адаптувалися, до цього впливу, ніж молоді [49, 50, 123].

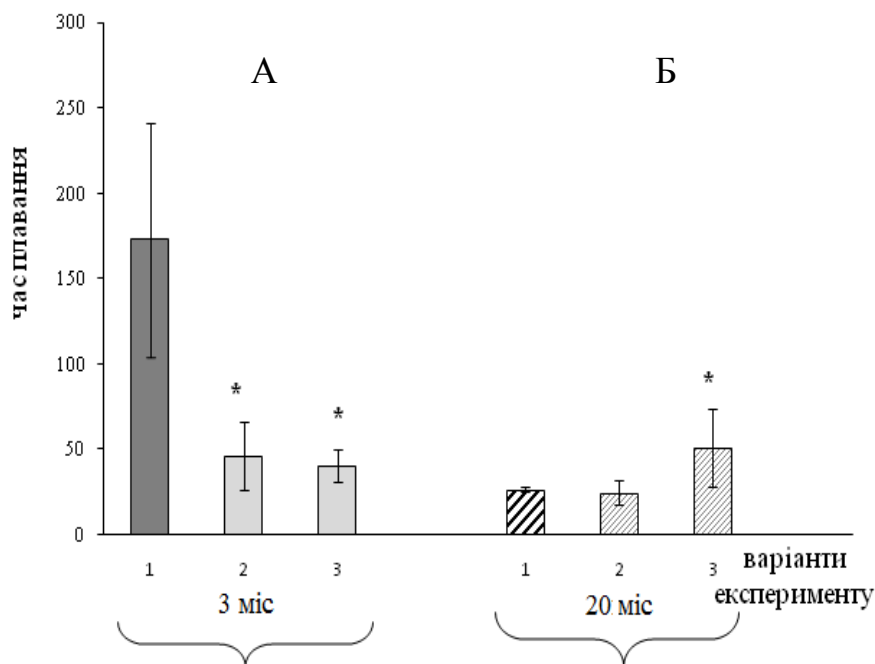


Рис. 3.10 Час плавання 3-х (А) і 20 міс (Б). щурів контрольних груп (1), через 24 години після останнього введення сірчаної кислоти міді (2) і повторне плавання цих тварин через 24 години після першого плавання (3)

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

Отже, навіть на початкових етапах Cu-індукованого фіброзу (5 діб від початку введення сірчаноокислої міді) виявлялося пригнічення росту, втрата працездатності та невелике зниження ректальної температури. Зміни мали складний вік-залежний характер; старі тварини менше втрачали масу тіла, швидше відновлювали працездатність на тлі більшого зниження температури тіла.

### **3. 2. 2 Морфологічні зміни в печінці після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді**

Як відомо, розвиток патологій печінки впливає на функціональні характеристики печінки. Всі існуючі тести на фіброз або цироз печінки містять оцінку цілої низки біохімічних показників. Однак, найбільш надійною є оцінка морфологічних характеристик тканини печінки. У зв'язку з цим на наступному етапі роботи провели гістологічну оцінку печінки після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді в дозі 33 % від летальної. Ця частина роботи була проведена на 3-х міс. самцях лінії Wistar. Старі тварини не використовувалися, тому що морфоаналіз не може забезпечити виявлення вікових відмінностей на цьому рівні.

Через 5 діб після введення сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла відносна маса печінки була достовірно нижче контрольних значень, зміст загального колагену навпаки, збільшено (Рис. 3.11).

Необхідно відзначити, що форма лопатей печінки була змінена і всі лопати були об'єднані, в результаті зростання сполучної тканини. Ступінь розвитку капсули печінки був різним у різних тварин, тобто мали місце індивідуальні особливості цього показника. Крім того колір печінки був темно-сірий і таку печінку погано перфузувати, що може вказувати на порушення кровообігу в печінці, на користь цього свідчать і морфологічні дані.

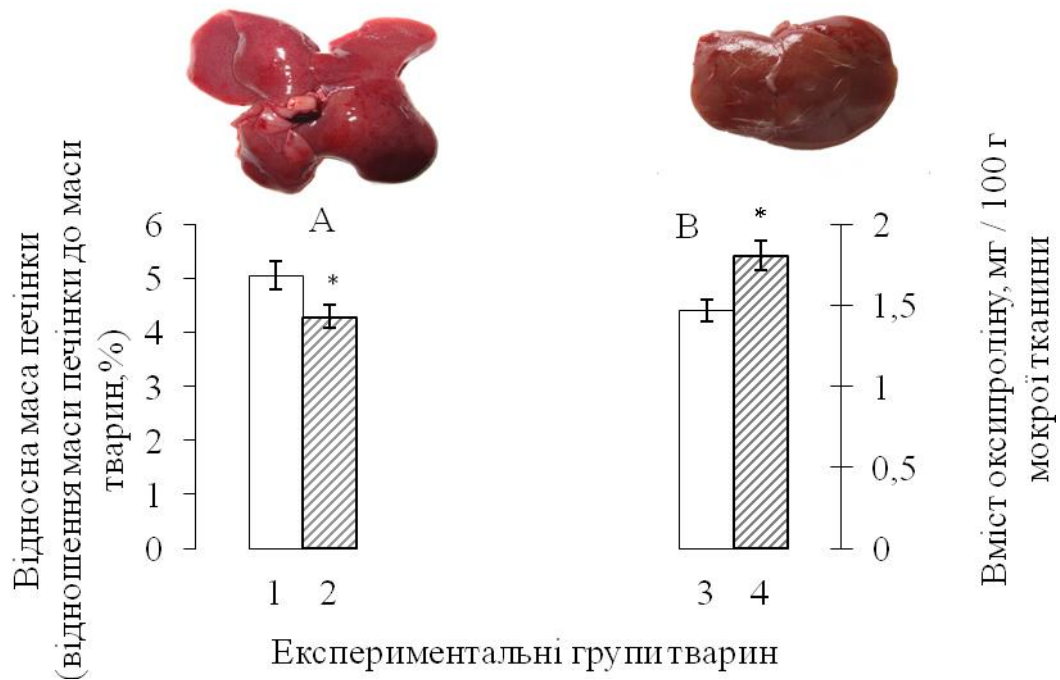


Рис. 3.11 Морфологія печінки групи контрольних щурів (А) та групи щурів, яким три рази послідовно вводили сульфат міді в дозі 1мг / 100г маси тіла кожні 48 годин між дозами (В). Відносна питома вага у контрольних щурів (1) та печінки щурів, які отримувом сульфат міді (2), вмістом колагену в контролі (3) та після отримання іонів міді (4) щурів. Параметри визначали через 24 години після останнього введення

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

На гістологічних препаратах контрольних тварин: печінкова капсула тонка, компактна, щільно прилягає до паренхімі печінки (Рис. 3.12а). Навколо центральної вени дольки печінки між балками є тонкий колагеновий матрикс, який радіально розходиться до портальних трактів, що характерно для нормальної тканини печінки (Рис. 3.12b).

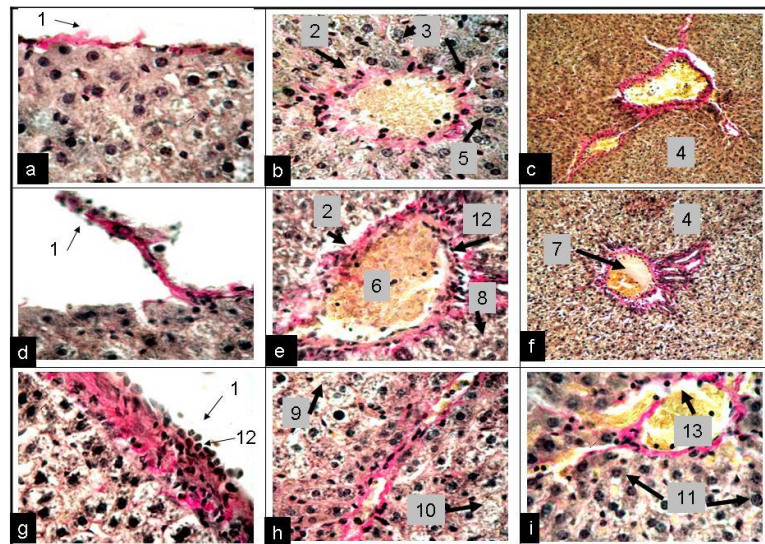


Рис. 3.12 Мікрофотографії препаратів печінки контрольних (а-с) і піддослідних тварин (d-i). Забарвлення за Ван-Гизоном. Збільшення X100 (с, f) і X400 (а, b, d, e, g, h, i)

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. «багатоядерні» клітини. 12. Інфільтрація мононуклеарних елементів. 13. Пошкодження ендотелію судини.

Портальні тракти представлені класичної тріадою (печінкова артерія, портальна вена, жовчний протік) з вираженим колагеновим компонентом, що оточують їх (Рис. 3.12с). Гепатоцити мають типову морфологію, клітинні ядра помірно гіперхромні, місцями зустрічаються двоядерні форми (Рис. 3.12b) уже через 24 години після останнього введення сірчаноокислої міді морфологічна організація печінки відрізнялася від такої контрольних тварин [1, 23, 46, 48, 49, 123].

У паренхімі мало місце виражене венозне повнокров'я, як в центральній вені, так і в венах портального тракту (Рис. 3.12e). У деяких гілках ворітної вени виявляється «сепарація» формених елементів від плазми

крові, що може свідчити про венозний застій (Рис. 3.12f). Дифузно по всій паренхімі зустрічаються гепатоцити в стані гідропічної дистрофії (клітини з «пінистою» цитоплазми), з елементами некробіозу («тіні» ядер) і некрозу (втратили ядра) (Рис. 3.12e, h). Збереження цілісності клітин говорить про незвичайний некроз гепатоцитів за апоптозним типом. У морфологічно збережених гепатоцитах часто виявляються до 3 ядерець, що може бути показником адаптивної проліферативної активності клітин (Рис. 3.12). Найбільш виражені зміни морфології печінки експериментальних тварин виявлено в організації капсули органу. На відміну від контрольного варіанту, вона була місцями пухка, нещільно спаяна з паренхімою, місцями з повним відшаруванням від паренхіми (Рис. 3.12d, g). У ній була присутня велика кількість фібробластів, лімфоцитів, ретикулоцитів, моноцитів (Рис. 3.12g). Інфільтрат мононуклеарних елементів виявлявся також в стромі портальних трактів (Рис. 3.12e). Описані явища є ознаками запального процесу в сполучної тканини. У ряді випадків мало місце пошкодження ендотелію судин, що супроводжувалося крововиливом в паренхіму органу, це призводило до зміни кольору печінки, вона мала темний колір (Рис. 3.12i).

Отже, виявлення зміни на морфологічному рівні тканини печінки свідчить про відносно невеликі зміни цього органу після 3-х послідовних уведень сірчаноокислої міді в дозі 1 мг / 100 г маси тіла, здебільшого, на початкових етапах (5 діб) розвитку запалення [23, 50, 123].

### **3. 2. 3 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 вище відповідних контрольних значень у 2 рази (Рис. 3.13).

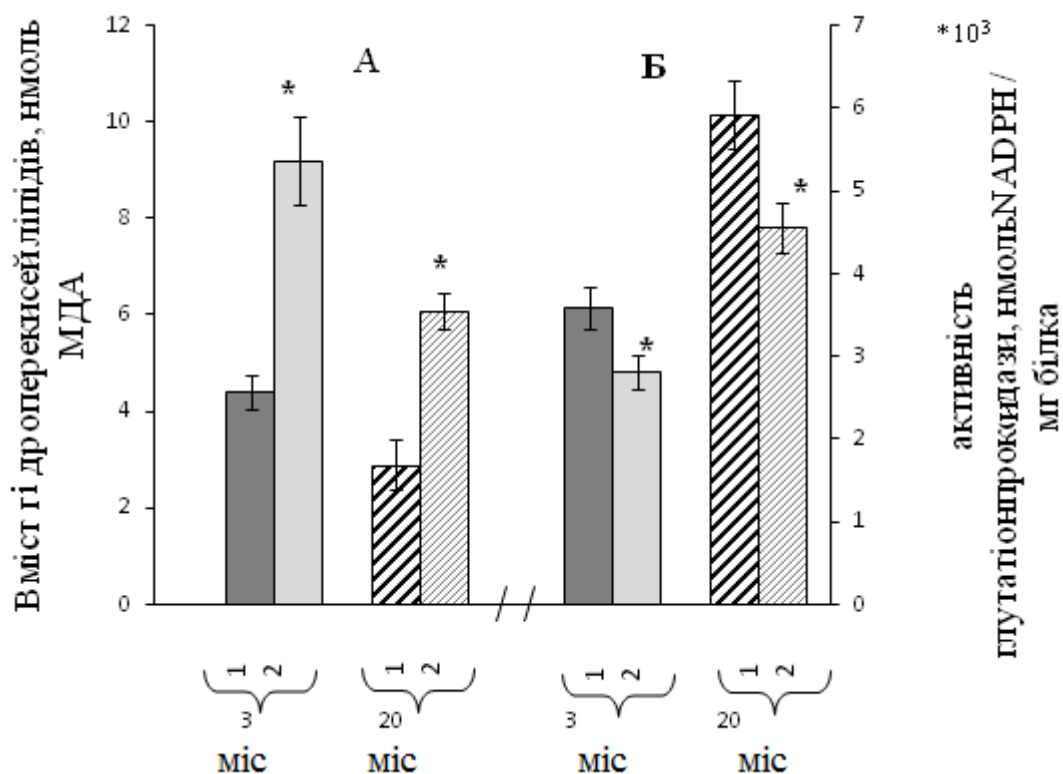


Рис. 3.13 Вміст гідроперексидів ліпідів у 3-х мес. контрольних (■) і у тварин з Cu-індукованим фіброзом (▨), то ж у 20 міс. контрольних (■) і у тварин з Cu-індукованим фіброзом (▨) у сироватці крові (А), а також активність глутатіонпероксидази у цих же тварин (Б)

\* -  $P \leq 0,05$  у порівнянні з відповідним віковим контролем, (n=5-7)

Необхідно відзначити, що вміст гідроперексидів ліпідів у старих тварин контрольної групи був на 44 % менше ніж у молодих і ці відмінності залишалися незмінними і на тлі фіброзу (Рис. 3.13А).

Отже, на тлі багаторазового введення сірчаноокислої міді мав місце оксидативний стрес, і він проявлявся в однаковій мірі у молодих і старих тварин.

Збільшення вмісту гідроперексидів ліпідів відбувалося на тлі зниження активності глутатіонпероксидази в однаковій мірі у молодих і старих тварин на 22-23 % (Рис. 3.13Б). Можна вважати, що оксидативний стрес обумовлений інгібуванням антиоксидантних ферментів.



Вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях при Cu-індукованому фіброзі збільшувалася у молодих тварин на 30 % в порівнянні з контролем, у той час як у старих воно збільшувалося в 2 рази (Рис. 3.14).

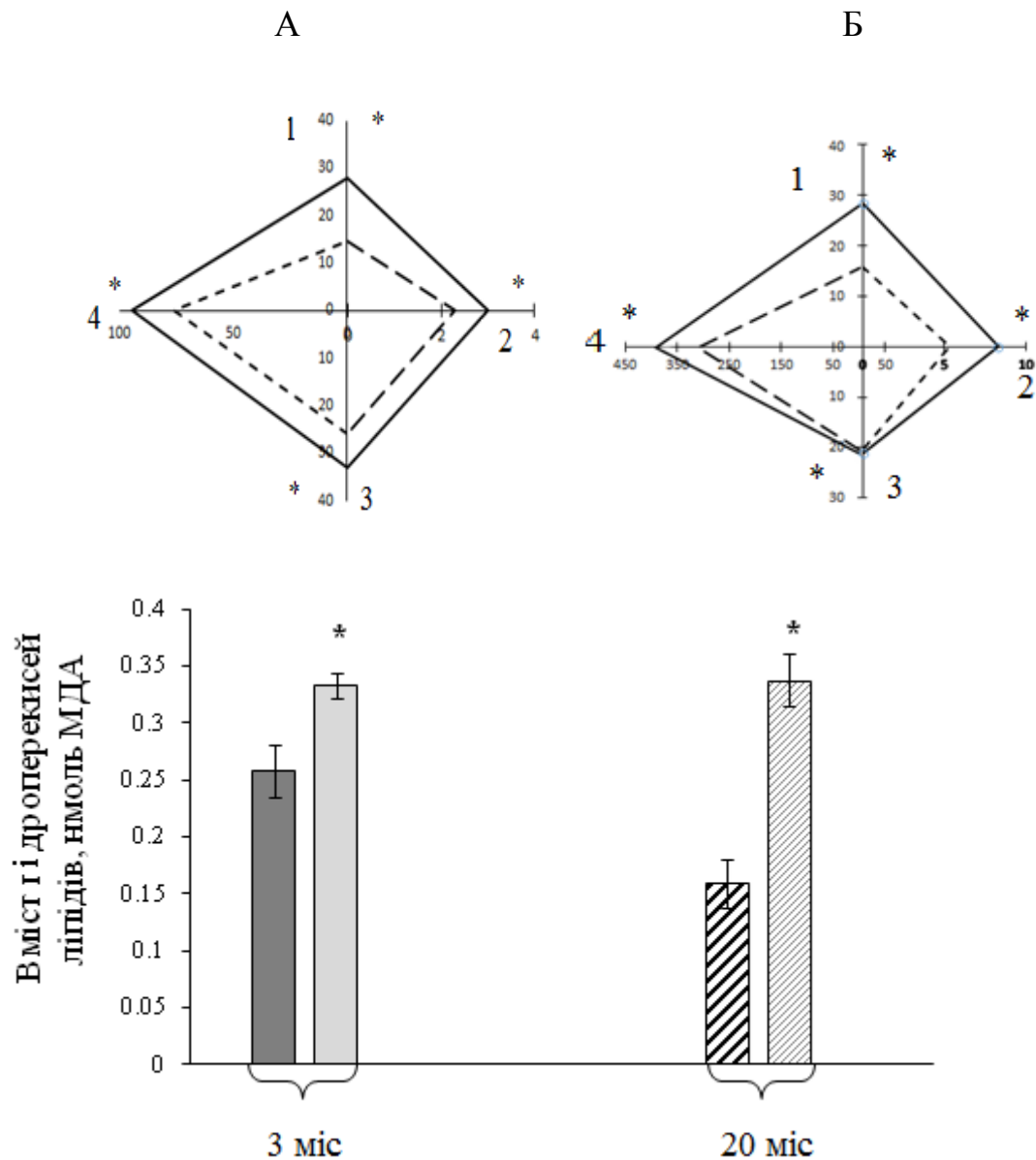


Рис. 3.14 Вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки контрольної групи 3 міс. ( ■ ) і 20 міс. ( ▨ ), груп з Cu-індукованим фіброзом у 3 міс. ( □ ) і у 20 міс. ( ▩ ) (гістограма).

Активність аконітази (1), глутаредоксина (2), глутатіонредуктази (3) і глутатіонпероксидази (4) у контрольних ( — ) і тварин з Cu-індукованим фіброзом ( --- ) у 3-х міс. (А) і 20 міс. (Б) тварин відповідно

\* -  $P \leq 0,05$  у порівнянні з відповідним віковим контролем, (n=8-10)

Активність аконітази в мітохондріях при фіброзі печінки була знижена у молодих і старих тварин на 90 % (рис. 3.14). У молодих тварин з фіброзом активність глутатіонредоксину, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази в мітохондріях була нижче контролю на 29, 24 і 23 % відповідно, а у старих на 54 і 26 %, глутатіонпероксидаза не змінювалася в порівнянні з контролем (Рис. 3.14).

Отже, ці показники прооксидазно-антиоксидазної системи на рівні печінки і сироватки крові, яка «активно» реагувала на багаторазові введення сірчаноокислої міді в дозі, що складає 33 % від летальної і кількісні зміни цих показників, мали вік-залежний характер [46, 48].

Вміст холестерину, триацилгліцеридів, альбуміну та креатиніну у тварин з фіброзом не відрізнялося від контролю, що дозволяє судити про збереження функціональної активності печінки, а фіброз перебував на початкових стадіях розвитку (Табл. 3.3).

*Таблиця 3.3*

**Біохімічні показники, які визначали в сироватці крові  
експериментальних груп тварин**

Група	Показатель			
(n=5-6)	Холестерин	Триацилгліцериди	Креатинін	Альбумін
Інтактний контроль	$1,6 \pm 0,2$	$0,77 \pm 0,13$	$69,7 \pm 15,1$	$32,3 \pm 0,4$
Су – індукований фіброз	$1,2 \pm 0,4$	$0,79 \pm 0,27$	$50,0 \pm 3,9$	$29,3 \pm 2,6$

Отже, триразове послідовне введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в дозі відповідної 33 % від летальної забезпечувало формування стійкості до подальшого введення летальних доз цього токсиканту, тобто гормезис. Однак адаптивна відповідь до іонів міді супроводжувалася розвитком фіброзу печінки, який розвивався на тлі окисного стресу. Як відомо, продукти вільнорадикальних реакцій є

неспецифічними регуляторами метаболізму. Можна вважати, що вік-залежні відмінності в редокс-системі можуть бути основою вікових відмінностей в адаптивних процесах. Як відомо, співвідношення прооксидантів / антиоксидантів можуть брати участь в регуляції активності 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 деякі показники імунної системи.

### 3. 2. 4 Певні показники клітинного та гуморального імунітету після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді у молодих і старих тварин

Кількість фагоцитувальних клітин, здатних захоплювати мікробні клітини (фагоцитарний індекс – ФІ) у тварин після трьох послідовних введень сірчаноокислої міді було зменшено в порівнянні з контрольним рівнем в 2 рази, як у молодих, так і у старих тварин (Рис. 3.15А). Це вказує на прояв імунодефіциту у тварин з Cu-індукованим фіброзом незалежно від віку.

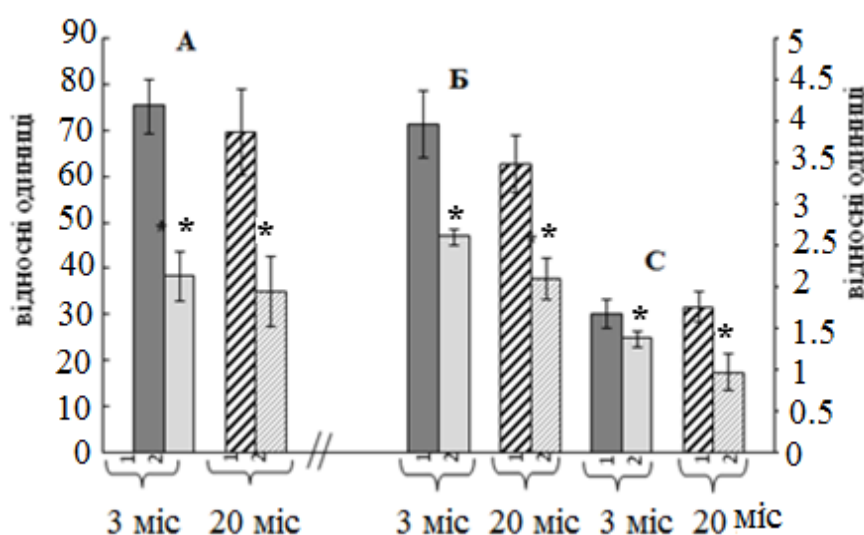


Рис. 3.15 Фагоцитарний індекс (А), фагоцитарне число (Б) й індекс завершеності фагоцитозу (С) у контрольних тварин (1) 3 міс. (■) та 20 міс. (■); групи з Cu-індукованим фіброзом (2) у 3 міс. (▨) і у 20 міс. (▨)

\* -  $P \leq 0,05$  у порівнянні з відповідним віковим контролем, (n=6-8)

Поглиналина здатність гранулоцитарних нейтрофілів, тобто середня кількість мікробних клітин, поглинених однією фагоцитарною клітиною (фагоцитарне число – ФЧ) було на 35 % менше контрольного рівня у молодих і на 40 % у старих тварин з Си-індукованим фіброзом (Рис. 3.15 Б).

Індекс завершеності фагоцитозу у молодих тварин з Си-індукованим фіброзом не відрізнявся від контрольного рівня, а у старих тварин він був на 45 % нижче відповідного контролю (Рис. 3.15С).

Отже, розвиток Си-індукованого фіброзу печінки навіть на самих ранніх стадіях супроводжувався формуванням імунодефіциту в клітинній ланці імунітету схоже у молодих і старих тварин, з тією різницею, що у старих тварин завершеність фагоцитозу було достовірно нижче відповідно контролю [23, 48, 49, 50, 123].

Вміст пептидів середньої молекулярної маси (ПСММ) в сироватці крові, до складу яких входять пептиди з молекулярною масою від 500 до 5000 Да, не знижувалися у молодих і у старих тварин, які отримували сірчаноокислу мідь в порівнянні з відповідними контрольними значеннями (Табл. 3.4).

*Таблиця 3.4*

**Вміст пептидів середньої молекулярної маси у експериментальних тварин**

	Група тварин	Група тварин
Показник	Інтактний контроль	Си-індукований фіброз
ПСММ	0,320±0,02	0,331±0,01

Вміст церулоплазміну в сироватці крові тварин з Си-індукованим фіброзом не відрізнявся від контрольного рівня, як у молодих, так і у старих тварин (Рис. 3.16А).

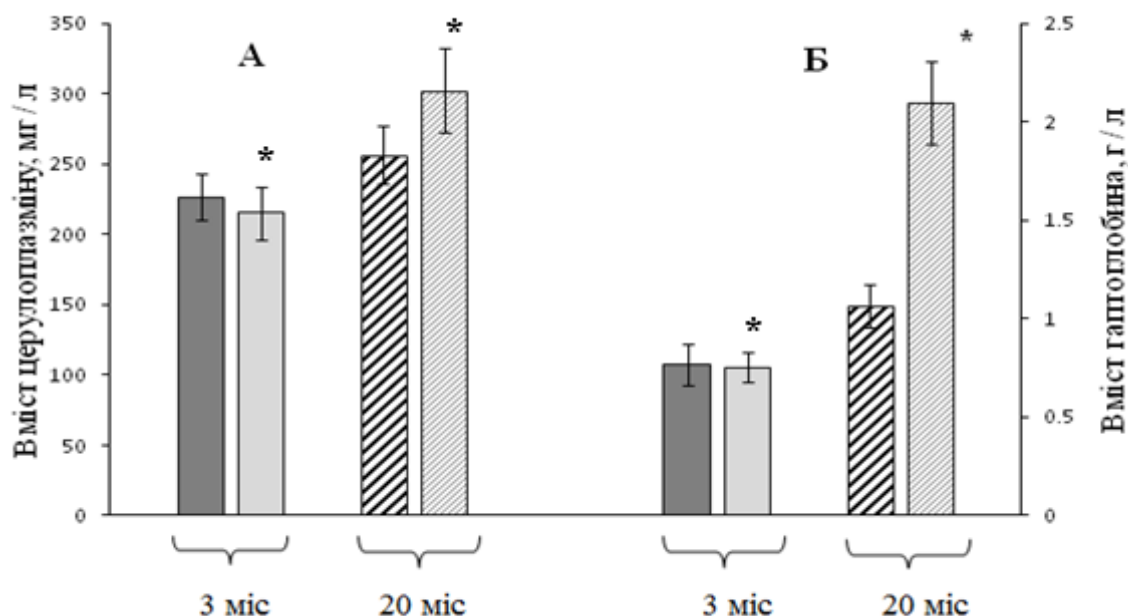


Рис. 3.16 Вміст в сироватці крові церулоплазміну (А) і гаптоглобіну (Б) у 3 міс. контрольних тварин (■), 20 міс. (■); групи з Cu-індукованим фіброзом у 3 міс. (▨) і 20 міс. (▨).

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

Як відомо, гаптоглобін пов'язує продукти гемолізу, а комплекс гем-гаптоглобін виконує в організмі антиоксидантну і антиокислювальну функції [25].

За вмістом гаптоглобіну молоді та старі контрольні тварини не розрізнялися між собою (Рис. 3.16Б). Індукція фіброзу печінки не впливала на вміст гаптоглобіна в сироватці крові молодих щурів. У той же час його вміст у старих - збільшувався в 2 рази в порівнянні з відповідним контролем (Рис. 3.16Б).

Розглядаючи механізм Cu-індукованого фіброзу, необхідно відзначити, що після 3-х послідовних введень сірчаноокислої міді вона виявлялася в сироватці крові і накопичувалася в печінці у великій кількості [171].

Накопичення іонів міді в печінці в таких високих концентраціях і в інших тканинах індукували системні зміни.

Так, на молекулярному рівні вона інгібувала активність ферментів циклу Кребса (аконітазу в 2 рази), антиоксидантні ферменти (глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу, глутаредоксину на - 40-50 %), що супроводжувалося збільшенням вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій.

Поряд з цим іони міді надавали виражену цитотоксичну дію на мембрани клітин печінки [171, 206]. В кінцевому підсумку, це проявлялося в запуску некрозу і можливого апоптозу гепатоцитів. Морфологічні порушення гепатоцитів добре виявлялися на гістологічних зразках (Рис. 3.12).

Такий специфічний склад медіаторів запалення, продуктів деградації клітин і вільнорадикальних реакцій забезпечує регуляцію різних метаболічних процесів.

З даних літератури відомо, що ключовим фактором у фіброгенезі печінки є трансформуючий фактор росту (TGF- $\beta$ 1) [94, 171].

Показано, що продукти вільнорадикальних реакцій, цитокіни і продукти деградації гепатоцитів індують синтез TGF- $\beta$ 1 в спокійних клітинах ІТЗ, що забезпечує перехід клітин ІТЗ в активовані клітини ІТЗ та їх трансформацію в фібробластоподібні клітини, які активно синтезують колаген і інші елементи сполучної тканини, що було показано і на Cu-індукованої моделі фіброзу і в нашій роботі [8, 9].

Про важливість синтезу основних компонентів сполучної тканини на тлі руйнування гепатоцитів може свідчити і той факт, що в цей час і інші типи клітин (навіть гепатоцити) починають продукувати сполучну тканину [18].

Однак після «усунення» загрози подальшого руйнування гепатоцитів і «напрацювання» достатньої кількості сполучної тканини, а це може збігатися з витратою жирових включень в клітинах ІТЗ, зменшенням вмісту ретиноїдів та інших метаболітів в них, клітини ІТЗ починають продукувати металлопротеїнази [175].

Матриксні металлопротеїнази - сімейство позаклітинних цинк-залежних ендопептидаз, які здатні руйнувати всі типи білків позаклітинного

матриксу [186]. В даний час виділено близько 30 ферментів цього сімейства [124]. Показано, що вони беруть участь в ремоделюванні тканин, ангіогенезі, проліферації, міграції та диференціюванні клітин, апоптої і стримуванні зростання пухлин [149, 168].

Отже, процес індукції фіброзу можна розділити на кілька етапів або стадій. На першому етапі в організмі і, перш за все, в печінці накопичуються генотоксичні з'єднання, які розподіляються за різними компартментам клітин і тканин (Рис. 3.17 I). На наступному етапі формується специфічний метаболічний патерн медіаторів запалення, продуктів деградації клітин і продуктів вільних радикалів (Рис. 3.17 II). Далі ці продукти активують клітини ІТЗ і фіброгенез, як строкову реакцію усунення деградації печінки. На цьому етапі проліферація гепатоцитів незначна і в подальшому віна закінчується синтезом великої кількості сполучної тканини (Рис. 3.17 III). І, нарешті, на четвертому етапі має місце активація матриксних металопротеїназ і вибір стратегій подальшої адаптації.

У такій метаболічній ситуації можуть бути запущені і реалізовані кілька стратегій подальшої адаптації, які спрямовані на виживання.

Стратегія I – посилення проліферації гепатоцитів, руйнування сполучної тканини металопротеїназами, тобто справжньої регенерації печінки з подальшим відновленням її функцій. На фізіологічному рівні це проявляється як одужання (Рис. 3.17).

Стратегія II – посилення продукції сполучної тканини, яка заміщає зруйновані гепатоцити, тобто формування фіброзу. Ця форма регенерації печінки є «терміновою», так як затримує подальше руйнування гепатоцитів. Однак в ряді випадків печінка здатна виконувати свої гомеостатичні функції, якщо з якихось причин металопротеїназа не здатна зруйнувати сполучну тканину і адаптивний процес може «зафіксуватися» на цьому рівні, тобто він буде підтримуватися на епігенетичному рівні, а фізіологічно він проявиться в вигляді хронічного, які тривалий час поточного фіброзу, без прямої загрози життю (Рис. 3.17).

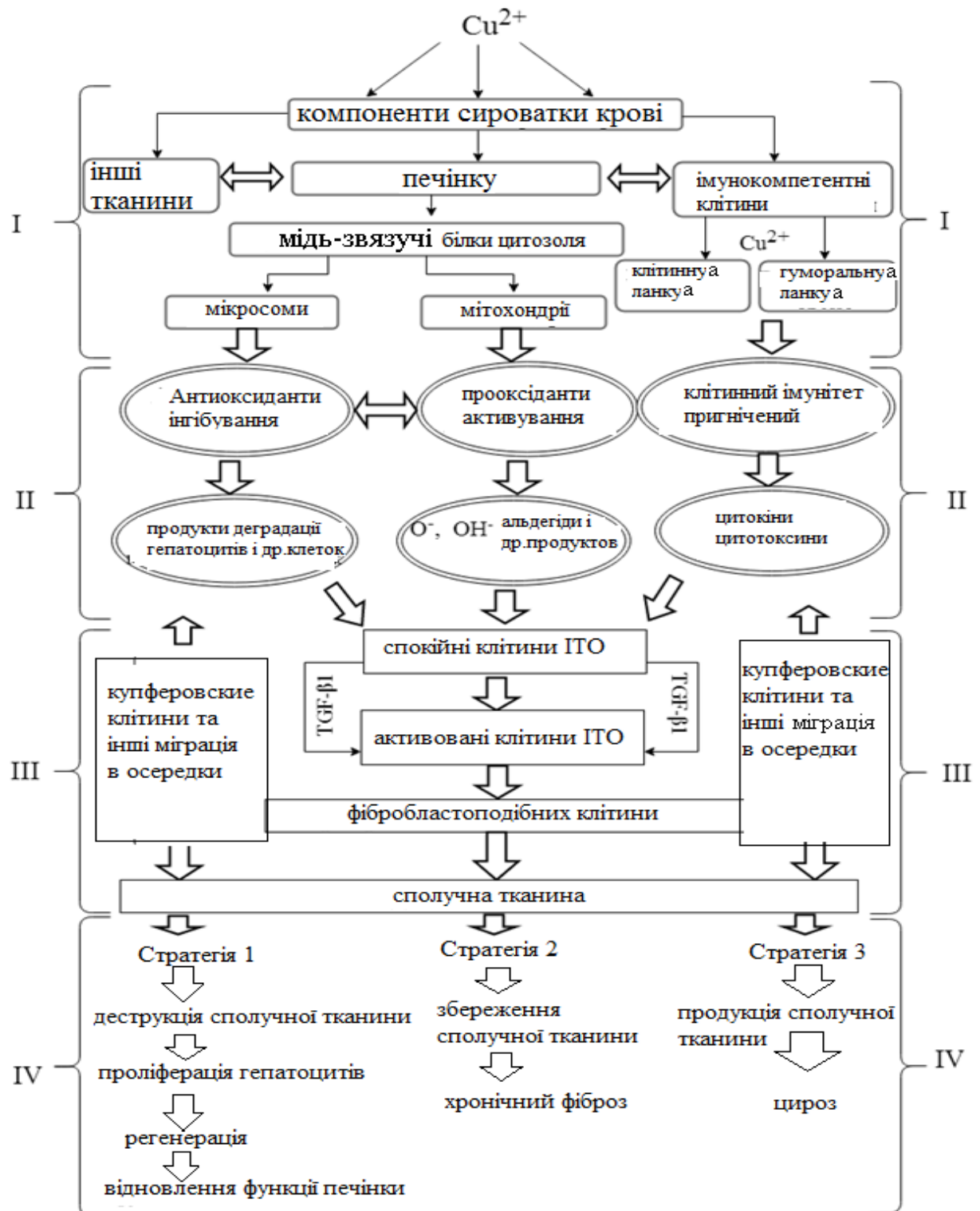


Рис. 3.17 Схема, яка продемонструвала ієрархію утворення фіброзу печінки, викликаного багатократним введенням сірчаноокислої міді в організм

Стратегія III – з якихось невідомих нам причин процес істинної регенерації печінки не здійснюється і, навпаки, триває деградація



гепатоцитів, які заміщаються сполучною тканиною, а фізіологічно це проявляється як цироз (Рис. 3.17).

Можна стверджувати, що всі молекулярно-клітинні процеси, що відбуваються в цей час в печінці, мають адаптивний характер. Доказом адаптивної, а не патогенетичної функції описаних змін є прояв вираженого гормезису до летальних доз сірчаноокислої міді у цих тварин.

Якщо ці міркування вірні, то виникає інше питання. Чому адаптивні реакції (корисні в одних випадках) можуть призводити до розвитку патологій і збільшувати ймовірність смерті?

Ми вважаємо, що вибір тієї чи іншої стратегії подальшої адаптації буде здійснюватися в момент досягнення такого метаболічного стану системи, коли вона має високу (найвищу) ступінь гетерогенності чинників, що визначають домінуючу роль у виборі метаболічної стратегії [46, 48, 49, 123].

Для даної моделі це досить високе співвідношення між факторами з протилежного спрямованістю (факторів активації проліферації і чинників активації регуляції фіброгенезу). Момент настання високого ступеня варіабельності визначальних чинників є точкою нестабільності або точкою біфуркації. Ймовірно, в момент досягнення точки біфуркації поведінки біологічної системи стає непередбачуваною в тому сенсі, що вона робить вибір між потенційно можливими станами. Серед можливих станів, Як було відзначено, можуть бути реалізовані 3 стратегії (Рис. 3.17).

Домінування факторів, що визначають стратегічний вибір, буде залежати не від одного фактора, а від складного комплексу різних факторів, і, перш за все, від характеру динаміки метаболічних патернів, а точніше від характеристик «центрів тяжіння» взаємопов'язаних метаболічних циклів.

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 наступ максимально можливої варіабельності, є час існування біологічної системи, або її вік.

Порівняльний аналіз зміни досліджуваних метаболічних показників у молодих і старих тварин з Си-індукованим фіброзом в порівнянні з відповідним віковим контролем показав відносно невеликі вік-залежних відмінності на цьому рівні (Рис. 3.18).

Так, у старих тварин більшою мірою проявлялося вміст ГПЛ в мітохондріях (підвищення на 112 %), індекс завершеності фагоцитозу (зниження на 45 %) і значно більшою мірою збільшувався вміст гаптоглобіну (на 96 %).

При цьому у старих тварин розвиток фіброзу не зробило настільки сильне пригнічення працездатності в порівнянні з молодими тваринами, вони менше втрачали масу тіла, ніж молоді. Більш того, оцінка виживання молодих і старих тварин протягом місяця після Си-індукованого фіброзу показала, що якщо серед молодих за цей час впала 10 відсотків експериментальних тварин, то серед старих вижили всі (в кожній віковій групі було по 50 тварин).

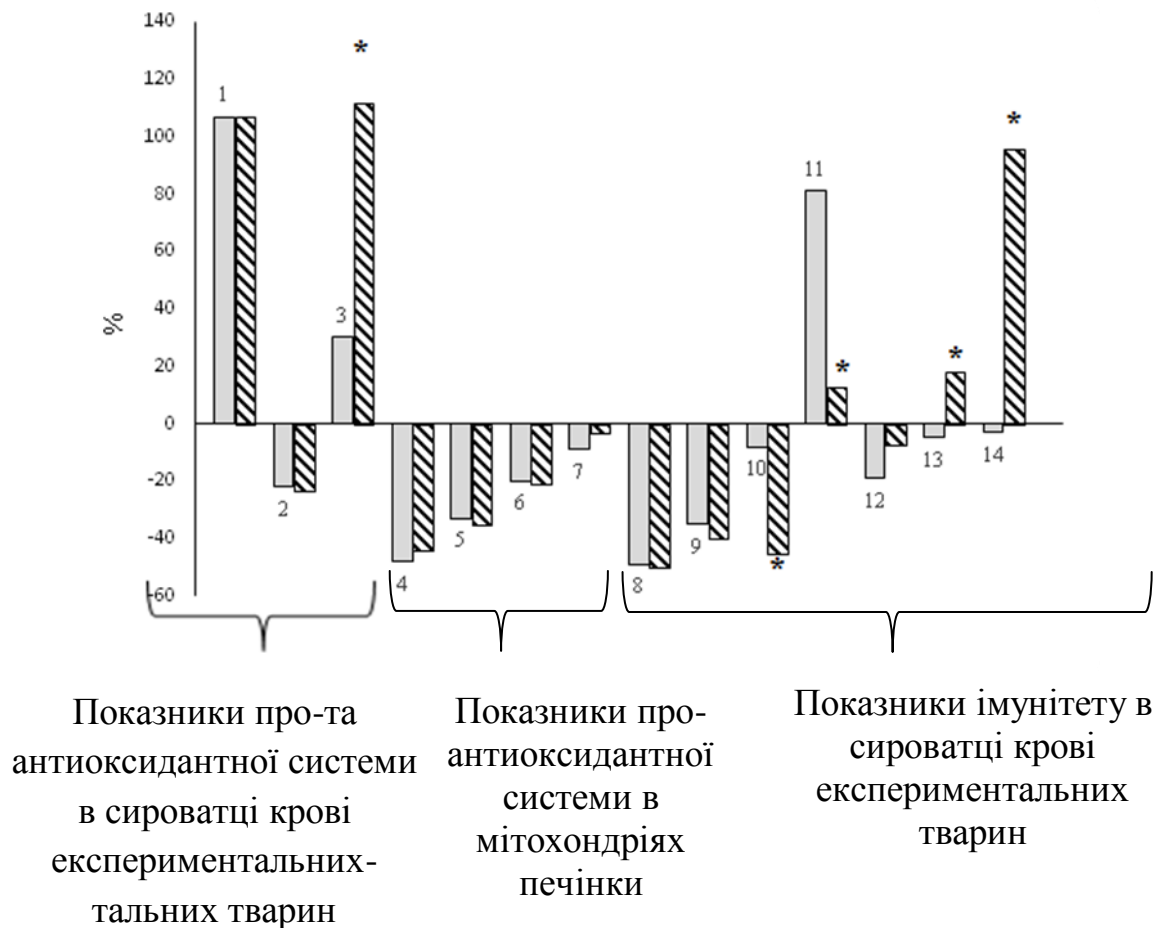


Рис. 3.18 Патерн досліджуваних показників у молодих і старих тварин через 24 години після введення сірчанокиислої міді. На осі «+» показано збільшення досліджуваних показників у відсотках % від контролю; «-» відповідно зменшення в порівнянні з контролем

Примітка: показники: 1 - вміст гідроперекисів ліпідів в сироватці крові щурів; 3 - вміст гідроперекисів ліпідів в мітохондріях печінки щурів; 4 - активність аконітаза в мітохондріях печінки щурів; 5 - активність глутатіонредоксіна; 6 - активність глутатіонпероксидази; 7 - активність глутатіонредуктази; 8 - фагоцитарний індекс; 9 - фагоцитарне число; 10 - індекс завершеності фагоцитозу; 11 - циркулюючі імунні комплекси; 12 - пептиди середньої молекулярної мас; 13 - церулоплазмін; 14 - гаптоглобін

### **Заклучення до підрозділу 3. 2**

У висновку цього підрозділу необхідно зазначити, накопичення іонів міді в клітинах печінки після трьох послідовних її введень індукує фібротичними зміни в ній. Для них характерно: 1 – формування специфічного адаптивного метаболічного патерну з вираженим зміщенням в системі про- та антиоксидантів у бік прооксидантів; 2 – системні зміни і зокрема пригнічення клітинної ланки імунітету, морфо-функціональної перебудови печінки і зміна фізіологічних характеристик; 3 – інгібування загального метаболізму, що проявлялося в зниженні температури тіла, втратою маси тіла і втрати працездатності; 4 – співвідношення між індукованими метаболічними патернами і фізіологічними характеристиками мали вік-залежний характер; 5 – сформувався специфічний адаптивний метаболічний патерн є нестабільним і в подальшому може бути реалізований в одну з трьох можливих адаптивних стратегій, на вибір якої впливає і вік тварин.

Дані та результати, отримані в даній роботі переконливо свідчать про те, що ключовою метаболічною ланкою в розвитку гормезису і подальшого формування фіброзу печінки, є функціональна активність прооксидантно ↔ антиоксидантної та імунної систем. Ми вважаємо, що «взаємодії» 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 форміруватися свої патерни в цих системах, що і буде впливати на майбутні характеристики адаптивної відповіді. 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 на моделі циклічного режиму годування вмісту показників про-та антиоксидантної системи.

### **3. 3 Певні показники прооксидантно-антиоксидантної та імунної систем при циклічному режимі годування, як моделі збільшення тривалості життя**

Як було показано в підрозділі 3.2, інтоксикація організму послідовними введеннями іонів міді супроводжувалася втратою маси тіла тварин і формуванням окислювального стресу. В даний час накопичення великої кількості даних, які вказують на те, що іони важких металів є індукторами окислюваного стресу [191]. З цих позицій індукція окисного стресу іонами міді є специфічною реакцією організму. Поряд з цим є досить велика кількість даних, які вказують, що окислювальний стрес формується під впливом великої кількості різноманітних стрес-факторів і в такому випадку, він є неспецифічною реакцією відповіді організму на екстремальні впливи. Перевірка цих положень є важливим не лише для перевірки вільнорадикальної гіпотези старіння, а й в розумінні механізмів адаптації та її зв'язку з розвитком вік-залежних патологій [198].

У зв'язку з цим в нашій лабораторії було розроблено модель циклічного режиму годування (ЦРГ). Особливості цієї моделі опубліковані в наших роботах [47] і ми відзначимо лише, що в цьому випадку тварини послідовно втрачали і відновлювали маси тіла. При такому підході можна визначити взаємозв'язок між змінами маси тіла і проявами оксидативного стресу і активності імунної системи.

#### **3. 3. 1 Показники про-антиоксидантної системи у молодих і старих тварин, що знаходяться на двох послідовних режимах цикл режим годування**

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) в мітохондріях печінки молодих тварин було збільшено на 105 % на тлі першого циклу втрати маси тіла (Рис. 3.19). У той же час у старих тварин вони були збільшені тільки на 69 % в порівнянні з контролем (Рис. 3.19 А, С).

Переведення цих тварин на звичайне годування з відновленням маси тіла супроводжується зменшенням вмісту гідропероксиду ліпідів в мітохондріях печінки, як у молодих, так і у старих тварин і досягала базового контрольного рівня (Рис. 3.19 а, с).

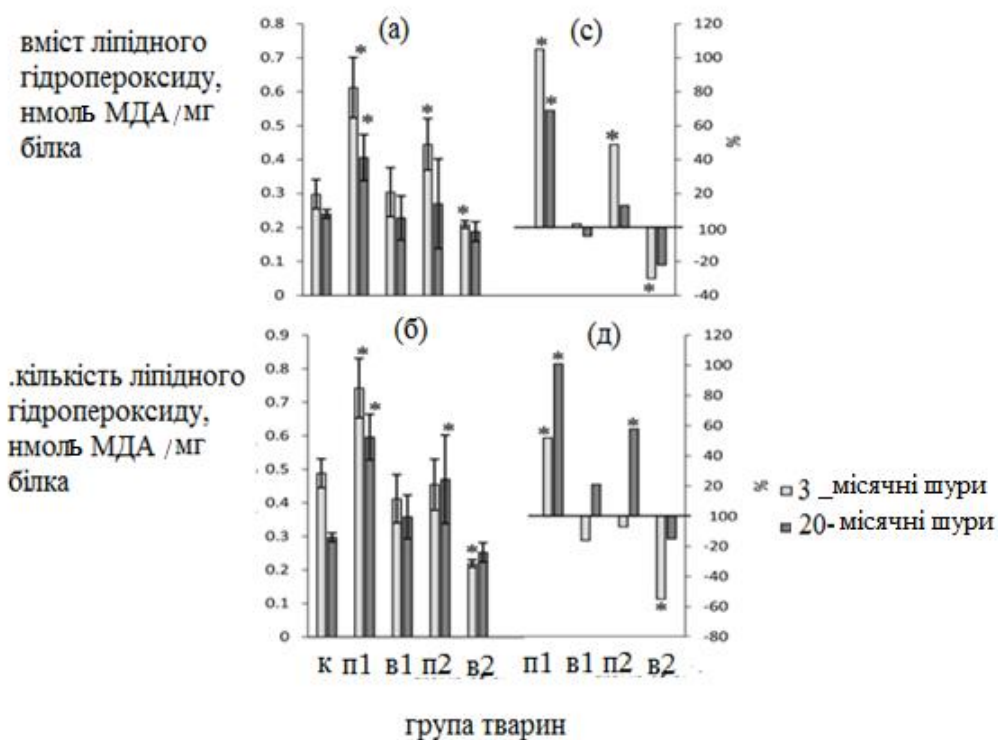


Рис. 3.19 Вміст ліпідного гідропероксиду (нмоль МД мг білка ) в мітохондрії (а) та фракції мікросом (б) у молодих (3 місяців) та старих (20 місяців) тварин. Зміна цих параметрів показана у відсотках до рівня контролю в мітохондріях (с) та мікросомах (д)

Примітка: К- контроль, П1-втрата маси тіла молодих тварин у першому циклі, П2- втрата маси тіла старих тварин у другому циклі, В1- відновленням маси тіла молодих тварин, В2 – відновленням маси тіла старих тварин у другому циклі; \* -  $P \leq 0,05$  у порівнянні з відповідним віковим контролем, (n=10)

Отримані результати вказують на те, що втрата маси тіла індукують окислювальний 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 фактору, при цьому вік тварин впливав на метаболічну відповідь на такі дії [1, 23, 49, 50, 123].

Якщо виходити з того, що зміна в характеристиці 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 ефектом збільшення вмісту ГПЛ в мітохондріях печінки молодих тварин (на 50 % в порівнянні з контрольним рівнем) і не змінювалася у старих (Рис. 3.19а, с).

Вміст ГПЛ в мітохондріях печінки 3-х і 20-ти міс. тварин після другого циклу відновлення маси тіла було нижче контрольного рівня (Рис. 3.19 а, с).

Отже, втрата і відновлення маси тіла виявлялися в збільшенні вмісту ГПЛ в мітохондріях печінки. Перший цикл втрати маси тіла супроводжувався вираженим оксидативним стресом у молодих і в меншій мірі у старих тварин. Другий цикл втрати маси тіла викликав у 2 рази менший ефект збільшення 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 забезпечувало відновлення до базового рівня ГПЛ в мітохондріях, як молодих, так і у старих тварин (Рис. 3.19).

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 3-х міс. тварин в першому циклі втрати маси тіла супроводжувалося їх збільшенням на 52 % в порівнянні з контролем, а у 20 міс. навпаки, на 100 % (Рис. 3.19).

Після відновлення маси тіла в першому циклі вміст ГПЛ не відрізнялося від контрольного рівня (Рис. 3.19).

Другий цикл втрати маси тіла не впливав на вміст ГПЛ у мікросомах молодих тварин і незначно збільшував їх у 20 міс. тварин. У той же час після другого циклу відновлення маси тіла вміст ГПЛ в мікросомах 3-х міс. тварин на 56 % було нижче відповідного контролю, а у старих достовірно не відрізнявся від їх контрольного рівня (Рис. 3.19).

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 досвідом або зменшувалися або не виявлялись. Ці коливання в вмісті ГПЛ супроводжувалися достовірним зменшенням вмісту ГПЛ як в мітохондріях, так і в мікросомах після двох циклів ЦРК. Можна вважати, що подібні ритмічні зміни в про-оксидантній системі ведуть до «формування» нового для мітохондрій і мікросом рівня ГПЛ.

Відомо, що мітохондріальна аконітази найбільш уразлива ланка циклу Кребса, вона відзначено зниження активними формами кисню, оксидом азоту [39] при киснево-глюкозній голодуванні [107].

Виявилося, що активність аконітази мітохондрій печінки при ЦРК змінюється по-різному у молодих і старих тварин (Рис. 3.20). Якщо у 3-х місячних тварин при втраті маси тіла в 1 і 2 циклі активність аконітази знижується на 30 %, а при першому циклі відновлення маси тіла вона не відрізнялася від контрольного рівня, то в другому циклі відновлення маси тіла вона відставала від контрольного рівня на 24 % (Рис. 3.20).

У той же час активність аконітази мітохондрій у печінці старих щурів не змінювалася при циклічному режимі годування (Рис. 3.20).

Як відомо, вміст ГПЛ залежить від співвідношення багатьох факторів і зокрема активності антиоксидантних ферментів. Раніше було показано, що одним з найбільш лабільних (швидко мінливих) і важливих антиоксидантних ферментів є глутатіонпероксидаза (ГП) [133].



нмоль/мг білка

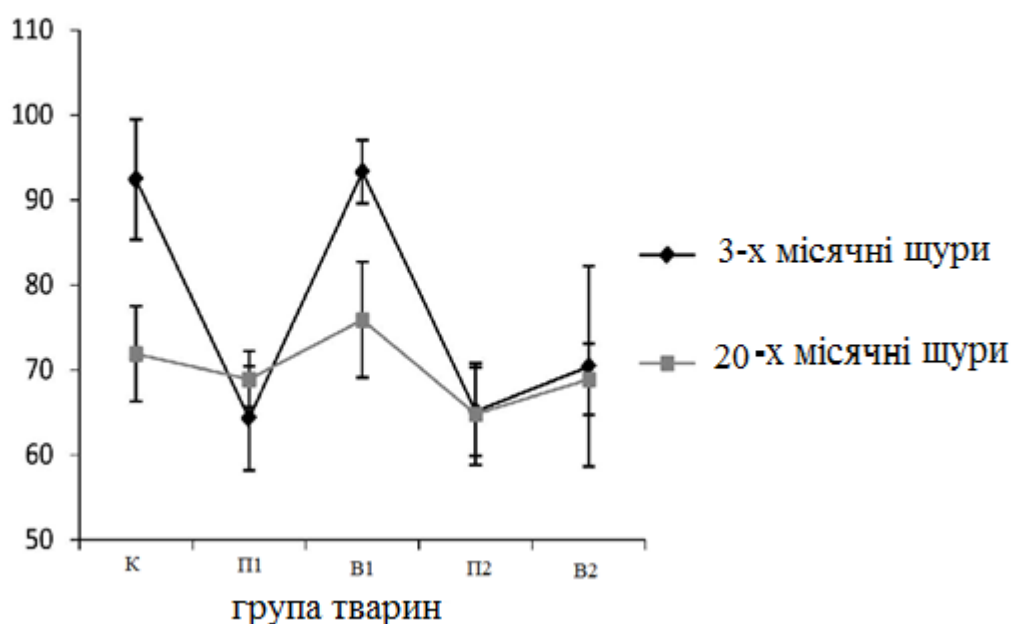


Рис. 3.20 Активність аконітази молодих (3-місячних) та старих (20-місячних) тварин

К, П1, В1, П2 і В2 - анімальні групи, як на Рис. 3.19

Визначення її активності показало, що вона сильно змінюється у відповідь на втрату і відновлення маси тіла і між її активністю і вмістом ГПЛ немає кореляційних зв'язків.

Так, втрата маси тіла у 3-х міс. щурів в першому циклі супроводжувалася збільшенням активності ГП в мітохондріях печінки на 142 %, а у 20 міс. тільки на 33 % (Рис. 3.21 А, С).

Після відновлення маси тіла активність ГП в мітохондріях печінки була на 33 % вище контролю, а у 20 міс. на 88 % (Рис. 3.21 А, С).

Другий цикл втрати маси тіла ще більшою мірою, ніж в першому циклі, збільшував активність ГП на 251 % у молодих і на 142 % у старих тварин (Рис. 3.21 А, С).

активність  
глутатіонпероксидази  
нмоль NADPH/мг білка

глутатіон  
пероксид  
активний, нмоль  
NADPH/мг білка

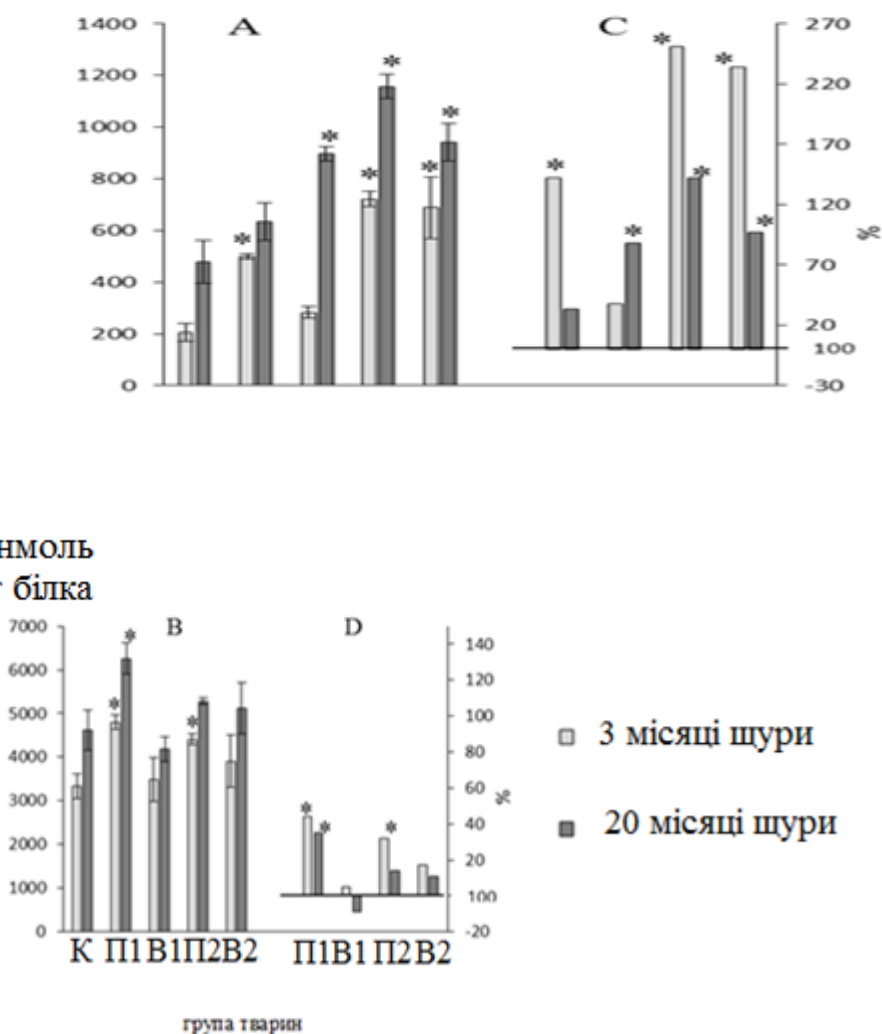


Рис. 3.21 Активність глутапероксидази (нмоль NADPH / хв на мг білка), внутрі мітохондрій (A) і крові (B) у молодих (3-місячних) і старих (20-місячних) тварин. К, П1, В1, П2 і В2 - групи, як показано на Рис. 3.19. Зміна цих параметрів відбувається в процентах до рівня контролю в мітохондріях (C) і мікросомах (D)

Після другого циклу відновлення маси тіла активність ГП у мітохондріях печінки залишалася практично такою ж високою у молодих і старих тварин, як і після 2-го циклу втрати маси тіла (на 234 % і 97 % відповідно в порівнянні з контролем) (Рис. 3.19 A). Отже, між зміною активності ГП та змістом ГПЛ у мітохондріях на тлі втрати-відновлення маси

тіла, як результат циклічного режиму годування, відсутні кореляційні зміни між цими показниками. При цьому індукція ГП багаторазово перевищує збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів, тобто вона залишається на високому рівні і після завершення ЦРК [46, 48, 49, 50].

Відомо, що існує кілька різних класів глутатіонпероксидази, які розрізняють за локалізацією, субстратної специфічності і активності [26]. У зв'язку з цим в наступній серії експериментів визначали активність ГП в сироватці крові.

Виявилося, що спрямованість і ступінь зміни її активності відрізняються від такої мітохондрій печінки. Так в першому циклі втрати маси тіла вона незначно збільшувалася в порівнянні з мітохондріями в однаковій мірі у 3-х і 20-ти міс. (44 % і 35 %, відповідно), при відновленні маса достовірно не відрізняється від контрольного рівня (Рис. 3.21 В, D).

Другий цикл втрати маси тіла супроводжувався збільшенням активності ГП в сироватці крові у 3-х міс. тварин на 33 % відносно до контролю (Рис. 3.21).

Отже, характер змін активності ГП у мітохондріях і сироватці крові були різними при ЦРК. Різні класи ГП по-різному змінюються у відповідь на ЦРК. Між молодими і старими тваринами виявлялися виражені кількісні, але не якісні відмінності за активністю ГП.

Таким чином, втрата маси тіла супроводжувалася зміщенням рівноваги прооксиданти  $\leftrightarrow$  антиоксиданти в бік прооксидантів і це мало чи не залежало від причин втрати маси, тобто окислювальний стрес – неспецифічна відповідь організму на фізіологічний стрес. Ці результати дозволяють дійти висновку, що окислювальний стрес під час розвитку Су-індукованого фіброзу не є специфічною реакцією.

Як відомо, при різних токсикозах і запалювальних процесах у кровотік потрапляє велика кількість пептидів середньої молекулярної маси. Про що часто під час оцінювання запалювальних процесів та інших патологічних

станів про процеси змісту пептидів середньої молярної маси в сироватці крові, як показував рівень розвитку патологічного процесу.

### 3. 3. 2 Показники клітинної ланки імунітету при циклічному режимі годування

Як було представлено в підрозділі 3.2, розвиток окислювального стресу, індукованого багаторазовими введеннями сірководню міді, супроводжувався інгібуванням клітинної ланки імунітету. Представлено необхідні виявити показники імунітету на тлі збільшення активності прооксидантної системи на моделі ЦРК.

ЦРК не впливав або незначно впливав на клітинну ланку імунітету на відміну від реакції про-антиоксидантної системи.

Так, фагоцитарний індекс (ФІ), який відображає здатність лейкоцитів переварювати тестову мікробну культуру, після першого циклу втрати маси тіла був на 17 % нижче у 3-х міс. тварин у порівнянні з контролем, а у 20 міс. він достовірно не відрізнявся від контролю (Рис. 3.22).

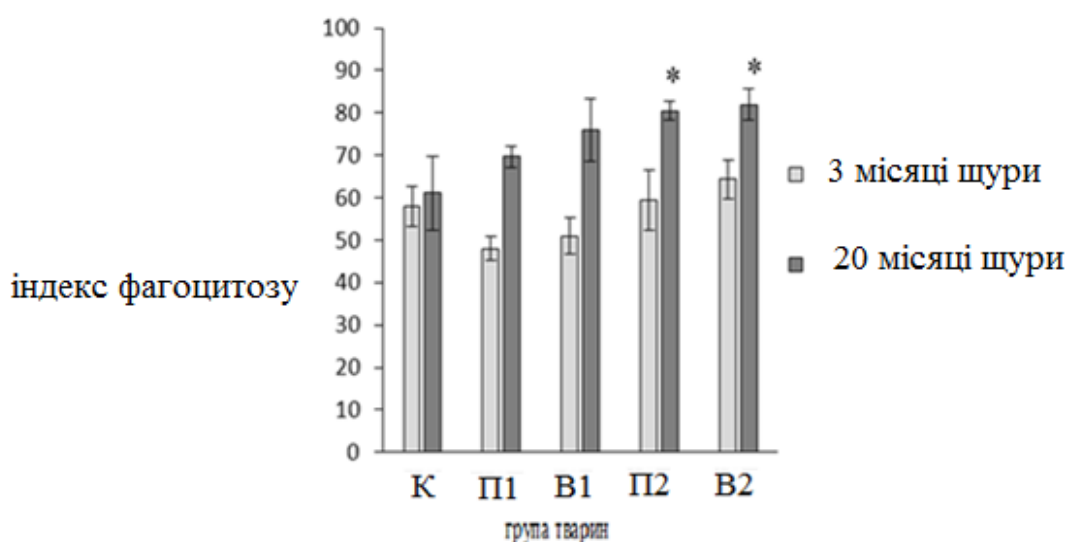


Рис. 3.22 Індеси фагоцитозу у молодих (3-місячних) і старих (20-місячних) тварин. К, П1, В1, П2 і В2 - експериментами групи, як на Рис. 3.19

Відновлення і втрата маси тіла в подальшому не впливало на ІФ в 3-х міс. тварин. У той же час цей показник незначно збільшувався в другому циклі у 20-ти міс. щурів (Рис. 3.22).

Фагоцитарне число (ФЧ) (поглинальна здатність лейкоцитів) також мало змінювалось, і залишалося близьким до контрольних значень у молодих і старих тварин (Табл. 3.5).

Стабільним на тлі ЦРК був і індекс завершеності фагоцитозу (Табл. 3.5).

Як відомо, нейтрофіли фагоцитують пошкоджені клітини власного організму, секретують бактерицидні речовини і сприяють регенерації пошкоджених тканин [210]. Лабораторний тест з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) характеризує активність НАДФН – оксидазну систему нейтрофілів. Для оцінки активності оксидазної системи нейтрофілів визначають спонтанний рівень, тобто їх стан яке характерно для організму в момент визначення і індукований зімозаном, тобто потенційно можливий рівень активності [15].

*Таблиця 3.5*

**Показники фагоцитозу після циклічного режиму годування  
молодих та старих щурів(n=10)**

Індикатор фагоцитозу	Група тварин				
	К	П1	В1	П2	В2
3-місячні (фч)	2.76 ± 0.28	2.56 ± 0.13	2.08 ± 0.44	2.15 ± 0.07	2.26 ± 0.06
20-місячні (фч)	2.03 ± 0.10	2.37 ± 0.23	2.77 ± 0.51	2.60 ± 0.14	2.36 ± 0.08

Примітка: К - контрольна група; П1 - втрата маси тіла в першому циклі CFR; В1 - відновлення маси тіла в першому циклі, а П2 і В2, відповідно, у другому циклі ЦРК

Було виявлено, що в перший цикл втрати маси тіла, спонтанний рівень активності оксидазної системи нейтрофілів був збільшений в 2,5 рази в

порівнянні з контролем у молодих тварин і в 1,9 рази у старих тварин (Рис. 3.23). Після відновлення маси тіла в першому циклі, спонтанний рівень активність нейтрофілів збільшувався ще більшою мірою (в 4 рази в порівнянні з контролем / і не змінювався у старих тварин) (Рис. 3.23). У другому циклі втрати і відновлення маси тіла він залишався незмінним і був в 2,5 рази вище контрольного рівня у молодих, а у старих після першого циклу відновлення маси він не відрізнявся від контрольного рівня, тобто приходив в норму (Рис. 3.23).

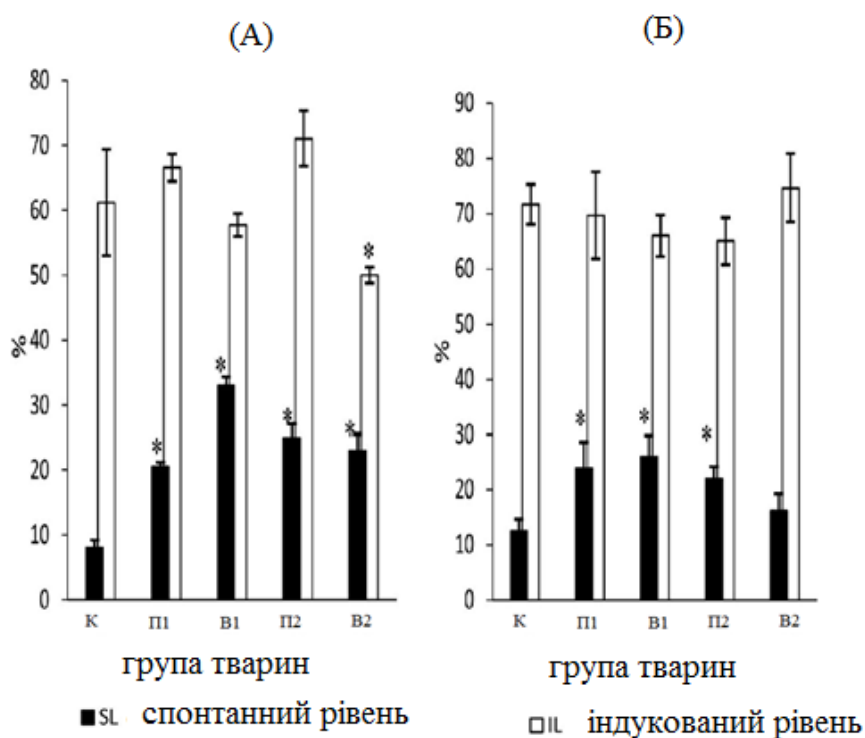


Рис. 3.23 Число нейтрофілів (%), позитивно забарвлених діформазаном (продукт окислення НБТ), оцінювалося *in vivo* (спонтанний рівень, SL) і кількість нейтрофілів, позитивно забарвлених діформазаном після стимульованих зімозаніном нейтрофілів *in vitro* (індукований рівень, IL) молодих А) і старих (Б) тварин. К, П1, В1, П2 і В2 - групи, як показано на Рис. 3.19

Отже, активність HADFH – оксидазної системи нейтрофілів реагувала на ЦРК і це проявлялася більшою мірою у молодих тварин у порівнянні зі старими тваринами.

Підвищення активності оксидазної системи після переведення тварин на ЦРК не приводило до вичерпання їх «резерву». Про це свідчать дані по активності цієї системи після активації їх зімозаном у системі *in vitro*.

Було виявлено, що в контролі зімозан збільшував активність HADFH у нейтрофілах в 7,6 разів у порівнянні зі спонтанним рівнем у молодих і в 5,7 разів у старих тварин (Рис. 3.23).

У разі втрати і відновлення маси тіла ефект стимуляції нейтрофілів зімозаном був практично однаковим у всіх досліджених варіантах і вікових групах (Рис. 3.23).

Отже, значна втрата і відновлення маси тіла експериментальних тварин незначно впливали на показники фагоцитарної активності клітинної ланки імунітету, і вони залишалися стабільними, на тлі виражених змін маси тіла, маси печінки і прояву оксидативного стресу. ЦРК супроводжувався активацією оксидазної системи нейтрофілів у молодих і старих тварин при цьому потенційний резерв їх активності залишився високим і не залежить від віку тварин.

Таким чином, необхідно відзначити, що циклічний режим годування, який супроводжувався збільшенням тривалості життя в експерименті, також супроводжувався проявами окислювального стресу як у молодих, так і у старих тварин. Найбільші прояви окислювального стресу були у першому циклі. У другому циклі втрати та відновлення маси тіла прояви окислювального стресу були менш виражені у порівнянні з першим циклом. Ці результати вказують на те, що у випадку ЦРГ, як і при гормезисі до сірчаноокислої міді, формувалася метаболічна пам'ять, яка визначає вибір стресової метаболічної адаптації [45, 46, 48, 49, 50].

Старі тварини незначно відрізнялися від молодих за реакцією про-антиоксидатної системи та клітинного імунітету на циклічний режим годування.

### **3. 4 Обговорення результатів**

Як було зазначено, сучасна парадигма геронтології полягає в тому, що у старих тварин зменшується (втрачається) здатність адаптуватися до негативних факторів середовища. Як правило, це супроводжується збільшенням захворюваності, втратою стійкості до різноманітних інфекцій, зниженням регенеративної активності, втратою працездатності та фізичної витривалості.

Деякі фахівці вважають, що старіння - це хвороба регуляції, яка супроводжується обмеженням адаптивних можливостей організму [2, 24, 25, 43].

Разом з тим, однією із фундаментальних властивостей всіх живих систем є їхня здатність адаптуватися до ендогенних і екзогенних факторів, які безперервно змінюються. Така властивість живих систем заснована на їх здатності до авторегуляції, збереженні гомеостазу і проявляється на всіх рівнях біологічної організації: від молекулярного до популяційного. Виходячи з цього, як і раніше залишається без відповіді центральне питання геронтології - чому у старих тварин має місце порушення систем регуляції процесів адаптації. Чи можна усунути ці вікові зміни і як цього досягти?

Результати наших досліджень дозволили сформулювати деякі важливих в цьому відношенні положення. Наприклад, твердження про те, що зі збільшенням віку знижується здатність до адаптації до екстремальних умов не завжди обґрунтована і строго доведена.

Так, дослідники не звертали увагу на той факт, що зі збільшенням віку нелінійно змінюється маса органів і маса тіла. Після досягнення дорослого стану маса тіла збільшується за рахунок накопичення жиру і кісткової



тканини. При цьому маса печінки змінювалася повільніше, і в результаті відношення маси печінки до маси тіла з віком достовірно і значно зменшувалася. Але так як при випробуванні ксенобіотиків, у тому числі лікарських препаратів, їх дозу розраховували на одиницю маси тіла, то в результаті такого підходу старі тварини отримують набагато більшу дозу і «показують» меншу стійкість до дії чужерідних речовин. Цим фактом можна пояснити те, що в США від передозування медичних препаратів щороку помирає 300 тис. старих людей (дані по інших країнах відсутні). Як відомо, доклінічні випробування нових медичних препаратів проводять на молодих тваринах, при цьому не враховується не тільки дозова залежність для різних вікових груп, але і особливості фармакокінетики медичних препаратів у старих людей. Як відомо, швидкість метаболізму ксенобіотиків, яка здійснюється в ЕПР клітин печінки, залежить від віку тварин [24]. І ця залежність не є наслідком віку, а визначається функціональною характеристикою печінки. На функціональну характеристику печінки впливають різні чинники: лікарські препарати, вірусні інфекції та інше.

Що стосується зниження здатності у старих тварин здійснювати фізичну роботу, яка є, здавалося би, незаперечним фактом, тут також є певні особливості.

Вік-залежна втрата м'язової діяльності може бути пов'язана з адаптацією старих тварин до малорухливого способу життя. Як було показано в цій роботі, якщо старі тварини мали регулярні фізичні навантаження в тесті плавання з вантажами, то вони не поступалися або перевершували молодих тварин за здатністю здійснювати роботу. Здатність збільшувати працездатність в старості була показана в нашій лабораторії також в тесті за часом бігу в тредбані. Ці дані дозволяють зробити висновок, що втрата старими тваринами здатності здійснювати роботу також може бути наслідком адаптації до малорухливого способу життя.

Старі тварини зберігали здатність адаптуватися і до токсичних доз сірчаної кислоти. Більш того, мідь-зв'язуючі білки, які відіграють важливу

роль у формуванні гормезису, у старих тварин навіть перевершують таку молодих тварин.

Отже, описані ефекти вікового зниження здатності адаптуватися до цілого ряду чинників може пояснюватися не стільки втратою зі збільшенням віку здатності до адаптації, а швидше за все це пов'язано з фізіолого-біохімічними особливостями старого організму, що може призводити до зміни стратегій адаптацій.

У зв'язку з цим необхідно дослідити механізми, які зумовлюють адаптацію до екстремальних факторів середовища. Вдалою моделлю для цього може бути адаптація до такого поширеного токсиканту як сірчанокислі міді. Було показано, що багаторазові послідовні введення сірчанокиислої міді формують стійкість тварин до такої токсичної дії. Адаптація до іонів міді характеризувалася формуванням гормезису.

Як зазначалося, прояви гормезису описано для малих доз радіації, хімічних сполук, в тому числі іонів металів, тобто це явище є загальнобіологічним. Деякі фахівці вважають, що збільшення тривалості життя також пов'язане з гормезисом. Або іншими словами, старіння може бути новим рівнем пристосування до середовища за рахунок розвитку компенсації до несприятливих змін [9, 24, 25]. На розвиток компенсаторних ефектів впливає метаболічна пам'ять, яка формується в процесі адаптації [52].

Результати наших досліджень також свідчать про формування метаболічної пам'яті (компенсаторні ефекти) до довготривалих чинників, яка забезпечує адаптацію до екстремальних впливів. Разом з тим, така метаболічна пам'ять поряд з її адаптивною спрямованістю надає побічні ефекти або формує так звані хибні кола метаболізму. Такі хибні кола метаболізму звужують варіабельність метаболічних варіантів відповіді на наступні дії і збільшують ймовірність виникнення різноманітних патологій.

Прикладом цього може служити комплекс метаболічних змін, що відбуваються у молодих і старих тварин у відповідь на багаторазові послідовні введення тваринам сірчанокиислої міді.

Слід зазначити, що формування резистентності до летальної дози сірчаноокислої міді залежить від кількості доз токсикантів, які попередньо вводяться, і в цьому відношенні існує оптимальна кількість для формування подальшої стійкості. Резистентність до летальної дози збільшувалася від 1 до 3 послідовних введенень малих доз, а збільшення попередніх введенень більше 3-х супроводжувалося втратою резистентності до летальної дози цього токсиканту. Такий U-образний ефект пояснюється тим, що акумуляція іонів міді перевершувала швидкість її виведення з організму і такий «надлишок» токсичних іонів зв'язувався не тільки зі специфічними мідь-зв'язуючими білками, але і неспецифічно з макромолекулами, в тому числі і з компонентами клітинних ядер, що приводило до загибелі клітин і, ймовірно, індукції патологій і загибелі тварин.

Як відомо, центральну роль у формуванні гормезису до іонів міді грає велика група мідь-зв'язуючих білків. До мідь-зв'язуючих білків належать церулоплазмін, металотіонеїни і інші білки. У нашій роботі було показано, що білки з молекулярною масою близькою до 12 кДа специфічно зв'язували досить велику кількість міді. Важливо відзначити те, що якщо вводили малі дози сірчаноокислої міді з інтервалом 30 днів, то здатність мідь-зв'язуючих білків зв'язувати мідь збільшується у порівнянні з першою серією введенень малих доз, і це виражено більшою мірою для старих тварин. Ці результати можуть вказувати на те, що білки з ММ 12 кДа «здатні» збільшувати ступінь зв'язування іонів міді. Це може пояснюватися їхніми конформаційними змінами. Те, що мідь-зв'язуючі білки у старих тварин пов'язують більше міді, ніж у молодих свідчить про те, що внутрішньоклітинний характер розподілу у них відрізняється від молодих, і вони використовують іншу стратегію адаптації до цього токсиканту, ніж молоді тварини.

Важливо відзначити, що індукована резистентність до сірчаноокислої міді, яка оцінюється як позитивна реакція, тому що забезпечує виживання в таких екстремальних умовах, має негативні наслідки. На тлі резистентності,

що формується, розвивається фіброз печінки. Фіброз печінки є наслідком дії іонів міді.

При введенні сірчаноокислої міді у відносно великих дозах, іони міді зв'язуються не тільки зі специфічними білками, але й з іншими функціонально важливими макромолекулами, що призводить до їх інактивації та деградації частини клітин. Як було показано в нашій роботі це приводить до активації макрофагів у вогнищі запалення і на цьому тлі розвивається окислювальний стрес. Прояви окислювального стресу є відповіддю на пошкоджуючу дію іонів міді. В цих умовах можна говорити про пригнічення клітинної ланки імунітету. Отже, іони міді поряд з індукцією гормезису, як наслідок, індукували комплекс запальних реакцій, а вони, в свою чергу, запускали комплекс реакцій, які формують фіброз печінки. З цих позицій розвиток фіброзу печінки також є адаптивною відповіддю на токсичну дію, тому що він забезпечує виживання організму в таких екстремальних умовах. Сутність проблеми – це вибір організмом подальшої стратегії адаптації.

Як зазначалося в розділі 2 на тлі фіброзу в подальшому можуть бути реалізовані 3 різні стратегії розвитку подій, такі як: активація металопротеїназ, деградація сполучної тканини, проліферація гепатоцитів і повне відновлення функції печінки. Також можуть зберігатися метаболічні зміни, які відбулися, та розвиватися або проявлятися хронічний фіброз (Рис. 3.17).

Нажаль, що саме визначає вибір стратегії адаптації поки залишається не зрозумілим. Але отримані результати вказують на те, що вік, а точніше та метаболічна пам'ять, яка сформувалася в процесі життєдіяльності, буде визначати вибір тієї чи іншої стратегії подальших адаптацій до екстремальних факторів, які діятимуть в подальшому.

Ще однією експериментальною моделлю в дослідженнях щодо метаболічної пам'яті у відповідь на повторні, багаторазові впливи є розроблена в нашій лабораторії модель циклічного режиму годування (ЦРГ).

В нашій роботі було показано, що втрата маси тіла тварин до 30 % від початкової маси тіла супроводжувалася вираженими змінами в показниках прооксидантно-антиоксидантної системи. Однак, на відміну від дії сірчаноокислої міді, коли спостерігалось збільшення вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій на тлі зменшення активності антиоксидантних ферментів, при ЦРГ спостерігали збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів на тлі збільшення активності антиоксидантних ферментів. Ці результати свідчать про різні механізми формування стресу і, ймовірно, різні регуляторні ефекти таких змін. Хоча для вирішення регуляторної ролі редокс-системи онтогенезу потрібні додаткові дослідження, можна стверджувати, що вони виконують важливу регуляторну роль в механізмах адаптації та виборі стратегії адаптації.

Поряд з цим важливим результатом цього розділу є демонстрація формування метаболічної пам'яті навіть до такого глобального чинника як харчування. Було показано, що відповідь практично всіх біохімічних показників, які були досліджені, на повторну втрату маси тіла істотно відрізнялася від відповіді в першому циклі. Більш того, ступінь вираженості відповіді у молодих і старих тварин розрізнялася. Такі вік-залежні відмінності можуть вказувати на те, що відповідь біологічної системи на екзогенні впливи залежить від попередньої метаболічної пам'яті, яка сформувалася в онтогенезі, а вона, в свою чергу, впливатиме на подальший вибір стратегій подальших адаптивних відповідей. Виходячи з цього, вік-залежна відповідь на зовнішні впливи залежить не від віку, а від метаболічної і, ймовірно, епігенетичної пам'яті, яка «накопичилася».

### **Висновки до розділу 3**

Циклічний режим годування, який забезпечував збільшення тривалості життя тварин, супроводжується двократнім збільшенням вмісту гідроперекисей ліпідів в мітохондріях. На тлі збільшення

вмісту гідроперекисів ліпідів мало місце збільшення активності глутатіонпероксидази. Активність глутатіонпероксидази не зменшується, як в разі фіброзу печінки, а навпаки, збільшується. Ці результати можуть вказувати на те що при фіброзі проявляється окислювальний стрес, а при ЦРК мало місце зміни регуляторних ефектів редокс-системи організму. Втрата і відновлення маси тіла експериментальних тварин при циклічному режимі годування приводила до прояву метаболічної пам'яті до режиму годування тварин.

Результати досліджень даного підрозділу наведено в таких публікаціях здобувача [1, 23, 45, 46, 48, 49, 50, 123].

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішена актуальна наукова задача – 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 імпринтінгу. Індукована малими дозами сірчаноокислої міді резистентність розвивається на тлі окислювального 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 введенень малих доз токсиканту. Ця залежність мала U-образний характер з максимумом після трьох попередніх введенень малих доз. Гормезис, що формувався, зберігався не менше 45 діб після останнього введення малих доз сірчаноокислої міді.

2. Старі тварини поступалися молодим тваринам за здібністю 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 молекулярної масою близькою 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'язуючій здатності МЗБ і це проявлялося в більшій мірі у старих тварин.

4. Введення іонів міді тваринам в адаптивних дозах 1 мг/100 г маси тіла (3-х кратне введення з інтервалом 48 годин), супроводжувалося інгібуванням антиоксидантних ферментів і це проявлялося в найбільшій мірі для глутатіонпероксидази. Це призводило до збільшення гідроперекисей ліпідів у мітохондріях та мембранах ендоплазматичного ретикулуму, та сироватки крові, при цьому основні біохімічні показники (активність АлТ та АсТ, вміст альбуміну та холестерину та ін.) залишались у межах норми.

5. Індукція резистентності до токсичних доз сірчаноокислої міді супроводжувалася формуванням окислювального стресу та розвитком фіброзу печінки, який мав вік-залежний характер. На початкових стадіях розвитку фіброзу печінки в найбільшій мірі змінювалися показники про-антиоксидантної системи, для якої було характерно зміщення в 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 гідроперекисів ліпідів в мітохондріях, мембрані ендоплазматичного ретикулума та сировотці крові на тлі збільшення, а не зменшення як при окислювальному стресі, активності глутатіонпероксидази.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аль Бегаї М. А. Ю. 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.
2. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург, 2008. 481 с.
3. Ашмарин И. П., Каразеева Е. П., Лелекова Т. В. Проблемы эффективности ультрамалых доз и концепций эндогенных и экзогенных веществ. Нейроиммунология, эпидемиология и интерферонология рассеянного склероза. Санкт-Петербург, 1996. 34 с.
4. Богатыренко Т. Н., Редкозубова Г. П., Конрадов А. А. Влияние органических пероксидов на рост культивируемых клеток высших растений // Биофизика. 1989. Т. 34, № 26. С. 327–329.
5. Божков А. И. К вопросу о факторах, влияющих на токсичность сернокислой меди для *Dunaliella viridis* Teod. // Альгология. 1997. Т. 7, № 3. С. 251–260.
6. Божков А. И. Низкокалорийная диета как модель увеличения продолжительности жизни и исследования механизмов старения // Успехи геронтологии. 2001. № 8. С. 89–99.
7. Божков А. И. Три дозозависимые стадии действия ионов меди на функциональную активность биологических систем // Биохимия. 1997. Т. 60, № 2. С. 176–186.
8. Божков А. И., Длубовская В. Л. Липидный обмен и структурно-функциональные особенности мембран эндоплазматического ретикулума регенерирующей печени крыс // Биохимия. 1992. Т. 57, № 1. С. 8–15.

9. Божков А. И., Длубовская В. Л., Линник М. А. Возрастные особенности адаптации животных к серноокислой меди // Доп. НАН України. 1998. № 5. С. 153–157.
10. Божков А. И., Малеев В. А. Снижается ли способность печени к регенерации с возрастом? Динамика функциональной активности митохондрий в процессе регенерации печени // Успехи геронтологии. 2004. № 13. С. 58–65.
11. Божков А. И., Сидоров В. И., Длубовская В. Л., Шевцова М. Я., Суоров Ю. Н. Проявление эффекта импринтинга в паттерне внутриклеточного распределения ионов меди в печени после многократных введений серноокислой меди // Биомед. химия. 2010. Т. 56, № 2. С. 195–208.
12. Божков А. И., Голтвянский А. В. Функциональная гетерогенность клеток *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) и чувствительность к действию серноокислой меди // Альгология. 2000. Т. 10, № 1. С. 22–31.
13. Божков А. И., Никитченко Ю. В., Сидоров В. И., Кургузова Н. И., Климова Е. М. Гормезисная модель метаболической памяти и возможности регуляции темпов старения // Проблемы старения и долголетия. 2012. Т. 21, № 3. С. 245–254.
14. Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Худяков И. В. Воздействие химических агентов в сверхмалых дозах на биологические объекты // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1990. № 2. С. 184–193.
15. Виксман М. Е., Маянский А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия : метод. рекомендации. Казань, 1979. 11 с.
16. Волошин-Гапонов И. К. Состояние печени у пациентов с церебральными формами болезни Вильсона —Коновалова // Український медичний часопис. 2013. № 4. С. 158-161
17. Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А., Савостьянова О. А. Средние молекулы и уровень эндогенной интоксикации у реанимационных больных // Анест. и реан. 1985. № 1. С. 36–38.

18. Гарбузенко Д. В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при ее повреждении и их практическое значение // РЖГГК. 2008. Т. 18, № 6. С. 14-21.
19. Герасимьяк Г. Р., Розанов В. А., Шафран Л. М. Изучение влияния бис (п-трибутилолова) оксида на ГАМК-ергическую систему мозга *in vitro* // Укр. биохим. журн. 1994. Т. 66, № 2. С. 161–167.
20. Давыдов В. В., Божков А. И. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза (обзор литературы и собственных исследований) // Журнал НАМН України. 2014. Т. 20, № 1. С. 25–34.
21. Ковалева М. К., Мензянова Н. Г., Anshu Jain, Abhishek Yada., Flora S.J.S., Божков А. И. Эффект гормезиса у *Dunaliella viridis* Teodor. (Chlorophyta) под действием сернокислой меди // Альгология. 2011. Т. 21, № 3. С. 277–294.
22. Кузин А. М. Проблема малых доз и идея гормезиса в радиобиологии // Радиобиология. 1991. Т. 31, № 1. С. 16–21.
23. 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., Київ, 2016. Т. 25, № 2. С. 345.
24. Кытикова О. Ю., Новгородцев А. Д., Гвозденко Т. А. Медицинский озон—как редокс-окислительный горметин в гериатрии // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. № 1(55). Р. 26–30.
25. Магомедов К. К., Бакуев М. М., Шахбанов Р. К., Арсаханова Г. А. Состояние антиоксидантных белков плазмы крови в динамике развития синдрома длительного сдавления // Известия ДГПУ. Естественные и точные науки. 2012. №1. С. 4–8.

26. Матейкович П. А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток // Международный научный журнал. Биологические науки. 2016. Т. 3, № 6. С. 21–24.
27. Нурмухамбетов А. Н. Патогенетические основы техногенных поражений систем организма // Актуальные вопросы патофизиологии : сб. науч. тр. международной научно-практической конференции. Алматы, 2008. С. 10-19.
28. Пыхтеева Е. Г. Металлопротеины: биологические функции. Роль металлопротеиназ в транспорте металлов в организме // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2009. № 5. С. 44–56.
29. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / под ред. С. Н. Лопач, А. В. Чубенко. Киев : МОРИОН, 2000. 320 с.
30. Эмануэль Н. М., Липчина Л. П. Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов // Докл. АН СССР. 1958. Т. 121. С. 141–144.
31. Andrews S. C., Robinson A. K., Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis // PEMS Microbiol. Rev. 2003. N 27. P. 215–237.
32. Apfeld J., Kenyon C. Cell nonautonomy of *C.elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and life span // Cell 95. 1998. P. 199-210.
33. Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano PS, Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulinlike signals to lifespan in *C. elegans* // Genes and Develop. 2004. Vol. 18. P. 3004–3009.
34. Arguello J., Raimunda D., Padilla-Benavides T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2013. N 3. P. 73.
35. Arumugam T. V., Gleichmann M., Tang S. C., Mattson M. P. Hormesis/preconditioning mechanisms, the nervous system and aging // Age Res. Rev. 2006. N 5. P. 165–178.
36. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. 1980. Vol. 15. P. 137-140.

37. Back P., Braeckman B., Matthijssens F. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012. N 10. P. 1–14.
38. Bakka A., Johnsen A., Endresen L. Radioresistance in cells with high content of metallothionein // *Cellular and molecular life sciences*. 1982. Vol. 38, N. 3. P. 381 – 383.
39. Balaban R., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants and aging // *Cell*. 2005. Vol. 120. P. 483–495.
40. Barja G. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts // *Antiox. & Redox Signal*. 2013. Vol. 19, N 12. P. 1420–1445.
41. Bashir K., Rasheed S., Kobayashi T., Seki M., Nishizawa N. K. Regulating subcellular metal homeostasis: the key to crop improvement // *Front. Plant Sci*. 2016. N 7. P. 1192 – 1196.
42. Baumeister R., Schaflitzel E., Hertweck M. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity // *J. Endocrinol*. 2006. Vol. 190. P. 191–202.
43. Bitterman K. J., Medvedik O., Sinclair D. A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability and heterochromatin // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2003. Vol. 67, N 3. P. 376–399.
44. Boxenbaum H., Neafsey P. J., Fournier D. J. Hormesis, Gompertz functions, and risk assessment // *Drug Metab. Rev*. 1988. Vol. 19. P. 195–229.
45. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Al Begai M. A. Y., Alsardia M. M. A., Kurguzova N. I. Low-molecular weight cow colostrum components in functional nutrition // *Journal of Nutritional Therapeutics*. 2017. Vol. 6. P. 11–17.
46. Bozhkov A. I., Klimova O. M., Nikitchenko Yu. V., Kurguzova N. I., Linkevych O. S., Lebid K. M., Protsenko O. S., Remneva N. A., Al-Bahadly 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.

47. Bozhkov A. I., Kurguzova N.I., Krivoruchko T. V., Lebed' E. N., Mikhailets A.O., Danladi S.D., Bozhkov A. A., Girich M.S. A cyclic feeding regime: A new model in experimental gerontology // *Advances in Gerontology*. 2014. Vol. 4. P. 251–257.
48. Bozhkov A. I., Linkevych O. S., Ivanov E. G., Klimova O. M., Al Begai M. A. Y. Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis // *International Journal of Current Research*. 2016. Vol. 8, N 12. P. 44129–44137
49. 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.
50. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Lebed' K. N., Linkevych O. S., Kurguzova N. I., Klimova O. 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.
51. Bozhkov A., Padalko V., Dlubovskaya V., Menzyanova N. Resistance to heavy metal toxicity in organisms under chronic exposure // *Ind. J. Exp. Biol*. 2010. Vol. 48. P. 679–696.
52. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V. Thermogenesis and longevity in mammals. Thyroxin model of accelerated aging // *Experimental Gerontology*. 2014. N 60. P. 173–182.
53. Calabrese E. J., Baldwin L. A. Defining hormesis // *Hum. Exp. Toxicol*. 2002. N 21. P. 91–97.
54. Calabrese E. J., Baldwin L. A. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis // *Hum. Exp. Toxicol*. 2000. N 19. P. 41–75.

55. Calabrese E. J., Baldwin L. A. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature // *Toxicol. Sci.* 2001. N 62. P. 330–338.

56. Calabrese E. J., Baldwin L. A. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology // *Toxicol. Sci.* 2003. N 71. P. 246–250.

57. Calabrese E. J., Blain R. B. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature // *Reg. Tox. Pharmacol.* 2011. N 61. P. 73–81.

58. Calabrese E. J., Bachmann K. A., Bailer A. J., Bolger P. M., Borak J., Cai L., Cedergreen N., Cherian M. G., Chiueh C. C., Clarkson T. W., Cook R. R., Diamond D. M., Doolittle D. J., Dorato M. A., Duke S. O., Feinendegen L., Gardner D. E., Hart R. W., Hastings K. L., Hayes A. W., Hoffmann G. R., Ives J. A., Jaworowski Z., Johnson T. E., Jonas W. B., Kaminski N. E., Keller J. G., Klaunig J. E., Knudsen T. B., Kozumbo W. J., Lettieri T., Liu S. Z., Maisseu A., Maynard K. I., Masoro E. J., McClellan R. O., Mehendale H. M., Mothersill C., Newlin D. B., Nigg H. N., Oehme F. W., Phalen R. F., Philbert M. A., Rattan S. I., Riviere J. E., Rodricks J., Sapolsky R. M., Scott B. R., Seymour C., Sinclair D. A., Smith-Sonneborn J., Snow E. T., Spear L., Stevenson D. E., Thomas Y., Tubiana M., Williams G. M., Mattson M. P. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. N 222. P. 122–128.

59. Calabrese E. J., Mattson M. P. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity // *J. Cell Comm. Signal.* 2011. N 5. P. 25–38.

60. Calabrese E. J., Stanek E. J., Nascarella M. A., Hoffmann G. R. Hormesis predicts low-dose responses better than threshold models // *Int. J. Toxicol.* 2008. N 27. P. 369–378.

61. Calabrese E. J., Stanek E. J., Nascarella M. A. Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships // *Mutat. Res.* 2011. N 726. P. 91–97.

62. Calabrese E. J., Staudenmayer J. W., Stanek E. J, Hoffmann G. R. Hormesis outperforms threshold model in National Cancer Institute antitumor drug screening database // *Toxicol. Sci.* 2006. N 94. P. 368–378.
63. Calabrese E. J. Biphasic dose responses in biology, toxicology and medicine: Accounting for their generalizability and quantitative features // *Environ. Poll.* 2013. N 182. P. 452–460.
64. Calabrese E. J. Hormetic mechanisms // *Crit. Rev. Toxicol.* 2013. Vol. 43. P. 580–606.
65. Calabrese E. J. Preconditioning is hormesis. Part I: documentation, dose-response features and mechanistic foundations // *Pharm. Res.* 2016. N 110. P. 242–264.
66. Calabrese E. J. Preconditioning is hormesis. Part II: how the conditioning dose mediates protection. Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks // *Pharm. Res.* 2016. N 110. P. 265–275.
67. Calabrese T. I., McCarthy M., Kenyon E. The occurrence of chemical hormesis // *Health Phys.* 1987. Vol. 52, N 5. P. 531–542.
68. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A. T., Calabrese E. J, Mattson M. P. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. N 13. P. 1763–1811.
69. Cao S. X., Dhahbi J. M., Mote P. L., Spindler S. R. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, N 19. P. 10630–10635.
70. Carelli G., Iavicoli I. Defining hormesis: the necessary tool to clarify experimentally the low dose-response relationship // *Hum. Exp. Toxicol.* 2002. N 21. P. 103–104.
71. Carlberg I., Mannerviek B. Glutathione reductase levels in rat brain // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 5475–5480.



72. Carpena E., Andreani G., Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics // *Journal of trace elements in medicine and biology*. 2007. Vol. 21. P. 35–39.
73. Chapman P. M. Defining hormesis: comments on Calabrese and Baldwin // *Hum. Exp. Toxicol.* 2002. N 21. P. 99–101.
74. Cheng C. L., Gao T. Q., Wang Z., Li D. D. Role of insulin/insulinlike growth factor 1 signaling pathway in longevity // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 11, N 13. P. 1891–1895.
75. Cohen H. Y., Miller C., Bitterman K. J., Wall N. R., Hekking .B., Kessler B., Howitz K. T., Gorospe M., de Cabo R., Sinclair D. A. Calorie 325 restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase // *Science*. 2004. Vol. 305. P. 390–392.
76. Cohen M. V., Downey J. M. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning. historical perspective and lessons for the future // *Br. J. Pharm.* 2015. N 172. P. 1913–1932.
77. Coleman P., O'Hanlon A. Ageing and adaptation. *Handbook of the Clinical Psychology of Ageing*, Second Edition. *Clinical Psychology. Handbook of the Clinical Psychology of Ageing*, 2nd Edition. 2008. 658 p.
78. Dalene H. van., Volsloo A., Nikinmaa M. Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquatic toxicology*. 2004. Vol. 69, N 3. P. 271–280.
79. Dawson C. A., Horvath S. M. Swimming in small laboratory animals // *Medicine and Science in Sports*. 1970. Vol. 2, N 2. P. 51–78.
80. Dean P. J. Radical-free biology of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008. Vol. 295, N 4. P. 849–868.
81. Dezfulian C., Garrett M., Gonzalez N. Clinical application of preconditioning and postconditioning to achieve neuroprotection // *Transl. Stroke Res.* 2013. N 4. P. 19–24.

82. Doonan R., McElwee J. J., Matthijssens F., Walker G. A., Houthoofd K., Back P., Matscheski A., Vanfleteren J. R., Gems D. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans* // *Genes*. 2008. P. 3236–3241.
83. Calabrese E. J., Baldwin L. A. The Frequency of U-Shaped Dose Responses in the Toxicological Literature. *Children's Mercy Hospital // Toxicol. Sci.* 2001 N 62(2). P. 330–338.
84. Eun J. Won., Rhee J. S., Ra K., Kim K.T., Au D.W., Shin K.H., Lee J.S. Molecular cloning and expression of novel Metallothionein gene in the polychaete. *Perinereis nuntia* exposed to metals // *Environmental science and pollution research*. 2011. Vol. 19, N 7. P. 2606–2618.
85. Fabrizio P., Gattazzo C., Battistella L., Wei M., Cheng C., McGrew K., Longo V. D. Sir2 blocks extreme life-span extension // *Cell*. 2005. Vol. 123. P. 655–667.
86. Fabrizio P., Li L., Longo V. Analysis of gene expression profile in yeast aging chronologically // *Mech. Ageing Develop.* 2005. Vol. 126, N 1. P. 11–16.
87. Fedarko N. S. Theories and Mechanisms of Aging // *Geriatric Anesthesiology*. 2017. P. 19–25.
88. Frankel N., Davis G. K., Vargas D., Wang S., Payre F., Stern D. L. Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers // *Nature*. 2010. Vol. 466. P. 490–493.
89. Freisinger E., Vasak M. Cadmium and metallothioneins // *Met. Ions Life Sci.* 2013. Vol. 11. P. 339–371.
90. Fulda S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells // *Cancer Biol. Ther.* 2013. Vol. 14. P. 999–1004.
91. Futakawa N., Kondoh M., Ueda S., Higashimoto M., Takiguchi M., Suzuki S., Sato M. Involvement of oxidative stress in the synthesis of

metallothionein induced by mitochondrial inhibitors // Biol. Pharm. Bull. 2006. Vol. 29. P 2016–2020.

92. Gallogly M., Shelton M. D., Qanungo S., Harish V. P., Starke D. W., Hoppel C. L., Lesnefsky E. J., Miele J. J. Glutaredoxin regulates apoptosis in cardiomyocytes via NF $\kappa$ B targets Bcl-2 and Bcl-xL: Implications for cardiac aging // Antioxid. Redox Signal. 2010. Vol. 12(12). P. 1339–1353.

93. Gems D., Doonan R. Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong? // Cell Cycle. 2009. Vol. 8. P. 1681–1687.

94. Ghoshal K., Majumder S., Zhiling Li., Tamy M. B., Samson T. J. Transcriptional induction of metallothionein and II genes in the livers of Cu Zn-superoxide dismutase knockout mice // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999. Vol. 264, N 3. P. 735–742.

95. Gladyshev V. N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory // Antioxid. Redox Signal. 2014. Vol. 20, N 4. P. 727–731.

96. Gomez – Garcia P., Gaudecker H., Lindeboom M. Health, disability and work: patterns for the working age population // International Tax and Public Finance. 2011. N 18. P. 146–165.

97. Habeebu S. S., Liu J., Liu Y. Klaassen C. D. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium // Toxicol. Sci. 2002. Vol. 55. P. 223–232.

98. Hakim M., Harris R., Garland L., Cordova C.A., Mikhael D. M., Sherry Chow H. H. Gender difference in systemic oxidative stress and antioxidant capacity in current and former heavy smokers // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012. Vol. 21(12). P. 2193–2200.

99. Halliwell B., Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford. 2007. 851 p.

100. Hansen M., Hsu A., Dillin A., Kenyon C. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen // *PLoS Biol.* 2005. Vol. 1, N 1. P. 119–128.
101. Harbort C. J., Soeiro-Pereira P. V., von Bernuth H., Kaindl A. M., Costa-Carvalho B. T., Condino-Neto A., Reichenbach J., Roesler J., Zychlinsky A., Amulic B. Neutrophil oxidative burst activates ATM to regulate cytokine production and apoptosis // *Blood.* 2015. Vol. 126, N 26. P. 2842–2851.
102. Harman D. Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry // *J. Gerontol.* 1956. Vol. 11. P. 298–300.
103. Heinrich R., Rapoport S. M., Rapoport T. A. Metabolic regulation and mathematical models // *Progress in biophysics and molecular biology.* 1978. Vol. 32. P. 1–82.
104. Hider R. C., Kong X. Met. Iron: effect of overload and deficiency // *Ions Life Sci.* 2013. P. 229–294.
105. Hijova E. Metallothioneins and zinc: their functions and interactions // *Bratisl Lec. Listy.* 2004. Vol. 105, N 5-6. P. 230–234.
106. Jarv J. A model of nonexclusive binding of agonist and antagonist on G-protein coupled receptors // *J. Theor. Biol.* 1995. N 175. P. 577–582.
107. Kaeberlein M., Kirkland K., Fields S., Kennedy B. Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background // *Mech. Ageing Develop.* 2005. Vol. 126. P. 491–504.
108. Kamatch S. A., Narayan K. A. Interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  with endoplasmatic reticulum of rat liver: a standart procedure for the isolation of microsomes // *Anal. Biochem.* 1972. Vol. 48. P. 53–61.
109. Kang J. J. Metallothionein redox cycle and function // *Exp. Biol. Med.* 2006. Vol. 231, N 9. P. 1459–1467.
110. Kang Y. J., Chen Y., Yu A., Voss-McCowan M., Epstein P. N. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. P. 1501–1506.

111. Kawarabayashi T., Younkin L. H., Saido T. C. Shoji M., Ashe K. H., Younkin S. G. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *Journal of neuroscience*. 2001. Vol. 21, N 2. P. 372–381.
112. Kayo T., Allison D. B., Weindruch R., Prolla T. A. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, N 9. P. 5093–5098.
113. Kelly E. J., Quaife C. J., Froelick G. J., Palmiter R. D. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice // *J. Nutr.* 1996. Vol. 126. P. 1782–1790.
114. Kenneth B. B., Ames B. N. The Free Radical // *Theory of Aging Matures*. 1998. N 2. P. 547–581.
115. Kirkwood T. B., Kowald A. The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support // *Bioessays*. 2012. Vol. 34. P. 692–700.
116. Kirkwood T. B., Austad S. N. Why do we age? // *Nature*. 2000. Vol. 408, N 9. P. 233-238.
117. Kitchin K. T. Defining, explaining and understanding hormesis // *Hum. Exp.* 2002. N 21. P. 105–106.
118. Kojima I., Nanaka T., Inagi R., Nishi H., Aburatani H., Kato H., Miyata T., Fujita T., Nangaku M. Metallothionein is upregulated by hypoxia and stabilizes hypoxia-inducible factor in the kidney // *Kidney Int.* 2009. Vol. 75, N 3. P. 268–277.
119. Koltover V. K. Antioxidant biomedicine: from free radical chemistry to systems biology mechanisms // *Rus. Chem. Bull.* 2010. Vol. 59, N 1. P. 37–42.
120. Kondoh M., Inoue Y., Atagi S. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress // *Life science*. 2001. Vol. 69, N 18. P. 2137–2146.
121. Kujoth G. C., Hiona A., Pugh T. D. Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S. E., Hofer T., Seo A. Y., Sullivan R., Jobling W. A., Morrow J. D.,

Van Remmen H., Sedivy J. M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C., Prolla T. A. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging // *Science*. 2005. Vol. 309. P. 481–484.

122. Kunlin Jin. Modern biological theories of aging // *Aging Disease*. 2010. Vol. 1, N 2. P. 72–74.

123. Kurguzova N. I., Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Mohammad Ali Yousef Al Begai, Goltvyansky A. V., Mohammad Morshed Ayed Alsardia, Bozhkov A. A. Interconnection of antitoxic and antioxidant systems of the organism under the action of natural low molecular complex-fungidol // *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2015. Vol. 2, N. 6-1. P. 25–32.

124. Ladhar-achaabouni R., Machreki-Ajmi M., Hamza-Chaffai A. Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia) // *Environ. Monit. Assess.* 2012. Vol. 184, N 84. P. 2177–2192.

125. Lapointe J., Hekimi S. When a theory of aging ages badly // *Cell Mol. Life Sci.* 2009. Vol. 67. P. 1–8.

126. Lee C. K., Allison D. B., Brand J., Weindruch R., Prolla T. A. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, N 23. P. 14988–14993.

127. Lee C. K., Weindruch R., Prolla T. A. Gene-expression profile of the ageing brain in mice // *Nature Gene.* 2000. Vol. 25. P. 294–297.

128. Lee J., Jo D. G., Park D., Chung H. Y., Mattson M. P. Adaptive cellular stress pathways as therapeutic targets of dietary phytochemicals: focus on the nervous system // *Pharm. Rev.* 2014. N 66. P. 815–868.

129. Levy M. A., Tsai Y. H., Reaume A., Bray T. M. Cellular response of antioxidant metalloproteins in Cu/Zn SOD transgenic mice exposed to hyperoxia // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001. Vol. 281, N 1. P. 172–182.

130. Libert S., Zwiener J., Chu X., Vanvoorhies W., Roman G., Pletcher S. D. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors // *Science*. 2007. Vol. 315, N 5815. P. 1133–1137.
131. Lin Wang., Dawai C., Heng W., Zongping L. Effects of Lead and/or Cadmium on the expression of Metallothionein in the kidney of rats // *Biological trace element research*. 2009. Vol. 129, N 1-3. P. 190–199.
132. Litchfield J. J. T., Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1949. Vol. 96, N 2. P. 99–113.
133. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods // Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 2010. Vol. 4, N 8. P. 118–126.
134. Lowry O. B., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall B. J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *Biological Chemistry*. 1957. Vol. 93. P. 265-273.
135. Luo Y., Xu Y., Bao Q., Ding Z., Zhu C., Huang Z. X., Tan X. The molecular mechanism for human metallothionein-3 to protect against the neuronal cytotoxicity of A $\beta$ (1-42) with Cu ions // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2013. Vol. 18, N 1. P. 39–47.
136. Mair W., Piper M. D. W., Partridge L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila* // *PLoS Biol.* 2005. Vol. 3, N 7. P. 1–7.
137. Malavolta M., Basso A., Piacenza F., Giacconi R., Costarelli L., Pierpaoli S., Mocchegiani E. Survival study of metallothionein-1 transgenic mice and respective controls (C57BL/6J): influence of a zinc-enriched environment // *Rejuvenation Res.* 2012. Vol. 15, N 2. P. 140–143.
138. Marvin M., Bert L. V. A cadmium protein from equine kidney cortex // *Journal of American Chemical Society*. 1957. Vol. 79. P. 4813–4814.
139. Martin I., Grotewiel M. S. Oxidative damage and age-related functional declines // *Mech. Ageing Develop.* 2006. Vol. 127. P. 411–423.

140. Martinho A., Goncalves I., Santos C. R. Glucocorticoids regulate metallothionein-1/2 expression in rat choroid plexus: effects on apoptosis // *Mol. Cell Biochem.* 2013. Vol. 376, N 1-2. P. 41-51.
141. Mattson M. P., Son T. G., Camandola Simonetta. Viewpoint: mechanisms of action and therapeutic potential of neurohormetic phytochemicals // *Dose Response.* 2007. N 5. P. 174–186.
142. Mattson M. P., Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems // *J. Nutr. Biochem.* 2005. N 16. P. 129–137.
143. Mattson M. P. Challenging oneself intermittently to improve health: *Dose Response.* 2014. N 12. P. 600–618.
144. Mattson M. P. Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease // *Cell Metab.* 2012. N 16. P. 706–722.
145. Mattson M. P. Hormesis defined // *Age. Res. Rev.* 2008. N 7. P. 1–7.
146. Moonjoo K., Hee-Young K. The effects of metallothionein on the activity of enzymes involved in removal of reactive oxygen species // *Bulletin-Korean Chemical Society.* 2001. Vol. 22, N 4. P. 362–366.
147. Muniz-Junqueira M., da Silva-Filho V., Figueira Peçanha L., Tosta C. E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003. N 6. P. 1096–1102.
148. Murray C. E., Jennings R. B., Reimer K. A. Preconditioning with ischemia – a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* 1986. N 74. P. 1124–1136.
149. Nordberg M., Gunnar F. Nordberg. Metallothioneins: Historical development and overview // *Met. Ions Life. Sci.* 2009. Vol. 5. P. 1-29.
150. Ohkawa H., Ohahi H. N., Jodi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal Biochem.* 1979. Vol. 95. P. 351–358.



151. Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. Adaptive response of human-lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine // *Science*. 1984. N 223. P. 594–597.
152. Paglia D. E., Valentine W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // *J. Lab. Clin. Med.* 1967. Vol. 70(1). P. 158–169.
153. Partridge L., Gems D. Mechanisms of aging: public or private? // *Nature Reviews Genetics*. 2002. Vol. 3, N 3. P. 165–175.
154. Persky E. E., Nikitina N. A., Naglov A. V., Kot J. G. Age features of induction and synthesis of Intensity of certain processing steps of collagen in the connective tissue under the influence of mechanical loading // *Biologicheskii Vestnik*. 2006. Vol. 10. P. 126–129.
155. Pickrell J. A., Oehme F. W. Invited response to definition of hormesis // *Hum. Exp. Toxicol*. 2002. N 2. P. 107–109.
156. Piush K., Amit K. S., Hemant N., Navdeep R. Hydroxyproline: A hotential biochemical marker and its role in the pathogenesis of different diseases // *Curr. Protein Pept. Sci*. 2016. N 6. P. 596–602.
157. Pletcher S. D., Macdonald S. J., Marguerie R., Certa U., Stearns S. C., Goldstein D. B., Partridge L. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster* // *Curr. Biol*. 2002. Vol. 12. P. 712–723.
158. Pliska V. Models to explain dose-response relationships that exhibit a downturn phase // *TiPS*. 1994. N 15. P. 178–181.
159. Pryor W. A., Houk K. N., Foote C. S., Fukuto J. M., Ignarro L. J., Squadrito G. L., Davies K. J. Free radical biology and medicine: it's a gas, man // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2006. Vol. 291, N 3. P. 491–511.
160. Purdon P. L., Pavone K. J., Akeju O., Smith A. C., Sampson A. L., Lee J., Zhou D. W., Solt K., Brown E. N. The ageing brain: age-dependent changes in the electroencephalogram during propofol and sevoflurane general anaesthesia // *British journal of anaesthesia*. 2015. Vol. 115, N 1. P. 146–157.

161. Raefsky S. M., Mattson M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance // *Free Rad. Biol. Med.* 2017. N 102. P. 203–216.
162. Raghavachari N., Lou M. F. Evidence for the presence of thiol transferase in the lens// *Exp. Eye Res.* 1996. N 63. P. 433–441.
163. Ravin H. A. Rapid test for hepatolenticular degeneration // *Lancet.* 1956. Vol. 1. P. 7267 – 7271.
164. Richardson R. B. Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea // *AGING.* 2009. Vol. 1, N 11. P. 887–902.
165. Robertson A. D. I., Grutsch J. F. J. Biphasic responses, quantal signals and cellular behavior // *Theor. Biol.* 1987. Vol. 125, N 1. P. 41–60.
166. Rovati G. E., Nicosia S. An alternative model for bell-shaped concentration-response curves–reply // *TiPS.* 1994. N 15. P. 321–322.
167. Rozman K. K., Doull J. Scientific foundations of hormesis. Pt 2. Maturation, strengths, limitations, and possible applications in toxicology, pharmacology, and epidemiology // *Crit. Rev. Toxicol.* 2003. N 33. P. 451–462.
168. Saito T., Tezuka T., Konno R., Fujii N. Protective effects of metallothioneins I and II against metal- and ultraviolet radiation-induced damage in cultured lens epithelial cells // *Jpn. J. Ophthalmol.* 2010. Vol. 54, N 5. P. 486–493.
169. Sato M., Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein // *Free Radic. Biol. Med.* 1993. Vol. 14. P. 325–337.
170. Satoh M., Aoki Y., Tohyama C. Protective role of metallothionein in renal toxicity of cisplatin // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997. Vol. 40. P. 358–362.
171. Seffner W., Schiller F., Lippold U., Dieter H. H., Hoffmann A. Experimental induction of liver fibrosis in young guinea pigs by combined application of copper sulphate and aflatoxin B // *Toxicology Letters.* 1997. Vol. 92. P. 161–172.

172. Shaw C. F., Savas M. M., Petering D. H. Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothioneins // *Methods Enzymol.* 1991. Vol. 205. P. 401–414.
173. Shinichiro T. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies // *Journal of Hematology & Oncology.* 2012. N 5. P. 1–8.
174. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // *Experimental Physiology.* 1997. Vol. 82, N 2. P. 291–295.
175. Simpkins A. M., Tatum T. E., Cardin D. L., Wolf W. C. Metallothionein and heat-shock protein 70 induction in caged and wild fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to the Ouachita River, Louisiana // *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2013. Vol. 76, N 2. P. 98–106.
176. Smith J. Psychological theories of aging: contemporary directions and perspectives // *The Gerontologist.* 2015. Vol. 55, N 2. P. 791–791.
177. Smolders E., Oorts K., van Sprang P., Schoeters I., Janssen C. R., McGrath S. P., McLaughlin M. J. Toxicity of trace metals in soil as affected by soil type and aging after contamination: using calibrated bioavailability models to set ecological soil standards // *Environm. Toxicol. Chem.* 2009. Vol. 28, N 8. P. 1633–1642.
178. Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1, 2 // *Free Radical Biology and Medicine.* 2002. Vol. 33, N 5. P. 575–586.
179. Sohal R. S., Orr W. C. The redox stress hypothesis of aging free // *Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52, N 3. P. 539–555.
180. Sparks D. L., Friedland R., Petanceska S., Schreurs B. G., Shi J., Perry G., Smith M. A., Sharma A., Derosa S., Ziolkowski C., Stankovic G. Trace copper levels in the drinking water, but not zinc or aluminum, influence CNS Alzheimer-like pathology // *J. Nutr. Health Aging.* 2006. N 10. P. 247–254.
181. Steibaugh M. J., Sun L. Y., Bartke A., Miller R. A. Activation of genes involved in xenobiotic metabolism is a shared signature of mouse models

with extended life span // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. Vol. 303, N 4. P. 488–495.

182. Sun X., Kang Y. J. Prior increase in metallothionein levels is required to prevent doxorubicin cardio toxicity // *Exp. Biol. Med.* 2002. Vol. 227. P. 652–657.

183. Swindell W. R. Metallothionein and biology of ageing // *Ageing Res Rev.* 2011. Vol. 10, N 1 P.132–145.

184. Swindell W. R. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse // *BMC Genomics.* 2009. Vol. 10, N 585. P. 1–28.

185. Szabadi E. Model of 2 functionally antagonistic receptor populations activated by same agonist // *J. Theor. Biol.* 1977. N 69. P. 101–112.

186. Szelachowska J., Dziegiel P., Tarkowski R., Gomulkiewicz A., Bebenek M., Halon A., Fortuna K., Wojnar A., Kornafel J., Matkowski R. Therapeutic radiation induces different changes in expression profiles of metallothionein (MT) mRNA, MT protein, Ki67 and minichromosome maintenance protein 3 in human rectal adenocarcinoma // *Anticancer Res.* 2012. Vol. 32, N 12. P. 5291–5297.

187. Tatar M., Bartke A., Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals // *Science.* 2003. Vol. 299. P. 1346–1351.

188. Tavernarakis N., Driscoll M. Caloric restriction and lifespan: a role for protein turnover? // *Mech. Ageing Develop.* 2002. Vol. 123. P. 215–229.

189. Testa R., Bonfigli A. R., Prattichizzo F., Sala L., Nigris de V., Ceriello A. The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications // *Nutrients.* 2017. Vol. 9, N 5. P. 1–9.

190. Thirumoorthy N., Shyam Sunder A., Manisenthil Kumar K., Senthil Kumar M., Ganesh G., Chatterjee M. Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology // *World Journal of Surgical Oncology.* 2011. Vol. 9. P. 1–7.

191. Thornalley P. J., Vasák M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. Vol. 827, N 1. P. 36–44.
192. Totter J. R. Physiology of the hormetic effect // *Health Phys.* 1987. Vol. 52, N 5. P. 549–551.
193. Tschen S. I., Dhawan S., Gurlo T., Bhushan, A. Age-dependent decline in  $\beta$ -cell proliferation restricts the capacity of  $\beta$ -cell regeneration in mice // *Diabetes*. 2009. Vol. 58, N 6. P. 1312–1320.
194. Tsuruma K., Shimazaki H., Ohno Y., Inoue Y., Honda A., Imai S., Lee J., Shimazawa M., Satoh M., Hara H. Metallothionein-III deficiency exacerbates light-induced retinal degeneration // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012. Vol. 53, N 12. P. 7896–7903.
195. Varghese S., Tang Y., Imlay J. Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases a and b to oxidation and iron depletion // *Journal of Bacteriology*. 2003. Vol. 185, N 1. P. 221–230.
196. Verghese J., Lipton R. B., Katz M. J., Hall C. B., Derby C. A., Kuslansky G., Ambrose A. F., Sliwinski M., Buschke H. Leisure activities and the risk of dementia in the elderly // *N. Engl. J. Med.* 2003 Vol. 348, N 25. P. 2508–2516.
197. Viña J., Borras C., Abdelaziz K., Garcia-Valles R., Gomez-Cabrera M. C. The free radical theory of aging revisited the cell signaling disruption theory of aging // *Antioxid. Redox Signal.* 2013 Vol. 19, N 8. P. 779–787.
198. Voronova V., Zhudenzov K., Helmlinger G., Peskov K. Interpretation of metabolic memory phenomenon using a physiological systems model: What drives oxidative stress following glucose normalization? // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, N 2. P. 1–16.

199. Walker G., Houthoofd K., Vanfleteren J. R., Gems D. Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways // Mech. Ageing Develop. 2005. Vol. 126. P. 929–937.
200. West A. K., Leung J. Y., Chung R. S. Neuroprotection and regeneration by extracellular metallothionein via lipoprotein-receptor-related proteins // J. Biol. Inorg. Chem. 2011. Vol. 16, N 7. P. 1115–1122.
201. Westendorp R., Kirkwood T. The biology of ageing // Ageing in Society: European Perspectives on Gerontology. P. 1067-1074.
202. Williamson S. A., Knight R. A., Lightman S. L., Hobbs J. R. Differential effects of beta-endorphin fragments on human natural killing // Brain. Behav. Immun. 1987. Vol. 1, N 4. P. 329–335.
203. Worek F., Aurbek N., Wetherell J., Pearce P., Mann T., Thiermann H. Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: Pig versus minipig acetylcholinesterase // Toxicology. 2008. Vol. 244, N 1, P. 35–41.
204. Yoshida M., Ohta H., Yamauchi Y., Yukio Seki, Morihisa Sag., Kentarou Yamazaki, Yawara Sumi. Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese // Biol. Trace Elem. Res. 1998. Vol. 63, N 2. P. 167–175.
205. Zakharova L. A., Belevskaya R. G., Yanovskii O. G. Participation by opioids in the immunostimulatory activity of myelopeptides // Biomed. Sci. 1990. Vol. 1, N 1. P. 139–143.
206. Zeitz B. P., Dieter H. H., Lakomek M., Schneider H., Kessler-Gaedtke B., Dunkelberg H. Epidemiological investigations on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply // The Science of the total environment. 2003. Vol. 302. P. 127–144.
207. Zhang B., Xue L. Q., Li L. L., De X. H., Chen Y. G., Wang J., Peng H. Z., Xiao D. F. Effects of exogenous metallothionein on thermoresistance and SOD gene expression of dairy cattle // The journal applied ecology. 2007. Vol. 18, N 1. P. 193–198.

208. Zhang Q., Zhou T., Xu X., Guo Y., Zhao Z., Zhu M., Li W., Yi D., Huo X. Downregulation of placental S100P is associated with cadmium exposure in Guiyu, an e-wasterecycling town in China // *Sci. Total Environ.* 2011. Vol. 410. P. 53-58.
209. Zheng J., Mutcherson R., Helfand S. L. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster* // *Aging Cell.* 2005. Vol. 4. P. 209–216.
210. Zhu X. D., Chen T. X., Ji R. X., Zhou X. L., Wang L.W., Zhu J. X. Non-mieloperoxidase - mediated system activity of neutrophil in newborn infants // *Zhonghua Er Ke za Zhi.* 2003. Vol. 41, N 4. P. 286–289.
211. Zheng J., Mutcherson R., Helfand S. L. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster* // *Aging Cell.* 2005. Vol. 4. P. 209–216.

## ДОДАТОК 1

## 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, аспаратамінотрансферази, 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, BozhkovAndrewAnatoliyvich 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 Бегаї Мохаммад Алі Юсеф.** Показники функціональної активності і морфології печінки за терапії Си-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).*

## ДОДАТОК 2

ЗАТВЕРДЖУЮ

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

М. О. Азаренков

## АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ «Вік-залежні особливості прояву гормезису до іонів міді» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі: завідувача кафедри молекулярної біології та біотехнології, професора, доктора біологічних наук Божкова А. І., заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Наглова О. В. та голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації МОХАММАД АЛІ ЮСЕФ АЛЬ БЕГАІ, а саме: дослідження вік-залежних механізмів гормезисного ефекту та можливі віддалені наслідки, а саме формування патологічних станів – фібриозу у молодих та старих тварин впроваджені в навчальний процес біологічного факультету 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, які викладаються на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, «Молекулярна біологія» та «Біотехнологія».

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

А. І. Божков

Заступник декана з навчальної  
роботи, кандидат біологічних  
наук, доцент

О. В. Наглов

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

В. В. Мартиненко

*Підписи Божкова А.І., Наглова О.В.  
та Мартиненко В.В. засвідчують*

