

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АКЖИГІТОВ РУСТАМ АНВЯРОВИЧ

УДК [57.017:57.033:57.036.2:57.084.1:574]

ДИСЕРТАЦІЯ

**Вплив мідзв'язуючих білків на формування
індукованої резистентності до іонів міді**

Спеціальність 091 — Біологія

Галузь знань 09 — Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ Рустам АКЖИГІТОВ

Науковий керівник:

Анатолій БОЖКОВ, доктор біологічних наук, професор

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Акжигітов Р. А. Вплив мідьзв'язуючих білків на формування індукованої резистентності до іонів міді. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 — Біологія). — Міністерство освіти і науки України. — Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню вік-залежних відмінностей адаптивного потенціалу на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки та хронічного випаювання пацюків лінії *Wistar* розчином етанолу та способів підвищення адаптивного потенціалу дією біологічно активних сполук різної природи (компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*; вітамін А в формі ретинол ацетату).

Було припущено, що підвищення виживання тварин в моделі Cu-індукованого фіброзу, яке мало місце в експериментах, можуть брати участь металотіонеїни, які здатні зв'язувати та нейтралізувати важкі метали, а також нарівні з антиоксидантною системою захищати організм від активних форм кисню, тобто впливати на адаптивну відповідь тварин.

Дослідження адаптивної відповіді на моделях, які віддзеркалюють токсичний вплив негативного фактора середовища або його хронічну дію, а також використання біологічно активних сполук для його підвищення, **допоможуть** з одного боку зрозуміти вікові відмінності в механізмах адаптивного потенціалу молодих та старих тварин, а з іншого — є **актуальними** для пошуку шляхів безпечного підвищення адаптивного потенціалу за допомогою природних компонентів.

Метою роботи було дослідити формування адаптивного потенціалу тварин різного віку на прикладі дій 5-водної сірчаної кислоти міді та етанолу, роль у цих процесах мідьзв'язуючих білків, а також можливості підвищення адаптивного потенціалу з використанням біологічно активних сполук.

Було показано, що старі тварини більш стійкі до гострої токсичності завдяки підвищеному початковому рівню металотіонеїнів та алкогольдегідрогенази в печінці. Така білкова «спеціалізація» дозволяє їм економити ресурси імунної та інших систем організму, але у подальшому знижує їх адаптивний потенціал і може призвести до смерті розтягнутої у часі через підвищений окисний стрес та інші відхилення від нормального гомеостазу.

Молоді тварини більш чутливі до різких змін середовища порівняно зі старими, оскільки їхні системи спеціалізованого «швидкого» реагування менше розвинені, що знижує захищеність окремих систем організму. Проте вони мають вищий адаптивний потенціал і можуть краще підлаштовуватися до дії слабких швидко змінюючихся негативні фактори середовища, активуючи різні системи організму і формуючи адаптивну пам'ять.

Ключові слова: адаптивний потенціал, резистентність до іонів міді, вік, печінка, мідьзв'язуючі білки, металотіонеїни, біологічно активні сполуки, вітамін А.

SUMMARY

Akzhyhitov R.A. The Influence of Copper-Binding Proteins on the Formation of Induced Resistance to Copper Ions. — Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation (thesis) for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 — Biology). — Ministry of education and science of Ukraine. — V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2024.

The dissertation is devoted to studying age-dependent differences in adaptive potential using models of Cu-induced liver fibrosis and chronic intoxication of rats (*Wistar*) with ethanol solution, and methods to enhance it with the action of biologically active compounds of various origins (components of *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* fungi; vitamin A in the form of retinol acetate).

It has been hypothesized that metallothioneins, capable of binding and neutralizing heavy metals, may participate in enhancing survival in the Cu-induced fibrosis model, alongside the antioxidant system, protecting the organism from reactive oxygen species and influencing the adaptive response of animals.

Research on adaptive responses using models reflecting the toxic influence of environmental factors or their chronic effects, as well as the use of biologically active compounds to enhance these responses, will **help** to understand age-related differences in the mechanisms of adaptive potential between young and old animals. Furthermore, it is **relevant** for exploring safe ways to enhance adaptive potential using natural components.

The aim of the study was to investigate the formation of adaptive potential in animals of different ages using the example of the effects of copper sulfate pentahydrate and ethanol, the role of copper-binding proteins in these processes, and the possibilities of enhancing adaptive potential through the use of biologically active compounds.

It has been shown that older animals are more resistant to acute toxicity due to elevated levels of metallothioneins and alcohol dehydrogenase in the liver. Such

protein "specialization" allows them to conserve the resources of the immune and other organ systems, but it reduces their adaptive potential and can lead to death over time due to increased oxidative stress and other deviations from normal homeostasis.

Young animals are more sensitive to abrupt environmental changes compared to older ones, as their specialized "rapid response" systems are less developed, which reduces the protection of individual organ systems. However, they have a higher adaptive potential and can better adjust to the action of weak, rapidly changing environmental factors by activating various organ systems.

Key words: adaptive potential, resistance to copper ions, age, copper-binding proteins, liver, metallothioneins, biologically active compounds, vitamin A

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., **Akzhyhitov, R. A.**, Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., Albegai, M. A., Gromovoi, T. Y. (2021). The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*, 5, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.11.001> (Scopus, Q3)

2) Bozhkov, A. I., Bozhkov, A. A., Ponomarenko, I. E., Kurguzova, N. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Goltvyanskii, A. V., Klimova, E.M., Shapovalov, S. O. (2021). Elimination of the toxic effect of copper sulfate is accompanied by the normalization of liver function in fibrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 655-663. <https://doi.org/10.15421/022190>

3) Bozhkov, A., Ionov, I., Kurhuzova, N., Novikova, A., Katerynych, O., & **Akzhyhitov, R. A.** (2022). Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver. *Clinical Nutrition Open Science*, 41, 82-97. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.12.003> (Scopus, Q3)

4) Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., **Akzhyhitov, R. A.**, Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., Haiovyvi, S. S. (2023). Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense system. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48–63. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006> (Scopus, Q2)

5) Bozhkov, A. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Bilovetska, S. G., Ivanov, E. G., Dobrianska, N. I., & Bondar, A. Y. (2024). The effect of retinol acetate on liver fibrosis depends on the temporal features of the development of pathology. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 14(3), 101338. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2023.101338> (Scopus, Q2)

6) Bozhkov, A. A., Ganin, V. Y., **Akzhyhitov, R. A.**, Ivanov, E. G., Bilovetska, S. G., Dobrianska, N. I., Novikova A.V., Bozhkov, A. I. (2024). Chlorogenic acid from

sunflower meal regulates the number of immunocompetent cells in animals with toxic liver fibrosis. *Clinical Nutrition Open Science*, 53, 78–94. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2023.12.007> (Scopus, Q3)

7) Bozhkov, A. I., Dobrianska, N. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Novikova, A. V., Haiovyi, S. S., Pankratova, A. O., Ivanova, O. O., Onipko, I. R., Komburlei, Y. O. (2024). Young and old animals “use” different strategies for adapting to the chronic effects of ethanol. *Translational Medicine of Aging*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2024.01.001> (Scopus, Q3)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1) **Akzhyhitov R. A.** (2021) Metallothionein: brief overview. *X Всеукраїнській науковій конференції з міжнародною участю: «Academic and scientific challenges of diverse fields of knowledge in the 21st century. CLIL in action»*. P. 228–235

2) Ivanov, E., **Akzhyhitov, R.**, & Bozhkov, A. (2024). COMPONENTS FROM VARIOUS BIOLOGICAL SOURCES REDUCES THE TOXIC EFFECTS OF COPPER SULPHATE IN OLD ANIMALS. Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ» (V міжнародній науково-практичній конференції «Ricerche Scientifiche e Metodi della Loro Realizzazione: Esperienza Mondiale e Realtà Domestiche»), (April 26, 2024; Bologna, Italy), 191-199. <https://doi.org/10.36074/logos-26.04.2024.039>

ЗМІСТ

ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	19
1.1. Іони міді як агент токсичного фактора середовища для дослідження механізмів формування адаптивного потенціалу печінки	19
1.2. Хронічна патологія печінки як наслідок адаптивної відповіді	20
1.3. Обмін іонів міді на тлі зниження адаптивного потенціалу	22
1.4. Характеристика металотіонеїнів в обміні іонів міді; припущення їх ролі у процесах формування адаптації у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки.....	23
1.5. Єдність кількох фундаментальних принципів структурно-функціональної організації організму та обґрунтування алкогольної моделі як негативного фактора середовища.....	26
Висновки до розділу 1.....	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	31
2.1. Використані реагенти.....	31
2.2. Летальна та адаптивна дози 5-водної сірчаноокислої міді	31
2.2.1 Приготування розчину міді.....	35
2.2.2. Обґрунтування використання 5-водної сірчаноокислої міді у якості моделі Cu-індукованого фіброзу печінки	36
2.3. Характеристика об'єкта дослідження та виділення біологічного матеріалу.....	40
2.4. Дослідження металотіонеїнів при формуванні Cu-індукованої адаптації у тварин різного віку	41
2.4.1. Дизайн експерименту	41
2.4.2. Фракціонування клітин печінки	43
2.4.3. Визначення вмісту іонів міді	44
2.4.4. Гель-хроматографія.....	44
2.4.5. Мас-спектрометрія фракції низькомолекулярних білків цитозоля	47
2.4.6. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9)	49
2.4.7. Визначення активності глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2).....	49
2.4.8. Визначення активності аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3).....	49

2.4.9. Визначення вмісту гідроперекисів ліпідів	49
2.5. Дослідження особливостей адаптації молодих та старих тварин до хронічної дії розчину етанолу	50
2.5.1. Дизайн експерименту	50
2.5.2. Визначення активності алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1)	52
2.5.3. Визначення вмісту карбонільованих білків	53
2.5.4. Визначення вмісту креатиніну в сироватці крові	53
2.6. Дослідження дії біологічно активні сполуки (компоненти грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> та <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; вітамін А)	53
2.6.1. Дизайн експерименту з дослідження впливу компонентів грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> та <i>Saccharomyces cerevisiae</i> на виживання молодих пацюків лінії <i>Wistar</i>	54
2.6.2. Дизайн експерименту з дослідження впливу вітаміну А на виживання молодих пацюків лінії <i>Wistar</i>	55
2.6.2.1. Визначення вмісту вітаміну А в печінці	57
2.6.2.2. Визначення кількості імуннокомпетентних клітин	58
2.7. Статистичні методи	58
Висновки до розділу 2	59
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	60
3.1. Дослідження адаптивної відповіді тварин різного віку у Cu-індукованої моделі та алкогольній моделі як негативних факторів навколишнього середовища	60
3.1.1. Дослідження внутрішньоклітинного розподілу іонів міді у тварин різного віку при різних схемах введення 5-водної сірчаноокислої міді	60
3.1.2. Характеристика відповіді на повторні впливи одного і того ж негативного фактора середовища (5-водна сірчаноокисла мідь)	62
3.1.3. Дослідження низькомолекулярних білків цитозоля печінки методом мас-спектрометрії MALDI-TOF	66
3.1.4. Дослідження утворення комплексів іонів міді з різними білками фракції низькомолекулярних білків цитозоля <i>in vitro</i>	75

3.1.5. Деякі характеристики антиоксидантної системи на фоні зв'язування надлишку іонів міді з металотіонеїнами та іншими білками.....	78
3.1.6. Хронічна дія етанолу як індуктора адаптивної відповіді у тварин різного віку на деякі біохімічні маркерні показники	88
3.1.7. Хронічна дія етанолу як індуктора адаптивної відповіді у тварин різного віку на деякі фізіологічні показники	101
Висновок до розділу 3.1.....	108
3.2. Дослідження адаптивного потенціалу тварин різного віку при використанні біологічно активних сполук різної природи	110
3.2.1. Дослідження впливу попереднього введення різних доз біологічно активних компонентів грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> та <i>Saccharomyces cerevisiae</i> на гостро-продовжану токсичну дію 5-водної сірчаної кислоти міді.....	111
3.3.2. Дослідження впливу попереднього введення різних доз ретинолу ацетату на гостру токсичну дію 5-водної сірчаної кислоти міді	120
Висновок до розділу 3.2.....	124
ВИСНОВКИ	128

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Унікальність живого організму полягає у його здатності адаптуватися до негативних факторів середовища, які можуть мати різну природу та відрізнятися механізмами дії. Ця здатність до адаптації є ключовим аспектом виживання і еволюційного успіху організмів. Серед таких факторів, які індукують адаптивну відповідь, можуть бути іони важких металів, зокрема міді. Іони міді відіграють важливу роль у біологічних процесах завдяки своїм унікальним електронним конфігураціям та реакційним властивостям: вони є перехідним металом, що дозволяє їм легко перемикатися між двома окислювальними станами: Cu (I) та Cu (II) [1, 2].

Окислювально-відновна активність іонів міді робить їх важливими учасниками молекулярних процесів у клітинах живих організмів. Завдяки своїй здатності брати участь у різних метаболічних шляхах і типах тканин, іони міді демонструють високий адаптивний потенціал. Вони можуть функціонувати як кофактори та «активатори» активних центрів у багатьох ферментів, що забезпечує їх різноманітні біологічні ролі. Така варіабельність функцій іонів міді сприяє гнучкості та стійкості організмів у відповідь на різні стресові умови середовища [3, 4].

Іони міді виконують: (1) перенесення електронів під час фотосинтезу в рослинних організмах [5]; (2) транспорт кисню в багатоклітинних організмах (молюски та членистоногі), де мідь є основою для дихальних білків гемоціанінів [6–8]; (3) участь у синтезі норадреналіну та дофаміну, необхідних для нормального функціонування нервової системи [9, 10]; (4) участь у метаболізмі інших іонів, переважно заліза [4, 11]; (5) регуляцію ферментів [4, 12–14] і (6) компартментів клітин [4]; окрім того, (7) іони міді відіграють важливу роль у формуванні та стабілізації двох структурних білків — колагену та еластину, які є основою для сполучної тканини в різних органах і тканинах, включаючи печінку [15–17].

Таким чином, властивості іонів міді дозволяють їм виконувати різні функції в організмі, сприяючи гнучкості біохімічних процесів і стійкості до змін середовища. Проте, порушення обміну цього елемента може призвести до тяжких наслідків.

Так, дефіцит іонів міді може призводити до: неврологічних захворювань [18], що пов'язано з їх роллю у синтезі норадреналіну та дофаміну; анемії [11] — через роль у метаболізмі іонів заліза; затримки розвитку [11, 18] — через роль у синтезі сполучної тканини та загалом через їхню важливість як кофакторів; та інших патологій. Сам дефіцит може бути наслідком неправильного харчування, захворювань шлунково-кишкового тракту і/або проблем з всмоктуванням під час травлення [19], або мати вроджений характер (Х-зчеплена рецесивна хвороба Менкеса) [20].

При цьому важливу роль у метаболізмі іонів міді відіграють мідьзв'язуючі білки, які багаті на цистеїн — металотіонеїни (МТ). МТ безпосередньо беруть участь у зберіганні цих та інших іонів [21]; тобто запуск синтезу МТ в організмі може бути однією з відповідних (адаптивних) реакцій на дію іонів міді, і навпаки — сам синтез частково або повністю буде залежати від дефіциту або надлишку іонів міді в організмі [22].

Надлишок іонів міді, у свою чергу, призводить до інтоксикації організму цим мікроелементом і формування ряду патологій на різних рівнях та в різних тканинах, наприклад, при спадковому захворюванні Вільсона–Коновалова, симптоми якого можуть проявлятися у різному віці, а летальний результат буде залежати від того, чи було надано своєчасну медичну допомогу [20]. При накопиченні іонів міді в організмі основний удар бере на себе видільна система, а страждає в першу чергу печінка.

При цьому стан та реакція відповіді печінки, як і інших систем організму, буде залежати та мати певні вікові відмінності, що пов'язано з підвищенням ризиків патологічних процесів в онтогенезі [23]. У свою чергу це може призводити до того, що молоді та старі організми будуть мати різний вихідний

адаптивний потенціал, тобто різну здатність елементів організму взаємодіяти з іонами міді, особливо при їх надлишку, або іншими сполуками, такими як хронічна дія етанолу.

Одним з прикладом таких вік-залежних проявів є розроблена в НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна Cu-індукована модель фіброзу печінки, яка у тому числі характеризується формуванням резистентності до іонів міді та підвищенням адаптивного потенціалу. Суть моделі полягає в тому, що з одного боку при введенні 5-водної сірчаноокислої міді у нелетальній дозі, яка становить 1/3 від летальної і найбільших ефект якої простежується при 3 попередніх введеннях кожні 48 годин, спостерігається підвищення групового виживання до подальшого введення летальної дози [24], а з іншого — такі нелетальні (адаптивні) введення супроводжуються активацією фібротичних процесів в органі-мішені, саме тому в назві цієї моделі віддзеркалюється «фіброз печінки» [25].

Таким чином у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки ми можемо спостерігати комплекс відповідей: як підвищення адаптивного потенціалу молодих та старих тварин до летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді, так і формування патологічних процесів на фоні стійкості до летальних доз, і при цьому різну реакцію відповіді у молодих та старих тварин на фоні гострих (доба) і гостро-продовжених (кілька діб) дій цієї токсичної сполуки.

На прикладі Cu-індукованої моделі було припущено, що молоді та старі тварини по-різному відповідають на негативні фактори навколишнього середовища, але які саме механізми можуть лежати в основі цих процесів залишається незрозумілим, однак було припущено, що мідьзв'язуючі білки печінки, насамперед досліджувані у цій роботі металотіонеїни, можуть грати в цьому важливу роль, тобто бути пов'язаними з адаптивним потенціалом у молодих та старих тварин.

Дослідження адаптивного потенціалу, в основі якого можуть лежати білкові системи організму, є актуальним для розуміння вікових відмінностей та пов'язаних з ними патологій і, найголовніше, для розробки ефективних підходів

підвищувати стійкість організму не пригнічуючи його функціональну активність, що може бути реалізовано використанням біологічно активних сполук.

Отже, одним з актуальних напрямків в біології є дослідження формування реакцій відповіді організму на дію біологічно активних компонентів різної природи, які можуть підвищувати адаптивний потенціал організму або зменшувати наслідки негативних впливів, якщо організм вже зіткнувся з ними. Одним із підходів до вирішення цієї проблеми є випробування біологічно активних компонентів на модельних об'єктах, таких як миші, пацюки й інше.

У зв'язку з цим, метою дисертаційної роботи було дослідити формування адаптивного потенціалу тварин різного віку на прикладі дій 5-водної сірчаноокислої міді та етанолу, роль у цих процесах мідьзв'язуючих білків, а також можливості підвищення адаптивного потенціалу з використанням біологічно активних сполук.

Предметом дослідження є адаптивний потенціал тварин різного віку.

В якості модельних об'єктів були використані пацюки лінії *Wistar* різного віку: молоді 3-місячні та старі 20-місячні (у досліді з дослідження біологічно активних сполук також була вікова група 30-місячних тварин).

В якості біологічно активних сполук були використані компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*, а також вітамін А (у формі ретинол ацетату).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна на базі НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи кафедри.

Завдання дослідження:

1. Дослідити вік-залежний характер розподілу іонів міді у компартментах клітин печінки після різних схем її введення в організм.

2. Дослідити можливу роль низькомолекулярних білків цитозоля у процесах зв'язування іонів міді у молодих та старих тварин.

3. Дослідити деякі характеристики редокс-системи у тварин на фоні дії іонів міді.

4. Дослідити вік-залежні особливості формування адаптивної відповіді на хронічну дію етанолу.

5. Дослідити можливий вплив низькомолекулярних компонентів грибів (*Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*) на модифікацію адаптивної відповіді у тварин різного віку.

6. Дослідити можливий вплив вітаміну А на модифікацію адаптивної відповіді у тварин різних вікових груп.

Наукова новизна отриманих результатів

На експериментальних моделях впливу різних токсичних факторів навколишнього середовища (5-водна сірчаноокисла мідь, хронічна дія етанолу) було показано, що темпоральна адаптивна відповідь організму на ці токсичні впливи залежить від віку тварин, а точніше від початкових функціональних характеристик систем організму, які беруть участь у формуванні відповіді (початковий метаболічний стан). Показано, що молоді та старі тварини характеризуються різними темпоральними характеристиками стійкості до хронічної дії токсичного фактора середовища. Експериментально встановлено, що старі тварини проявляють більшу стійкість до гострої дії 5-водної сірчаноокислої міді на початкових етапах формування адаптивної відповіді, що пояснюється високою кількістю специфічних білків, що зв'язують мідь — металотіонеїнів. Вперше було показано, що збільшення кількості металотіонеїнів у цитозолі клітин печінки на фоні дії іонів міді змінює подальший характер зв'язування іонів міді з металотіонеїнами і призводить до вік-залежного внутріклітинного розподілу іонів міді. Експериментально обґрунтована гіпотеза, згідно з якою адаптивний потенціал впливає на «вибір» стратегії адаптивної відповіді.

Показано, що металотіонеїни з молекулярною масою приблизно 6200 Да, які локалізовані в цитозолі клітин печінки, мають некооперативний характер зв'язування з атомами двовалентної міді в моделі Cu-індукованого фіброзу печінки.

На прикладі хронічної дії етанолу (6-15%) підтверджено центральну роль початкового функціонального стану систем організму у формуванні наступної стратегії адаптації, тобто його адаптивної відповіді. Було показано меншу групову стійкість старих тварин до хронічної дії етанолу порівняно з молодими тваринами.

Результати досліджень по модифікації адаптивної відповіді організму після попередніх введень низькомолекулярних багатокомпонентних речовин з грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*, які були отримані в НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна, свідчать про важливість початкового стану систем організму у виборі стратегії адаптації та його адаптивного потенціалу.

На прикладі Cu-індукованого фіброзу печінки та хронічного випаювання розчином етанолу у якості негативного фактора середовища було показано, що молоді та старі тварини мають принципово різний адаптивний потенціал у відповідь на дію негативного фактора:

— Старі тварини більш стійкі до гострої токсичності за рахунок більш «спеціалізованої» захисної системи на рівні білкових пулів, що характеризується підвищеним вмістом у інтактних старих тварин металотіонеїнів та алкогольдегідрогенази в печінці, тобто елементів, які безпосередньо беруть участь у формуванні адаптивної відповіді до досліджуваних негативних факторів середовища (іони міді, етанол). Подібна «спеціалізація» робить старих тварин більш стійкими до рідко повторюваних дій негативних факторів середовища або до низьких доз токсичних сполук. «Спеціалізація» дозволяє їм економити ресурси імунної та інших систем організму, які ослабли або втратили свою початкову функціональну активність в процесі онтогенезу. Однак це супроводжується зниженням їх адаптивного потенціалу: пасивність або неможливість функціонування інших систем організму у таких тварин

призводить до підвищення оксидативного стресу та інших відхилень від нормального гомеостатичного стану без можливості його стабілізації (і, як наслідок, до смерті).

— На відміну від старих тварин, молоді більш чутливі до різких змін середовища (гостра токсичність). Системи спеціалізованого «швидкого» реагування розвинені слабо, тобто окремі системи організму у молодих тварин менше захищені. Проте у молодих тварин вищий адаптивний потенціал, а також можливі варіанти його напрямків при часто змінюваних (але слабких) діях негативних факторів середовища за рахунок підключення різних систем організму у відповідь на дію фактора.

Практичне значення отриманих результатів

Отримані результати мають фундаментальне значення для розуміння вік-залежних механізмів адаптації та формування хронічних патологій. Розуміння можливих механізмів дії біологічно активних компонентів із грибів *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae* на організм молодих і старих тварин, одержаних в НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна, розширює можливості їх застосування, зокрема в геріатрії. Вивчення ролі вітаміну А в механізмах адаптивної відповіді у тварин має практичне значення для дослідження механізмів та розробки лікування цирозу печінки. Результати дослідження використовуються під час викладання курсів, таких як «Загальна біотехнологія», «Молекулярна біологія», «Основи біоінженерії» на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, а також під час виконання бакалаврських дипломів.

Особистий внесок здобувача

Всі дослідження проводилися на базі НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна разом зі співробітниками лабораторії та з безпосередньої участю здобувача в усіх експериментах, результати яких увійшли в текст дисертації та опубліковані співавторські статті. Усі етапи роботи узгоджувалися та проводилися спільно з науковим керівником д.б.н., проф. Божковим А.І.

Апробація результатів дисертації

Основні та додаткові положення дисертації було апробовано на семінарах кафедри молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна, двох конференціях та статтях.

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 8 статей: 1 стаття у V міжнародній науково-практичній конференції «Ricerche Scientifiche e Metodi della Loro Realizzazione: Esperienza Mondiale e Realtà Domestiche» (Італія), 1 стаття у фаховому журналі України, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus (Regulatory Mechanisms in Biosystems, Україна), 4 статті у міжнародному виданні з Q3 Scopus (Translational Medicine of Aging, Китай, та Clinical Nutrition Open Science, Нідерланди) та 2 статті у міжнародних виданнях з Q2 Scopus (Journal of Clinical and Experimental Hepatology, Нідерланди).

Структура та обсяг роботи

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів досліджень та їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури.

Дисертацію викладено на 148 сторінках машинного тексту, вона містить 35 рисунків та 5 таблиць, 139 пунктів цитованої літератури.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Іони міді як агент токсичного фактора середовища для дослідження механізмів формування адаптивного потенціалу печінки

За правилами та нормами біоетики дослідження механізмів формування адаптивного потенціалу до великих доз токсичних сполук можна проводити лише на експериментальних об'єктах, зокрема на тваринах, з подальшим перенесенням цих даних у клінічну практику або їх внесення до теоретичної бази [51]. Модельним об'єктом у цій дисертаційній роботі були молоді та старі пацюки лінії *Wistar* НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна; предметом дослідження — адаптивний потенціал тварин різного віку, де іони міді (у формі 5-водненої сірчаноокислої міді) виступали агентом токсичного фактора середовища, що обумовлено декількома причинами.

Перше, іони міді у фізіологічних концентраціях забезпечують активність ряду ферментів організму [7–16]. Здви́г балансу цих іонів в одну зі сторін призводить до хвороб, згаданих раніше [23–27, 30], а надходження до організму великих доз мідь-вмісних сполук може супроводжуватися гострою токсичністю та призводити до гибелі організму [49].

Друге, концентрація іонів міді залежить від віку: її вміст у ембріонів і новонароджених більший, ніж у дорослих, тобто існують вік-залежні особливості обміну цих іонів в організмі, механізми яких на сьогоднішній день дослідженні не повністю [52].

Третє, з'єднання міді — один з найпоширеніших негативних факторів середовища, зокрема через діяльність людини; тому одним з важливих практичних значень має дослідження особливостей обміну іонів міді при багаторазових послідовних введеннях цих іонів в організм. В дисертаційній роботі використовували 5-водневу сірчаноокислу мідь, бо вона, як було показано, здатна моделювати патології надлишку цих іонів [53].

Четверте і останнє, введення 5-водневої сірчаноокислої міді в організм супроводжується найбільшим накопиченням іонів міді в печінці [54], що,

по-перше, дозволяє коректно розрахувати дозу для молодих та старих тварин враховуючі вік-залежні зміни маси цього органу [55], по-друге, дозволяє спостерігати утворення фіброзу, що дає змогу досліджувати розвиток цієї патології у цьому органі [56], і, по-третє, розвиток цієї патології є наслідком адаптивної відповіді на дію токсичного фактора, що дозволяє вивчати у тому числі адаптивний потенціал.

Таким чином, використання 5-водневої сірчаноокислої міді як для дослідження фіброзу, так і для дослідження механізмів формування адаптивного потенціалу у тварин різного віку є вдалою моделлю при вирішенні теоретичних та/або практичних завдань біології.

1.2. Хронічна патологія печінки як наслідок адаптивної відповіді

Хронічні патології є природною реакцією організму і в його основі лежить важливий процес усіх живих організмів — адаптація до несприятливих факторів як екзогенної, так і ендогенної природи [26]: токсичних сполук (іони міді, етанол) [27, 28], вірусів (гепатити) [29], механічних ушкоджень [30] тощо.

Суть адаптації у разі формування хронічної патології печінки у відповідь на дію іонів міді полягає в тому, що лише кілька систем органів беруть на себе основну функцію нейтралізації та виведення з організму надлишків токсичних сполук при їх попаданні та/або накопиченні в організмі; однак це призводить до пригнічення їх функціональної активності [11]. Пригнічення активності є наслідком відмирання клітин, в разі печінки — гепатоцитів, що призводить до формування множинних ушкоджень в цьому органі і запускає механізми фіброгенезу, які спрямовані на усунення цих клітинних втрат [31].

Утворення сполучної тканини дозволяє печінці та організму загалом «пережити» зустріч із токсичним фактором середовища: не дати печінці втратити свою функціональну активність повністю, а організму — дозволяє зберегти працездатний гомеостаз, що може підвищувати групове виживання [32–35]. Однак, у тривалій перспективі наслідки цього можуть призводити до появи хронічних патологій печінки та/або до часткової втрати її

функціональної активності назавжди [36], а ці патологічні процеси в свою чергу тягнуть за собою зменшення адаптивного потенціалу організму загалом, тобто при зустрічі з тим же або новим негативним фактором середовища організм буде більш чутливим до його впливу; а так чи інакше усі живі організми завжди знаходяться під дією різних негативних факторів навколишнього середовища. При цьому є дані, коли у випадку дії деяких факторів середовища у певних невеликих кількостях в організмі може формуватися адаптивний потенціал саме до цієї сполуки, навіть до її летальної дози [37–40].

Основною проблемою хронічних патологій печінки є те, що вони зберігаються протягом тривалого періоду часу, найчастіше — протягом усього життя, а сама хвороба в більшості випадків не лікується, а купірується. До таких захворювань здатні призводити у тому числі сполуки з міддю або порушення її обміну в організмі, згадані раніше [11, 18–20]. Крім цих порушень до хронічних патологій печінки можна віднести діабети [41, 42], захворювання на рак [43], деякі аутоімунні захворювання [44] тощо.

При накопиченні надлишку іонів міді в організмі, процес формування хронічного патології печінки в кінці кінців буде призводити до рубцювання через надмірне накопичення сполучної тканини, що призводить до втрати функціональної активності печінки. В ідеалі процес зупинки фіброгенезу на накопичення іонів міді в печінці, так само, як і його активація, повинен регулюватися металопротеїназами, транскрипційними факторами та цитокінами, які запускають або зупиняють певні сигнальні шляхи клітинної регуляції [45–47]; але надмірні кількості міді можуть відкладати запуск механізмів гальмування фіброгенезу та посилювати розвиток патології печінки, що призводитиме до зниження адаптивного потенціалу цього органу [48].

Ще однією з основних причин зниження адаптивного потенціалу у моделі Cu-індукованого фіброзу може бути властивість іонів міді як есенційного елемента легко перемикається між Cu (I) и Cu (II) та їх участь в різних метаболічних шляхах, тобто їх надлишок може зсувати іонний та інші баланси в організмі, зокрема в печінці [1, 2, 4, 11]. Саме тому першим завданням

дисертаційної роботи було дослідити вік залежний характер розподілу іонів міді у компартментах клітин печінки після різних схем її введення в організм.

1.3. Обмін іонів міді на тлі зниження адаптивного потенціалу

Враховуючи те, що необхідні для організму іони міді всмоктуються разом з їжею, то вже на цьому етапі у випадку надлишку, дефіциту або розвитку гострої або хронічної токсичності в печінки можуть спостерігатися патологічні процеси у їх обміні [18–20]. При цьому патологічні процеси в обміні іонів міді першочергово призводять до окисного стресу, через вплив на реакцію пероксиду водню з іонами заліза в клітинах організму [49], що сприяє посиленню пошкодження печінки; а ці пошкодження в свою чергу призводять до посилення проблем в обміні іонів міді, пригнічують їх відтік до жовчного міхура та синтез білків, необхідних для зв'язування з ними [50]. Фактично, надлишок іонів міді в організмі формує порочне коло свого обміну, впливаючи на механізми виведення свого надлишку з організму: чим надлишків більше, тим сильніше пригнічуються ці механізми [51].

Основні білки, які транспортують іони міді у кровотоці, доставляють їх до клітин та забезпечують перенос у середині самих клітин або позаклітинний простір, — це, по-перше, (1) мідьвмісний церулоплазмін кровотоку, який окрім транспорту міді виконує функції перетворення заліза з Fe^{2+} у Fe^{3+} [52, 53]; по-друге, (2) цистеїнвмісні металотіонеїни, які за рахунок своєї структури та наявності сірковмісних амінокислот з одного боку підтримують гомеостаз фізіологічних металів, а з іншого — захищають від токсичності ксенобіотичних та надлишку фізіологічних металів, тобто беруть участь у механізмах регуляції окисного стресу [21, 22, 54]. Окрім церулоплазміну та металотіонеїнів виділяють ще ряд важливих білків-транспортів, таких як: (3) трансмембранні CTR (Copper Transporter), які відповідають за перенос іонів міді з позаклітинного простору у клітину і навпаки [55]; (4) трансмембранні АТР7А та АТР7В, які входять до складу іонних АФТ-азних насосів Р-типу і мутації генів яких як раз і викликають раніше згадані генетичні захворювання відповідно з дефіциту

(Х-зчеплена рецесивна хвороба Менкеса) та надлишку (хвороба Вільсона–Коновалова) іонів міді в організмі [20, 56]; (5) цитоплазмові мідні шаперони (Copper Chaperones), які доставляють та забезпечують обмін іонами міді з іншими білками, у тому числі з перерахованими вище [57].

За транспорт іонів міді з кров'яного русла до клітин печінки можуть відповідати трансмембранні АТР7В білки, а за їх розподіл у клітині — цитоплазмові мідні шаперони, які, залежно від їх типу, можуть або доставляти іони міді до цільових ферментів та органел, наприклад, для процесу клітинного дихання у якості кофактора цитохром-с-оксидази [58]; або доставляти до захисних білків для антиоксидантних процесів у якості кофактора супероксиддисмутази [59]; або до металотіонеїнів, які не тільки можуть виконувати антиоксидантну роль, а й накопичувати, зберігати та розподіляти іони міді та інші метали у клітині [60–62].

Тобто іони міді пов'язують навколо себе комплекс захисних систем, включаючи як металотіонеїни, так і антиоксидантну систему [63].

Металотіонеїни виконують широкий спектр функцій і крім того цікаві тим, що, по-перше, локалізуються у різних органах, але найбільша їх кількість синтезується саме в печінці [64]; по-друге, вони здатні зв'язувати за допомогою тіолової групи залишків цистеїну важкі метали; і, по-третє, вони безпосередньо беруть участь у регулюванні міді в клітинах організму [21, 22, 60, 61]. Саме тому одним із завдань дисертаційної роботи було дослідити можливу роль низькомолекулярних білків цитозоля у процесах зв'язування іонів міді у молодих та старих тварин.

1.4. Характеристика металотіонеїнів в обміні іонів міді; припущення їх ролі у процесах формування адаптації у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки

Як було сказано раніше, в обміні іонів міді в організмі беруть участь велика кількість специфічних білків [21, 22, 52–57], особливий інтерес з яких викликають металотіонеїни (МТ) як один з можливих компонентів у механізмах

адаптації організму до іонів важких металів, що обумовлено декількома причинами, окремо з яких потрібно виділити їх переважну локалізацію в печінці, яка бере на себе основну функцію нейтралізації при потраплянні надлишків іонів міді до організму. До інших причин можна віднести:

Перше, вміст металотіонеїнів в організмі корелює з кількістю важких металів у тканинах, тобто збільшення/зменшення різних іонів, насамперед міді, цинку, кадмію та/або ртуті буде впливати на індукцію МТ у клітинах [60–63]; тобто ці білки чутливі до надлишків іонів міді.

Друге, запуск індукції металотіонеїнів іонами важких металів може збільшувати кількість МТ у десятки разів [65], що дозволяє коректно оцінити кількісні відмінності у експериментальних груп навіть опосередкованими методами оцінювання.

Третє, металотіонеїни можуть з одного боку виступати у якості депо для іонів важких металів, а з іншого — МТ можуть легко передавати ці іони іншим білкам; тобто однією з найважливіших властивостей МТ виступає їх функція у якості буфера міді та інших іонів у клітинах організму в фізіологічних умовах, і яка може порушуватися при надлишках цих іонів; що дозволяє зв'язати МТ з процесами фіброгенезу печінки, а ці процеси — з адаптацією організму [21, 22, 60].

Четверте і останнє, металотіонеїни (МТ) здатні взаємодіяти не тільки з різними іонами металів, а й з клітинними компартментами та факторами транскрипції. Так, є данні, що цитоплазмові МТ можуть взаємодіяти з апаратом Гольджі та ендоплазматичним ретикулумом, а також з мітохондріями, де МТ можуть знаходитися у фізіологічних кількостях [4, 66]. В усіх випадках, це обумовлено транспортною функцією МТ і необхідністю розподіляти та зберігати іони міді у клітині. Крім того, було показано [67, 68], що певна частина МТ може або локалізуватися в ядрі клітини та безпосередньо впливати на експресію своїх генів, або опосередковано через білок ядерного транспорту — фактор транскрипції MTF-1 (Metal Regulatory Transcription Factor 1), який накопичується в ядрі у відповідь на зміни внутрішньоклітинних рівнів іонів міді і який здатен

зв'язуватися з метал-чутливими промоторами МТ. Ці особливості локалізації МТ у клітинах печінки дозволяють використовувати класичні методи фракціонування, такі як високошвидкісне рефрижераторне центрифугування та колончасту гель-хроматографію, для виділення досліджуваних МТ [69]. Так, в цій дисертаційній роботі досліджувалися МТ, які були виділені з фракції цитозоля печінки.

Таким чином, на основі вищеперерахованих властивостей металотіонеїнів, було припущено, що у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки саме вони можуть грати провідну роль у процесах формування адаптації та адаптивного потенціалу організму до летальних доз іонів міді (у формі 5-водневої сірчаної кислоти міді) після введення попередніх нелетальних доз. Крім того, враховуючі ще й вікові особливості характеру розподілу та зв'язування іонів міді з різноманітними компонентами клітин, які були згадані раніше [4, 66–68], було припущено, що одна з базових властивостей усіх біологічних систем, а саме: здатність динамічно перебудовувати свої структурно-функціональні характеристики відповідно до умов навколишнього середовища, — залежить від віку і відрізняється у молодих та старих тварин; тобто дія одного й того ж негативного токсичного фактора середовища на молоді й старі організми буде по-різному впливати на зміщення їх початкового гомеостазу, на що можуть вказувати зміни та відмінності в антиоксидантній системі [70].

Таким чином, ще одним з завдань дисертаційної роботи було дослідити деякі (активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та аконітази, а також вміст гідроперекисів ліпідів) характеристики редокс системи у тварин на фоні дії іонів міді.

Логічність дослідження металотіонеїнів у зв'язі з антиоксидантною системою була у тому числі обумовлена припущенням існування єдності кількох фундаментальних принципів структурно-функціональної організації біосистем, яка поділяє дію навколишніх факторів середовища за їх впливом на функціональний стан і відображає у тому числі як гострі, так і хронічні варіанти дії негативного фактора середовища (Розділ 1.5). В якості гострих (та

гостро-продовжених) варіантів токсичної дії негативного фактора середовища були використані іони міді, однак вони не повністю відповідали дослідженню хронічної дії негативного фактора середовища через свою токсичність. Тому була використана модель випаювання етанолом [71].

1.5. Єдність кількох фундаментальних принципів структурно-функціональної організації організму та обґрунтування алкогольної моделі як негативного фактора середовища

Було припущено, що взаємодія систем на тлі адаптування до нових умов середовища у молодих та старих тварин може здійснюватися за рахунок єдності кількох фундаментальних принципів структурно-функціональної організації організму (Рис. 1.1): (1) темпоральної оптимальності — стану, в якому знаходиться організм у даний момент часу (в момент впливу стрес-фактора або, навпаки, лікувальних маніпуляцій); (2) поліфункціональності молекул — здатності одного типу молекул виконувати різні функції залежно від фізико-хімічних умов клітини (до цих молекул у тому числі відносяться металотіонеїни та інші мідьзв'язуючі білки); (3) ієрархічності організації — коли одні системи організму підпорядковані та залежать від інших; та (4) біологічної пам'яті — здатності метаболічних процесів до самопідтримання та відтворення взаємопов'язаних циклічних процесів, тобто формування системної відповіді організму на дії різноманітних факторів [72–82].

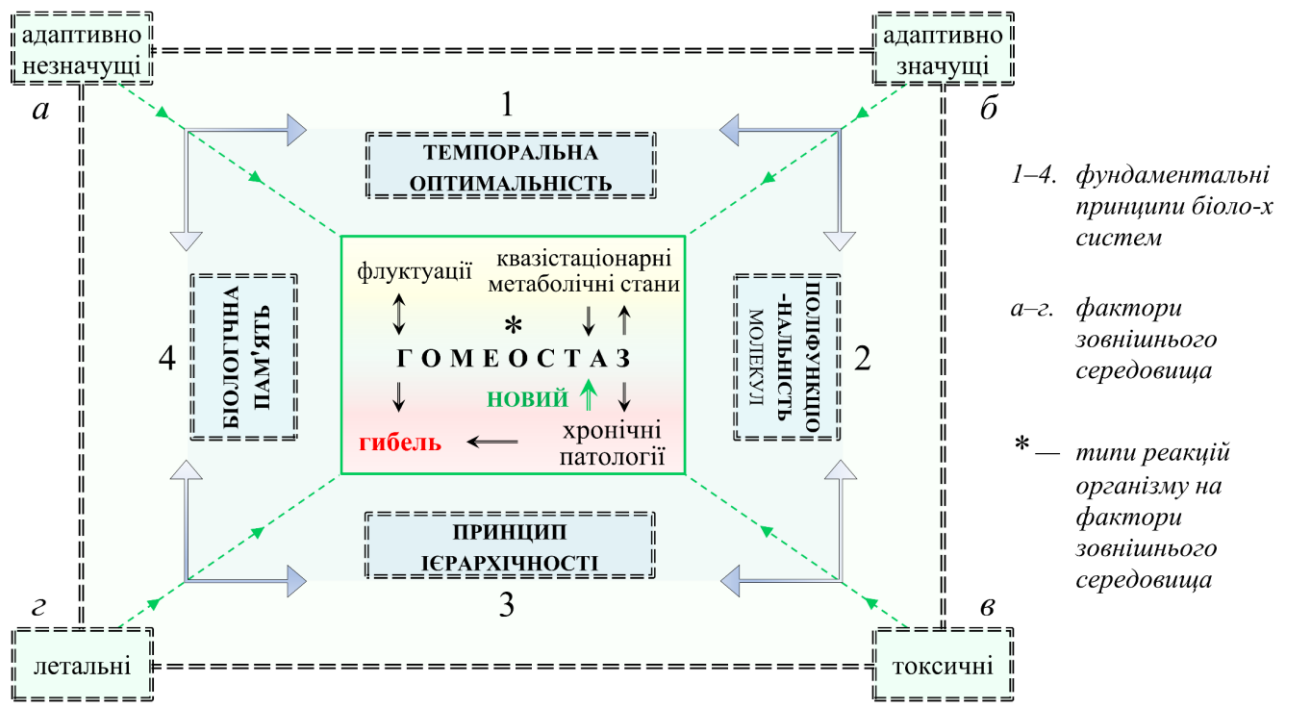


Рис. 1.1. Схема, яка демонструє участь чотирьох базових принципів структурно-функціональної організації біосистем у формуванні єдиної системної відповіді на рівні гомеостазу у відповідь на дію різноманітних факторів середовища (а-г): зеленими пунктирними стрілками умовно показано, як сигнали екзогенних факторів трансформуються на рівні структурно-функціональної організації біосистеми чотирма фундаментальними принципами (1-4), які функціонують як єдина система (показано кутовими стрілками) і які забезпечують формування адаптивних реакцій в організмі (відзначено *).

З Рисунок 1 видно, що все різноманіття екзогенних факторів середовища (а-г), де пунктирні зв'язки між цими категоріями факторів віддзеркалюють широкий спектр можливих варіацій між ними, можна представити у вигляді чотирьох умовних категорій за їх здатністю індукувати різноманітні відповіді в організмі.

По-перше, це адаптивно-не-значущі категорії факторів (Рис. 1а), які призводять до метаболічних відхилень у вигляді флуктуацій, тобто результатом дії цих факторів середовища будуть незначні та короточасні відхилення від

гомеостатичного рівня, для нормалізації яких організму не потрібні затратні та додаткові механізми регуляції, особливо у випадках, коли він вже зустрічався з подібними впливами і має певний додатковий спеціалізований пул молекулярних механізмів (принцип поліфункціональності молекул).

По-друге, це адаптивно-значущі категорії факторів (Рис. 1б), при яких спостерігається квазі-стаціонарне відхилення метаболічних станів, що призводить до активації більш затратних механізмів врегулювання для повернення попереднього гомеостатичного рівня. Враховуючи «не-жорсткість» квазі-стаціонарних відхилень, нормалізація гомеостатичного рівня може відбуватися практично без змін, але можуть використовуватися більш затратні механізми регуляції, що може зроби організм більш чутливим до дії інших стрес-факторів середовища у даний момент часу (принцип темпоральної оптимальності).

По-третє, це токсичні категорії факторів (Рис. 1в), які фактично призводять до розвитку патології в різних органах або системах органів, залежно від того, які тканини страждають і як проходить реакція відповіді організму. Це пов'язано з тим, що стрес-фактори з цієї категорії призводять до значного здвигу гомеостатичного рівня в організмі, порушуючи функціонування тих чи інших систем; а для подальшої нормалізації гомеостатичного балансу та відновлення тканин необхідний запуск жорстких затратних та додаткових механізмів регуляції та захисту, а також певні темпоральні межі для стабілізації гомеостазу. При цьому існують два основні варіанти розвитку подій. Якщо (1) темпоральні межі для стабілізації були дотримані і нових значних впливів факторів середовища не було (а можливо ще й були дотримані певні лікувальні заходи), то гомеостатичний рівень в організмі нормалізується; при цьому важливою відмінністю є те, що новий гомеостаз не буде повністю відповідати попередньому і матиме певні відхилення. До того ж, навіть не дивлячись на нормалізацію гомеостазу, процеси відновлення можуть супроводжуватися хронічними патологіями. Так, у разі дії підвищених доз 5-водневої сірчанокислої міді, модель якої досліджується в цій дисертаційній роботі, спостерігається

пригнічення печінки та розвиток фіброзу. Інший (2) варіант розвитку подій, це гибель організму, пов'язаний як з недотриманням темпоральних меж, так і з можливими епі- та генетичними відмінностями, які у тому числі можуть «впливати» на такий базовий принцип як поліфункціональність молекул; тобто початковий нормальний гомеостатичний рівень у різних груп тварин може відрізнятися між собою або мати якісну або кількісну варіативність, що може пояснити закономірність у відсіюванні невеликої частини тварин у різних експериментальних схемах при однакових умовах утримання та маніпуляціях і які не пов'язані з «людським фактором».

По-четверте і останнє, це летальні категорії факторів (Рис. 1з), до яких можна віднести введення летальної дози 5-водневої сірчаної кислоти міді інтактним та експериментальним тваринам у Cu-індукованій моделі, яка досліджувалася у цій дисертаційній роботі.

Виходячи з цих гіпотетичних уявлень можна припустити, що в основі формування адаптивного потенціалу на дію негативних факторів середовища, зокрема на нелетальні дози 5-водневої сірчаної кислоти міді, лежить запропонована концепція єдності 4 базових принципів: темпоральної оптимальності, поліфункціональності молекул, ієрархічності організації та біологічної пам'яті, — які, по-перше, формують єдину систему відповіді і, по-друге, можуть мати вікові відмінності.

Таким чином, наступним етапом у цій дисертаційній роботі в контексті дослідження адаптивної відповіді у формуванні адаптивного потенціалу після металотіонеїнів та їх зв'язку з антиоксидантною системою було перевірити хронічний вплив дії етанолу як негативного фактора середовища на організм молодих та старих тварин, повноцінно охоплюючи варіанти для токсичних та летальних факторів середовища (Рис. 1.1, в та з). Виходячи з цього, ще одним завданням в рамках дисертаційної роботи було дослідити вік-залежні особливості формування адаптивної відповіді на хронічну дію етанолу (на рівні маркерних показників у динаміці в 40 днів (активність алкогольдегідрогенази,

вміст карбонільованих білків та креатиніну, відносні маси селезінки, печінки та нирок) та в 160 днів (маса тіла, виживання та споживання розчину етанолу)).

Вибір етанолу полягав ще й в тому, що з одного боку він може виступати у якості ендogenous з'єднання, яке синтезується в організмі як побічний продукт вуглеводного обміну [83], тобто може розглядатися як есенційний елемент; а з іншого — прийом цієї сполуки у відносно великих кількостях призводить до формуванням хронічних патологій, фіброзу печінки [84].

Через розповсюдженість фіброзів [83–85], актуальним є і пошук способів лікування цих патологічних станів печінки. Одним з підходів є використання біологічно активних сполук різної природи, саме тому останніми в рамках цієї дисертаційної роботи були завдання з дослідження можливих впливів низькомолекулярних компонентів грибів (*Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*) та вітаміну А на модифікацію адаптивної відповіді у тварин різного віку.

Висновки до розділу 1

Проведено аналіз ролі та впливу дефіциту та надлишку іонів міді як есенційного мікроелементу в організмі та їх зручності у якості моделювання патологій печінки (Cu-індукований фіброз), які формуються в наслідок адаптивної відповіді до цих іонів у тварин різного віку. Показано, що в метаболізмі іонів міді беруть участь мідьзв'язуючі білки, акцент зроблен на металотіонеїнах печінки. У якості хронічної дії токсикогенного фактора середовища було запропоновано використати модель випаювання етанолом та обґрунтовано зручність цієї моделі порівняно з Cu-індукованою моделлю фіброзу печінки у дослідженні хронічної дії негативного фактора середовища через їх меншу токсичну дію. Було припущено, що взаємодія систем на тлі адаптування до нових умов середовища у молодих та старих тварин може здійснюватися за рахунок єдності принципів структурно-функціональної організації організму: темпоральної оптимальності, поліфункціональності молекул, ієрархічності організації, біологічної пам'яті.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Використані реагенти

Іони міді були у формі розчину 5-водної сірчаноокислої міді (Україна), яку вводили на 1 г маси печінки молодих та старих тварин, що дорівнювало дозам на 100 г маси тіла молодих тварин (Розділ 2.2).

Sephadex G-75 використовувався для гель-хроматографії: виробник Pharmacia Fine Chemicals Inc., Швеція;

Реагенти для вимірювання білка за Лоурі: Реактив А (20,41 г Na_2CO_3 розчиняли в 1000 мл дистильованої води); Реактив Б (1 г цитрату натрію з 0,5 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ розчиняли в 98,5 мл дистильованої води); Реактив В (49 мл реактиву А + 1 мл реактиву Б, готується під час безпосередню дослідження, бо тривало не зберігається).

Вітамін А використовувався у формі ретинолу ацетату (розчин нашкірний та оральний, олійний, 34,4 мг/мл або 100 000 МЕ), виробник АТ «ВІТАМІНИ», Україна.

96,6 % етанол «Пшенична Сльоза» закупався в інтернет магазині «Люкс 96.6» та розводився дистильованою водою до необхідної концентрації під час експериментів на тваринах.

0,01 М Трис-НСІ буфер, рН 7,4 готували на 1 літр, для цього змішували 0,0185 г ЕДТА; 0,605 г Трис НСІ та 42,75 г цукрози.

2.2. Летальна та адаптивна дози 5-водної сірчаноокислої міді

Летальна доза (внутрішньоочеревинна) 5-водної сірчаноокислої міді, яка використовувалася при проведенні досліджень на тваринах, була експериментально встановлена у НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна з подальшим корегуванням та складала 2,5-3,0 мг на 100 г маси тіла молодих тварин що дорівнювало 0,58-0,75 на 1 г печінки в перерахунку як для молодих, так і для старих тварин. Перерахунок летальної дози на масу печінки молодих тварин пов'язан з тим, що відносна маса

цього органу в період онтогенезу зменшується, що було встановлено раніше [85] і підтверджено в цій роботі під час уточнення методологічних маніпуляцій, пов'язаних зі схемами введення 5-водної сірчаної кислоти міді у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки на фоні зміни раціону модельних пацюків віварію ХНУ імені В. Н. Каразіна до та після 24.02.2022.

Так, було показано, що середня маса 3–4 місячних пацюків віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при НДІ біології після 24.02.2022 була достовірно нижчою у більше ніж 1,5 рази порівняно з п'ятьма попередніми роками (Табл. 2.1 А, групи I та III), як і у 20–21 місячних тварин (групи II та IV), що пов'язано зі зміною раціону годівлі. При цьому тварини до та після 24.02.2024 отримували добову норму їжі, а відмінності, найімовірніше, пов'язані з надлишком їжі у період з 2016–2021 років (та більш ранніх років).

Табл. 2.1. Маса тіла у інтактних молодих (3 міс.) та старих (20 міс) пацюків лінії Wistar віварію ХНУ імені В. Н. Каразіна до та після 24.02.2022 року

Вік тварин, міс.	Рік аналізу	n	X, г	±SD	±SE	ЛД100/1 г печінки		H test
						гостро-проланг.	гостра	
I	3–4	20	233,6	51,3	11,5	0,58 мг	0,69 мг	$p \leq 0,01$
II	20–21							
III	3–4	10	115,0*	24,3	7,7	0,63 мг	0,75 мг	
IV	20–21							

*/** — достовірні відмінності відповідно груп III/IV порівняно з I/II; # — достовірні відмінності групи II та IV порівняно з I та III; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (H-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,01$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для 6 порівнянь, $p \leq 0,008$).

Спостерігалися й достовірні зміни у масі печінки, яка зменшується у два рази як у молодих, так і старих тварин (Рис. 2.1 А), що прямо корелює з масою

тіла. Однак на цьому фоні спостерігається відсутність змін у відносній масі печінки на масу тіла між групами одного віку, і їх наявність у груп різного: у старих пацюків вона менша (Рис. 2.1 Б).

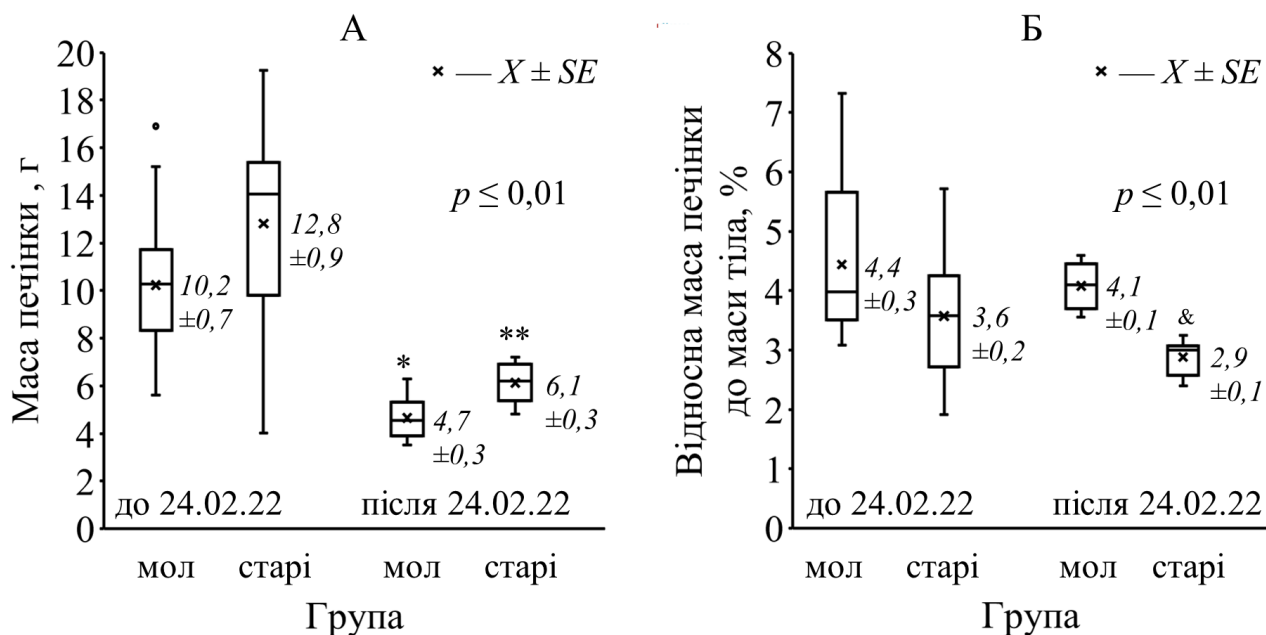


Рис. 2.1. Маса печінки (А) та її відношення (Б) до маси тіла у інтактних молодих (3–4 міс.) та старих (20–21 міс.) пацюків лінії *Wistar* віварію ХНУ імені В. Н. Каразіна до та після 24.02.2022 року; */** — достовірні відмінності відповідно груп молодих та старих після 24.02.22; & — достовірні відмінності старих після 24.02.22 порівняно з молодими тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (Н-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,01$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для 6 порівнянь, $p \leq 0,008$).

Ці фізіологічні особливо цікаві на фоні виживання тварин при введеннях 5-водної сірчаноокислої міді, яка використовується як модель дослідження для адаптаційних механізмів та механізмів розвитку фіброзу печінки.

Раніше було показано, що при введенні летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді молодим тваринам у дозі 2,5–3,0 мг/100 г маси тіла, що у подальшому перераховувалося на масу печінки молодих та старих тварин і

відповідно складало 0,58–0,69 мг/1 г спостерігалася гостра (3,0 мг) та гостра-продовжена (2,5 мг) гибель тварин (Рис. 2.2, до 24.02.22).

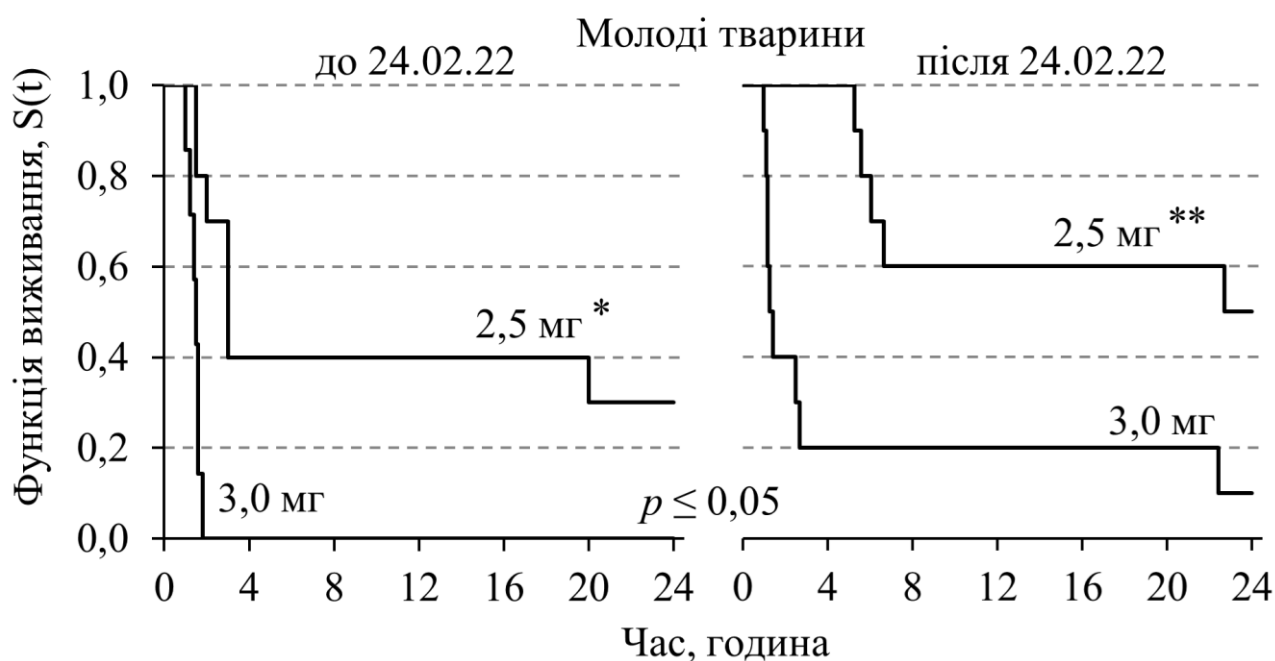


Рис. 2.2. Функція виживання за Каплан–Мейером для інтактних молодих тварин після внутрішньоочеревинних введень 5-водної сірчанокислої міді у дозі 2,5–3,0 мг/100 г маси тіла (0,58–0,69 мг/1 г печінки) до 24.02.2022 та після цієї дати, коли доза на масу тіла залишалася тією ж самою (2,5–3,0 мг), але відрізнялася у перерахунку на 1 г печінки у зв’язку зі змінами у співвідношенні маси до тіла (Рис. 2.1) і складала 0,63–0,75 мг/1 г печінки; * — достовірні відмінності між групою 2,5 та 3,0 мг до 24.02.2022; ** — достовірні відмінності між групою 2,5 та 3,0 після 24.02.2022, а також цієї ж групи порівняно з групою 3,0 до 24.02.2022; відмінності між групами були визначені за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,05 рівним 1,960.

Однак, при цьому, тварини, які отримували цю ж саму дозу на 100 г маси тіла (2,5–3,0 мг), але з новим перерахунком на 1 г печінки, який піднявся з 0,58–0,69 до 0,63–0,73 мг/1 г, були більш стійкими, особливо на фоні введень 3,0 мг на 100 г маси тіла.

Таким чином, це призвело до того, що у різних за часом експериментах доза летальної міді і, відповідно, її адаптивна доза, яка складала 1/3, мали варіації, які у цілому позначені як летальна доза для молодих та старих тварин 0,58–0,75 мг/1 г печінки. Для визначення адаптивної дії біологічно активних сполук використовували летальну дозу, яка відповідала 2,5 або 3,0 мг/100 г маси тіла. Доза, яка мала пролонговано-виражений ефект (2,5 мг/100г маси тіла) використовувалася частіше для дослідження темпоральних особливостей виживання, у цілому достовірні відмінності у токсичності спостерігалися в обох схемах введення. Крім того, важливим для коректної дії цих та нелетальних адаптивних доз є спосіб їх доставки до організму, тобто розчин та концентрація у ньому іонів міді на об'єм рідини.

2.2.1 Приготування розчину міді

Наважку 83,4 мг 5-водної сірчаноокислої міді для приготування розчину нелетальних адаптивних доз сірчаноокислої міді (1 г/100 г маси тіла молодих тварин, що відповідало 0,23 мг/1 г печінки молодих та старих тварин) робили з використанням аналітичних ваг (точність до четвертого знаку після нуля), після чого розчиняли у 20 мл 0,9 % NaCl. В усіх з дослідженнях готовий розчин робився однаково, без змін.

Відповідно, летальні дози 2,5–3,0 мг/100 г маси тіла молодих тварин, які відповідали 0,58–0,75 мг/1 г печінки молодих та старих тварин готували, розчиняючи 208,5–250,2 мг 5-водної сірчаноокислої міді у 20 мл 0,9 % NaCl.

Таким чином, об'єм розчину як летальної, так і нелетальної доз, що вводився на 100 г маси тіла, завжди залишався однаковим, але відрізнявся коефіцієнт в перерахунку на 1 г печінки для молодих та старих тварин і складав відповідно при цьому розведені та з урахуванням відмінностей відносної маси печінки в процесі онтогенезу 0,24 (до 24.02.2022) / 0,25 (після 24.02.2022) мл готового розчину на 100 г маси тіла молодих тварин, а також 0,13 (до 24.02.2022) / 0,17 мл (після 24.02.2022) готового розчину на 100 г маси тіла старих тварин.

Для внутрішньоочеревинних введень готового розчину тваринам використовували інсулінові шприци на 1 мл (Україна; Німеччина). Масу тварин визначали за допомогою кухонних ваг з точністю один знак після нуля.

2.2.2. Обґрунтування використання 5-водної сірчаноокислої міді у якості моделі Cu-індукованого фіброзу печінки

Групове виживання молодих та старих тварин. При порівнянні адаптивного потенціалу молодих та старих тварин, яким внутрішньоочеревинно вводили 5-водної сірчаноокислу мідь у дозі 2,5 мг/100 г маси тіла молодих тварин (або 0,58 мг/1 г маси печінки) спостерігалися певні вік-залежні відмінності, які були показані як у ранніх роботах колективу НДІ біології [86], так і підтвердилися під час доповнюючих повторів при написанні цієї дисертаційної роботи.

Було показано, що гостро-продовжена дія (0,58 мг/1 г маси печінки) 5-водної сірчаноокислої міді на інтактних пацюків лінії *Wistar* 3 місячного віку призводила до гибелі 100% тварин у групі на 72 години, у той час як у групі старих 20 місячних пацюків до цього часу виживало близько 20%, а процес гибелі був розтягнутий у часі (Рис. 2.3 А, крива I та II). Хоча статистичної потужності недостатньо для того, щоб стверджувати, що відмінності достовірні, ці результати узгоджуються з раніше отриманими даними [86] і можуть свідчити про те, що старі тварини мають механізми, які допомагають їм пережити введення летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді. Однак, враховуючи, що відсоток тварин, які вижили досить невисокий, можна припустити, що у формуванні цих процесів мають значення як природа стрес-фактора, так і його темпоральність, тобто час впливу. На основі цих та літературних [60–62] даних було припущено, що саме металотіонеїни можуть грати одну з ролей у цих процесах, бо, відомо, що вони здатні як зв'язувати та переносити іони важких металів [21], так і синтезуватися в організмі під час впливів негативних факторів середовища різної природи [22].

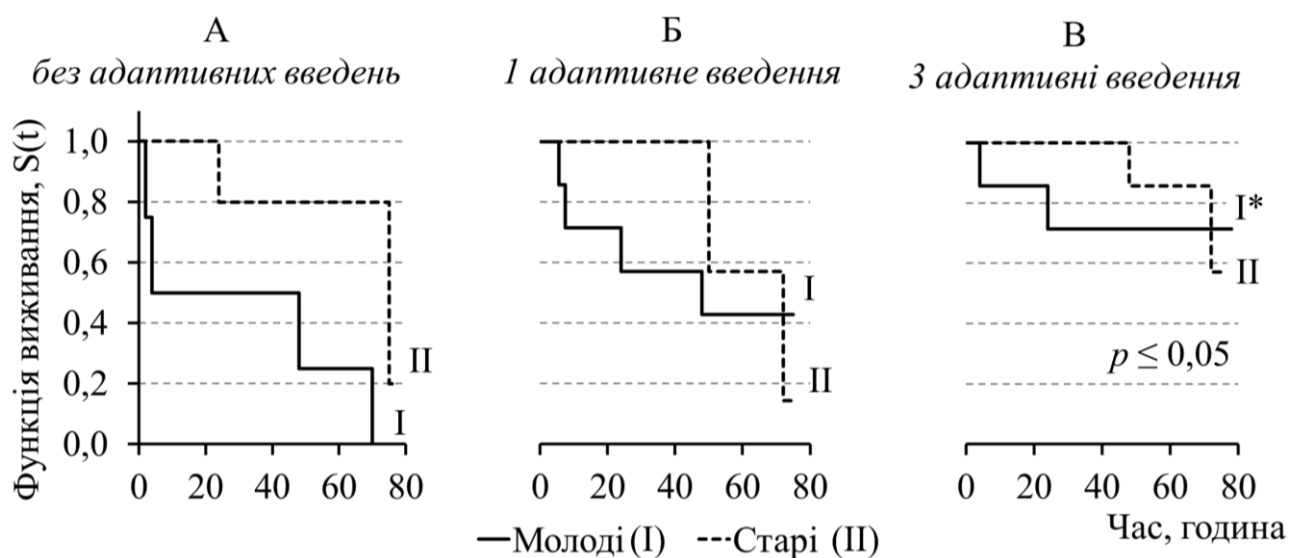


Рис. 2.3. Функція виживання за Каплан–Мейєром молодих та старих тварин після внутрішньоочеревинних введення різних варіантів адаптивних нелетальних доз у варіантах: без адаптивних введень, отримували відповідні дози фізичного розчину (А); 1 адаптивне введення (Б); 3 адаптивні введення (В), — з подальшим введенням гостро-продовженої летальної дози 5-водної сірчаної кислоти міді (0,58 мг/1 г маси печінки); адаптивні дози були фіксованими і дорівнювали 0,23 мг/1 г печінки та вводилися кожні 48 годин у випадках більше 1 введення, летальна доза вводилась через 24 години після останнього адаптивного введення усім групам в один і той же день та час; * — достовірні відмінності для молодих тварин, які отримували 3 адаптивні введення порівняно з молодим контролем без адаптивних введень; відмінності між групами були визначені за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,05 рівним 1,960; $n = 7$ (для кожної групи тварин).

Однак, дослідження здатності молодих та старих тварин адаптуватися до дії 5-водної сірчаної кислоти міді при введенні попередніх адаптивних нелетальних доз з подальшим введенням летальної дози підтвердив, що тимчасовий характер індукованої резистентності залежав від віку тварин: у старих смерть наставала пізніше, ніж у молодих, але сама смертність у продовж 72 годин була вищою (Рис. 2.3 Б та В), хоча казати про суттєві відмінності при уточнюючих

експериментах під час виконання цієї дисертаційної роботи між молодими та старими тваринами не має можливості, ці дані узгоджуються з раніше отриманими [85] і можуть характеризувати вік-залежні особливості. При цьому було показано, що у тварин, які отримували 3 адаптивні введення 5-водної сірчаноокислої міді на третю добу спостерігався добре виражений ефект стійкості до летальної дози, тобто формувалася адаптивний потенціал під впливом тривалих нелетальних доз. У групі з молодими тваринами виживав 71%, а зі старими — 57%, однак про достовірні відмінності можна казати лише для молодих тварин порівняно з їх контрольною групою, яка отримувала виключно летальну дозу (Рис. 2.3 А, В).

Якщо говорить про гомеостаз, то про вплив на нього 5-водної сірчаноокислої міді можна опосередковано судити на прикладі введення адаптивних нелетальних доз за описаною вище моделлю (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин), бо відомо, що молоді 3-місячні тварини в цьому віці знаходяться на активному етапі росту та збільшенні маси тіла.

Було показано, що динаміка росту маси тіла молодих тварин, які знаходилися в стандартних умовах віварію та отримували 3 адаптивні введення 5-водної сірчаноокислої міді, була достовірно меншою у порівнянні з інтактними тваринами (Рис. 2.4 А), що може бути пов'язано не тільки зі зменшенням «апетиту» на фоні інтоксикації, але й зі зрушенням гомеостазу та запуском механізмів адаптогенезу, про що свідчить час початку відмінностей: затримка в динаміці росту почала проявлятися тільки на 7 день після першого введення нелетальної дози; при цьому вона спостерігалася в період всього часу спостережень (4 тижні).

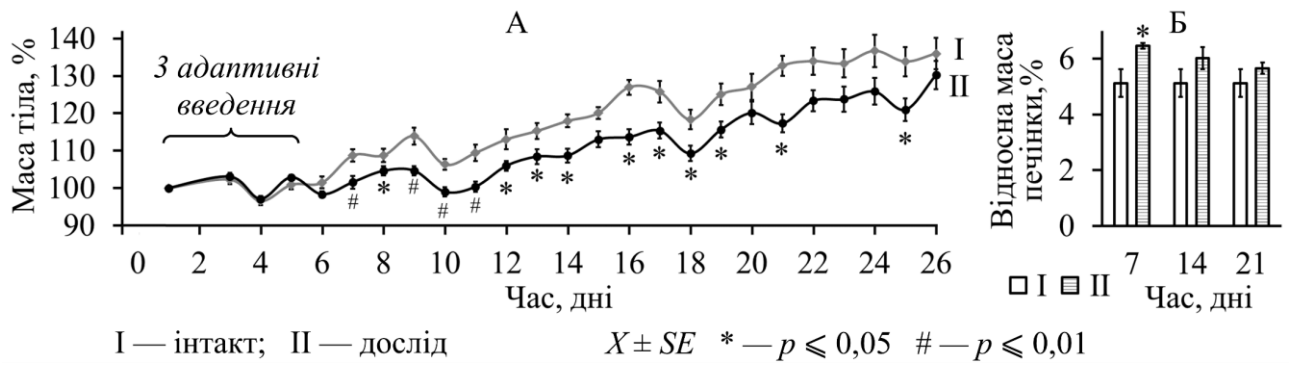


Рис. 2.4. Динаміка росту маси тіла (А) та динаміка відносної маси печінки (Б) у молодих інтактних тварин (І) та дослідні тварин (ІІ), які отримували 3 адаптивні введення 5-водної сірчаноокислої міді кожні 48 годин у дозі 0,23 мг/1 г печінки; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні ($p \leq 0,05$ та $p \leq 0,01$); $n = 6$ (інтактні тварини); $n = 8$ (дослідні тварини); $n = 3$ (для кожного вимірювання відносної маси печінки).

Як було згадано вище, зміни маси тіла, як правило, корелюють зі змінами маси органу. Відносна маса печінки контрольної групи тварин залишалася незмінною з 1 по 21 добу експерименту, у зв'язку з чим вихідний масив даних об'єднували та обчислювали єдине середнє для підвищення статистичної потужності (Рис. 2.4 Б-I). На цьому фоні спостерігалися зміни цього органу у тварин, які отримували три нелетальні введення 5-водної сірчаноокислої міді. У них спостерігалася достовірне підвищення відносної маси печінки порівняно з контролем на 7 добу з подальшою нешвидкою нормалізацією на 14 та 21 добу (Рис. 2.4 Б-II). Це може свідчити про запальні реакції в цьому органі та формуванням початкових стадій фіброзу, що у тому числі було підтверджено в роботах [86].

Таким чином, модель Cu-індукованої резистентності до іонів міді є практичною моделлю для дослідження адаптивних процесів і патологічних проявів в організмі тварин (фіброз печінки як наслідок цієї адаптації).

2.3. Характеристика об'єкта дослідження та виділення біологічного матеріалу

Усі експерименти на лабораторних тваринах проводилися з узгодженням біоетичного комітету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, який керується положеннями «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (Україна, наказ від 01.03.2012 №249) [87] та «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18 березня, 1986).

Експерименти проводилися на лабораторних тваринах різного віку — молодих (3–4 місячних) та старих (20–21 місячних) пацюках лінії *Wistar*, які утримувалися в стандартних умовах віварію НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Необхідні експериментальні маніпуляції (зважування для дослідження динаміки маси тіла; введення внутрішньоочеревинно 5-водної сірчаноокислої міді для оцінки виживання або модуляції фіброзу печінки та адаптивного потенціалу; доставка розчину етанолу та біологічно активних сполук Per Os) проводили в один і той же час доби до прийому їжі: з 8:30–9:30 щоденно або через денні проміжки залежно від схеми експерименту або його етапів. Декапітація для отримання біологічного матеріалу (кров, печінка) для подальшого аналізу проводилася з 8:30 ранку та під ефірним наркозом натщесерце.

Перші каплі крові збирали в пластикові центрифужні пробірки на 10 мл для подальшого виділення сироватки крові та/або в вакуумні пробірки КЗ на 2 мл з ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти, виробник: «ПЛАСТИ ЛАБ», Ліван, представник: ТОВ «Теспро», Україна) для дослідження імуннокомпетентних клітин.

Після розтину черевної порожнини печінку перфузували фізичним розчином (0,9% NaCl), вирізали, зважували, пресували та гомогенізували при 800 об/хв протягом 30 секунд у 0,01 М Трис-HCl буфері у співвідношенні 8

г печінки на 25 мл розчину для подальшого виділення та дослідження металотіонеїнів хроматографічно та спектрометрично.

Цільну кров для виділення сироватки інкубували при кімнатній температурі 20 хв та центрифугували при 1500 g 15 хв (центрифуга медична ОПн-3). Надосадову рідину переносили в мікропробірки ПП 1,5 мл тип Eppendorf (виробник: Biosigma, Italy; представник: ТОВ «Старлаб», Україна) для подальшого спектрофотметричного дослідження ферментів сироватки крові на біохімічному аналізаторі STAT FAX 1904 (Awareness Technology, США) або СФ-76 (Україна).

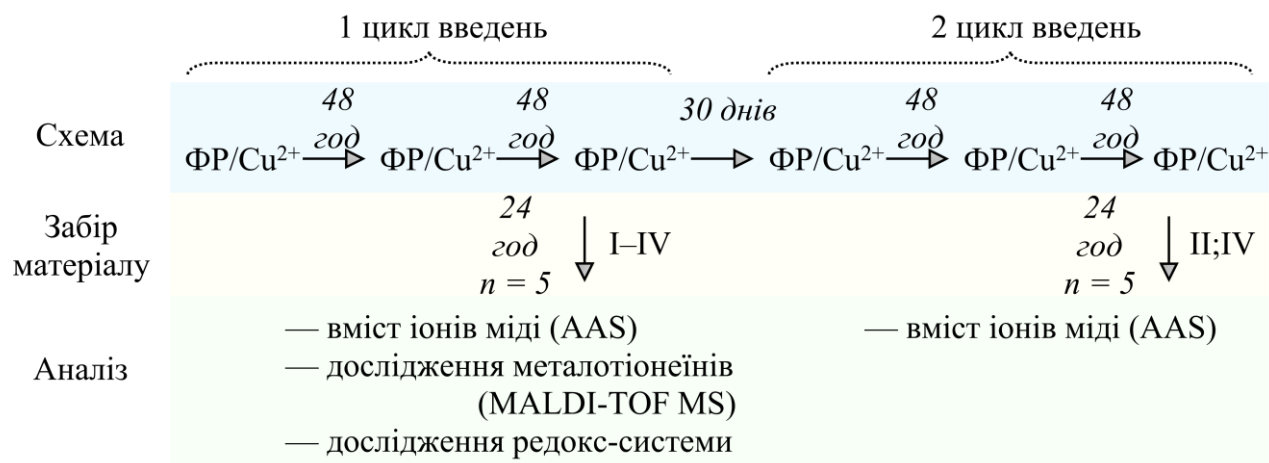
Гематологічні показники визначали на автоматичному аналізаторі Mindray BC-2800 Vet. (США) на базі ветеринарної клініки «Пес і Кіт». Метод базується на імпедансному методі вимірювання [88].

2.4. Дослідження металотіонеїнів при формуванні Си-індукованої адаптації у тварин різного віку

2.4.1. Дизайн експерименту

Досліди проводили на пацюках-самцях лінії *Wistar*. Усього було сформовано 4 групи (N = 40): інтактні та дослідні тварини різного віку, а саме молоді (3 місячного віку) і старі (20 місячного віку).

Інтактні групи (I та III) (Рис. 2.5) отримували введення фізичного розчину, який відповідав об'єму розчину 5-водної сірчаної кислоти міді для дослідних груп (II та IV) (Рис. 2.5). У групах було 5 молодих і 5 старих інтактних тварин.



I — молоді інтакт

II — молоді дослід (Cu²⁺)

III — старі інтакт

IV — старі дослід (Cu²⁺)

ФР — фізичний розчин (0,9 % NaCl)

Cu²⁺ — внутрішньоочеревинні введення; сірчанокислої міді у дозі 0,23 мг/1 г печінки.

Рис. 2.5. Схема введень нелетальних адаптивних доз 5-водної сірчанокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин), була однаковою для молодих та старих тварин; забір біологічного матеріалу (печінка для дослідження вмісту іонів міді у цитозолі, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі та фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ), а також дослідження металотіонеїнів у НБ) проводилося на 24 годину після 1 та 2 циклу введень; ААС — атомно-абсорбційна спектрофотометрія; MALDI-TOF MS — матрично-активована лазерна десорбційна/іонізаційна часопротітна мас-спектрометрія.

Дослідні групи II (молоді) та IV (старі) отримували нелетальні адаптивні введення 5-водної сірчанокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин). Всього було 15 молодих та 15 старих, які у подальшому підрозділялися на 3 частини по 5 тварин.

Перша частина молодих та старих тварин (n = 5) разом з інтактним контролем виводилася з експерименту на 24 годину після останнього введення 5-водної сірчанокислої міді (Рис. 2.5, I–IV) для дослідження вмісту іонів міді (n = 5) та металотіонеїнів (n = 3).

Інші дві частини молодих та старих тварин на 30 день після останнього введення 5-водної сірчаноокислої міді (1 цикл) отримували відповідно 2-й цикл введення сірчаноокислої міді ($n = 5$) (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) або фізичний розчин ($n = 5$) для дослідження вмісту іонів міді у різних компартментах печінки після ре-інтоксикації (тобто на фоні вже сформованого адаптивного потенціалу) та після тривалого часу (тобто після виведення цих іонів з організму через місяць) (Рис. 2.5, II та IV).

2.4.2. Фракціонування клітин печінки

Отриманий гомогенат печінки центрифугували (вакуумна центрифуга ЦВР-1; 4 °С) для відділення фракції мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума та цитозоля.

Спочатку при 600–900 g у продовж 10 хвилин осаджали великі частинки (ядра, цитоскелет тощо). Супернатант зливали для подальшого центрифугування та виділення осадку мітохондрій.

Мітохондрії (МХ) виділяли при 7000–10000 g 15 хвилин. Для контролю чистоти фракцій використовували електронну мікроскопію. Отриманий осадок МХ розбавляли 2 мл 0,01 М Трис-НСІ буфером та гомогенізували дозатором на 1 мл, після чого відбирали у чисті пробірки. Супернатант зливали для подальшого центрифугування та виділення ендоплазматичного ретикулума (постмітохондріальна фракція) та цитозоля.

Постмітохондріальна фракція та цитозоль виділялися при 22000–29000 g 90 хвилин. Для контролю чистоти фракцій ендоплазматичного ретикулума використовували маркерний фермент глюкозо-6-фосфатазу як описано [89]. Цитозоль (супернатант) відбирали та ділили на дві порції, а осадок розбавляли буфером як і мітохондрії, після чого переносили в чисті пробірки.

Перша порція виділеного цитозоля разом з фракціями мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума використовувалась для визначення вмісту іонів міді за допомогою атомно-абсорбційної спектрофотометрії (Рис. 2.5).

Друга порція цитозоля печінки додатково фракціонувалась методом гель-хроматографії.

2.4.3. Визначення вмісту іонів міді

Для визначення вмісту іонів міді у фракціях печінки: мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі, цитозолі та виділених у подальшому низькомолекулярних білках цитозоля (Розділ 2.4.4), — 0,5 мл досліджуваного матеріалу розчиняли у 2 мл суміші концентрованої сірчаної кислоти (ТОВ «ХІМЛАБОРРЕАКТИВ», Україна) та 65% азотної кислоти («Lachema», Чехія) у співвідношенні 1:1 при температурі 120 °С протягом години. Після повного розчинення вмісту визначали концентрацію металів методом атомно-абсорбційної спектрометрії з електротермічною атомізацією (СФ С-115М1, «Selmi», Україна) при 324,8 нм з атомізатором (графітна кювета) та джерелом випромінювання (лампи з порожнім катодом для збільшення інтенсивності випромінювання). Після завантаження мікрокількостей зразка в графітну кювету та включення приладу запускається цикл з 4 етапів: прогрівання кювети з подачею інертного газу (аргон); нагрів кювети до 1000 °С для випаровування кислоти та інших речовин зі зразка; атомізація при 2500 °С для переходу іонів міді у газоподібний стан; та реєстрація поглинання. Вміст іонів міді виражали у мкг/мг білка. Білок аналізували при 260 та 280 нм методом Лоурі [90].

2.4.4. Гель-хроматографія

Для фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ), які, як передбачалося, містили найбільшу кількість іонів міді та які ми розглядали як фракцію металотіонеїн-вмісних білків, використовували колончасту гель-хроматографію.

Цитозоль печінки очищали з використанням гелю декстрана Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals Inc., Sweden); розчин-розділювач — 0,01 М трис-НСІ буфер (рН = 7,4). Роздільна властивість Sephadex G-75 для білків молекулярна

маса яких не більше 80 кДа. Діаметр колонки складав 25 мм, висота гелю 400 мм. Гель-роздільник Sephadex G-75 готували суспендуючи 30 г сухої речовини в трис-НСІ буфері, оставляли на ніч для набрякання, готовий розчин зберігали на холоді не більше 3 днів.

Під час забивання колонки готовий Sephadex G-75 перемішували та заливали до колонки на дні якої був фільтрувальний папір рівний діаметру колонки. Коли область поділу осада в колонці досягала 50–70 мм відкривали кран зі швидкістю скапування 30 мл/год. Після досягнення висоти 400 мм на поверхню гелю кран перекривали і давали відстоятися добу. На наступний день клали ще один фільтрувальний папір зверху гелю, і у подальшому наносили проби цитозоля печінки різних груп тварин (поетапно після промивань буфером або нового забиття колонки) загальним об'ємом 20 мл, але за один раз наносили не більше 25 мм, що визначалося діаметром колонки. По мірі проходження перших об'ємів скляною піпеткою додавали нові порції, доки не наносили усі 20 мл. Білковий елюат збирали у 25 пробірок по 3 мл зі швидкістю 30 мл/год.

Для ідентифікації фракції металотіонеїн-вмісних білків у кожному елюаті після гель-хроматографічного розділення аналізували атомно-абсорбційно кількість іонів міді (СФ С-115М1, «Selmi», Україна) та спектрофотометрично вміст білків при 260 та 280 нм методом Лоурі [90] (СФ UV-2600 «Shimadzu», Японія). Було розраховано кількість міді мкг/мл, а білка — мг/мл для відповідних фракцій для подальшого співставлення між отриманими даними (Рис. 2.6 А). У якості контрольного маркера у даному випадку виступали криві для експериментальної групи молодих тварин з 3 адаптивними введеннями 5-водної сірчаної кислоти міді, тобто судячи з концентрації міді у елюатах цієї групи тварин (Рис. 2.6 А, криві), було припущено, що саме вони (елюати) містять металотіонеїни, на що також можуть вказувати раніше отримані дані з електрофорезу [91]. У подальшому ідентифіковані номери елюатів використовувалися для відбору необхідних номерів елюатів для інших груп тварин, це стало можливим завдяки однаковому розподілу білків в усіх групах

тварин (Рис. 2.6 А, стовпи), які мали молекулярну масу ~ 10 кДа, що було експериментально показано у ранніх роботах [91].

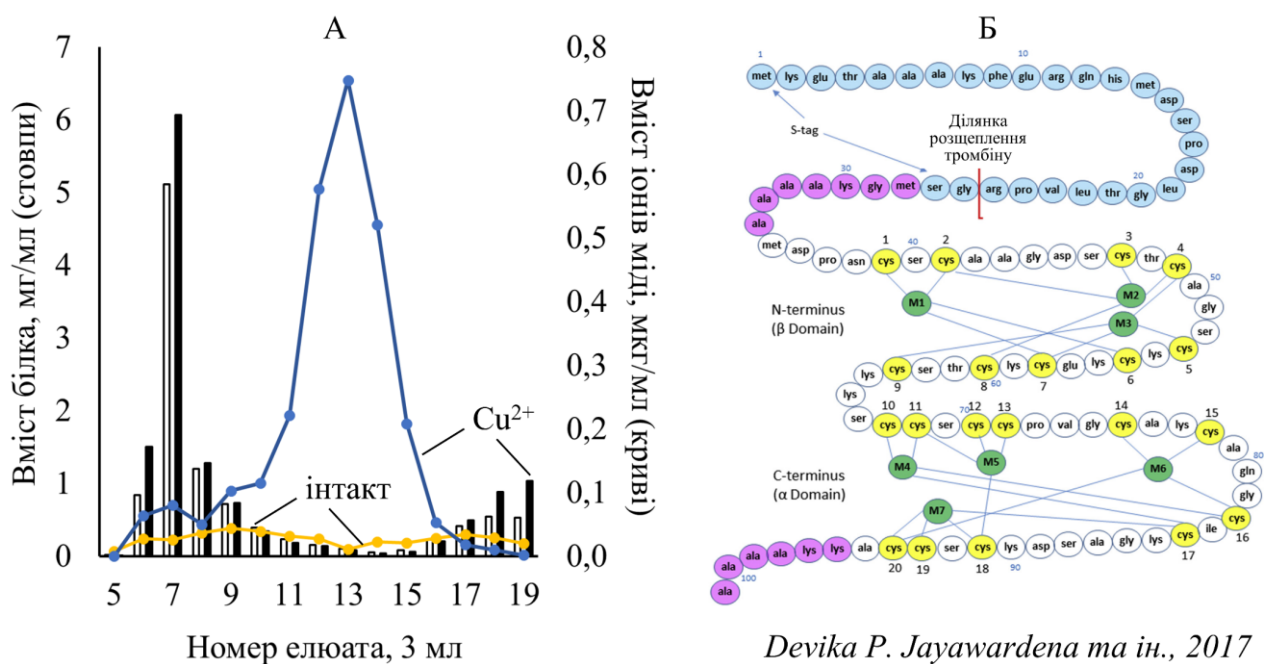


Рис. 2.6. Гель-хроматограма (А) цитозоля печінки маркерних молодих пацюків інтактних та з 3 нелетальними адаптивними введеннями 5-водної сірчаної кислоти міді $0,23$ мг/1 г печінки (Cu^{2+}) (Рис. 2.5, група I та II), яка демонструє характер розподілу іонів міді у елюатах на фоні вмісту в них білка і, таким чином, демонструє фракції цитозоля печінки в елюатах 11–15, які були ідентифіковані як низькомолекулярні білки (НБ) за рахунок найбільшого вмісту в них іонів міді на фоні невеликої кількості білків, тобто фракції, які містили металотіонеїни (МТ) та інші білки, що у тому числі підтверджується розміром МТ та їх високою насиченістю цистеїном, який бере основну участь у зв'язуванні іонів важких (одно-, двох- та трьох-валентних металів) (Б) [60].

Після гел-хроматографії та ідентифікації фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) усіх дослідних груп (I–IV), які відповідали елюатам з найбільшим вмістом іонів міді (номера 11–15) за рахунок особливостей структури металотіонеїнів (Рис. 2.6 Б), пробірки 11–15 зливалися та концентрувалися на роторному вакуумному випарнику і доводилися до

однакової концентрації білка в зразку (1,5 мг/мл) для подальшого дослідження розподілу білків НБ за масою/зарядом.

Розподілу білків фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) досліджувався методом мас-спектрометрії у отриманих концентратах та у пробах, до яких додатково вносили 5-водну сірчанокислу мідь з концентрацією міді 0,25 мг/мл для оцінки специфічності зв'язування іонів міді з білками НБ в системі *in vitro*, бо, як відомо з літературних джерел, сьогодні припускають існування двох основних механізмів зв'язування іонів важких металів металотіонеїнами: кооперативний та некооперативний [61, 62].

2.4.5. Мас-спектрометрія фракції низькомолекулярних білків цитозоля

Мас-спектрометрія концентрату фракції низькомолекулярних білків цитозоля (1,5 мг/мл) відбувалася з використанням матрично-активованої лазерної десорбційної/іонізаційної часопротітної мас-спектрометрії (MALDI-TOF MS) на базі Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйко НАН України з використанням спектрометра Autoflex II LRF 20 «Bruker Daltonics» (Німеччина) з імпульсним азотним лазером ($\lambda = 337$ нм), тривалість дії 3 нс.

Концентрат фракції низькомолекулярних білків цитозоля, змішаний з матрицею, наносили на стандартну сталеву мішень та сушили при кімнатній температурі. Кожен мас-спектр складався з суми 490 індивідуальних спектрів. Дослідження проводилися у лінійному режимі роботи приладу з реєстрацією як позитивних, так і негативних іонів.

Матрицю готували за стандартною методикою: 12 мг синапінової кислоти («Fluka», Німеччина) розчиняли в 1 мл суміші вода/ізопропанол у співвідношенні 1:1 (об/об) з додаванням 0,1% трифтороцтової кислоти.

Отримані спектри мали спільні риси, і загальний вигляд для фракції печінки представлений на Рис. 2.7. Видно, що найбільша інтенсивність піків припадає на діапазон 5000–10000 Да (у нашому випадку відповідає m/z в усіх варіантах) (Рис. 2.7 А). Інтенсивність піків в діапазоні 11000–20000 m/z була

набагато нижча (Рис. 2.7 Б). Більш великих молекул не було ідентифіковано, що підтверджує коректність відбору виділених елюатів які відповідали фракції низькомолекулярних білків цитозоля та літературним даним за якими маса металотіонеїнів дорівнює близько 6000–7000 Да [21, 22, 60–63].

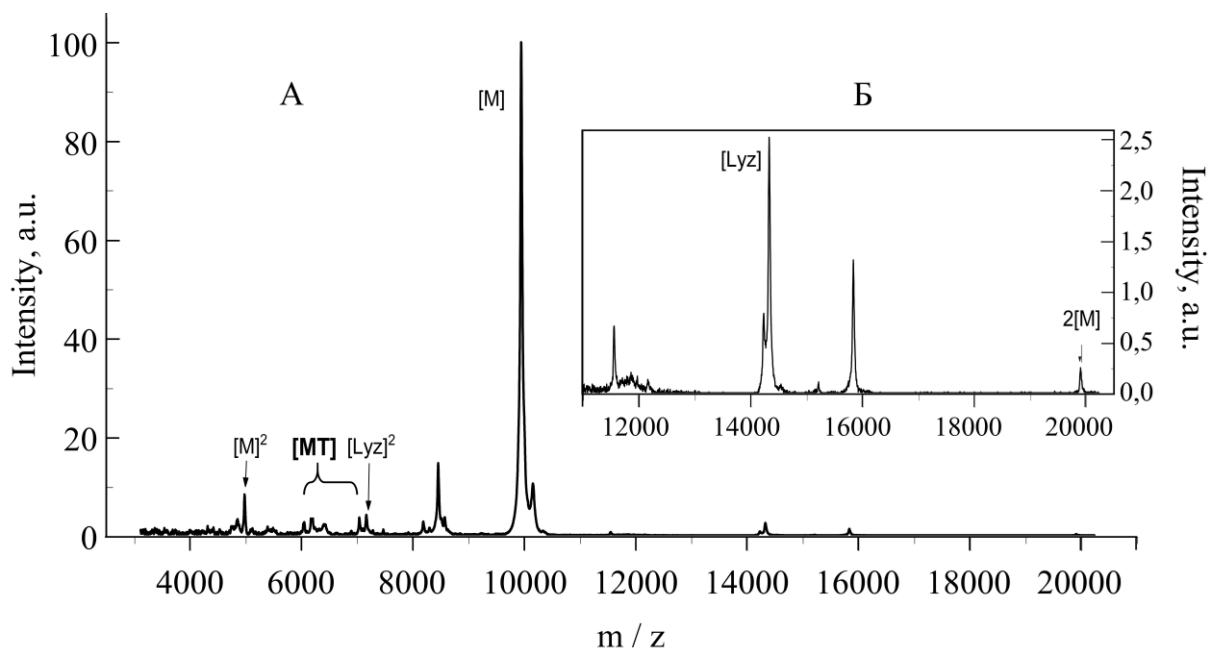


Рис. 2.7. Загальний вигляд спектрів з виділенням основних піків низькомолекулярних білків (А) та частина спектра в області 11000–20000 Да (у даному випадку відповідає m/z) збільшена в 40 разів (Б); [M] — основний іон; [M]² — двозарядний іон; 2[M] — однозарядний димер; [Lyz] — лізоцим ($m = 14332$ Да), використовувався для додаткового калібрування, як і [Lyz]² — його двозарядний іон; [MT] — передбачуваний діапазон металотіонеїнів з молекулярною масою 6000–7000 Да.

Аналіз та візуалізацію отриманих результатів проводили за допомогою відкритого програмного забезпечення ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net>), mMass (<https://github.com/xxao/mMass>) та OpenMS (<https://www.openms.de>).

Після аналізу отриманих даних мас-спектрів та ідентифікації металотіонеїнів, досліджували можливий взаємозв'язок низькомолекулярних

білків цитозоля печінки з антиоксидантною системою організму, яка чутлива до надлишку важких металів в організмі. Було проаналізовано активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та аконітази, а також вміст гідроперекисів ліпідів у тварин різного віку за модельною схемою введення 5-водної сірчаної кислоти міді: 1 цикл (Рис. 2.5).

2.4.6. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9)

Активність глутатіонпероксидази (ГП) у мітохондріях печінки (виділення описано у розділі 2.4.2) вимірювалася спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм класичним методом як описано [92]. Активність виражалася у нмоль НАДФН/хв на мг білка з урахуванням молярного коефіцієнта екстинкції $6,22 \times 10^3 \times \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.4.7. Визначення активності глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2)

Активність глутатіонредуктази (ГР) у мітохондріях печінки (виділення описано у розділі 2.4.2) вимірювалася спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм класичним методом як описано [93]. Активність виражалася у нмоль НАДФН/хв на мг білка з урахуванням коефіцієнта екстинкції $6,22 \times 10^3 \times \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.4.8. Визначення активності аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3)

Швидкість активності аконітатгідратази (аконітази) визначали у фракції мітохондрій (виділення описано у розділі 2.4.2) класичним методом як описаною у роботі [94]. Активність виражали в нмоль аконітату на 1 мг білка з використанням молярного коефіцієнта екстинкції $3,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.4.9. Визначення вмісту гідроперекисів ліпідів

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) у мітохондріях печінки (виділення описано у розділі 2.4.2) та сироватки крові вимірювали аналізуючи різницю в екстинкції при 535 та 520 нм класичним методом як описано у роботах [95–97].

Активність виражалася в нмоль МДА/мг білка з урахуванням молярного коефіцієнта екстинкції $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5. Дослідження особливостей адаптації молодих та старих тварин до хронічної дії розчину етанолу

В наступних експериментах в рамках дослідження адаптивного потенціалу молодих та старих тварин для перевірки гіпотези про відновлення гомеостатичного стану після хронічної дії негативного фактора середовища (підтвердження або спростування), запропонованої на основі отриманих даних (розподіл іонів міді і ролі металотіонеїнів при моделі Cu-індукованого фіброзу печінки), була розроблена додаткова схема, яка полягала в дослідженні особливостей адаптації молодих та старих тварин до хронічної дії стрес-фактора, в якості якого виступав розчин етанолу.

Обґрунтування використання цього токсиканту пов'язано з його властивостями, розповсюдженістю та міфом про можливу користь при вживанні у певних формах (невеликі кількості, у вигляді продуктів природного спиртового бродіння тощо), який спростовується сучасними дослідженнями [98, 99]. При цьому потрібно розуміти, що оптимальним варіантом визначення вікових особливостей формування адаптаційних стратегій до дії етанолу є повне дослідження його метаболічних шляхів та елементів, які беруть в них участь, однак це завдання методологічно важке, тому у рамках роботи дослідження хронічної дії етанолу було обмежено оцінкою деяких ключових елементів, які беруть участь у його метаболізмі та формуванні тимчасової відповіді у молодих та старих пацюків, у зв'язку з чим була розроблена наступна схема експерименту.

2.5.1. Дизайн експерименту

Молоді і старі тварини (N = 130) утримувалися в стандартних умовах віварію, де інтактні тварини (n = 5) отримували звичайну воду, а дослідні тварини (n = 5 для дослідження динаміки на 0, 10, 20 та 40 день; n = 45 для

дослідження фізіологічних показників впродовж 160 днів) щоденно отримували розчин етанолу замість води (Рис. 2.8 А). Перший тиждень випаювання водний розчин етанолу складав 6% вмісту речовини, далі — 15%. Оскільки тварини мали вільний доступ до водного розчину етанолу, об'єм випитого алкоголю фіксувався щодня у продовж всього експерименту (160 днів).

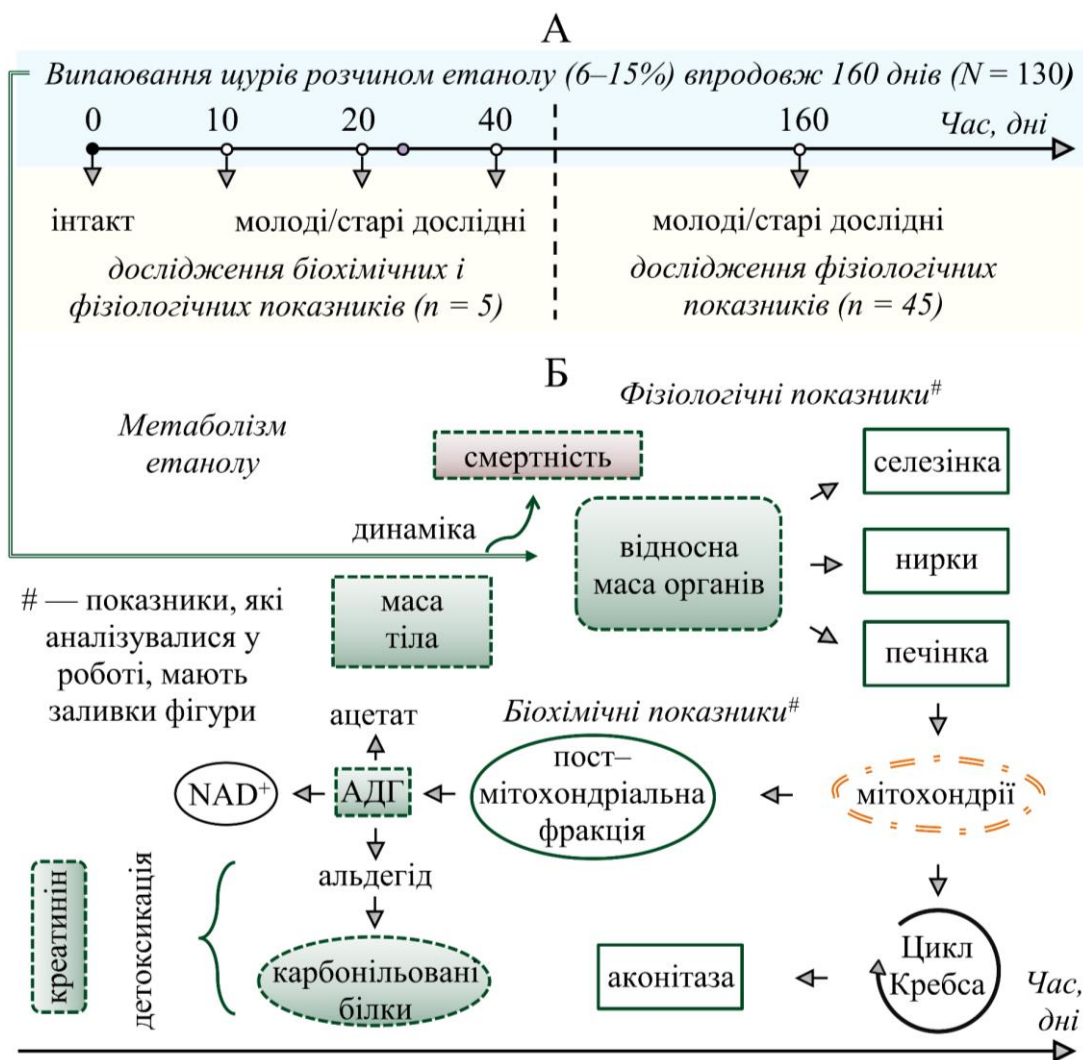


Рис. 2.8. Схема випаювання пацюків різного віку розчином етанолу (6% перший тиждень, далі 15%) та виведення їх з експерименту (А) для дослідження фізіологічних і біохімічних показників (Б, заливки фігур) в динаміці 0, 10, 20 і 40 днів, які беруть участь у метаболізмі етанолу або являються продуктами його метаболізму (Б); фізіологічні показники (кількість випитого розчину етанолу, маса тіла та виживання) досліджувалися у тому числі в

продовж 160 днів; АДГ — алкогольдегідрогеназа; NAD^+ — окиснений нікотинамідаденіндинуклеотид.

Важливо відзначити, що в дослідях з вимірювання фізіологічних показників (Рис. 2.8 А, динаміка маси тіла та тривалості життя протягом 160 днів) інтактні групи молодих та старих тварин не формувалися, бо ці характеристики для пацюків лінії *Wistar* НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна добре вивчені в схемах інших експериментів, а також опубліковані у деяких роботах [100–103].

Отже, на Рис. 2.8. Б наведено функціональний зв'язок між досліджуваними показниками. Зокрема, в рамках цієї дисертаційної роботи було досліджено динаміку (на 0, 10, 20, 40 день, де «0» день — це показники інтактних молодих та старих пацюків): (1) активності алкогольдегідрогенази (АДГ, КФ 1.1.1.1) в постмітохондріальній фракції печінки, яка забезпечує перетворення етанолу в ацетальдегід (у подальших реакціях він розчіплюється до ацетату та альдегіду); (2) вмісту карбонільованих білків (білки з окисненими до альдегідних та кетонних груп бічними ланцюгами), як показника токсичної дії етанолу [104]; (3) вмісту креатиніну, як показника функції детоксикації токсичних метаболітів [105–107]; (4) смертності за Каплан–Мейером [108] протягом 160 днів (5,3 міс.), що є важливим показником в довготривалих експериментах на тваринах різного віку; (5) деяких фізіологічних характеристик: зміни маси тіла та динаміки відносної маси органів.

2.5.2. Визначення активності алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1)

Виділену та продавлену через прес печінку гомогенізували в 0,01 М Трис-НСІ буфері у співвідношенні 1 г тканини + 9 мл середовища. Фракціонування печінки для отримання постмітохондріальної (ПМХ) фракції робили як описано в розділі 2.4.2. Визначення алкогольдегідрогеназної активності відбувалось у 2,6 мл 0,1 М гліцин NaOH буфер (рН 9,6); 0,1 мл 0,04 М НАД; 0,1 мл 0,75 М етанол; 0,1 мл ПМХ як описано [109].

Активність ферментативної реакції представлена в нмоль НАДН/хв на 1 мг білка. Вміст білка в пробах оцінювали за методом Лоурі [90].

2.5.3. Визначення вмісту карбонільованих білків

Оцінку інтенсивності окисної модифікації білків у досліджуваних зразках проводили за методикою Р. Л. Левіна у модифікації Є. Є. Дубініної [110]. Методика заснована на взаємодії карбонільних груп та іміногруп окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, які мають специфічний спектр поглинання в ультрафіолетовій і видимій областях спектра.

2.5.4. Визначення вмісту креатиніну в сироватці крові

Вміст креатиніну визначали за стандартною методикою [111], яка лежить в основі наборів ТОВ «Глобал Біомаркетинг Груп» (раніше «Global Scientific») для біохімічних аналізів. Креатинін реагує з пікриновою кислотою в лужному середовищі і утворює кольорову сполуку з поглинанням на довжині хвилі 510 нм (STAT FAX 1908, США). Рівень утворення кольорової сполуки пропорційний рівню креатиніну в зразку.

2.6. Дослідження дії біологічно активні сполуки (компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*; вітамін А)

Під час формування адаптивної відповіді організму на дію токсичних факторів, яка з одного боку збільшує групове виживання, а з іншого сприяє формуванню хронічних патологій [112], актуальним є пошук методів для лікування або навіть способів звернути ці процеси всп'ять. Одним зі способів вирішення цієї проблеми можуть виступати біологічно активні сполуки, бо відомо, що вже сьогодні одним з підходів у питанні регуляції функції печінки, зокрема при фіброзі, є розробка та використання речовин біологічного походження [113].

У зв'язку з цим у роботі було досліджено вплив таких з'єднань як компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* та вітамін А (у формі ретинол ацетату), які, як показано [114], мають гепатотропну дію.

Компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* були отримані у НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна [114, 115] та використовувались для тестування на тваринах, яким вводили 5-водну сірчаноокислу мідь. Розчин ретинолу ацетату (АТ «ВІТАМІНИ», Україна), був придбаний у аптеці та розводився у соняшниковій олій під час експериментальних маніпуляцій з тваринами.

2.6.1. Дизайн експерименту з дослідження впливу компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на виживання молодих пацюків лінії *Wistar*

Попередні дослідження зі впливу компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* показали, що вони можуть усувати гостру інфекційну діарею (колібактеріоз) у піддослідних тварин (телята, поросята), модулювати імунну систему, зменшувати прояви окисного стресу [114–116].

У цій дисертаційній роботі в рамках дослідження адаптивних проявів при Си-індукованому фіброзі печінки аналізували здатність біологічно активних компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* запобігати загибелі піддослідних тварин при гостро-продовжаному отруєнні 5-водною сірчаноокислою міддю (2,5 мг/100 г маси тіла молодих тварин або 0,58 мг/1 г маси печінки) (Розділ 2.2) після введення різних доз компонентів грибів.

Досліди проводили на молодих та старих пацюках лінії *Wistar* (N = 90). Було сформовано молоді групи, які отримували різні концентрації компонентів грибів для дозової оптимізації (отримували біологічно активні компоненти *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* щоденно у дозах 0,01, 0,05, 0,4 та 0,8 мл/100 г маси тіла протягом 6 днів, а на сьомий усі тварини отримували внутрішньоочеревинно 5-водну сірчаноокислу мідь у дозі 2,5 мг/100 г маси тіла.

Потім цей експеримент проводили на старих 20 місячних та 30 місячних тваринах.

Вживання оцінювали за функцією Каплан–Мейера [108], відмінності між групами визначалися за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,05 рівним 1,960.

2.6.2. Дизайн експерименту з дослідження впливу вітаміну А на виживання молодих пацюків лінії *Wistar*

У наших роботах [112, 117] з дії вітаміну А на тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки (Розділ 2.2), яким через 24 години після останнього введення 5-водної сірчаної кислоти міді щоденно вводили Per Os масляний розчин ретинолу ацетату у десятикратній від щоденної норми дози (0,10 мг (300 МЕ)/100 г маси тіла) у продовж 21 доби спостерігали підвищення групового виживання тварин (Рис. 2.9, група $CuSO_4 \cdot 5H_2O \& Vit.A$), тобто впродовж усього експерименту ці тварини були більш стійкими після введення 5-водної сірчаної кислоти міді на фоні контрольних тварин, які не отримували введення вітаміну А (Рис. 2.9, група $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), і виживання тварин складало відповідно 94% проти 59%. При цьому було показано, що у тварин, які вижили в групі $CuSO_4 \cdot 5H_2O \& Vit.A$ на 21 день відсоток сполучно-тканинних утворень був більшим на відміну від контрольної групи $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, і становив відповідно 91% тварин від групи проти 75% (Рис. 2.9, сполучнотканинні утворення для цих груп). При цьому ніяких змін у цих показниках у груп інтактних тварин та тварин, які отримували лише вітамін А впродовж 21 дня не спостерігалось (100% виживання, жодної тварини у групі зі сполучнотканинними утвореннями).

Групи	N _{total} = 129	Вживання		Сполучнотканинні утворення [#] , % (від загальної кількості тварин)	
		шт.	%	норма	утворення
<i>Інтакт</i>	n = 27	27	100	норма	100
				утворення	0
<i>CuSO₄*5H₂O</i>	n = 34	20	59	норма	25
				утворення	75
<i>CuSO₄*5H₂O & Vit. A</i>	n = 34	32	94	норма	9
				утворення	91
<i>Vit. A</i>	n = 34	34	100	норма	100
				утворення	0

Рис. 2.9. Вживання тварин після інтоксикацією 5-водною сірчаною кислотою міддю та кількість тварин у групі зі сполучнотканинними утвореннями навколо печінки у відсотках: *Інтакт* — тварини отримували відповідні введення фізичного розчину або соняшникової олії аналогічно групам II та IV (n = 27); *CuSO₄*5H₂O* — тварини отримували три внутрішньоочеревинні введення 5-водної сірчаною кислотою міді у дозі 1 мг/100 г маси тіла (0,23 мг/1 г печінки) з інтервалом 48 год (n = 34); *CuSO₄*5H₂O & Vit. A* — тварини отримували три введення 5-водної сірчаною кислотою міді та вітамін А аналогічно групам II та IV (n = 34); *Vit. A* — тварини щодня отримували вітамін А (у формі ретинолу ацетату) в дозі 0,10 мг (300 МЕ)/100 г маси тіла (n = 34); # — сполучнотканинні утворення фіксувалися лише у тварин, які дожили до декапітації під ефірним наркозом, тварини, які загинули під час експериментальної частини, не враховувалися.

Таким чином, на основі цих даних був розроблений експеримент для перевірки можливого впливу вітаміну А на «захисну» дію організму при введенні летальної дози 5-водної сірчаною кислотою міді, тобто до гострої токсичності.

Для цього було сформовано 1 інтактну та 3 дослідні групи молодих тварин (n = 13) з масою тіла 80–130 г у кожній. Інтактні тварини отримували замість

вітаміну А три дня щоденно рослинну олію. Дослідні групи тварин отримували вітамін А (у форму ретинолу ацетату) у дозі 0,03 мг (100 МО), 0,10 мг (300 МО) та 0,31 мг (900 МО) на 100 г маси тіла. Через 24 години після останнього введення вітаміну А всі групи тварин поділяли на дві підгрупи: перша підгрупа (n = 3) декапітувалася під ефірним наркозом для аналізу вмісту вітаміну А в печінці [118]; тварини другої підгрупи (n = 10) отримували внутрішньоочеревинні введення 5-водної сірчаної кислоти міді у дозі 3,00 мг/100 г маси тіла (гостра летальність).

Крім того, в окремому експерименті у якому було 5 інтактних, 5 тварин з Cu-індукованим фіброзом та 5 з фіброзом та 3 введеннями вітаміну А у формі ретинолу ацетату в дозі 0,10 мг на 100 г маси тіла тварини було досліджено кількість імуннокомпетентних клітин.

Фіксували час смерті тварин. Виживання оцінювали за функцією Каплан–Мейєра [108], відмінності між групами визначалися за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,05 рівним 1,960.

2.6.2.1. Визначення вмісту вітаміну А в печінці

Визначення вмісту вітаміну А в печінці аналізували методом, заснованим на утворенні вітамінного комплексу з ефіратом трифториду бору та на визначенні швидкості розпаду цього комплексу спектрофотометрично як описано в роботі Іонов та інші [118].

Проведення аналізу. Відібрану печінку масою 0,1–0,5 г розтирають з безводним сульфатом натрію до отримання однорідної маси у фарфоровій ступці. Потім додають 7–10 мл хлороформу, ретельно перемішують та залишають для екстракції на 10–15 хвилин. Після завершення екстракції вміст ступки фільтрують у мірну пробірку через паперовий фільтр, а ступку та залишки на фільтрі промивають невеликими порціями хлороформу, доводячи об'єм у пробірці до 15 мл. Для подальшого аналізу відбирають 0,5–5,0 мл хлороформеного екстракту, доводячи загальний обсяг до 5 мл хлороформом.

Далі по стінках пробірки додають 1 мл кольорореагенту (ефірату трифториду бору) так, щоб він не змішувався з екстрактом. Через 30 секунд після початку збовтування проводять перше вимірювання оптичної щільності при 610 нм в кюветі проти повітря. Друге вимірювання проводять через 1 хвилину після першого (через 1,5 хвилини після початку збовтування) на тій же довжині хвилі. Різницю між двома вимірюваннями визначають і розрахунок виконують за формулою:

$$X = \frac{(E_1 - E_2) \times V}{V_1 \times m} \times 100,$$

де: X — кількість вітаміну А у зразку, мкг/г; E_1 — величина першого виміру; E_2 — величина другого виміру; V — загальний обсяг екстракту, мл (15); V_1 — обсяг екстракту, взятий на аналіз, мл; 100 — коефіцієнт перерахунку, мкг; m — наважка, г.

2.6.2.2. Визначення кількості імуннокомпетентних клітин

Для визначення кількості імуннокомпетентних клітин перші каплі крові збирали в пробірки з ЕДТА для подальшого аналізу на гематологічному аналізаторі [88].

2.7. Статистичні методи

Візуалізація даних, оформлення схем та статистична обробка виконувалися за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office 365 (корпоративна підписка). Відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (H-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні) або непараметричного U-тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні. Відмінності між групами для критерія виживання за Каплан–Мейером були визначені за допомогою

логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,05 рівним 1,960.

Висновки до розділу 2

Охарактеризовано модель Cu-індукованого фіброзу печінки та особливості введення доз на 1 г маси печінки молодих та старих тварин. Розписані дизайни маніпуляцій з лабораторними тваринами в експериментах з дослідження металотіонеїнів, хронічного випаювання пацюків розчином етанолу та впливу біологічно активних сполук. Описано методи, які були використані в дисертаційній роботі з фракціонування печінки, аналізу іонів міді, виділенню металотіонеїнів, дослідження антиоксидантної системи та маркерних показників до дії етанолу. Обґрунтовано постановки схем, описані статистичні критерії для аналізу відмінностей між групами.

Результати дослідження, які були отримані дисертантом та обґрунтовують дослідження цієї роботи у розділі 2, але не увійшли до основного тексту результатів та обговорення, були опубліковані в:

Bozhkov, A., Ionov, I., Kurhuzova, N., Novikova, A., Katerynych, O., & **Akzhyhitov, R. A.** (2022). Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver. *Clinical Nutrition Open Science*, 41, 82-97. DOI: 10.1016/j.nutos.2021.12.003 (Scopus, Q3)

Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., **Akzhyhitov, R. A.**, Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., Haiovy, S. S. (2023). Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense system. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48-63. DOI: 10.1016/j.jceh.2022.09.006 (Scopus, Q2)

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження адаптивної відповіді тварин різного віку у Си-індукованої моделі та алкогольної моделі як негативних факторів навколишнього середовища

3.1.1. Дослідження внутрішньоклітинного розподілу іонів міді у тварин різного віку при різних схемах введення 5-водної сірчаноокислої міді

Для визначення специфічності зв'язування іонів міді з низькомолекулярними білками (НБ), які були виділені гель-хроматографічно з цитозоля печінки та містили МТ, проводився атомно-адсорбційний аналіз кількості іонів міді у фракціях цитозоля, ендоплазматичного ретикулума (ЕР) та мітохондріях (МХ). Встановлено, що у інтактних молодих та старих тварин відповідно 82 та 83 % іонів міді локалізовано в виділених НБ, а від 4 до 8% іонів міді асоціюється з білками цитозолю, ЕР і МХ (Табл. 3.1, група I).

Табл. 3.1. Вміст іонів міді (мкг/мг білка) у 4 фракціях печінки молодих та старих тварин: низькомолекулярних білках цитозоля (НБ), цитозоля (ЦЗ), ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) та мітохондріях (МХ); n = 5, X±SE

		Групи експериментальних тварин									
		I інтакт (фізрозчин)		II введення сірчаноокислої міді 1Цикл (Ц)				III 1Ц+ 30 днів		IV 2Ц	
вік:		3 міс.	20 міс.	3 міс.	20 міс.	3 міс.	20 міс.	3 міс.	20 міс.	3 міс.	20 міс.
НБ	0,62 ±0,01	0,64 ±0,091	*5,3 ±0,09	**6 ±0,09	0,63 ±0,12	0,63 ±0,1	*,&15,3 ±0,91	***#30 ±0,85			
ЦЗ	0,05 ±0,009	0,06 ±0,009	*0,42 ±0,08	**0,4 ±0,08	0,039 ±0,01	0,034 ±0,01	*,&0,205 ±0,08	***#0,877 ±0,05			

EP	0,05 ±0,008	0,03 ±0,009	*2,1 ±0,1	**1,8 ±0,1	0,05 ±0,01	0,04 ±0,01	*,&0,25 ±0,08	**#0,61 ±0,09
MX	0,04 ±0,006	0,04 ±0,005	*0,84 ±0,08	**0,94 ±0,2	0,044 ±0,01	0,037 ±0,009	*,&0,475 ±0,07	**#1,764 ±0,1

1Ц — один цикл введення нелетальних адаптивних доз 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин); *2Ц* — 2 цикли введення 5-водної сірчаноокислої міді з проміжком між введеннями 30 днів; */** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ відповідно для молодих/старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем (група I); &/# — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ відповідно для молодих/старих дослідних тварин з 2 циклами введення 5-водної сірчаноокислої міді (група IV) у порівнянні з тваринами з 1 циклом введення (група II); відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (Н-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 7 пар порівнянь ($p \leq 0,007$)).

Якщо молодим тваринам вводили 1 цикл 5-водної сірчаноокислої міді, то у печінковій фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) було ідентифіковано 61% іонів міді; у ендоплазматичному ретикулумі (EP) — 24%; у мітохондріях — 10%; а в цитозолі — 5%, при цьому вміст у всіх фракціях був достовірно вищим порівняно з інтактною групою молодих тварин, $p \leq 0,05$ (Табл. 3.1, група II, 3 міс. порівняно з групою I, 3 міс.).

У групі старих тварин з 1 циклом введення 5-водної сірчаноокислої міді розподіл іонів міді у чотирьох фракціях печінки не відрізнявся від відповідної експериментальної молоді групи (Табл. 3.1, група II), при цьому вміст у всіх фракціях був достовірно вищим порівняно з інтактною групою старих тварин, $p \leq 0,05$ (Табл. 3.1, група III та I).

Отже, після триразового послідовного введення експериментальним тваринам 5-водної сірчаноокислої міді (1 цикл), тобто формування адаптивного потенціалу до летальних доз у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки,

переважне зв'язування іонів міді з фракцією низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) було «порушено» — частина надлишку зв'язувалася з фракцією ендоплазматичного ретикулума, і у менших кількості — мітохондрій; тобто специфічного зв'язування або переважного підвищення вмісту іонів міді у фракції НБ не спостерігалось, як і вік-залежних відмінностей у цих показниках для даних груп тварин.

3.1.2. Характеристика відповіді на повторні впливи одного і того ж негативного фактора середовища (5-водна сірчаноокисла мідь)

Характеристика відповіді на повторні впливи одного і того ж негативного фактора середовища через деякий час після первинного впливу (ре-інтоксикація) представляє значний інтерес для вивчення механізмів адаптації, бо часто живі організми стикаються з одним і тим же негативним фактором навколишнього середовища не один раз, а впродовж усього свого життя (або його частини), що може бути пов'язано з постійним ареалом проживання, концентрацією забруднень або їх поширенням під дією техногенних факторів, а також (у випадку людей) з постійним місцем роботи на «брудних» виробництвах тощо; крім того, існують ситуації, коли токсичні сполуки промислових викидів акумулюються в сільськогосподарських культурах, тваринах або морепродуктах, і потрапляють до організму людини з їжею. У зв'язку з цим у рамках дисертаційної роботи було досліджено, по-перше, розподіл іонів міді через 30 днів після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді і, по-друге, їх розподіл після повторних введенень (2 цикл) через 30 днів після 1 циклу (реіндукція).

Було встановлено, що через 30 діб після 1 циклу введенень 5-водної сірчаноокислої міді, її вміст у фракціях печінки (низькомолекулярні білки цитозоля, ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії та цитозоль) не відрізнявся від початкового інтактного рівня для молодих та старих тварин (Табл. 3.1, групи III та I). Можна зробити висновок, що у тварин, які отримували 1 цикл 5-водної сірчаноокислої міді, іони міді повністю виводилися з організму впродовж 30 днів

після останнього введення, однак це супроводжувалося формуванням початкової стадії фіброзу печінки [112, 117].

Якщо такі тварини з 1 циклом введень 5-водної сірчаноокислої міді через 30 днів отримували 2 цикл введень, то вміст іонів міді у фракції низькомолекулярних білків цитозоля для молодих тварин порівняно з 1 циклом введень достовірно збільшувався у 2,9 рази, з 5,3 до 15,3 мкг/мг білка ($p \leq 0,05$), при цьому їх вміст у інших трьох фракціях достовірно відрізнявся в протилежному напрямку і був нижчим у 2 і більше разів (Табл. 3.1, група IV, 3 міс. порівняно з групою II, 3 міс.).

У старих тварин з 2 циклами введення 5-водної сірчаноокислої міді вміст іонів міді у фракції низькомолекулярних білків цитозоля достовірно збільшувався у 5 разів порівняно з 1 циклом введень і змінювався з 6 до 30 мкг/мг білка ($p \leq 0,05$), крім того спостерігалися достовірні підвищення цього показника приблизно у 2 рази і у фракціях цитозоля та мітохондріях; зменшення спостерігалось лише для фракції ендоплазматичного ретикулума, у 3 рази (Табл. 3.1, група IV, 20 міс. порівняно з групою II, 20 міс.).

Таким чином після 2 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді спостерігалися відмінності у зв'язуванні іонів міді у фракціях молодих та старих тварин в порівнянні з 1 циклом введень: у цитозолі і мітохондріях молодих тварин воно було достовірно меншим, у той час як у старих, навпаки, — більшим. Однак, незважаючи на це, спостерігається загальна тенденція збільшення зв'язування іонів міді саме фракцією низькомолекулярних білків цитозоля (НБ): якщо після першого введення 5-водної сірчаноокислої міді на цю фракцію припадало 61% від усіх 4 фракцій для молодих тварин і 65% — для старих, то після 2 циклу введення через 30 днів на цю фракцію припадало вже відповідно 94% та 90%. Тобто спостерігалось підвищення ступеня «специфічності» зв'язування іонів міді з фракцією НБ у порівняння з першим циклом введень.

Крім того, підвищення ступеня «специфічності» зв'язування фракцією низькомолекулярних білків цитозоля та загальна картина розподілу як для

молодих, так і для старих тварин підтверджується і порівняльною характеристикою ступеня збільшення іонів міді порівняно з інтактним рівнем.

Порівнянні ступеня збільшення іонів міді. З Рис. 3.1 видно, що при порівнянні ступеня збільшення іонів міді у дослідних тварин при різних схемах введення 5-водної сірчаною кислотою міді (1 цикл та 2 цикли), де інтактний рівень для цих груп береться за 1, розподіл цих іонів у досліджуваних фракціях (низькомолекулярні білки цитозоля (НБ), цитозоль, ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії) був різним: після 2 циклу спостерігається «ріст» рівня зв'язування фракцією НБ, а загальна «картина» розподілу по фракціям однакова для молодих та старих тварин, тобто ці закономірності є фундаментальними, не мають вік-залежного характеру і, скоріш за все, можуть бути пов'язані з індукцією білків, які входять до фракції НБ після першого циклу введення 5-водної сірчаною кислотою міді, тобто формування адаптивного потенціалу на рівні макромолекул печінки.

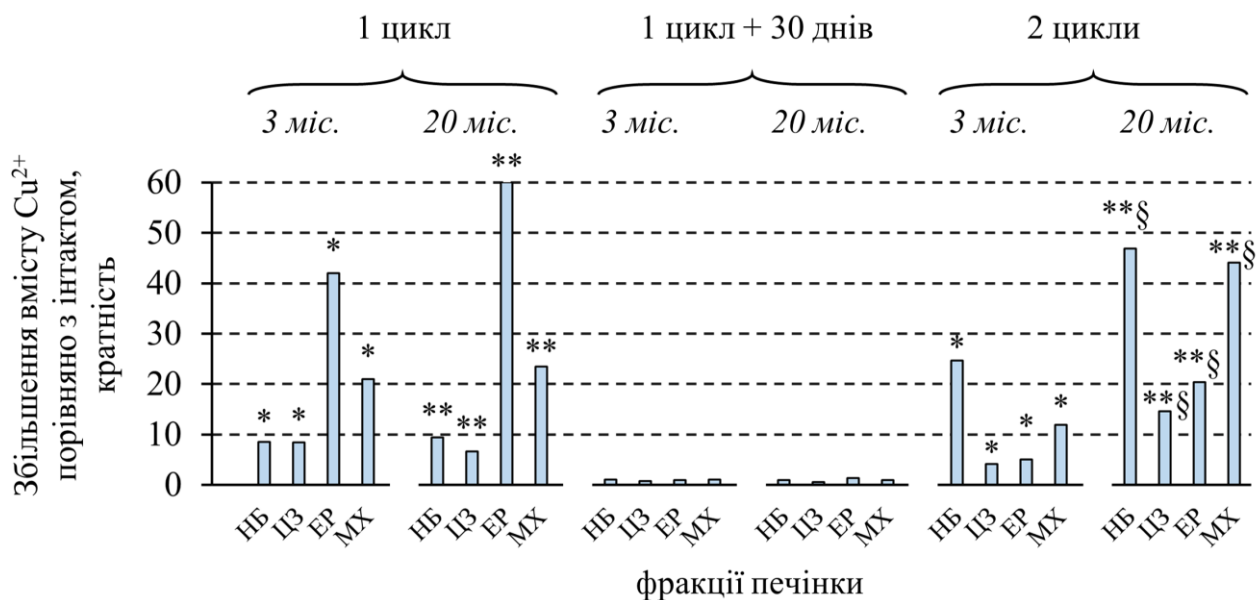


Рис. 3.1. Збільшення вмісту іонів міді в різних фракціях клітин печінки порівняно з інтактним рівнем (дорівнює 1) у молодих та старих тварин: НБ — низькомолекулярні білки цитозоля, ЦЗ — цитозоль, ЕР — ендоплазматичний ретикулум, МХ — мітохондрії; 1 цикл — введення

нелетальних адаптивних доз 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин); 2 цикли — введення 5-водної сірчаноокислої міді з проміжком між введеннями 30 днів; */** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ відповідно для молодих/старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих тварин з 2 циклами введення порівняно з молодими тваринами з 2 циклами введення; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (Н-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 7 пар порівнянь ($p \leq 0,007$)).

Узагальнення. На основі літературних даних [60–63] було припущено, що цими макромолекулами, які входять до фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) печінки після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді і формують стійкість [86] до подальших введення летальних доз у моделі Cu-індукованого фіброзу можуть виступати металотіонеїни (МТ), які, по-перше, синтезуються майже у всіх живих організмах, по-друге, локалізуються в різних тканинах і органах, по-третє, мають молекулярну масу близько 6000 Да, тобто є низькомолекулярними, і які, по-четверте, здатні зв'язувати іони важких металів [21, 22, 54, 60–62, 64–66, 68, 69]. Більш того, ці особливості МТ у контексті отриманих результатів з розподілу іонів міді після 1 та 2 циклів (реіндукція) введення 5-водної сірчаноокислої міді (Рис. 3.1) співвідносяться з припущенням про чотири базові принципи структурно-функціональної організації біосистем при формуванні єдиної системної відповіді на дію різноманітних факторів середовища (Рис. 1.1, елемент 1–4), у даному випадку на дію 5-водної сірчаноокислої міді.

Так, при реіндукції і беручи до уваги, що через 30 днів після 1 циклу іони міді у фракціях печінки відповідають інтактному рівню (Рис. 3.1, 1 цикл + 30 днів), у механізмах розподілу іонів міді простежується підпорядкування принципам темпоральної оптимальності та біологічної пам'яті (Рис. 1.1, 1 та 4),

коли з одного боку після 1 циклу введень формується стійкість до летальних доз токсиканту (прояв на фізіологічному рівні) [85, 86], а з іншого, після 2 циклу введень, — спостерігається підвищення ступеня «специфічності» зв'язування іонів міді з фракцією НБ (прояв на молекулярному рівні) (Рис. 3.1, 2 цикли). При цьому ці принципи «діють» у зв'язці з принципами ієрархічності та поліфункціональності молекул, на що опосередковано може вказувати прояв ефекту як на фізіологічному (організменному), так і на молекулярному (клітинному) рівнях, тобто з отриманих даних видно, що відповідь у процесах формування стійкості до летальних доз 5-водної сірчаної кислоти міді спостерігається на декількох рівнях організації живого (принцип ієрархічності) (Рис. 1.1, 3).

На основі вищесказаного було припущено, що металотіонеїни, які у тому числі є поліфункціональними молекулами, — важливий компонент у формуванні стійкості у моделі Си-індукованого фіброзу печінки, який може брати участь у стабілізації гомеостатичного рівня на фоні дії токсичного фактора зовнішнього середовища (Рис. 1.1, в).

Для експериментальної оцінки можливої ролі металотіонеїнів у моделі Си-індукованого фіброзу печінки на наступному етапі дисертаційної роботи фракція низькомолекулярних білків цитозоля у досліджуваних груп тварин додатково аналізувалась методом мас-спектрометрії за масою/зарядом.

3.1.3. Дослідження низькомолекулярних білків цитозоля печінки методом мас-спектрометрії MALDI-TOF

На даному етапі дослідження було проаналізовано взаємодію низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) печінки з іонами міді після введення нелетальних адаптивних доз 5-водної сірчаної кислоти міді 1/3 від летальної (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) з метою ідентифікації металотіонеїнів (МТ).

Аналіз спектрів та ідентифікація металотіонеїнів. Відомо, що у разі утворення білкової сполуки з одним або декількома іонами важких металів новий комплекс буде проявлятися на спектрах MALDI-TOF у вигляді піків, які послідовно розташовуються праворуч від основного піку (апометалотіонеїну або апоМТ) і які будуть відрізнятися від нього (та кожного попереднього після нього) на атомну масу одного іона металу [60]. Це пов'язано з тим, що одна молекула МТ здатна зв'язати від одного до декількох іонів металів [62]; для двовалентних металів ця цифра дорівнює 7 атомам [61] (Рис. 3.2). При цьому сьогодні [61] наявні два можливих механізми зв'язування іонів металів металотіонеїнами: кооперативний та некооперативний (Рис. 3.2).

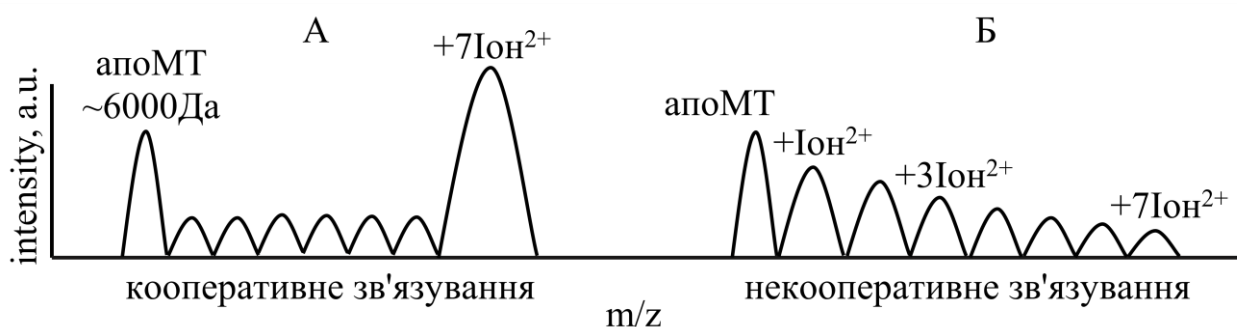


Рис. 3.2. Теоретична модель варіантів зв'язування двовалентних іонів металів металотіонеїнами, де кожен наступний «пік» відрізняється на атомну масу одного іона металу: кооперативне зв'язування припускає підвищення специфічності зв'язування МТ з приєднанням кожного нового атома, що на мас-спектрах повинно відобразитися утворенням піку з максимальним насиченням МТ (+7Іон²⁺) (А); некооперативне зв'язування припускає відсутність або зменшення специфічності зв'язування МТ з приєднанням кожного нового атома, що на мас-спектрах повинно відобразитися поступовим зменшенням спостережуваних піків МТ з кожним додатковим зв'язуванням іона (Б).

Таким чином, передбачалося, що у разі отримання мас-спектрів фракції низькомолекулярних білків цитозоля печінки експериментальних тварин в діапазоні мас 6000–7000 Да буде спостерігатися утворення послідовних піків, які

б відповідали одному з варіантів зв'язування (Рис. 3.2) і які б у даному випадку відрізнялися на один атом міді, тобто на його атомну масу, яка дорівнює близько 63,5 Да [119].

Так, були отримані мас-спектри фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) для 4 груп тварин: молодих та старих інтактних та яким вводили 1 цикл 5-водної сірчаноокислої міді (Рис. 3.3 А). Спектри були отримані в режимі реєстрації позитивних та негативних іонів, розподіл m/z для яких у цілому має схожий характер, що може пояснюватись налаштуваннями аналізатора, використанням єдиної матриці на основі синапінової кислоти та у цілому особливостями досліджуваного зразка [121] (Розділ 2.4.5). При цьому чітка відповідність та накладення піків для різних груп тварин (два піки в діапазоні від 8000 до 10000 Да) (Рис. 3.3 А) підтверджують коректність зіставлення фракцій НБ після гель-хроматографії, а також дозволяє порівнювати («накладати») отримані спектри цих 4 груп тварин між собою.

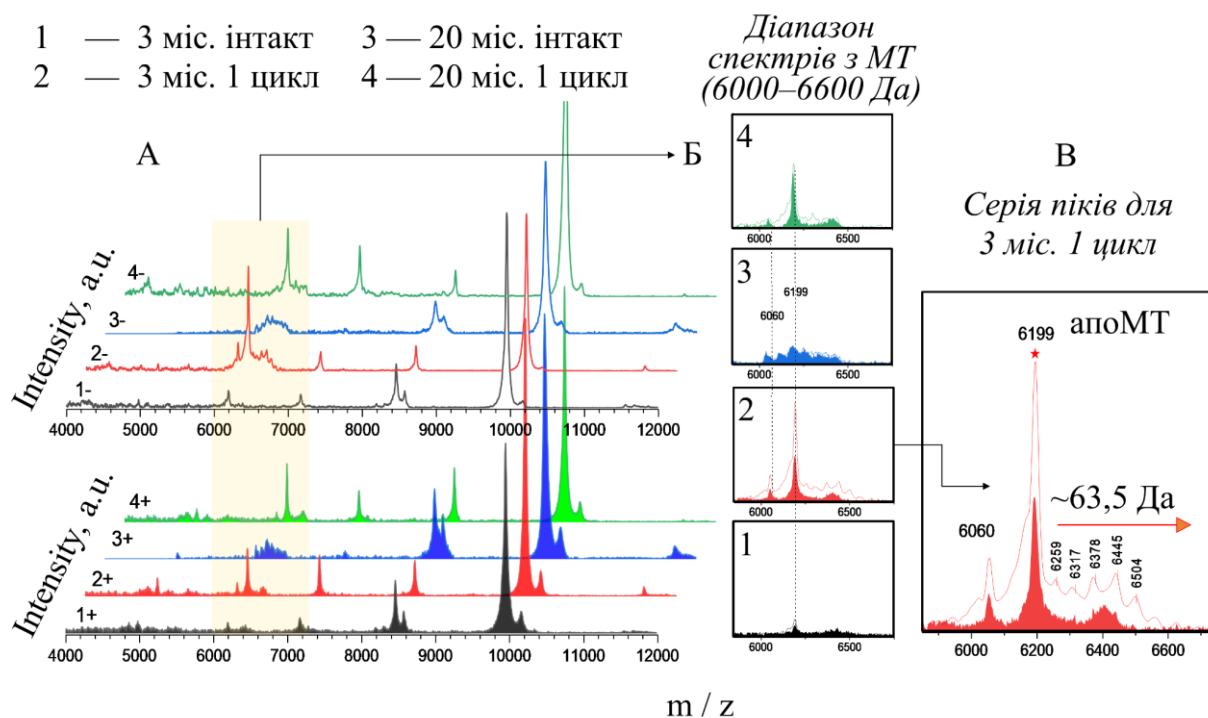


Рис. 3.3. Загальний вид спектрів MALDI-TOF для низькомолекулярних білків цитозоля печінки молодих та старих інтактних тварини (1 та 3) і молодих та старих тварин, яким вводили нелетальні адаптивні дози 5-водної

сірчаноокислої міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) (2 та 4) в режимі реєстрації позитивних (+, криві із заливкою) та негативних (-, криві без заливки) іонів (А); а також окрема область індивідуальних спектрів для кожної групи тварин (1–4) з основним піком близько 6200 Да (у нашому випадку відповідає m/z в усіх варіантах), яка була віднесена до металотіонеїнів (МТ) (Б) на основі ідентифікації окремих комплексів металотіонеїнів з атомами міді у фракції НБ печінки молодих тварин з 1 циклом введення 5-водної сірчаноокислої міді (показано комплекси з 1 до 5 атомів міді у діапазоні 6259-6504 Да), тобто послідовних піків, які відрізняються на $\sim 63,5$ Да (В).

Показано, що в отриманих мас-спектрах для молодих та старих тварин з 1 циклом введення 5-водної сірчаноокислої міді спостерігається утворення серії піків, які починаються масою приблизно 6200 Да (6199 Да) і послідовно відрізняються на масу, яка з невеликою похибкою відповідає загальноприйнятій масі для іона міді (63,5 Да) (Рис. 3,3 Б, В); і яка, крім того, потрапляє в діапазон мас, очікуваних для специфічних метал-зв'язуючих білків [60, 61]. Таким чином, пік 6200 Да був ідентифікований як основний пік для апометалотіонеїнів (апоМТ), хоча пік з масою 6060 Да (Рис. 3,3 В) теж потенційно розглядався як можливий варіант для апоМТ, однак відсутність формування проміжного піку між цим та піком 6200 Да (тобто ймовірного варіанта для зв'язування 1 іона міді) змусив відкинути ці припущення при аналізі отриманих даних. До того ж, обґрунтованість цього «відкидання» опосередковано підтверджується переважанням інтенсивності піку віднесеного до апоМТ (6200 Да) на тлі порівняння з варіантами, які зв'язали від 1 до 5 іонів міді (діапазон 6259-6504 Да) (Рис. 3.3 В) після введення 5-водної сірчаноокислої міді, бо, як відомо, при надлишку іонів металів йде підвищення синтезу апоМТ [121] (1), запуск механізмів для інтенсивного виведення надлишку цих іонів з організму (2), а також усунення загального окислювального стресу (3), який додатково утворюється опосередкованою дією надлишку цих іонів на системи клітин

печінки [15–20], а як відомо, окисний стрес сам по собі впливає на підвищення синтезу апоМТ, тобто вони є поліфункціональними молекулами «стресу» [21, 22, 61].

На наступному етапі робили порівняльний аналіз спектрів для ідентифікованої ділянки з апоМТ у різних дослідних групах. Інтактні тварини. З Рис. 3.3 Б видно, що у групі інтактних молодих тварин (спектр 1) інтенсивність піку 6200 Да, яка імовірно відповідає апоМТ, слабо виражена, однак при цьому у інтактних старих тварин (спектр 3) інтенсивність вимірювання для цього білка була значно вищою, як і піків для діапазону 6200–6500 Да, тобто, не дивлячись на те, що про вміст апоМТ можна казати тільки з якісної точки зору, кількість цього білка в печінці, а також його варіантів (МТ), зв'язаних з іонами металів (цинк, мідь та інші) у інтактних старих тварин значно вище, аніж у молодих.

Отже, металотіонеїни (МТ) у певних кількостях присутні у інтактних тварин різного віку, однак вихідний рівень МТ у старих тварин вищий, аніж у молодих, що може бути пов'язано з онтогенезом: за рахунок більш тривалого часу життя старі тварини «встигли» сформувати певний необхідний пул стрес-білків у якості наслідку під час адаптації до негативних факторів середовища (зміна сезонів, зустріч з інфекційними агентами, інші запальні реакції в організмі) [22, 122]; що, крім того, узгоджується з раніше отриманими даним з дослідження адаптивного потенціалу молодих та старих тварин до летальних доз 5-водної сірчаної кислоти міді, де показано, що групова стійкість старих інтактних тварин на 20–40% більша в порівнянні з молодими, а час смерті більш розтягнутий у часі, тобто присутні темпоральні відмінності [85, 86].

Для тварин, які отримували нелетальні адаптивні дози 5-водної сірчаної кислоти міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) було показано: у молодих інтенсивність піку з молекулярною масою 6200 Да багаторазово збільшувалася порівняно з інтактним рівнем (Рис. 3.3 Б, спектр 2 порівняно з 1), тобто спостерігалася індукція синтезу

апометалотіонеїнів (апоМТ) на фоні введення адаптивних доз 5-водної сірчаноокислої міді. Інтенсивність для цього білка багаторазово збільшувалася і у старих тварин (спектр 4), однак при цьому вона була меншою, порівняно з молодим дослідом.

Узагальнення. Формування резистентності у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки, що характеризується підвищенням групового виживання до летальних доз 5-водної сірчаноокислої міді (Рис. 2.3) супроводжується індукцією синтезу металотіонеїнів (МТ) як у молодих, так і старих тварин. Ці результати підтверджують гіпотезу про те, що МТ можуть виступати як один з важливих механізмів у формуванні адаптивного потенціалу до іонів міді. Незважаючи на те, що в даній дисертаційній роботі не досліджувалися ізоформи МТ, які беруть безпосередню участь у зв'язуванні та транспорті надлишку іонів міді у нашій моделі, сьогодні відомо, що у цілому в печінці один з найбільших пулів цих білків (основна ізоформа представлена 1 типом) [60]. При цьому отримані результати вказують на те, що для запуску синтезу МТ клітинами печінки організму необхідно стикатися зі стрес-факторами зовнішнього середовища, специфічних до цих білків, і які прямо або опосередковано будуть включати триплети і запускати транскрипцію відповідних генів. Хоча в нормальних умовах ці білки присутні в клітинах печінки молодих тварин, проте цієї кількості недостатньо для протидії «жорстким» факторам зовнішнього середовища — летальним і (частково) токсичним, які можуть призводити до летальності (Рис. 1.1 в, г). До того ж, підвищення кількості МТ у клітинах печінки з віком (або після індукції «м'якими» стрес-факторами) вказує на те, що МТ пов'язані і з ефектом гормезису, тобто вони є елементом придбанної стійкості [38]. Однак з отриманих результатів важко відповісти на питання, який саме внесок у механізми індукованої стабільності пов'язаний саме з МТ: чи беруть вони безпосередню участь у виведенні; як саме взаємодіють з іншими білками і чи може ця можлива взаємодія бути частиною їх внеску у формуванні стійкості?

З Рис 3.1 видно, що не дивлячись на збільшення зв'язування іонів міді фракцією низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) (містять металотіонеїни (МТ)) після другого циклу введення 5-водної сірчаної кислоти міді через 30 днів, інші фракції печінки (цитозоль, ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії) все одно беруть на себе частину цих іонів. Крім того, фракція мітохондрій старих тварин взагалі підвищує специфічність цього зв'язування (Рис. 3.1 2 цикли порівняно з 1 циклом для 20 міс. тварин), як і фракція НБ обох вікових груп; було припущено, що це може бути пов'язано з взаємодією синтезованих апоМТ з мітохондріями старих тварин, бо відомо, що з віком в мітохондріях відбуваються зсуви в їх метаболізмі, а саме: збільшення утворення реактивних форм кисню на фоні зниження окисного фосфорилування [123] — це може залучати МТ, пул яких зберігається після виведення іонів міді з організму. Однак це все одно не відміння порушення іонами міді структури інших білків у цих фракціях печінки. Тоді чому в даному випадку (після адаптивних введеннь) спостерігається підвищення виживання до однієї і тієї ж дози токсиканту, хоча в обох випадках печінка бере на себе основний удар, щоб не постраждали інші органи? Можливих відповідей на це питання може бути декілька.

По-перше, після введення адаптивних доз стійкість до летальних не обмежується формуванням пулу МТ, а охоплює й інші білки транспортери [21, 22, 52–57], які загалом можуть формувати швидку мережу для зв'язування та виведення надлишку іонів міді, однак раніше отримані дані [124] про склад церулоплазміна (основний мідь вмісний білок сироватки крові) при Си-індукованому фіброзі показав, що достовірних підвищень чи знижень цього білка порівняно з інтактним рівнем немає, хоча на перший погляд було б логічно, якби він брав участь у формуванні стійкості до летальних доз 5-водної сірчаної кислоти міді, яку вводили внутрішньоочеревинно. Тому ідею про формування мережі на даному етапі було відхилено через нестачу необхідних експериментальних даних.

По-друге, це може пояснюватися темпоральною оптимальністю (Рис. 1.1, 1), тобто — чим швидше іони міді зв'яжуться зі специфічними

молекулами і не зачеплять функціонування інших білків печінки, особливо ферментів, тим вірогідність критичного зміщення гомеостазу нижча. У цілому ця ідея посиляється на таке фундаментальне поняття з імунології як «імунологічна пам'ять», коли швидкість специфічної відповіді на повторну зустріч з антигенами значно вища порівняно з першою, що забезпечується збереженням генетичної інформації у клітинах-пам'яті — лімфоцитах [125]. Однак ця гіпотеза все одно не може повністю відповісти на питання, чому зв'язування з іншими білками фракцій печінки, навіть незважаючи на збільшення вмісту пулу металотіонеїнів значно підвищує виживання тварин [86]. Більш того, в інших раніше опублікованих роботах [126] було показано, що при Cu-індукованому фіброзі печінки (1 цикл введення 5-водної сірчаної кислоти міді) активність таких класичних ферментів печінки як АЛТ, АСТ і ГГТ швидко приходить в норму і достовірно не відрізняється від інтактного рівня.

Було висловлено припущення, що металотіонеїни (МТ) здатні не просто зв'язувати іони міді та конкурувати з ними з іншими білками за рахунок більшої спорідненості [127], але й повертати ці іони назад цим молекулам для «підбору» таких конформаційних варіантів, які б залишали активний центр незачепленим, тобто припущено, що МТ здатні акліматизувати ці білки. Опосередковано це може підтверджуватися і отриманими даними зі зв'язування іонів міді МТ (Рис. 3.3 В), бо, як було зазначено (Рис. 3.2), існує дві моделі зв'язування іонів металів МТ: кооперативне та некооперативне. Якби б ми спостерігали кооперативне зв'язування, тобто дуже високу спорідненість до іонів міді МТ, тоді б на мас-спектрах для наших зразків це відобразалося б у вигляді утворення великого піку в діапазоні мас 6600–6700 (як показано на моделі Рис. 3.4 А, III); а у такому випадку казати про обмін іонами міді МТ з іншими білками було б важко. Однак одна з таких прогнозованих моделей на практиці була іншою і відповідала моделі некооперативного зв'язування (Рис. 3.4 А, II; Б), тобто зв'язування МТ з кожним новим іоном міді не робить цей білок більш специфічним до зв'язування з наступним іоном. Таким чином, якщо МТ зв'язують більш ніж один іон міді, є вірогідність, що у подальшому вони можуть

взаємодіяти з іншими білками для передачі/повернення надлишків цих іонів, а це у свою чергу буде допомагати зберегти активний центр цих білків в робочому стані.

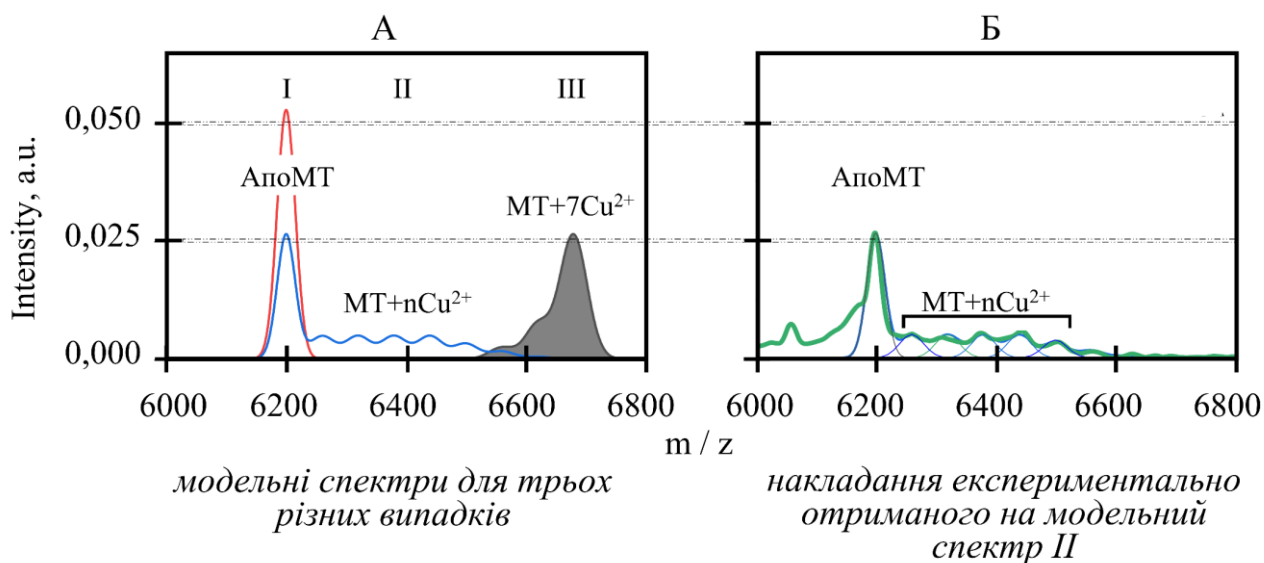


Рис. 3.4. Моделі спектрів MALDI-TOF для трьох випадків зв'язування МТ з іонами міді (А), де АпоМТ (I) — варіант, у якому МТ не зв'язували іонів міді, МТ+nCu²⁺ — варіант, у якому МТ зв'язуються некооперативно, а МТ+7Cu²⁺ — варіант, у якому МТ зв'язуються кооперативно, а всі ділянки зв'язування для двовалентного варіанта заповнені повністю; при цьому (Б) експериментально показано, що отриманий спектр для молодих тварин, які отримували 1 цикл міді (зелена крива) співвідноситься з його модельним спектром II (МТ+nCu²⁺) (блакитні криві) з вираженим піком для варіанта з апоМТ, що відповідає некооперативному зв'язуванню.

Отже, незважаючи на свою спорідненість до іонів двовалентної міді, металотіонеїни (МТ) не проявляють жорсткої специфічності і не «прагнуть» зв'язати максимум (7 іонів для цього елементу). Отримані дані свідчать про те, що механізм зв'язування іонів міді з МТ відповідає некооперативній моделі, що дозволяє припустити наявність двоспрямованого обміну цих іонів між МТ і іншими білками фракцій печінки. Такий двоспрямований обмін може казати про

те, що МТ здатні не тільки функціонувати як тимчасове депо для атомів міді, а й переносити мідь іншим білкам. Щоб додатково уточнити це припущення, на наступному етапі було досліджено утворення комплексів іонів міді з різними білками фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) — метою було дослідити специфічність зв'язування усіх білків у зразках НБ для чотирьох отриманих груп тварин шляхом забезпечення цих білків доступності до іонів міді в умовах *in vitro*.

3.1.4. Дослідження утворення комплексів іонів міді з різними білками фракції низькомолекулярних білків цитозоля *in vitro*

Для дослідження утворення комплексів іонів міді з різними білками фракції низькомолекулярних білків (НБ) цитозоля печінки в зразки НБ молодих дослідних тварин, які до цього отримували 1 цикл введення 5-водної сірчаної міді *in vivo*, в умовах *in vitro* вносили додатково розчин сірчаної міді у концентрації 0,25 мг/1 мл для подальшого мас-спектрометричного аналізу. Було показано, що мас-спектри для комплексів з міддю в системі *in vitro* тепер були виявлені для багатьох білків фракції НБ в діапазоні 6000–12000 Да (Рис. 3.5), тобто ці білки зв'язували від одного до декількох атомів міді і його молекулярна маса відрізнялася на одну атомну масу атома міді — 63,5 Да, що особливо чітко простежувалося для піків в діапазоні мас 8400-8800 та 9800-10200 Да (Рис. 3.5 Б та В, синій спектр *in vivo* + *in vitro* порівняно з червоним *in vivo*). При цьому суперечлива картина спостерігається в діапазоні мас для досліджуваного діапазону з металотіонеїнами (6000–6400 Да), де хоч і з'являються зсуви на масу атомів міді, однак, по-перше, вони не повністю співвідносяться з контрольними піками для молодих тварин і, по-друге і найголовніше, в таких умовах зникають раніше ідентифіковані послідовні піки, які відрізняються на масу атома міді, більш того — не спостерігаються нові добре виражені варіанти для діапазону 6200–6500 Да, які б характеризували утворення комплексів вільних апоМТ з іонами міді, хоча на мас-спектрі можна побачити варіанти з 1 та 2 приєднаними атомами міді (6180 Да та наступні за ним

6238 та 6290 Да), які приблизно відповідають контрольному варіанту (Рис. 3.5 А, синій спектр *in vivo* + *in vitro* порівняно з червоною *in vivo*). Однак незважаючи на це, очікуваних варіантів, де б утворювалася велика кількість високоінтенсивних піків для цього діапазону як у контрольному варіанті для молодих тварин (червона крива *in vivo*), які б відрізнялися на масу атома міді і фактично характеризували високу специфічність зв'язування досліджуваних МТ з цими іонами за таких умов *in vitro* не виявлялося, тобто ідентифіковані апоМТ з молекулярною масою близько 6200 Да виявляють не набагато вищу спорідненість до іонів міді порівняно з іншими білками фракції НБ цитозоля печінки; що у цілому співвідноситься з деякими даними [60], за якими зв'язування іонів міді МТ порівняно з іншими важкими металами може бути менш специфічним за рахунок біологічної особливостей самого іона, а саме — через його «есенціальність» — легше зв'язування з іншими білками. Таким чином, специфічність зв'язування надлишку іонів міді МТ в умовах *in vitro* може бути знижена через конкуренцію з іншими білками.

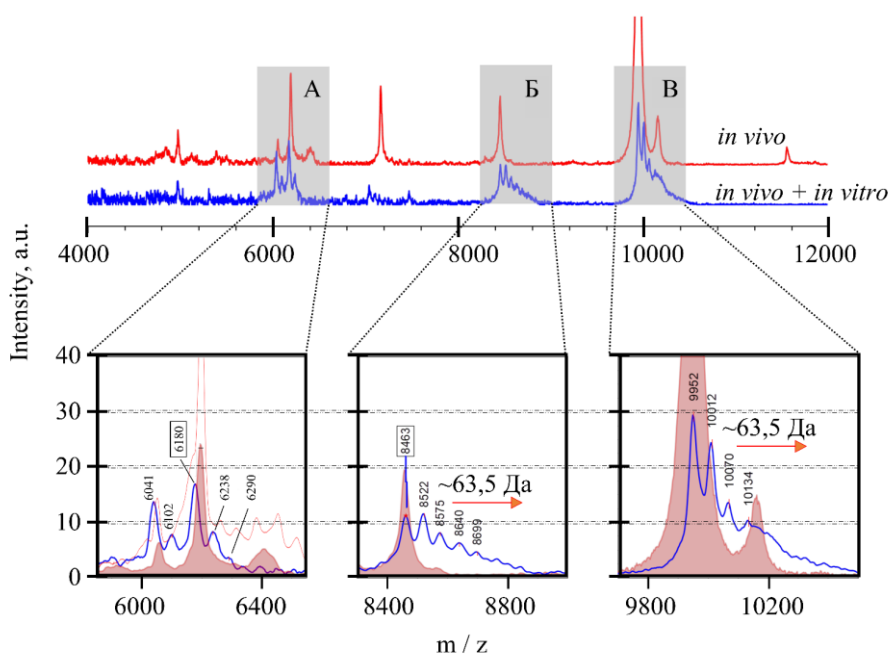


Рис. 3.5. Мас-спектри фракції низькомолекулярних білків (НБ) цитозоля печінки молодих пацюків контрольних (червона крива *in vivo*), які отримували 1 цикл 5-водної сірчанокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48

годин), і цих же фракцій НБ (синя крива *in vivo* + *in vitro*) після додавання *in vitro* розчину 5-водної сірчаної кислоти міді у концентрації 0,25 мг/1 мл зі збільшеними варіантами для діапазонів 6000–6400 (А), 8400–8800 (Б) та 9800–10200 (В) Да.

Крім того на Рис. 3.5 А спостерігається ще один варіант зв'язування іншого білка з 1 атомом міді (пік 6041 Да та його варіант 6102 Да з міддю). Як було раніше сказано, цей пік розглядався як можливий варіант для апоМТ, однак після аналізу ця ідея була відхилена, а нові спостереження з утворенням піка 6102 Да підтверджую, що, скоріш за все, це інша макромолекула, яка швидше за все належить іншому низькомолекулярному білку у цьому діапазоні мас, і, ймовірно, теж може відповідати за зв'язування іонів металів, проте обговорювати його більш детально або давати будь-які твердження на даному етапі немає можливості, враховуючи, що картина розподілу для нього та наступного піку з молекулярною масою близько 6200 Да не відповідає існуючим моделям кооперативного/некооперативного зв'язування.

Узагальнення. Можна припустити, що зв'язування іонів міді з низькомолекулярними білками (НБ) цитозоля печінки пацюків в системі *in vitro* буде відрізнятися від зв'язування в клітині *in vivo*, коли інші системи як клітини, так організму в цілому будуть брати участь у цьому процесі. Однак отримані результати з мас-розділення молекул фракції НБ вказують на те, що металотіонеїни (МТ), по-перше, беруть активну участь у зв'язуванні надлишку іонів міді у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки, при цьому, по-друге, їх взаємодія з цими іонами відповідає некооперативній моделі (Рис. 3.2 та 3.4), однак, по-третє, не дивлячись на те, що вони здатні зв'язувати відносно великі кількості двовалентної міді, інші білки все одно конкурують з ними за цей іон, що, по-четверте, може приводити до акліматизації структур цих білків через постійний обмін іонами міді між ними та МТ.

Таким чином, сформований пул металотіонеїнів (МТ) після адаптивних введень 5-водної сірчаної кислоти міді здатен підвищувати стійкість організму до

летальних доз цього токсиканту, однак отриманні дані свідчать і про те, що це не заважає іншим білкам печінки теж зв'язувати ці іони і, частково (порівняно з інтактними тваринами), зберігати свій функціонуючий стан, що обумовлено наявністю МТ, які беруть на себе частину надлишку і прямо знижують окисний «удар» на організм.

На основі отриманих даних можна припустити наявність і опосередкованого зниження цього окисного удару іонами міді за рахунок збереження активності антиоксидантних ферментів. Відомо, що зазвичай при розгляді токсичної дії іонів важких металів у першу чергу розглядають два основні механізми:

Перший — компоненти антиоксидантної системи, які забезпечують захист від активних форм кисню та інших радикалів.

Другий — утворення нових комплексів іонів важких металів з ферментами, що, як наслідок, може призводити до пригнічення активності цих функціонально-активних макромолекул [128].

На основі даних мас-спектрів фракції низькомолекулярних білків цитозоля вже було припущено, що МТ здатні не просто зв'язувати іони міді, а й взаємодіяти з іншими системами захисту на рівні білків, у тому числі з ферментами, або за рахунок прямого обміну з ними цими іонами, або комплексно окремо. Для того, щоб перевірити можливість цього, було досліджено антиоксидантну активність клітин печінки (гідроперекиси ліпідів, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза та аконітаза) молодих та старих тварин після зв'язування надлишку іонів міді з металотіонеїнами та іншими білками.

3.1.5. Деякі характеристики антиоксидантної системи на фоні зв'язування надлишку іонів міді з металотіонеїнами та іншими білками

Відомо, що один з механізмів захисту клітин від окисного стресу пов'язан з активацією ключових ферментів нейтралізації активних форм кисню, таких як перекиси, якими у тому числі є продукти окиснення ліпідів (гідроперекиси

ліпідів) [129]. До цих ключових ферментів відносяться глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза, які нейтралізують продукти вільно-радикальних реакцій.

Відомо, що з однієї сторони активність антиоксидантних ферментів може збільшуватись у кілька разів з утворенням активних форм кисню в організмі [129], тобто з підвищенням окислювального стресу під дією негативних факторів середовища; проте з іншої сторони є інформація, що надлишок саме іонів міді здатний пригнічувати активність цих ферментів, порушуючи їх нормальне функціонування, зв'язуючись з певними ділянками [130], що буде призводити, навпаки, до зниження їх активності. Було припущено, що формування пулу металотіонеїнів після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді (Рис. 3.3) здатне призводити до зменшення цього негативного ефекту на ферменти антиоксидантної системи.

Глутатіонпероксидаза. Було показано, що активність ключового ферменту антиоксидантного захисту, а саме глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки дослідних тварин після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) пригнічується на 20–21% (з 94,3 до 75,9 нмоль/хв мг білка для молодих тварин і з 391,7 до 308,8 нмоль/хв мг білка для старих), однак достовірно ($p < 0,05$) лише для старих тварин (Рис. 3.6). Пригнічення активності глутатіонпероксидази (ГПО) свідчить про те, що, не дивлячись на здвиг балансу в сторону утворення активних форм кисню, надлишок іонів міді впливає на її активність і частково інгібує її, що може бути однією з причин посилення ураження гепатоцитів та запуску фіброгенезу у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки при нелетальних дозах та/або смерті при летальних. При цьому зв'язок ГПО після введення 5-водної сірчаноокислої міді з даними мас-спектрів отриманими для цих груп і ідентифікації металотіонеїнів не простежується. Однак інтерес викликають отримані результати для інтактних молодих та старих тварин, порівняння між якими на цьому етапі не планувалося.

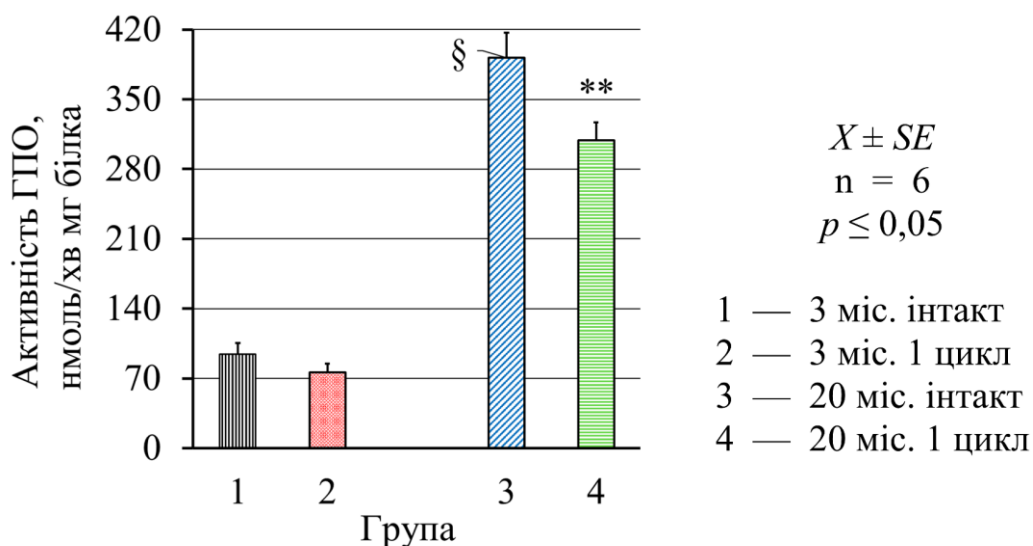


Рис. 3.6. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) у мітохондріях печінки молодих та старих інтактних тварини (1 та 3) і молодих та старих тварин, яким вводили нелетальні адаптивні дози 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) (2 та 4); ** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих інтактних тварин у порівнянні з молодими інтактними тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (H-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 6 пар порівнянь ($p \leq 0,008$)).

Відомо, що з віком процеси утворення радикалів превалюють порівняно з процесами їх знешкодження антиоксидантами [131], а активність необхідних ферментів, у тому числі глутатіонпероксидази (ГПО) зменшується, однак в цій роботі за даними для активності ГПО у інтактних тварин спостерігається протилежна картина — активність ГПО у старих тварин достовірно вища у декілька разів порівняно з інтактними молодими тваринами (Рис. 3.6, стовп 3 порівняно зі стовпом 1). При цьому з даних виживання за Каплан–Мейєром у

нашій моделі (Рис. 2.3 А) введення летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді у старих інтактних тварин спостерігається темпорально-підвищена стійкість до цього токсиканту в порівнянні з молодими тваринами, тобто вони гинуть повільніше, а групове виживання не достовірно, але вище. Крім того, дані мас-розподілу та ідентифікація m/z металотіонеїнів (МТ) показали, що початковий (інтактний) рівень МТ у старих тварин вищий, ніж у молодих (Рис. 3.3 А, Б). Таким чином, отримані дані з активності ГПО для інтактних тварин корелюють з результатами дослідження МТ для інтактних тварин, а більш висока активність цього ферменту у старих тварин може бути пов'язана і з їх підвищеною стійкістю до летальних доз 5-водної сірчаноокислої міді, за рахунок якої вони більш захищені на рівні оксидативного стресу (Рис. 2.3 А). Як і у випадку з металотіонеїнами більш висока активність ГПО може бути пов'язана з адаптацією до навколишнього середовища за рахунок більш тривалого онтогенезу, а також активації альтернативних шляхів на тлі формування вік-залежних патологій, однак, щоб краще розібратися в цьому, варто дослідити інші компоненти антиоксидантної системи.

Глутатіонредуктаза. Для нормальної роботи глутатіонпероксидази (ГПО) в процесах нейтралізації гідроперекисів ліпідів необхідний кофактор у формі активного глутатіону, який у свою чергу перетворюється в цих реакціях нейтралізації в окиснений продукт [127]. Для його подальшого відновлення в активний глутатіон та взаємодії з ГПО необхідний ще один фермент антиоксидантного захисту — глутатіонредуктаза.

Було показано, що активність глутатіонредуктази в мітохондріях печінки дослідних тварин після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) достовірно менша на 19% у молодих тварин (з 33,1 до 26,9 нмоль/хв мг білка), тоді як у мітохондріях старих тварин вона не відрізнялася від інтактного рівня (21,1 і 20,4 нмоль/хв мг білка відповідно для інтакта та досліда) (Рис. 3.7).

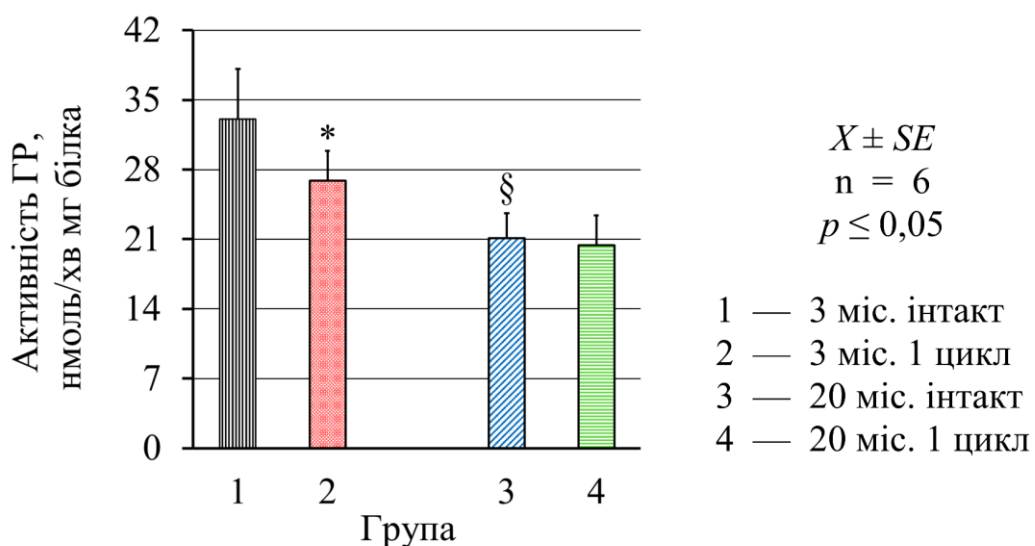


Рис. 3.7. Активність глутатіонредуктази (ГР) у мітохондріях печінки молодих та старих інтактних тварини (1 та 3) і молодих та старих тварин, яким вводили нелетальні адаптивні дози 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) (2 та 4); * — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих інтактних тварин у порівнянні з молодими інтактними тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (Н-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 6 пар порівнянь ($p \leq 0,008$)).

Зменшення активності глутатіонредуктази (ГР) у молодих тварин після введення 5-водної сірчаноокислої міді може свідчити про достатньо велике підвищення оксидативного стресу в організмі через ушкодження клітинних структур печінки надлишком іонів міді. Зазвичай більш «м'яка» дія важких металів на організм [131], навпаки, стимулює підвищення ГР, а у нашому випадку наявне протилежне. Схожа картина спостерігалася і для глутатіонпероксидази (Рис. 3.6.). Таким чином, триразове введення 5-водної сірчаноокислої міді у дозі, яка складала 1/3 від летальної на 1 г печінки, призводить до пригнічення ефективності антиоксидантної системи у цілому.

Цікаво, що, не дивлячись на відмінності в активності глутатіонредуктази (ГР) у старих інтактних тварин порівняно з молодими інтактними тваринами (вона в них достовірно менша на 36%) (Рис. 3.7, стовп 3 порівняно зі стовпом 1), варіант з міддю у старих тварин для ГР не змінювався і залишався на вихідному рівні на відміну від молодих, тобто іони міді не впливали на його активність і це мало вік-залежний характер. З одного боку це може бути пов'язано з більшою активністю глутатіонпероксидази (ГПО) у старих тварин (Рис. 3.6), тобто підвищений вихідний рівень цього ферменту зменшує навантаження на ГР, а отже зменшує і запуск їх синтезу, що опосередковано може вказувати і на підвищений вихідний рівень активного глутатіону у старих інтактних тварин порівняно з молодими інтактними тваринами, однак на фоні достатньо високої інтоксикації організму іонами міді це виглядає не зовсім логічно. З іншого, якщо рівень активного глутатіону насправді не корелює з ГПО у старих тварин, — збереження активності ГР після введення 5-водної сірчаноокислої міді може вказувати і на можливі інші адаптивні механізми, які зберігають цей показник на інтактному рівні. Щоб спробувати відповісти на це питання, було досліджено вміст одного з радикалів, у циклі нейтралізації якого беруть участь глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза, — гідроперекиси ліпідів у мітохондріях печінки.

Гідроперекиси ліпідів у мітохондріях печінки. Показано, що вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) в мітохондріях печінки дослідних тварин після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) збільшувався на 30% у молодих тварин (з 0,257 до 0,333 нмоль МДА, однак недостовірно через недостатню потужність експерименту) і достовірно на 112% у старих тварин (з 0,159 до 0,337 нмоль МДА) (Рис. 3.8). Ці результати з одного боку підтверджують, що як молоді, так і старі тварини зазнають значний окислювальний стрес і пошкодження клітин печінки на фоні введення 5-водної сірчаноокислої міді, однак з іншого і це найголовніше — показують, що, незважаючи на підвищену активність

глутатіонпероксидази (ГПО) у старих тварин у порівнянні з молодими (Рис. 3.6), а також відсутності у них змін в активності глутатіонредуктази (ГР) на фоні інтоксикації організму іонами міді (Рис. 3.7), окислювальний стрес у старому організмі на рівні утворення активних форм кисню насправді більший, ніж у молодих, — це спростовує попередні припущення після аналізу цих антиоксидантів (ГПО та ГР), що у старих тварин вихідний рівень активного глутатіону може бути вищим.

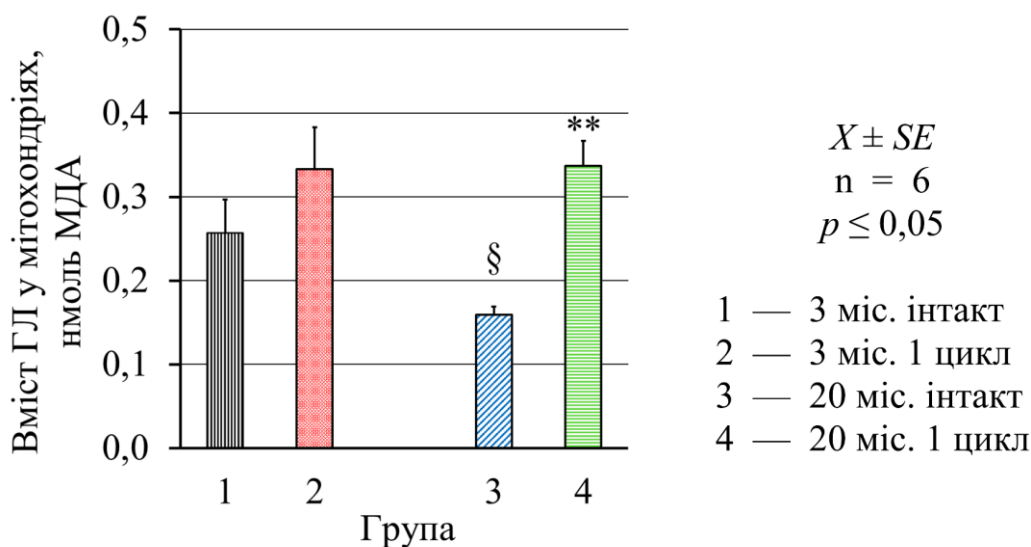


Рис. 3.8. Вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) у мітохондріях печінки молодих та старих інтактних тварини (1 та 3) і молодих та старих тварин, яким вводили нелетальні адаптивні дози 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) (2 та 4); ** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих інтактних тварин у порівнянні з молодими інтактними тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (H-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 6 пар порівнянь ($p \leq 0,008$)).

При цьому підвищений вміст гідроперекисів ліпідів після інтоксикації організму трьома адаптивними введеннями 5-водної сірчаноокислої міді, доза яких в сумі дорівнювала летальній, характеризувався різницею (збільшення у старих тварин по відношенню до їх інтактного рівня порівняно зі збільшенням у молодих до їх інтактного рівня) майже в 2,5 рази (Рис. 3.7), і це може свідчити про те, що:

— по-перше, механізм темпорально-підвищеної стійкості у старих тварин до одноразового введення летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді (Рис. 2.3 А) пов'язаний не з більш ефективною роботою антиоксидантної системи, а з іншими механізмами.

— по-друге, ці механізми пов'язані з можливістю швидше знешкоджувати токсичні іони міді, тобто ці механізми частково захищають від прямої дії іонів міді, однак подальше порушення роботи клітин цими іонами (тими, які залишилися і не були знешкоджені) супроводжується збільшенням окисного стресу, який настає пізніше за часом, однак в кінці кінців не на багато зменшує смертність тварин у групі порівняно з їх молодими варіантами.

Таким чином, враховуючи ці, а також отримані дані мас-спектрів для інтактних тварин, де у старих тварин спостерігається більш виражені піки для низькомолекулярних білків цитозоля, ідентифікованих як металотіонеїни (МТ) (Рис. 3.3 А, Б), а у варіантах з введенням нелетальних доз 5-водної сірчаноокислої міді — ще й багаторазове збільшення інтенсивності для цих піків з МТ для обох вікових груп (Рис. 3.3 Б, В), можна прямо казати про безпосередню роль МТ у знешкодженні надлишку іонів міді у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки, і чим більший пул цих білків, тим імовірність виживання буде вищою.

Розтягнута у часі групова стійкість старих тварин пов'язана саме з наявністю пулу таких низькомолекулярних білків у печінці, але, більш того, можна припустити, що пул таких білків знаходиться і в інших органах після індукцій металотіонеїнів (МТ) введеннями нелетальних доз 5-водної сірчаноокислої міді. Хоча в рамках цієї роботи подібне не досліджувалося, проте про це можна опосередковано судити з розповсюдженості МТ у тканинах та

органах загалом [21, 22, 60], а також зі спостережень прояву гострої токсичності до летальних доз 5-водної сірчаної кислоти міді у молодих тварин, яка настає впродовж перших 24 годин через гостру дихальну недостатність — страждає насамперед дихальна система, тобто негативний вплив іонів міді має загальний характер на фоні пригнічення роботи печінки. Крім того, формування стійкості до летальних доз після введення нелетальних адаптивних доз (Рис. 2.3 Б, В) може говорити і про те, що нехай печінка і бере на себе основний удар, але адаптація на рівні збереження пулу низькомолекулярних білків відбувається і в інших органах організму. Однак остаточною відповідь на це запитання потребує подальших досліджень розподілу МТ у різних органах у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки. На зараз ці припущення можна додатково підкріпити інформацією про стан антиоксидантної системи в організмі, у зв'язку з чим було проаналізовано активність аконітази печінки та вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові.

Аконітаза. Показником функціональної активності мітохондрій може виступати активність аконітази, яка, крім своєї безпосередньої участі в циклі Кребса (каталізує реакції утворення проміжних продуктів, а саме перетворення цитратної кислоти на ізоцитратну для метаболічних шляхів), також відіграє значну роль у захисті клітин від активних форм кисню, що робить її важливим показником окислювального стресу та загального метаболічного стану організму [132].

Показано, що вміст аконітази дослідних тварин після 1 циклу введення 5-водної сірчаної кислоти міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) зменшується майже у 2 рази як для молодих, так і для старих тварин, при цьому вік-залежні особливості повністю відсутні (Рис. 3.9), і хоча отримані відмінності статистично не підтверджуються через недостатню потужність експерименту, у цілому ці дані співвідносяться з результатами активностей глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази (Рис. 3.6 та 3.7), а також корелюють зі збільшенням гідроперекисів ліпідів у мітохондріях (Рис. 3.8).

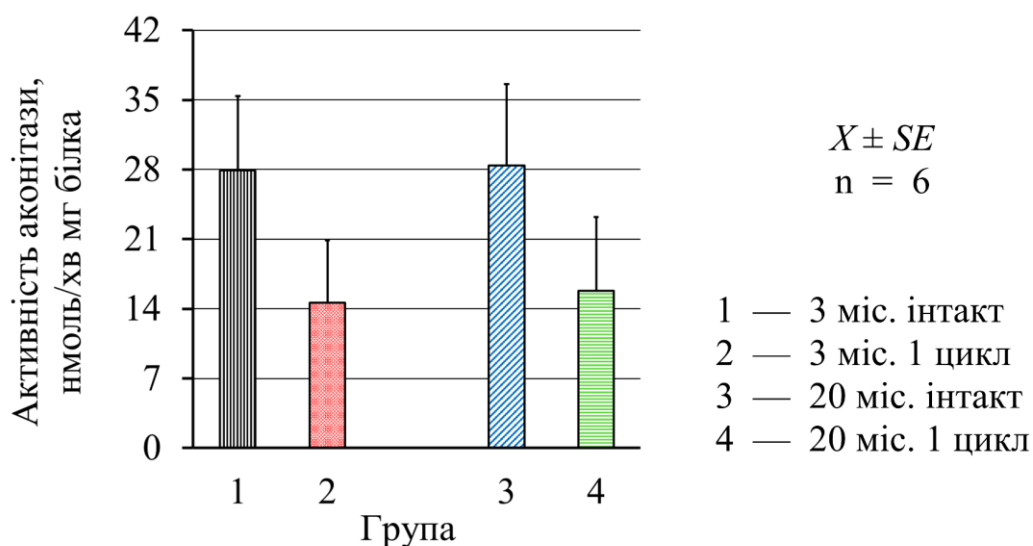


Рис. 3.9. Активність аконітази у мітохондріях печінки молодих та старих інтактних тварини (1 та 3) і молодих та старих тварин, яким вводили нелетальні адаптивні дози 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) (2 та 4).

Завершуючи аналіз антиоксидантної системи, її співставлення з результатами мас-спектрів та ролі металотіонеїнів, було досліджено гідроперекиси ліпідів у сироватці крові, вміст яких більш цілісно віддзеркалює окислювальний стрес всього організму.

Гідроперекиси ліпідів у сироватці крові. Показано, що вміст гідроперекисів ліпідів дослідних тварин після 1 циклу введення 5-водної сірчаноокислої міді (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) достовірно збільшується майже в 2 рази як у молодих, так і старих тварин (Рис. 3.10), що узгоджується з даними їх вмісту в мітохондріях та в цілому з отриманими результатами з дослідження антиоксидантної системи (Рис. 3.6–9); тобто баланс в системі прооксидант-антиоксидант зсувається у бік збільшення прооксидантних механізмів та пригнічення антиоксидантних механізмів.

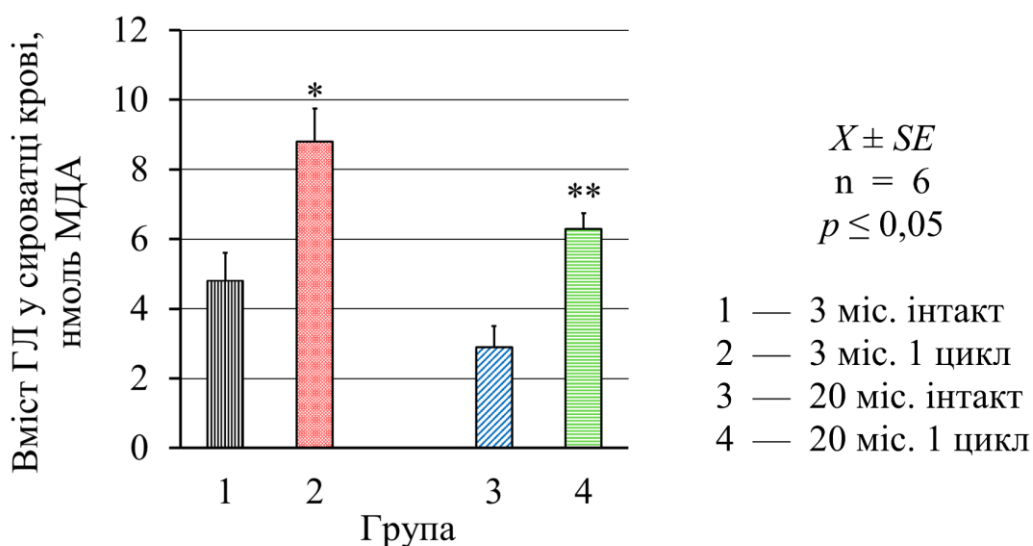


Рис. 3.10. Вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) у сироватці крові молодих та старих інтактних тварини (1 та 3) і молодих та старих тварин, яким вводили нелетальні адаптивні дози 5-водної сірчаноокислої міді 1/3 від летальної 1 цикл (3 введення в дозі 0,23 мг/1 г печінки кожні 48 годин) (2 та 4); * — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; ** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (H-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 6 пар порівнянь ($p \leq 0,008$)).

3.1.6. Хронічна дія етанолу як індуктора адаптивної відповіді у тварин різного віку на деякі біохімічні маркерні показники

Хронічне вживання етанолу має глибокий вплив на тварин усіх вікових груп, спричиняючи каскад фізіологічних, зокрема адаптаційно-патологічних, змін, які спрямовані на пристосування до його токсичної дії на організм [28, 35, 71, 83, 84]. При цьому ці адаптації зазвичай можуть мати системний характер, тобто вони можуть проявлятися на різних ієрархічних рівнях (принцип ієрархічності) (Рис. 1.1, 3), що з одного боку дозволяє ефективно використовувати модель випаювання тварин розчином етанолу для

дослідження тривалої дії негативного фактора середовища, а з іншого — ускладнює підбір необхідних показників для інтерпретації отриманих ефектів, враховуючи, що існують певні методичні обмеження лабораторій і неможливість проаналізувати всі рівні, які могли б характеризувати реакцію у відповідь на дію токсиканту, що у цілому стосується і багатьох інших досліджень. Однак при цьому основне знешкодження етанолу відбувається у печінці, а його дія при цьому може призводити до патології різного ступеня тяжкості, включаючи у тому числі формування фіброзу, що робить використання цього токсиканту зручною моделлю для протиставлення більш «жорсткої» моделі Си-індукованого фіброзу. У зв'язку з цим у рамках дисертаційної роботи було проаналізовано лише деякі біохімічні показники в динаміці (на 0, 10, 20 та 40 день прийому 6–15% розчину етанолу, де «0» день відповідає інтактному рівню), які пов'язані з метаболізмом етанолу та його фізіологічними проявами впродовж 160 днів (Рис. 2.8). Однак у першу чергу аналіз впливу випаювання розчином етанолу потрібно почати з основного ферменту, який бере безпосередню участь у його знешкодженні (окисненні до ацетальдегіду), — алкогольдегідрогенази (АДГ), яку аналізували у цитозолі печінки (Розділ 2.4.2). АДГ фактично є першим і найголовнішим етапом у метаболізмі етанолу, бо, відомо, що тварини, у яких слабовиражена активність цього ферменту або є генетичні відхилення в його синтезі, не можуть ефективно справлятися з надходженням цього токсиканту до організму, що прямо корелює з їх смертністю [133].

Алкогольдегідрогеназа. Динаміка активності алкогольдегідрогенази у цитозолі печінки молодих та старих пацюків на тлі тривалого випаювання 6–15% розчином етанолу мала різний характер, однак при цьому на 40 день експерименту достовірно пригнічувалась в обох вікових групах: з 100,2 до 60,8 нмоль НАДН/хв на 1 мг білка у молодих і з 253,8 до 75,1 у старих (Рис. 3.11, 40 днів порівняно з 0). При цьому у інтактних варіантів різних вікових груп (0 день) спостерігається відмінність більш ніж у 2,5 рази: активність цього ферменту з

віком збільшується, що може бути пов'язано з ендогенним синтезом невеликих кількостей етанолу у продовж усього життя дією мікрофлори шлунково-кишкового тракту або деякими ферментативними шляхами [133], однак у цілому ці відмінності у декілька разів, які до того ж несильно змінюються навіть після 10 днів випаювання етанолом (Рис. 3.11, 0 та 10 днів), найімовірніше, мають загально-фізіологічну природу і пов'язані зі змінами у функціонуванні різних систем організму у цілому, тобто наявні вік-залежні особливості в активності цього ферменту.

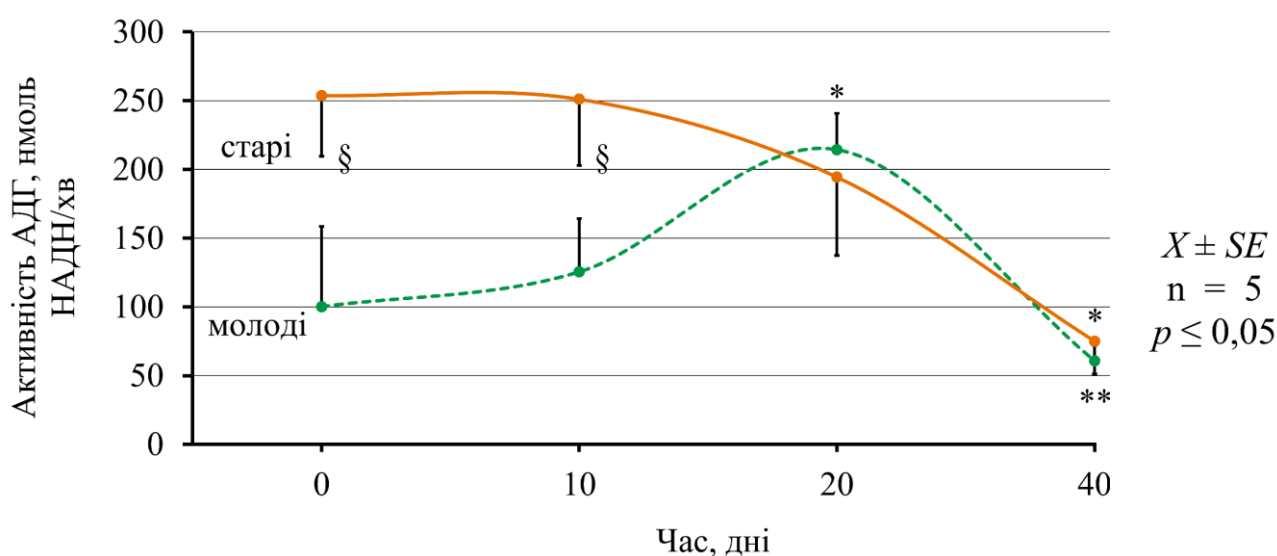


Рис. 3.11. Активність алкогольдегідрогенази (АДГ) в цитозолі печінки молодих та старих інтактних тварини (0 день) і молодих та старих тварин на 10, 20 та 40 день випаювання 6–15% розчином етанолу (6% перший тиждень, далі — 15%); * — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; ** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного *U*-тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 4 пар порівнянь ($p \leq 0,01$).

Незважаючи на нормальне функціонування алкогольдегідрогенази впродовж перших 10 днів випаювання і враховуючи різний початковий рівень активності цього ферменту, до 20 дня випаювання спостерігаються протилежні ефекти в характері динаміки цього ферменту у тварин різного віку.

Було показано, що активність алкогольдегідрогенази (АДГ) у старих тварин починає зменшуватися, і при цьому цей процес є односпрямованим, тобто варіантів з підвищенням його активності не спостерігалось (Рис. 3.11).

У той же час було показано, що активність алкогольдегідрогенази (АДГ) у молодих тварин достовірно підвищувалася до 20 дня більш ніж у 2 рази (з 100,2 до 214,4 нмоль НАДН/хв на 1 мг білка) (Рис. 3.11), тобто щоденне випаювання починаючи з першого дня експерименту 6% розчином етанолу з подальшим підвищенням концентрації до 15% через 7 днів стимулює активацію механізмів нейтралізації етанолу і, крім того, може характеризуватися ураженням клітин печінки. Останнє характерно як для молодих, так і для старих тварин, і співвідноситься з різким зниженням активності цього ферменту на 40 день, тобто спостерігається пригнічення функціонування печінки на тлі насичення організму етанолом. Однак при цьому, під час забору біологічного матеріалу, було зафіксовано відсутність чітко виражених сполучнотканинних утворень в печінці.

Відсутність сполучнотканинних утворень, після випаювання молодих та старих тварин 6–15% розчином етанолу протягом 40 днів, вказує на те, що невисокі концентрації етанолу, по-перше, не призводять до розвитку важких патологічних процесів у печінці навіть через місяць щоденного випаювання, але, по-друге, вони можуть сприяти запальним реакціям у печінці та частковому пригніченню її функціональності, що може бути обумовлено прямою дією надлишку етанолу в крові (його накопиченням), а також опосередкованою — зміщенням балансу у бік утворення радикалів і збільшенням окислювального стресу. Про наявність або відсутність запального процесу можуть свідчити зміни в органі імунної відповіді (селезінка), у зв'язку з чим на наступному етапі роботи була досліджена ця складова організму.

Селезінка. Було показано, що динаміка зміни відносної маси селезінки у молодих та старих пацюків на тлі тривалого випаювання 6–15% розчином етанолу мала вік-залежний характер (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Динаміка зміни відносної маси селезінки на 10, 20 та 40 день по відношенню до маси тіла у молодих та старих тварин (%), які отримували 6–15% розчин етанолу впродовж 40 днів; n = 5

Дні прийому розчину	Молоді		Старі		U-тест Манна–Уїтні
	<i>X</i>	$\pm SE$	<i>X</i>	$\pm SE$	
0 (інтакт)	0,36	0,03	0,34	0,03	
10	*0,49	0,04	§0,38	0,04	$p \leq 0,05$
20	*0,49	0,04	§0,36	0,02	
40	0,43	0,02	0,37	0,03	

* — позначені достовірні варіанти для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені достовірні варіанти для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами для відповідних днів; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного U-тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 4 пар порівнянь ($p \leq 0,01$).

У старих тварин відносна маса селезінки не змінювалась, залишаючись на постійному рівні з інтактним варіантом (Табл. 3.2, старі). При цьому вихідний інтактний рівень старих тварин не відрізнявся від інтактного для молодих, і складала відповідно 0,34% та 0,36% (Табл. 3.2). Таким чином, у старих тварин, на фоні пригнічення активності алкогольдегідрогенази при щоденному випаюванні розчином етанолу, змін на рівні імунної відповіді, яка б віддзеркалювалась роботою селезінки, не спостерігалось.

Однак зовсім інша картина була властива для молодих тварин, які отримували 6–15% розчин етанолу на 10, 20 та 40 дні. Показано, що динаміка відносної маси селезінки у молодих тварин достовірно збільшувалася на 10 та 20

дні випаювання розчином етанолу порівняно з інтактним рівнем (з 0,36 до 0,49%) (Табл. 3.2, молоді), після чого починала зменшуватися, але все одно була більшою порівняно з інтактним рівнем, хоч і не достовірно. Ці результати співвідносяться з активністю у таких тварин алкогольдегідрогенази (АДГ): видно, що збільшення відносної маси селезінки на 10 та 20 дні, що характеризує запуск імунної відповіді в організмі, йде паралельно з підвищенням активності АДГ (Рис. 3.11, молоді).

Тобто, взаємозв'язок між відотною масою селезінки і активністю алкогольдегідрогенази (АДГ) спостерігається як для молодих, так і для старих тварин, хоча при цьому між самими віковими групами існують характерні відмінності в динаміці цих двох показників. Однак важливим є те, що отримані дані в зміні динаміки відносної маси селезінки, тобто опосередкованої характеристики імунної відповіді організму, дозволяють по-новому подивитись на динаміку активності АДГ. З Рис. 3.11 видно, що як у молодих, так і старих тварин на 10 день активність цього ферменту не змінюється, а на 20 та 40 — вона фактично однакова для цих вікових груп, незважаючи на різний (у 2,5 рази!) початковий інтактний рівень. Тобто отримані результати свідчать про дві різні стратегії відповіді організму у тварин двох вікових груп, проте в умовах однакового хронічного впливу негативного фактора, ці відмінності нівелюються кінцевим результатом — пригніченням роботи основного нейтралізуючого компонента (АДГ), що може вказувати на зменшення функціональної активності печінки.

При цьому ці відмінності для двох різних стратегій відповіді з практично ідентичним кінцевим результатом на токсичну сполуку у тварин різного віку вказую на те, що:

— інтоксикація молодих тварин розчином етанолу супроводжується з одного боку запуском синтезу алкогольдегідрогенази, тобто запуском безпосередніх механізмів нейтралізації цього токсиканту, а з іншого — активацією імунної системи, яка бере участь в цих процесах на фоні формування запалення.

— старі тварини на перших етапах стійкіші, їм не потрібна активація витратніших механізмів (іmunна система): вже є інші елементи, які більш пристосовані до специфічної відповіді (підвищена активність алкогольдегідрогенази), однак це не обов'язково підтверджує, що в них не формується запальний процес, тому що зміна маси селезінки є опосередкованим показником цих процесів.

— отримані дані перетинаються з результатами дослідження ролі металотіонеїнів у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки (Рис. 3.3) в тому аспекті, що як і початковий рівень алкогольдегідрогенази, так і початковий пул металотіонеїнів у інтактних старих тварин був вищим, ніж у молодих, тобто з віком спостерігається збереження певних захисних механізмів на рівні молекулярних пулів та/або метаболічних шляхів (принцип біологічної пам'яті) (Рис. 1.1, 4).

При цьому можна припустити, що менш чутлива реакція у старих тварин на рівні інших систем при зустрічі з певними негативними факторами середовища за рахунок формування певних специфічних захисних механізмів в процесі онтогенезу в порівнянні з молодими тваринами може бути обумовлена не просто «пасивною байдужістю» цих систем, а бути вимушеною мірою, беручи до уваги, що з віком усі системи організму можуть так чи інакше вичерпувати свій потенціал, у тому числі адаптивний, через певні запрограмовані механізми та/або генетичні й епігенетичні зміни, пригнічення окремих органел та/або самих клітин [86] тощо. Це співвідноситься і частково підтверджується з даними з вмісту гідроперекисів ліпідів у старих тварин після інтоксикації організму 5-водною сірчаною кислотою міддю (Рис. 3.8 і 3.10), де можна побачити, що вихідний інтактний рівень цього радикала у старих тварин нижчий, аніж у молодих тварин, проте при цьому, при надходженні надлишків іонів міді (тобто різка зустріч з негативним фактором) до організму, вміст цих показників збільшується сильніше саме у старих тварин, що характеризує і збільшення окислювального стресу.

У зв'язку з цим було цікавим оцінити окислювальний стрес і у тварин з хронічним випаюванням розчином етанолу, і, хоч антиоксидантна система на цьому етапі детально не аналізувалася, для уточнення змін в окислювальному стресі було досліджено вміст білків, які підвергаються окисному пошкодженню, а саме — карбонільовані білки в мітохондріях печінки молодих та старих тварин.

Карбонільовані білки. Динаміка вмісту карбонільованих білків у мітохондріях печінки молодих та старих пацюків на тлі тривалого випаювання 6–15% розчином етанолу мала різний характер впродовж усіх 40 днів. Показано, що їх вміст у інтактних старих тварин достовірно вищий аніж у молодих у 1,7 рази (відповідно 7,22 проти 4,16 мкмоль/мг білка) (Рис. 3.12, старі 0 день порівняно з молодими 0 день). При цьому випаювання старих пацюків розчином етанолу призводить до накопичення карбонільованих білків: на 10 та 20 дні починається збільшення, однак достовірні відмінності проявлялися лише к 40 дню, к цьому часу їх вміст збільшувався у 2 рази (7,22–8,05–9,72–14,98 мкмоль/мг білка відповідно для кожного з дослідних днів) (Рис. 3.12, старі). Отримані результати підтверджують, що, як і у випадку з гідроперекисами ліпідів після інтоксикацій іонами міді (Рис. 3.8 та 3.10), хронічна дія токсиканту іншої природи (етанол) призводить до поступового зміщення балансу в сторону утворення прооксидантів. Однак інтерес визивають відмінності динамік зміни карбонільованих білків у старих на фоні молодих тварин, результати яких фактично підтверджують, що у цілому груповий адаптивний потенціал молодих тварин, особливо у випадку дії не-жорстоких концентрацій, вищий.

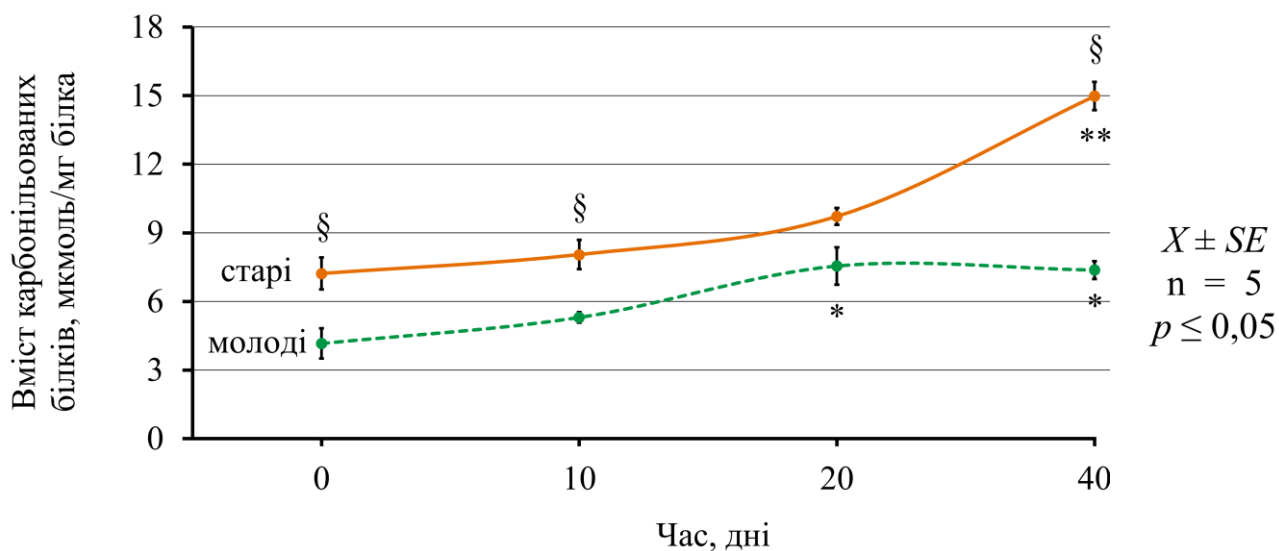


Рис. 3.12. Вміст карбонільованих білків в мітохондріях печінки молодих та старих інтактних тварини (0 день) і молодих та старих тварин на 10, 20 та 40 день випаювання 6–15% розчином етанолу (6% перший тиждень, далі — 15%); * — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; ** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного *U*-тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 4 пар порівнянь ($p \leq 0,01$).

Отже, було показано, що випаювання молодих пацюків розчином етанолу призводить до збільшення вмісту карбонільованих білків на 10 та достовірно на 20 дні (з 4,16 відповідно до 5,30 та 7,55 мкмоль/мг білка) (Рис. 3.12, молоді). У цілому характер підвищення на даному етапі схожий зі старими до 20 дня, проте швидкість утворення карбонільованих білків у молодих вища (у старих збільшення в 1,3 рази, тоді як у молодих у 1,8). Однак найголовніші відмінності спостерігаються далі, на 40 день.

Показано, що у молодих тварин рівень карбонільованих білків к 40 дню стабілізується і приблизно дорівнює 20 дню, становлячи 7,37 мкмоль/мг білка

(Рис. 3.12, молоді), у той час як у старих картина була зовсім інша (Рис. 3.12) і вказувала на збільшення окисного стресу в печінці.

Таким чином, ці дані з динаміки зміни карбонільованих білків підтверджують висловлені припущення про більшу стійкість старих тварин на перших етапах дії негативного фактора середовища, що з іншого боку корелює з їх нижчим адаптивним потенціалом і що обернено пропорційно молодим тваринам.

Отримані дані динаміки карбонільованих білків прямо вказують на пригнічення функціональної активності печінки старих тварин, і її пригнічення в перші 20 днів у молодих, однак з подальшим відновленням к 40 дню. Зазвичай пригнічення активності печінки корелює зі зменшенням її відносної маси [85]. Для додаткового дослідження цього питання та уточнення відмінностей адаптивного потенціала у тварин різного віку, було проаналізовано зміну відносної маси печінки у молодих та старих тварин, які випаювалися розчином етанолу.

Печінка. Відомо, що в онтогенезі маса печінки зменшується відносно маси тіла [85], це підтверджується і результатами для інтактних тварин різного віку у цій роботі: з Табл. 3.3 видно, що відносна маса старих тварин достовірно менша, аніж у молодих (відповідно 4,35% проти 5,52%). Однак найбільший інтерес викликають відмінності цього показника на фоні випаювання пацюків 6–15% розчином етанолу.

Табл. 3.3. Динаміка зміни відносної маси печінки на 10, 20 та 40 день по відношенню до маси тіла у молодих та старих тварин (%), які отримували 6–15% розчин етанолу впродовж 40 днів; $n = 5$

Дні прийому розчину	Молоді		Старі		U-тест Манна–Уїтні
	X	$\pm SE$	X	$\pm SE$	
0 (інтакт)	5,52	0,50	§4,35	0,15	
10	4,81	0,35	§3,62	0,10	$p \leq 0,05$
20	*4,32	0,30	3,82	0,15	
40	5,26	0,55	**§ 3,30	0,10	

* — позначені достовірні варіанти для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; ** — позначені достовірні варіанти для старих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені достовірні варіанти для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами для відповідних днів; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного U-тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 4 пар порівнянь ($p \leq 0,01$).

Було показано, що динаміка відносної маси печінки молодих тварин достовірно зменшується на 20 день випаювання, а на 40 — поверталася до свого інтактного рівня (Табл. 3.3, молоді), що співвідноситься з отриманими результатами зі зміни карбонільованих білків для цієї групи (Рис. 3.12, молоді).

Схожа картина спостерігається і для старих тварин: на фоні різкого збільшення утворення карбонільованих білків на 40 день дослідження відносна маса печінки старих тварин на відміну від молодих продовжує втрачати свою масу (Табл. 3.3, старі).

Отримані дані підтверджують логіку у спостережуваних відмінностях між молодими та старими тваринами, які пов'язані з різною реалізацією їх адаптивної відповіді на хронічну дію негативного фактора середовища та неможливістю старими тваринами тривалий час підтримувати свої захисні механізми, які були збережені до початку дії негативного фактора середовища, а тривале

навантаження на які зрештою призводить до їх збою та підвищення окислювального стресу в організмі на рівні не тільки печінки, а й інших органів.

Додатково про підвищення окислювального стресу в інших органах можна судити аналізуючи зміни в ще одному важливому органі системи виділення — нирках.

Нирки. Було показано, що динаміка зміни відносної маси нирок для молодих та старих пацюків була схожою з динамікою зміни відносної маси селезінки (Табл. 3.2). У старих тварин відносна маса нирок не змінювалася, при цьому інтактний рівень був таким же, як у молодих (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4. Динаміка зміни відносної маси нирок на 0, 10, 20 та 40 день по відношенню до маси тіла у молодих та старих тварин (%), які отримували 6–15% розчин етанолу впродовж 40 днів; n = 5

Дні прийому розчину	Молоді		Старі		U-тест Манна–Уїтні
	X	± SE	X	± SE	
0 (інтакт)	0,78	0,03	0,72	0,02	
10	*0,95	0,03	§0,73	0,02	$p \leq 0,05$
20	*0,92	0,05	§0,73	0,02	
40	0,85	0,04	0,74	0,04	

* — позначені достовірні варіанти для молодих дослідних тварин у порівнянні з їх інтактним рівнем; § — позначені достовірні варіанти для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами для відповідних днів; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного U-тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 4 пар порівнянь ($p \leq 0,01$).

Зміна динаміки відносної маси нирок молодих тварин співвідноситься з раніше описаними результатами (Рис. 3.12; Табл. 3.2 та 3.3) і показує, що на 20 день вони беруть участь в процесі адаптації до хронічної дії негативного фактора

середовища, а на 40 день гомеостатична система починає стабілізуватися (Табл. 3.4), однак все одно зазнає пригнічення своїх захисних механізмів (активність алкогольдегідрогенази) (Рис. 3.11).

Ще один компонент, котрий віддзеркалює стан нирок і який був проаналізований в рамках цієї дисертаційної роботи — це креатинін сироватки крові.

Креатинін. Було показано, що динаміка вмісту креатиніну у сироватці крові молодих та старих пацієнтів на тлі тривалого випаювання 6–15% розчином етанолу не мала достовірних відмінностей порівняно з інтактним рівнем (Рис. 3.13). Хоча при цьому спостерігаються певні «тенденції» у його підвищенні на 10 та 20 дні випаювання розчином етанолу та зниження на 40 день. На перший погляд простежуються й певні варіації його вмісту між молодими та старими тваринами, проте достатньо великий груповий розкид масиву даних, а також недостатня потужність експерименту не дозволяють обговорювати його далі.

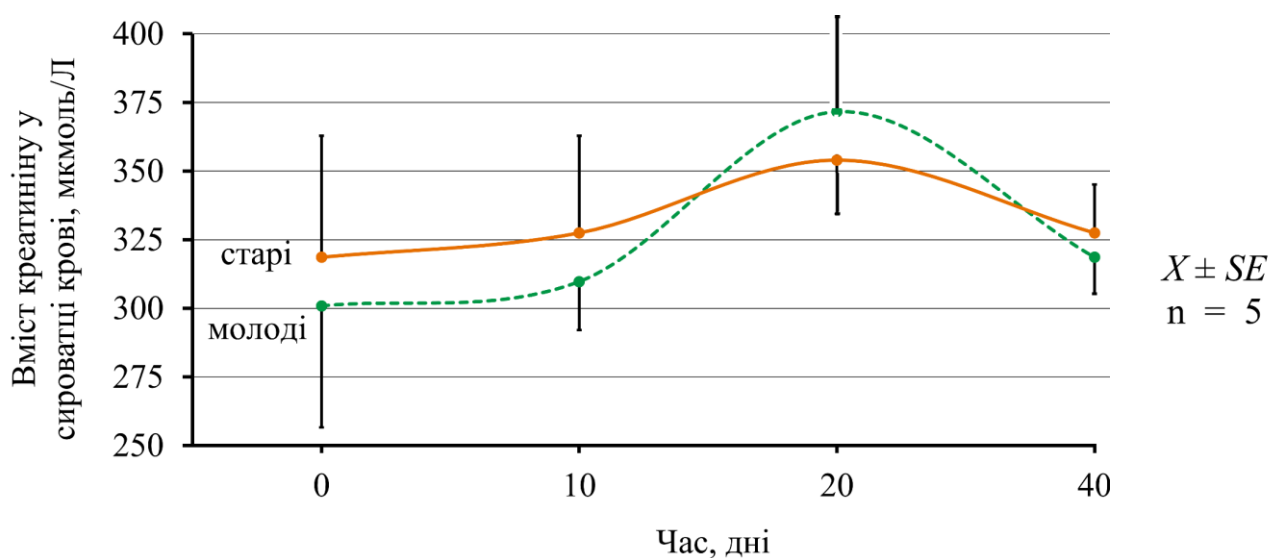


Рис. 3.13. Вміст креатиніну у сироватці крові молодих та старих інтактних тварини (0 день) і молодих та старих тварин на 10, 20 та 40 день випаювання 6–15% розчином етанолу (6% перший тиждень, далі — 15%).

Однак, враховуючи відмінності у відносній масі нирок, яка співвідноситься з іншими даними, можна припустити, що відмінностям у динаміці вмісту креатиніну є місто, однак для підтвердження цього потрібні подальші дослідження в цьому напрямку. Інтерес у вивченні зміни креатину пов'язаний не тільки з тим, що він є маркером стану нирок, але й з тим, що він є кінцевим продуктом метаболізму креатину м'язів, а його накопичення в організмі може призводити до інших негативних впливів [134].

Таким чином, було досліджено вплив випаювання 6–15% розчином етанолу на особливості деяких біохімічних показників та основних органів, які з ними пов'язані і які у першу чергу беруть на себе удар негативного впливу токсиканту. Ці процеси пов'язані між собою прямо чи опосередковано, і при цьому мають безпосередній вплив на фізіологічний прояв хронічної дії розчину на тварин (принцип ієрархічності) (Рис. 1.1, 3). До цих проявів можна віднести групове виживання тварин під дією негативного фактора, зміни в динаміці маси тіла тощо. У зв'язку з цим частина дослідних тварин, яка не відбиралася для забіру біологічного матеріалу на 10, 20 або 40 день експерименту, продовжувала випаюватися 15% розчином етанолу після останнього (40) дня ще у продовж 120 днів (усього виходить 24 тижні). У цих тварин фіксували масу тіла, кількість випитого розчину етанолу в перерахунку на пацюка та виживання за Каплан–Мейером.

3.1.7. Хронічна дія етанолу як індуктора адаптивної відповіді у тварин різного віку на деякі фізіологічні показники

Виживання. Групове виживання є інформативним показником при дослідженні різних патологій, моделей дії токсичних і токсикогенних сполук тощо.

Аналіз функцій виживання молодих та старих пацюків на тлі тривалого випаювання 6–15% розчином етанолу у продовж 24 тижнів показав вік-залежні відмінності, котрі пов'язані не просто з віком тварин, а й безпосередньо з дією розчину етанолу. Попередні довготривалі дослідження з виживання тварин

різного віку, проведені в НДІ біології ХНУ ім. Каразіна і опубліковані раніше [100–103] показують, що виживання старих інтактних тварин 19–22 місячного віку в різних експериментах характеризується доживанням близько 60% тварин до 28–29 місячного віку, однак у нашому експерименті старі пацюки мали іншу функцію для цього показника.

Було показано, що загибель старих тварин тривала майже лінійно у продовж перших 12 тижнів дослідження, при цьому слід зазначити, що к цьому часу з 45 особин живими залишилися близько 60% тварин у віці 22–23 місяці (Рис. 3.14, старі). Таким чином, у той час як для інтактних тварин цього віку виживання 60% спостерігалось для віку 28–29 місяців [100–103], у пацюків, які випаювалися розчином етанолу з 20 місячного віку ця цифра складала 22–23 місяця, тобто на фоні надходження в організм етанолу спостерігалось підвищене падіння тварин у групі — фактично поділ тварин на дві різні когорти: які адаптувалися до токсиканту і які ні. І хоча інтактні варіанти тварин у довготривалих фізіологічних дослідженнях дії етанолу не використовувалися, а статистичний аналіз між інтактними і дослідними варіантами як наслідок не проводився, в отриманих даних простежується чітка тенденція поділу старих тварин на «підгрупи», на що у тому числі вказують і подальші спостереження виживання цих тварин після перших 12 тижнів: процес їх гибелі різко гальмувався, і до кінця експерименту виживало близько 50% старих тварин (Рис. 3.14, старі).

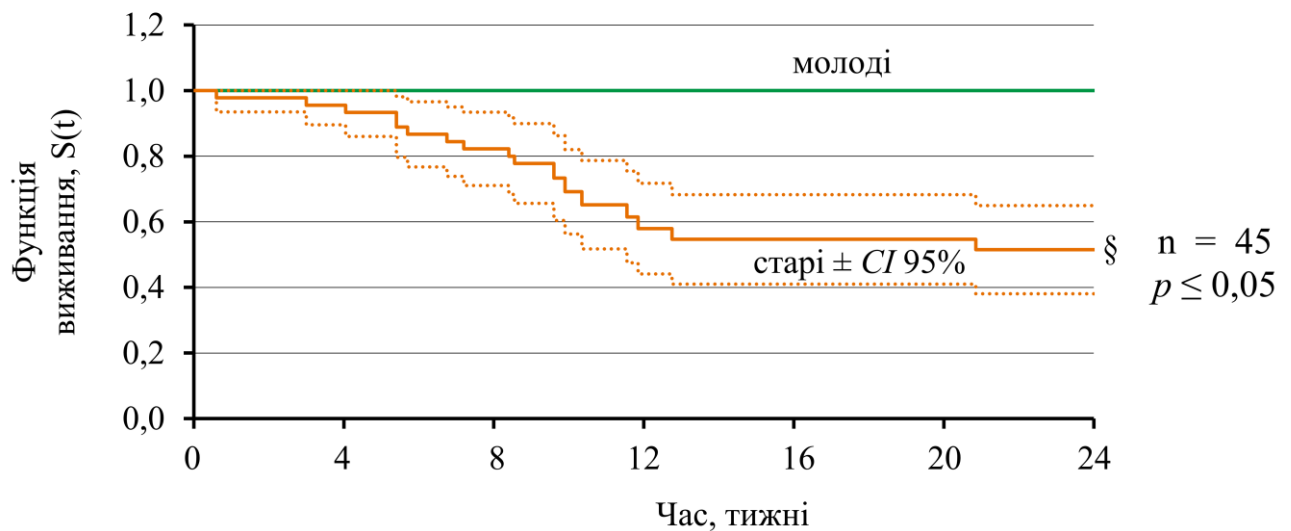


Рис. 3.14. Функція виживання за Каплан–Мейером молодих та старих тварин, які упродовж 24 тижнів випаювалися 6–15% розчином етанолу; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,05$ для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,05 рівним 1,960; $\pm CI$ — довірчий інтервал.

На фоні поділу старих тварин, молоді тварини, які знаходилися в таких самих умовах і випаювалися розчином етанолу як і старі, не помирали, і виживання у продовж всього часу експерименту становило 100% (Рис. 3.14, молоді). Загалом це суперечливі результати, враховуючи, що в інших ранніх спостереженнях для інтактних молодих тварин [135] був наявний відсоток загиблих тварин в групі. Крім того, зазвичай смертність молодих тварин, які знаходяться у віварії, пов'язана з елементами природного відбору та конкуренції на ранніх етапах онтогенезу (перші місяці життя), враховуючи, що тварини знаходяться в спеціальних клітинах, тобто мають обмежений простір. У нашому випадку відбиралися вже більш дорослі пацюки, 3-4 місячного віку, і рандомно розподілялися в клітини для утримання по 5 штук, тобто відсутність спаду в цій групі, ймовірно, пов'язано зі зниженням конкуренції і постійним моніторингом їх стану в період всього експерименту.

Таким чином казати, що це може бути пов'язано з випаюванням розчином етанолу, не є коректним. З іншого боку, чому у таких тварин, які хронічно його п'ють, не спостерігається групового падіння (?) — відповідь пояснюється, виходячи з вище описаних результатів з хронічної дії етанолу на біохімічні показники (Розділ 3.1.6): незважаючи на пригнічення активності алкогольдегідрогенази на 40 день випаювання (Рис. 3.11), у молодих тварин спостерігається активізація інших додаткових систем у відповідь на хронічну дію токсичної сполуки: так, на фоні запальної реакції відбувається запуск імунної системи (Табл. 3.2), при цьому і це найголовніше спостерігається формування робочої антиоксидантної системи, яка гальмує підвищення утворення карбонільованих білків після 20 дня випаювання, тобто зменшує окисний стрес організму (Рис. 3.12). Таким чином на 40 день організм молодих тварин адаптується і починає успішно нейтралізувати надлишки етанолу, однак в подальшому ці процеси можуть призводити до запуску в їх органах фібротичних процесів [112, 117].

У старих же тварин відбувався поділ «навпіл» (майже половина померла у перші 12 тижні, у той час як інша половина вижила впродовж усього експерименту) (Рис. 3.14, старі). Як і у випадку з молодими тваринами та біохімічними показниками для їх груп, відповідь, чому старі тварини поділилися на дві когорти, можна дати беручи до уваги отримані дані з біохімічних показників для їх груп, і, ймовірно, цей поділ було здійснено за принципом можливості «подолати / не подолати» підвищення окислювального стресу в їх організмі. Однак від чого саме залежало це явище (генетична активність, підключення у частині тварин якихось додаткових систем «допомоги», підвищена активність певних метаболічних шляхів або ще щось) — питання залишиться відкритим і вимагає подальших досліджень.

Маса тіла. Динаміка маси тіла є простим та інформативним показником. Її збільшення або зменшення може буди маркером функціонального стану організму. Було показано, що динаміка маси тіла як молодих, так і старих тварин

не відрізнялася від спостережуваних інтактних значень для цих вікових груп тварин в НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна на цій популяції пацюків лінії *Wistar* [100]. З Рис. 3.15 видно майже стандартне відображення динаміки маси тіла для тварин двох вікових груп:

— молоді тварини, які знаходяться в фазі активного росту та набору маси з перших днів експерименту і до його завершення набирають масу тіла, яка за цей час збільшується майже в два рази;

— старі тварини майже не міняють своєї маси, однак цікавим є невелике пригнічення динаміки в діапазоні 10–14 тижнів з подальшим вирівнюванням до початкового рівня: відомо, що пригнічення маси тіла віддзеркалює пригнічення функціонального стану організму і, якщо повернутися до результатів виживання, можна побачити, що пригнічення росту (Рис. 3.15, старі) для цього діапазону пов'язан з тваринами, котрі помирали до цього часу, тобто зменшення їх маси перед загибеллю змінювало середню по групі, однак коли поділ тварин пройшов, спостерігається повернення кривої для динаміки на початковий рівень.

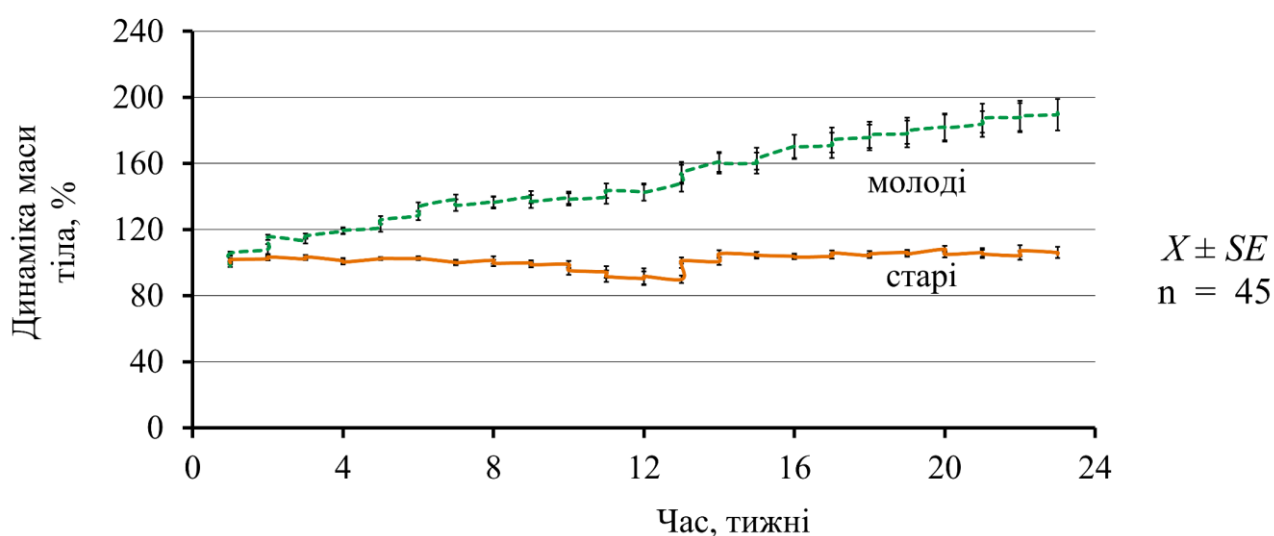


Рис. 3.15. Динаміка маси тіла молодих та старих тварин, які упродовж 24 тижнів випаювалися 6–15% розчином етанолу.

Кількість споживання водного розчину етанолу. Тварини двох вікових груп мали вільний доступ до розчину етанолу і випивали на добу в перерахунку

на пацюка у перші декілька тижнів від 9 до 31 мл розчину етанолу (Рис. 3.16). Далі, починаючи з 3 тижня було пригнічення його вживання (від 3 до 18 мл розчину етанолу на добу), яке тривало до 12 тижня. Після цього етапу відбувалося збільшення діапазону вживання пацюком розчину етанолу на добу як для молодих, так і для старих тварин, яке не припинялося до кінця експерименту (Рис. 3.16). При цьому, не дивлячись на те, що старі випивали у цілому більший об'єм розчину етанолу на пацюка на добу, доза на масу тіла молодих тварин була неменшою, враховуючі вік-залежні відмінності в масі тіла тварин різних вікових груп.

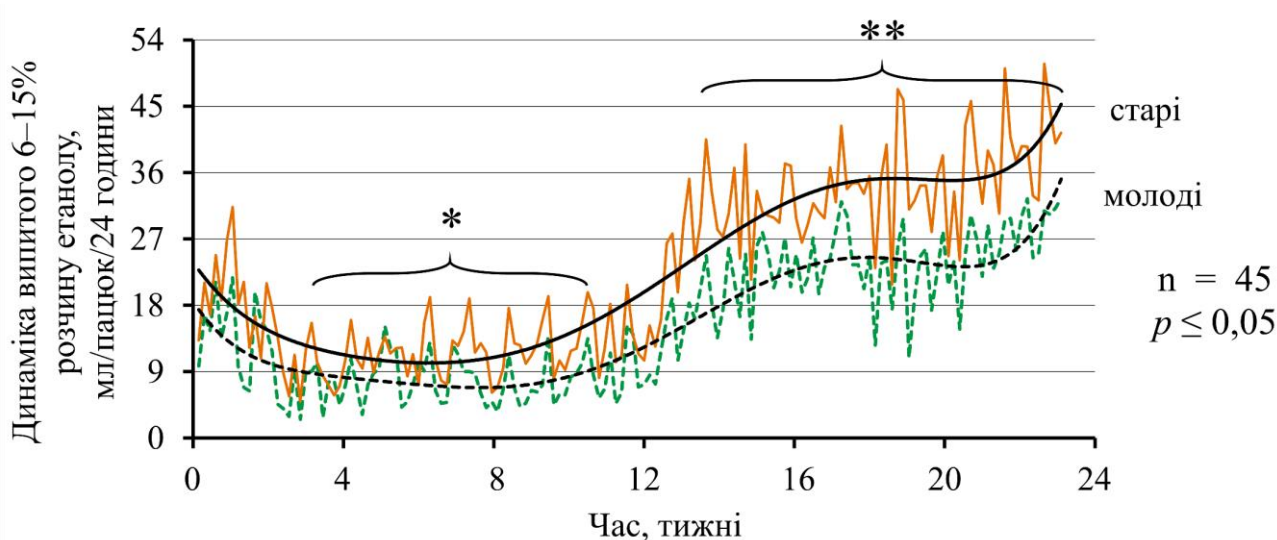


Рис. 3.16. Динаміка споживання 6–15% розчину етанолу молодими та старими тваринами (включаючи лінії апроксимації); * — позначено наявність варіантів зменшення, у яких $p \leq 0,05$ для молодих та старих тварин у порівнянні з їх першими днями; ** — позначено наявність варіантів збільшення, у яких $p \leq 0,05$ для молодих та старих тварин у порівнянні з їх першими днями; відмінності між групами були визначені за допомогою непараметричного *U* тесту Манна–Уїтні.

Узагальнення. Отримані дані свідчать та підтверджують наявність різних вік-залежних механізмів адаптивної відповіді на токсичні сполуки. Виявлено, що у старих тварин спостерігається підвищений вихідний рівень

алкогольдегідрогенази (Рис. 3.11) та вміст металотіонеїнів (Рис. 3.3), що свідчить про наявність специфічних молекулярних механізмів захисту. Однак результати аналізу радикалів (гідроперекиси ліпідів (Рис. 3.8; 3.10), карбонильовані билки (Рис. 3.12)) та виживання після розділу на дві когорти старих тварин у хронічній моделі випаювання 6–15% розчином етанолу (Рис. 3.14) показали, що з одного боку адаптивний потенціал старих тварин до хронічної дії токсичних сполук нижчий, аніж у молодих, однак з іншого — вони більш пристосовані до зустрічі з різкими негативними факторами середовища.

Отримані результати підкреслюють важливість подальших досліджень вік-залежних відмінностей у механізмах адаптивного потенціалу для кращого розуміння гострих та хронічних токсичних впливів. Крім того, цікавим та актуальним може бути пошук та розробки стратегій підвищення адаптивного потенціалу. У якості однієї з таких стратегій може бути використання біологічно активних сполук різної природи та виявлення їх потенціалу у зміні вікових механізмів захисту та підвищенні адаптивного потенціалу організму до окислювального стресу. У зв'язку з цим в рамках дисертаційної роботи було досліджено вплив компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на гостро-продовжану токсичну дію 5-водної сірчаної кислоти міді та вітаміну А у формі ретинолу ацетату на гостру дію.

Висновок до розділу 3.1

Розподіл іонів міді в компартментах клітин печінки показав, що іони міді зв'язуються не лише з фракцією низькомолекулярних білків цитозоля (НБ), але й також з ендоплазматичним ретикуломом та мітохондріями, однак після першої зустрічі з токсичним фактором середовища фракція НБ підвищує специфічність до іонів міді у 3 рази для молодих та у 5 разів для старих, тобто відбувається індукція специфічних білків.

Мас-спектральний аналіз фракції низькомолекулярних білків цитозоля (НБ) виявив, що металотіонеїни (МТ) з молекулярною масою близько 6200 Да у молодих та старих тварин демонструють відсутність жорсткої специфічності до зв'язування іонів міді, що вказує на некооперативну модель зв'язування; при цьому старі тварини мають вищий вихідний рівень МТ, що свідчить про адаптивні процеси на негативні фактори середовища в продовж більш тривалого онтогенезу та відповідає на питання, чому вони темпорально більш стійкі до гострих або гостро-продовгованих введень 5-водної сірчаної кислоти міді, аніж молоді.

Аналіз антиоксидантної системи молодих та старих тварин на фоні отриманих результатів з дослідження металотіонеїнів показав, що металотіонеїни, відіграють ключову роль у знешкодженні надлишку іонів міді у моделі Cu-індукованого фіброзу печінки на перших етапах зустрічі з токсичною сполукою, що має прямий взаємозв'язок з розтягнутою у часі групою стійкістю до летальних доз міді та відмінною від молодих тварин адаптивною відповіддю, основний сенс якого полягає у використанні специфічних молекулярних механізмів, які у молодих тварин ще не сформовані; однак швидке зменшення ресурсів цих систем на тлі високої токсичності та вікового ослаблення інших систем захисту (антиоксидантна система) призводить до кінцевого зміщення балансу в бік окиснювального стресу, про що свідчить вищий рівень гідроперекисів ліпідів у старих тварин в порівнянні з молодими тваринами.

Отримані дані з хронічної дії 6–15% етанолу підтвердили наявність різних вік-залежні механізмів адаптивної відповіді, які характеризуються використанням старими тваринами специфічних молекулярних механізмів до дії токсичних факторів середовища: так, разом із підвищеним вмістом металотіонеїнів, у них був вищий вихідний рівень алкогольдегідрогенази, однак при цьому отримані дані з вмісту радикалів та розділу старих тварин на дві когорти після аналізу їх виживання (за принципом можливості «подолати / не подолати» підвищення окислювального стресу), свідчать про те, що адаптивний потенціал старих тварин до хронічних дій токсичних сполук нижчий, аніж у молодих, які у свою чергу більш чутливі до високих доз токсичних сполук.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 3.1, були опубліковані в:

Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., **Akzhyhitov, R. A.**, Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., Albegai, M. A., Gromovoi, T. Y. (2021). The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*, 5, 62-74. DOI: [10.1016/j.tma.2021.11.001](https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.11.001) (*Scopus, Q3*)

Bozhkov, A. I., Dobrianska, N. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Novikova, A. V., Haiovyi, S. S., Pankratova, A. O., Ivanova, O. O., Onipko, I. R., Komburlei, Y. O. (2024). Young and old animals “use” different strategies for adapting to the chronic effects of ethanol. *Translational Medicine of Aging*, 8, 1-11. DOI: [10.1016/j.tma.2024.01.001](https://doi.org/10.1016/j.tma.2024.01.001) (*Scopus, Q3*)

3.2. Дослідження адаптивного потенціалу тварин різного віку при використанні біологічно активних сполук різної природи

У дослідженнях, які лежать в обґрунтуванні експериментальної моделі, використаної в цій дисертаційній роботі, було показано, що адаптивна відповідь до гостро-продовжених летальних доз 5-водної сірчаної кислоти міді у старих тварин має більш тривалий темпоральний характер, тобто падіння тварин в цих групах розтягнуте у часі, хоча згодом загальне виживання тварин обох вікових груп вирівнюється (Рис. 2.3 А). При цьому спостерігається підвищення групового виживання, якщо тварини отримують попередні нелетальні дози 5-водної сірчаної кислоти міді, тобто в організмі формується адаптивна пам'ять на рівні різних молекулярно-клітинних механізмів, що у тому числі підтверджується отриманими даними в рамках дослідження цієї дисертаційної роботи, а саме:

1. На рівні формування пулу метал-зв'язуючих білків — металотіонеїнів (Розділ 3.1.1–4):

2. На рівні активації антиоксидантної системи. (1) У випадках дії значного негативного фактора середовища, антиоксидантна система може пригнічуватися з неможливістю відновлення балансу (введення 5-водної сірчаної кислоти міді у моделі Cu-індукованого фіброзу відносяться до таких і, як йдеться з назви, призводять до розвитку важких хронічних патологій) (Розділ 3.1.5). У випадках дії менш жорсткого негативного фактора середовища, в тому числі при його хронічній дії, антиоксидантна система адаптується легше через менший зсув балансу в сторону утворення прооксидантів, проте її потенціал має вік-залежні відмінності — молоді та старі тварини використовують різні стратегії (Розділ 3.1.6,7).

3. На рівні інших систем організму, у тому числі імунній, які можуть брати більш активну участь або менш активну участь в загальній відповіді організму на дію негативного фактора середовища, але як це буде реалізовано залежить від віку тварин та характеристик, пов'язаних з ним.

В зв'язку з цим важливим є пошук сполук, які б могли активувати захисні механізми організму, формувати пам'ять на рівні молекулярних пулів та метаболічних шляхів організму, а також посилювати адаптивну відповідь при зустрічі з негативним фактором середовища, що дозволить з одного боку відтягнути незворотні наслідки у випадках тяжких інтоксикацій і дати більше часу на діагностування, а з іншого — не буде мати негативного впливу на організм (наприклад, у моделі Cu-індукованого фіброзу використовуються введення нелетальних доз для формування адаптивного потенціалу, проте навіть незначні попадання подібної сполуки в організм у дозах, що перевищують норму, можуть привести до інтоксикації та розвитку патологічних процесів).

У якості таких стимулюючих сполук можуть виступати біологічно активні компоненти різної природи, бо, відомо, що вони здатні впливати на антиоксидантні реакції, стимулювати імунну систему і у цілому на регуляцію фізіологічних процесів. У якості таких сполук в рамках цієї дисертаційної роботи було проаналізовано вплив біологічно активних компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на гостро-продовжану токсичну дію 5-водної сірчаної кислоти міді (виживання) на тварин різного віку; вплив ретинолу ацетату, бо відомо, що вітамін А, який локалізується в печінці, необхідний для нормального проходження запальних реакцій [136].

3.2.1. Дослідження впливу попереднього введення різних доз біологічно активних компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на гостро-продовжану токсичну дію 5-водної сірчаної кислоти міді

Для дослідження дії компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на виживання молодих та старих тварин після введення летальної дози 5-водної сірчаної кислоти міді на першому етапі було проаналізовано вплив різних доз активної сполуки (гідролізат грибів) при попередніх введеннях Per Os у продовж 6 днів на молодих тваринах, тобто проведено дозову оптимізацію: низькі дози склали 0,01 та 0,05 мл/100 г маси тіла, підвищені — 0,4 та 0,8 мл; що було обумовлено раніше отриманими даними

та мас-розділенням компонентів гідролізату [137]. У дозовій оптимізації використовували тварин лише молодшої вікової групи для отримання більш коректного зіставлення дії різних доз досліджуваної речовини, бо відомо, що з віком в організмі підвищується вірогідність формування різних патологічних процесів [138], у цьому сенсі попереднє введення компонентів грибів молодим тваринам буде більш специфічним саме до подальшого введення 5-водної сірчаної кислоти міді, тобто запальні хронічні процеси іншої природи, які можуть непомітно проходити в організмі, будуть з меншою вірогідністю впливати на отримані результати.

Контрольні тварини отримували фізичний розчин з подальшим введенням гостро-продовженої летальної дози (0,58 мг/1 г печінки) та аналізу функції виживання (Рис. 3.17).

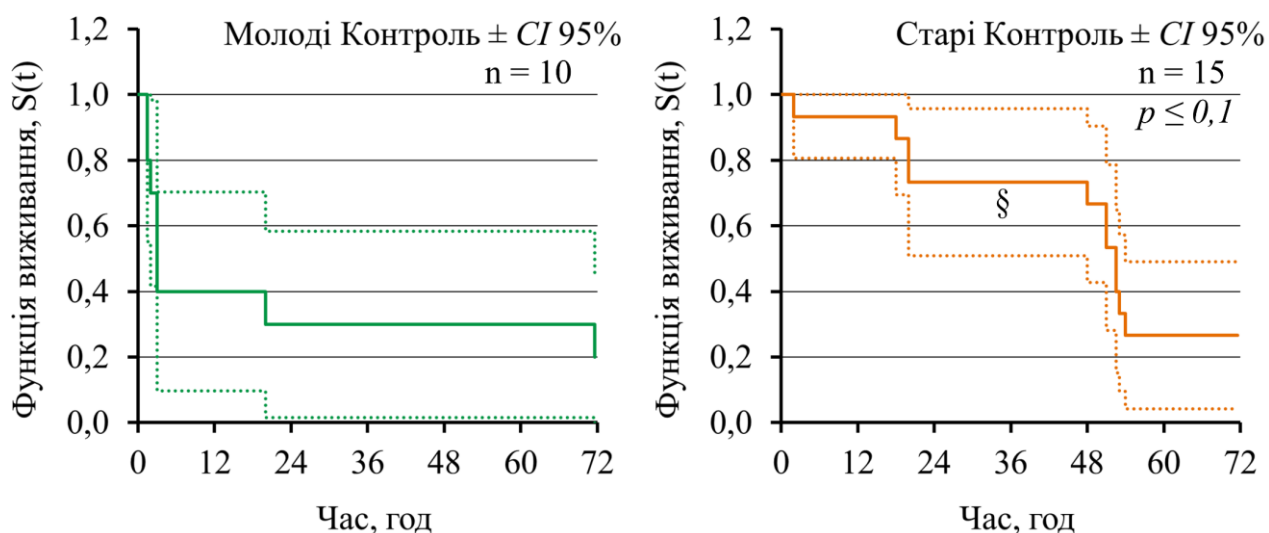


Рис. 3.17. Функція виживання за Каплан–Мейєром молодих та старих тварин, які отримували одне введення гостро-продовженої летальної дози 5-водної сірчаної кислоти міді (0,58 мг/1 г печінки) внутрішньоочеревинно; § — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,1$ для старих тварин у порівнянні з молодими тваринами; відмінності між групами були визначені за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,1 рівним 1,645; $\pm CI$ — довірчий інтервал.

Було показано, що отримані дані з виживання молодих та старих контрольних тварин після введення летальної дози 5-водної сірчаноюкислої міді узгоджуються з даними, отриманими раніше: у старих тварин спостерігається розтягнуте у часі підвищене групове виживання в порівнянні із молодими тваринами в перші два дні (Рис. 3.17), однак у подальшому виживання вирівнювалося. Контрольні варіанти використовувалися для порівнянь зі своїми дослідними групами, які отримували попередні введення компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*.

Молоді тварини: низькі дози. У якості низьких доз були використані 0,01 та 0,05 мл концентрату гідролізату компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*.

Було показано, що попередні введення Per Os компонентів грибів у дозі 0,01 мл/100 г маси тіла не призводили до достовірних відхилень від кривої виживання для молодих контрольних тварин (Рис. 3.18 порівняно з Рис. 3.17), тобто ефекти, які б могли проходити на рівні описаних раніше систем (пул металотіонеїнів, активація антиоксидантної або імунної системи) у молодих тварин не спостерігалися.

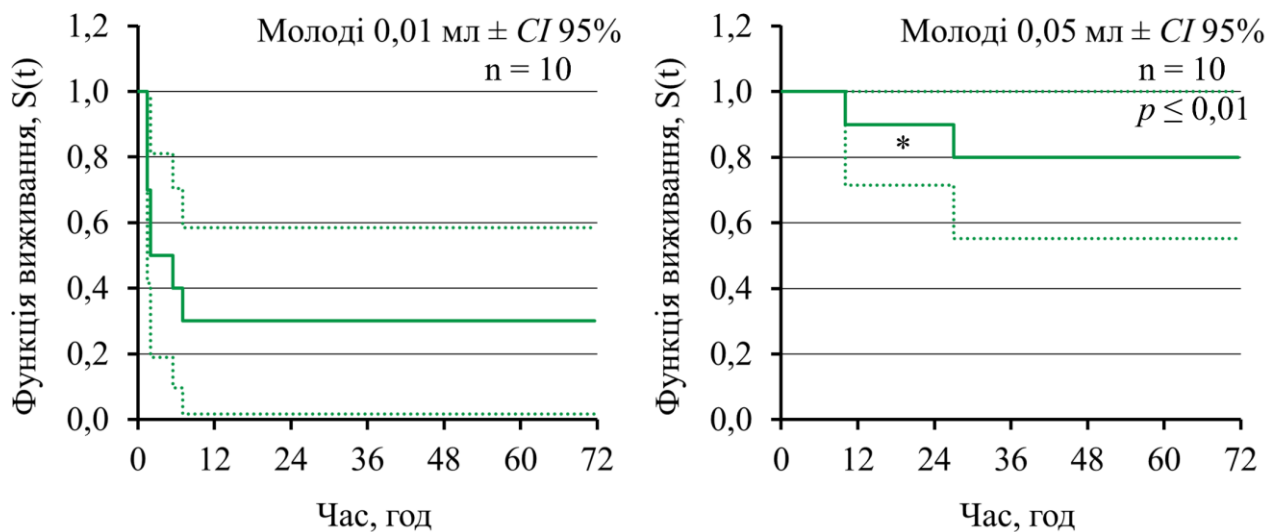


Рис. 3.18. Функція виживання за Каплан–Мейєром молодих тварин, які отримували одне введення гостро-продовжено летальної дози 5-водної сірчаноюкислої міді (0,58 мг/1 г печінки) внутрішньоочеревинно після 6 днів

введення Per Os компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* у низьких дозах, 0,01 та 0,05 мл гідролізату на 100 г маси тіла; * — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,01$ для молодих тварин 0,05 мл у порівнянні з контрольними молодими тваринами (Рис. 3.17); відмінності між групами були визначені за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,01 рівним 2,576; $\pm CI$ — довірчий інтервал.

Зовсім інша картина спостерігалася, коли тварини отримували розчин компонентів грибів з концентратом гідролізату 0,05 мл/100 г маси тіла. У цьому випадку летальна доза призводила до виживання 80% тварин у період гостро-продовженої дії сірчаноокислої міді (3 дні), і цей ефект був достовірно вищим порівняно з молодими контрольними тваринами, які отримували тільки летальну дозу токсиканту (Рис. 3.18 порівняно з Рис. 3.17).

Таким чином було припущено, що доза 0,05 мл/100 г маси тіла, яку тварини отримували у продовж 6 днів, здатна адаптувати деякі системи організму, що на молекулярному рівні може проявлятися: або утворенням пулів специфічних білків, або активацією інших систем організму. Однак як саме працюють ці механізми потребує подальших досліджень. При цьому потрібно зазначити, що подальші спостереження після 3 дня експерименту (гостра-продовжена токсичність), у цілому показують, що системи все одно відчують пригнічення, оскільки смертність тварин триває протягом наступних місяців, тобто, можна припустити, що на тлі виживання при гостро-продовжаній токсичності, у тварин формуються хронічні патології, які у подальшому можуть призводити до смерті. На даному етапі роботи ці механізми не досліджувалися, проте описані спостереження щодо формування адаптивного потенціалу при введенні нелетальних доз 5-водної сірчаноокислої міді з подальшим введенням летальної дози та підвищенням групового виживання молодих тварин у перші дні, мають схожі прояви [86], тобто ці процеси можуть бути подібними.

Молоді тварини: підвищені дози У якості варіантів підвищених доз були використані розчини, об'єми яких становили 0,4 та 0,8 мл концентрату.

Було показано, що як варіант тварин, які отримували 0,4 мл розчину концентрату компонентів грибів, так і варіант 0,8 мл достовірно не відрізнялися від контрольних молодих тварин (Рис. 3.18 порівняно з Рис. 3.16), тобто підвищення дози на 100 г маси тіла не призводило до підвищення виживання тварин, як це було з варіантом введення 0,05 мл (Рис. 3.17), що вказує на наявність дозозалежного характеру дії компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на підвищення адаптивного потенціалу на дію летальної дози 5-водної сірчаної кислоти міді.

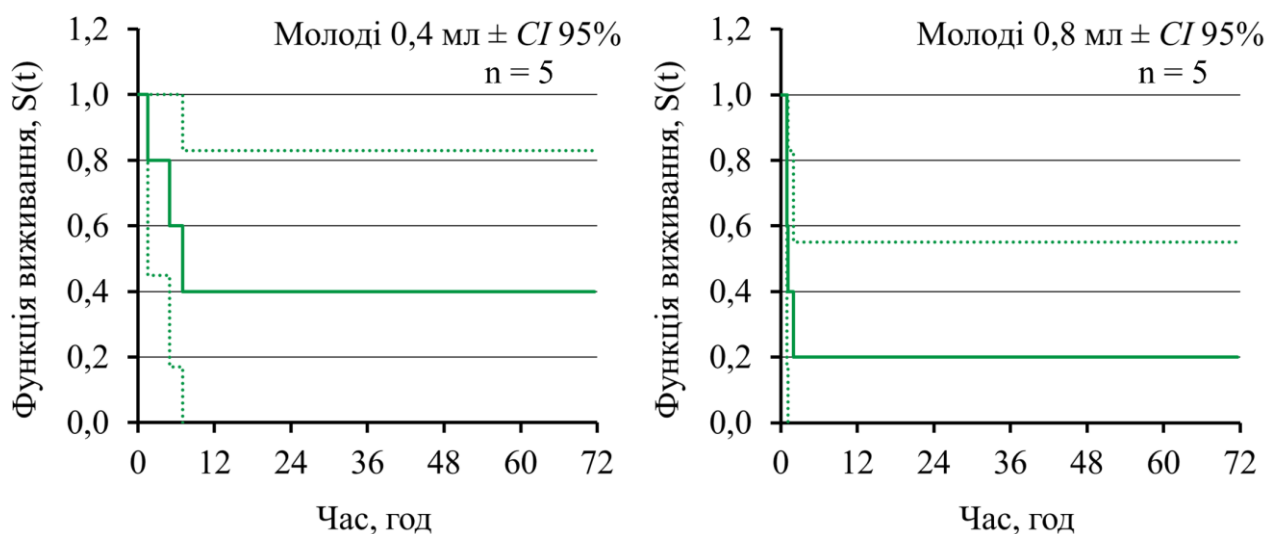


Рис. 3.19. Функція виживання за Каплан–Мейєром молодих тварин, які отримували одне введення гостро-продовжено летальної дози 5-водної сірчаної кислоти міді (0,58 мг/1 г печінки) внутрішньоочеревинно після 6 днів введення *Per Os* компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* у підвищених дозах, 0,4 та 0,8 мл гідролізату на 100 г маси тіла; $\pm CI$ — довірчий інтервал.

Однак цікавим є сам розподіл виживання при цьому дозозалежному характері введення компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* молодим тваринам. Як видно з Рис. 3.18, не дивлячись на відсутність

достовірних відмінностей, виживання тварин 0,4 мл на 3 день після введення летальної дози складало 40%, тобто на 20% більше, аніж у контрольних тварин (Рис. 3.16) і на 10%, аніж у тварин, які отримували низьку дозу 0,01 мл (Рис. 3.17); а виживання тварин з дозою 0,8 мл (Рис. 3.18) складало 20% і на 3 день повністю співпадала з молодим контролем (Рис. 3.16).

Таким чином дія компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* на групову стійкість до токсичної дії 5-водної сірчаної кислоти міді не просто залежала від дози, а й мала U-подібний характер з найбільшим «захисним» ефектом при введенні розчину гідролізату грибів у дозі концентрату 0,05 мл/100 г маси тіла (Рис. 3.20).

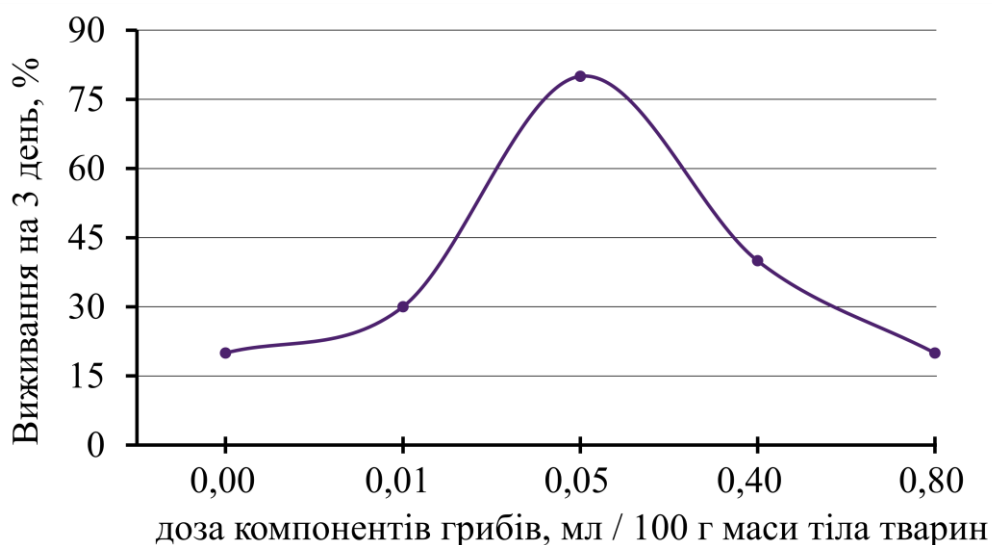


Рис. 3.20. Дозова залежність виживання при дії компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* 6 днів в різних дозах на молодих пацюків на 3 день після введення тваринам летальної гостро-продовженої дози 5-водної сірчаної кислоти міді (0,58 мг/1 г печінки).

На основі отриманих даних доза компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* 0,05 мл концентрату гідролізату на 100 г маси тіла проявила себе як найбільш оптимальна і була використана для дослідження адаптивного потенціалу до летальних доз 5-водної сірчаної кислоти міді у старих тварин після введення цієї біологічно активної сполуки.

Старі тварини. Дослідження дії компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* 0,05 мл концентрату гідролізату на 100 г маси тіла проводилась на старих тваринах двох вікових варіантів: 20 місячних та 30 місячних. Відомо, що різниця між тваринами, які формально належать до однієї вікової групи (старі), але з різницею у сім і більше місяців мають суттєві відмінності між собою, що у тому числі пояснюється прогресуванням вікових змін, переважно патологічних, а також, і це найголовніше — відбором, тобто доживанням до 30 місяців не всіх тварин, які доживають до 20 місячного віку, а лиш частини з них. Відомо, що з групи тварин 20 місячного віку до 28–29 місяців в стандартних умовах віварію доживає лише близько половини [100–103], тобто пацюки віком 30 місяців і більше — довгожителі.

Було показано, що попередні введення Per Os компонентів грибів у дозі 0,05 мл/100 г маси тіла призводили до виживання 90% старих 20 місячних тварин у групі, і цей ефект був достовірно вищим порівняно зі старими контрольними тваринами, які отримували тільки летальну дози токсиканту (Рис. 3.21 порівняно з Рис. 3.17), тобто дія біологічно активної сполуки формувала стійкість до гострого-продовжаного отруєння, однак дані спостережень після 3 дня, як і у випадку з молодими тваринами, показують, що пригнічення систем продовжується, як і групове падіння тварин.

Схожа картина спостерігається і для тварин 30 місячного віку, однак на 3 добу на відміну від 20 місячних тварин в їх групі після 6 введень компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* в живих залишалось 70% тварин, тобто вони були чутливіші (Рис. 3.21). При цьому їх виживання було вищим, аніж у їх контрольній групі, яка отримувала лише гостро-продовжану дозу 5-водної сірчаної кислоти міді, тобто дія компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* у дозі 0,05 мл гідролізату мала позитивний ефект до летальної дози токсиканту у продовж першої гостро-продовжаного дії токсичної сполуки (3 доби), і це не залежало від віку тварин (Рис. 3.18 та 3.21).

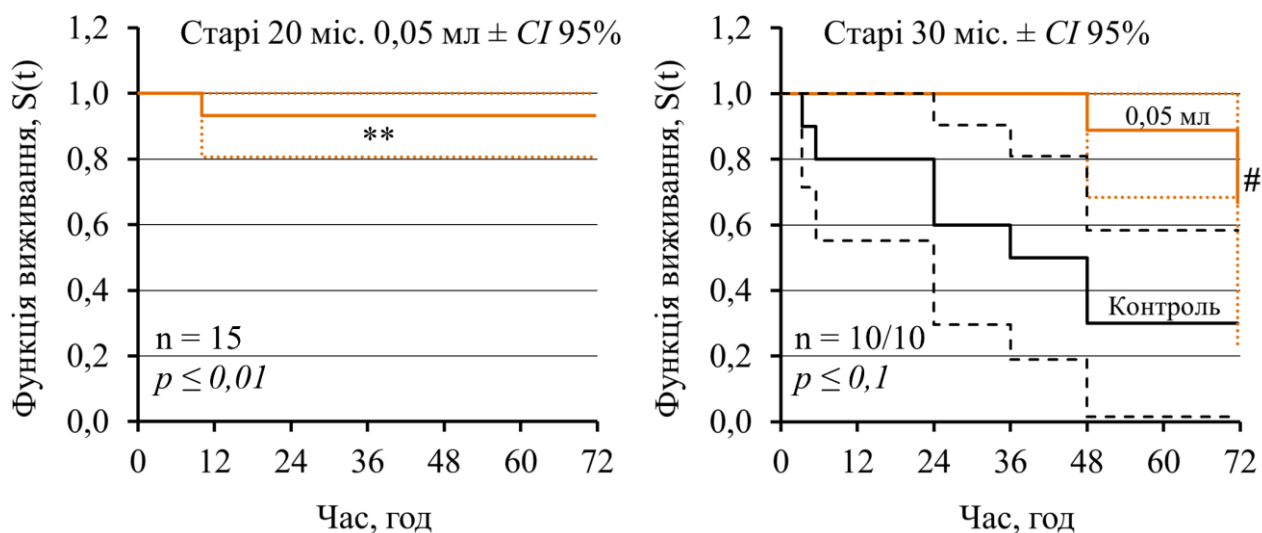


Рис. 3.21. Функція виживання за Каплан–Мейером старих тварин двох вікових груп (20 місяців та 30 місяців), які отримували одне введення гостро-продовжено летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді (0,58 мг/1 г печінки) внутрішньоочеревинно після 6 днів введення Per Os компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* у дозі 0,05 мл гідролізату на 100 г маси тіла; ** — позначені варіанти, у яких $p \leq 0,01$ для старих 20 місячних тварин 0,05 мл у порівнянні з контрольними старими тваринами (Рис. 3.17); # — $p \leq 0,1$ для 30 місяців; відмінності між групами були визначені за допомогою логрангового критерію із поправкою Йейтса та критичним значенням (двосторонній варіант t) для рівня значущості 0,01 рівним 2,576; $\pm CI$ — довірчий інтервал.

Таким чином, компоненти грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*, технологія виділення яких була розроблена в НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна, може використовуватися як активний компонент біологічної природи для дослідження адаптивного потенціалу. Однак важливим є дослідження фармакінетичних особливостей дії подібних багатоконпонентних біологічних сполук, чого не робилося в рамках цієї дисертаційної роботи. Аналіз гідролізату грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* показав наявність великої кількості різноманітних низькомолекулярних сполук та, окрім цього, розчин має зсув у бік кислотного рН, а Per Os введення молодим тваринам

з Cu-індукованим фіброзом призводить до пониження гідроперекисів ліпідів у мітохондріях та сироватці крові [137], однак наявність можливих негативних наслідків ще не досліджувалася і потребує подальших постановок схем.

Узагальнення. З одного боку отримані результати показують, що підвищувати адаптивний потенціал молодих та старих тварин біологічно активними сполуками дійсно можливо, однак через їх багатоконпонентність та складність аналізу механізмів впливу, які можуть проявлятися на різних рівнях і системах організму, необхідні більш детальні дослідження ефекту «захисту» на дію гострої або гостро-продовженої токсичності при введенні компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* у дозі концентрату 0,05 мл/100 г маси тіла тварин.

При цьому, у разі успішного подолання дії токсичного негативного фактора середовища, на наступному етапі не менш важливим є пошук способів протистояти наслідкам такої адаптації — розвитку хронічних патологій. Для вирішення цього питання в інших експериментах НДІ біології ХНУ ім. Каразіна з використанням моделі Cu-індукованого фіброзу печінки було показано, що вітамін А (десятикратна доза від добової норми пацюків) здатний підвищувати групове виживання у тварин з фіброзом (Рис. 2.9), однак при цьому стимулювати розростання сполучної тканини [112]. У зв'язку з цим в рамках цієї дисертаційної роботи було запропоновано перевірити виживання молодих і старих тварин до гострої дії 5-водної сірчаноокислої міді (0,75 мг/1 г печінки тварин) після попередніх введень вітаміну А (у формі ретинол ацетату) в дозах, які були трикратними, десятикратними та тридцятикратними за добову норму для пацюків і відповідно становили 0,03, 0,10 та 0,31 мг/100 г маси тіла.

Таким чином, на наступному етапі досліджувався адаптивний потенціал тварин різного віку на вплив вітаміну А як ще одного прикладу біологічно активної сполуки, яка на відміну від гідролізату грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* є, по-перше, однокомпонентною сполукою (у формі ретинол ацетату) і, по-друге, життєво необхідним вітаміном, більша частина

якого локалізується в печінці та може брати участь у запальних та регенеративних процесах.

3.3.2. Дослідження впливу попереднього введення різних доз ретинол ацетату на гостру токсичну дію 5-водної сірчаноокислої міді

Як і у випадку дослідження впливу попереднього введення різних доз компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*, на першому етапі було проведено дозову оптимізацію: молоді тварини отримували три дози масляного розчину вітаміну А у формі ретинол ацетату: трикратну, десятикратну та тридцятикратну від добової норми, нижня та верхня межі якого становлять від 30 до 80 МО або 0,01 до 0,03 мг [139]. У нашому випадку за добову норму була обрана нижня межа, яка становила 0,01 мг для стандартизації, і вже виходячи з неї змінювали кратність досліджуваних варіантів. Підвищені дози (у 3, 10 і 30 разів) вводилися для збільшення можливого ефекту та у зв'язку з раніше отриманими результатами, де десятикратна доза (0,10 мг) підвищувала функціональний стан організму у модельному Су-індукованому фіброзі (Рис. 2.9).

Виживання. При оцінці функції виживання було показано, що достовірних відмінностей між групами тварин, які отримували три попередніх введення вітаміну А в різних дозах з подальшим введенням гострої дози 5-водної сірчаноокислої міді, не виявлялося. Однак, незважаючи на це, простежуються певні тенденції, які можуть мати дозозалежний характер і бути у цьому плані схожими з дією компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*, крім того, виходячи з цих спостережень, можна припустити, що, у разі підвищення потужності експерименту з одного боку, а з іншого — додатковій корекції доз (в бік їх зниження) можна отримати результати значного підвищення адаптивного потенціалу тварин.

Так, з Рис. 3.22 видно, що до 24 години (гостра токсичність) виживання у групах становила від 0 до 30%. При цьому відмінностей у часових

характеристиках не спостерігалось, і до 3 години гострої токсичності летальність у кожній групі перевищувала 50%.

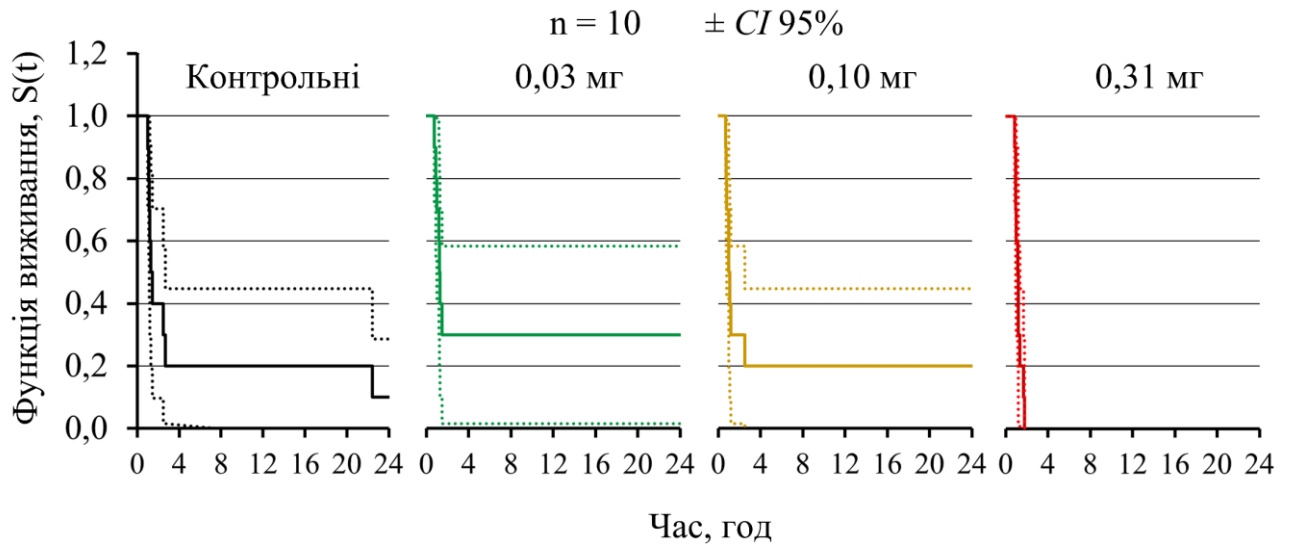


Рис. 3.22. Функція виживання за Каплан–Мейером молодих тварин, які отримували одне введення гострої летальної дози 5-водної сірчаноокислої міді (0,75 мг/1 г печінки) внутрішньоочеревинно після 3 днів введення Рer Os ретинолу ацетату у дозі 0,03, 0,10 та 0,31 мг вітаміну А масляного розчину на 100 г маси тіла; $\pm CI$ — довірчий інтервал.

При цьому в контрольній групі к 24 годині залишалось 10% тварин, в групі з трикратною дозою — 30, а далі відповідно 20 та 0 для десяти- та тридцятикратних варіантів (Рис. 3.22), тобто виділяється слабовиражений через відсутність достовірних відмінностей U-подібний дозозалежний характер (Рис. 3.23), який нагадує дозозалежне розподілення виживання при попередньому введенні компонентів грибів (Рис. 3.20). Однак слід враховувати, що у двох варіантах експерименту використовувалися різні варіанти летальної дози: у першому гостро-продовжена, а в другому просто гостра.

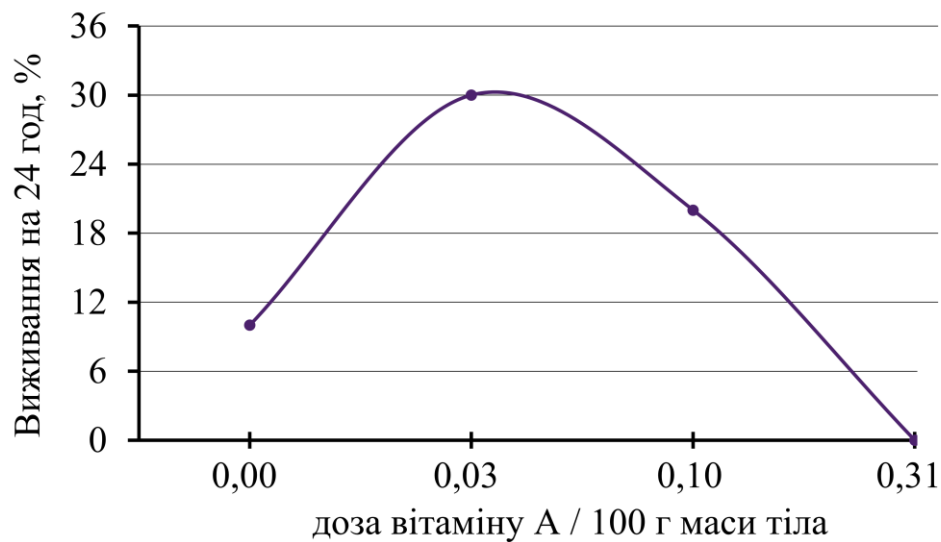


Рис. 3.23. Дозова залежність виживання пацюків на 24 години після введення тваринам летальної гострої дози 5-водної сірчаної кислоти міді (0,75 мг/1 г печінки) при попередньому введенні вітаміну А (у формі ретинол ацетату) 3 дні в різних дозах.

Цікаво, що найбільша летальність спостерігається у тварин, які отримували найбільшу дозу вітаміну А (тридцятикратну від добової норми), у них вона складала 100%, при цьому контрольні тварини, які отримували лише летальну дозу токсиканту, на 24 години мали 10% тварин, які не померли. Дослідження вмісту вітаміну А у тварин зі 100% летальністю показав, що його вміст достовірно збільшувався у 15 разів (з 0,008 до 0,123 мг/г печінки) порівняно з інтактними тваринами, які не отримували експериментальних впливів (Рис. 3.24 А). Це може вказувати на те, що на фоні надлишку, вітаміну А сам стає токсичним для організму і, навпаки, зменшує його адаптивний потенціал, вірогідно, через навантаження печінки та інших систем, роблячи їх слабкішими перед дією 5-водної сірчаної кислоти міді, тобто нової токсичної негативної дії на їх організм. При цьому десятикратна доза, яка добре проявила себе у роботах з функціональної активності печінки [112, 117], не показала якогось значущого результату, як і не показала його у дослідженні імуннокомпетентних клітин в іншому експерименті (Рис. 3.24 Б), але не з дією гострої летальної дози, а при введенні трьох адаптивних, які складала 1/3 від летальної, хоча у цілому зміни в

імуннокомпетентних клітинах у нашій моделі могли б вказувати на вплив на рівні імунної системи, у тому числі і у випадках гострої летальної дії, однак вони не спостерігалися.

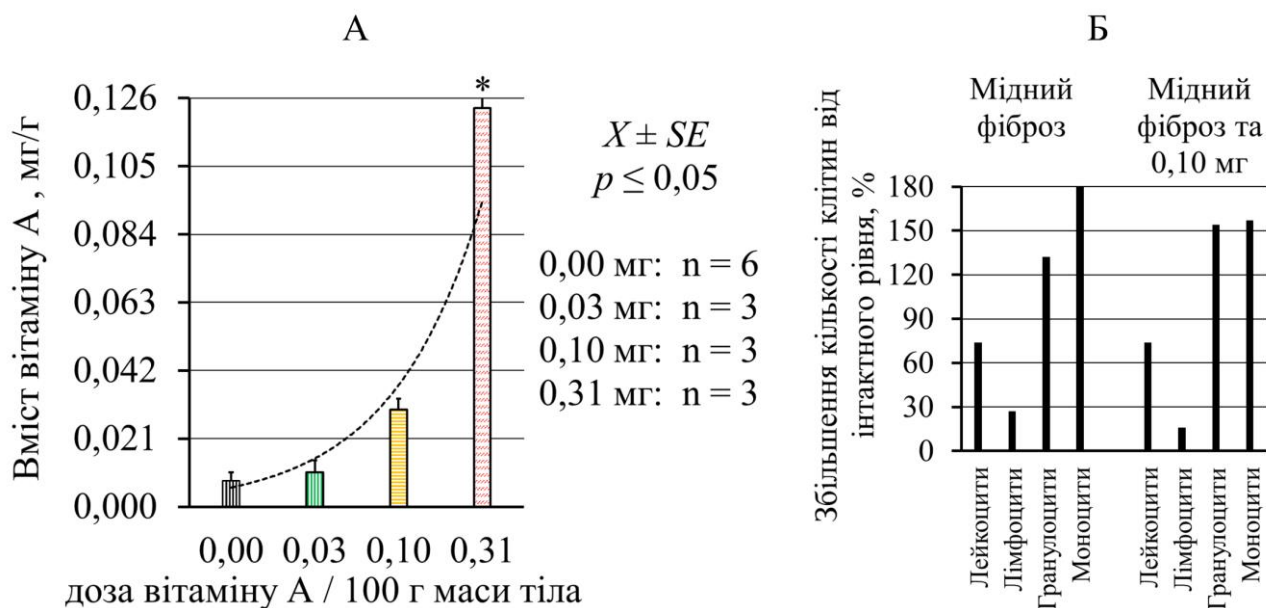


Рис. 3.24. Вміст вітаміну А в печінці пацюків молодих тварин, які отримували 3 дні введення Per Os ретинолу ацетату у дозі 0,03, 0,10 та 0,31 мг вітаміну А масляного розчину на 100 г маси тіла (А) та збільшення кількості імуннокомпетентних клітин у тварин порівняно з інтактним рівнем (дорівнює 1) (Б), які отримували вітамін А в дозі 0,10 мг/100 г маси тіла 3 дні; * — позначений варіант для 0,31 мг, у якого $p \leq 0,05$ у порівнянні з 0,00 (не отримували введення вітаміну А); відмінності між групами були визначені за допомогою дисперсійного аналізу (Н-критерій Краскела–Уолліса, $p \leq 0,05$) з апостеріорними порівняннями (тест Данна з поправкою Бонферроні для рівня значущості 0,05 для 6 пар порівнянь ($p \leq 0,008$))

Загалом, робити подальші припущення та висновки можна тільки після нових експериментів та уточнення доз. На даному етапі цієї роботи цього зроблено не було у зв'язку з відсутністю явно вираженого ефекту. Крім того через це було відкладено проведення вік-залежного випробування щодо підвищення адаптивного потенціалу введеннями вітаміну А, тобто подібні

експериментальні маніпуляції на старих тваринах не проводилися. Однак роботи в цьому напрямку продовжуватимуться в майбутньому.

Висновок до розділу 3.2

Аналіз функції виживання молодих та старих тварин під дією гостро-продовженої летальної дози 5-водневої сірчаної кислоти міді після 6 попередніх введень біологічно активних компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae* показав, що вони здатні підвищувати адаптивний потенціал молодих та старих тварин, що може бути пов'язане з їх впливом або як можливого джерела низькомолекулярних білків, або як активатора синтезу низькомолекулярних білків у організмі.

У разі вітаміну А подібних ефектів не спостерігалось. Проаналізувавши функцію виживання молодих тварин після введення гострої летальної дози 5-водної сірчаної кислоти після три-, десяти- та тридцятикратних доз від добової норми вітаміну А відмінностей між групами молодих тварин не виявилось. Однак спостерігалися тенденції, які можуть вказувати на можливий дозозалежний ефект, аналогічний дії компонентів грибів *Pleurotus ostreatus* та *Saccharomyces cerevisiae*, що потребує подальших досліджень.

Сумуючі, можна сказати, що отримані результати узгоджуються з основними принципами структурно-функціональної організації біосистем (Рис. 1.1).

З одного боку, ми бачимо важливість початкового функціонального стану, коли від цього буде залежати не лише адаптивний потенціал, а й вибір різних механізмів відповіді на один і той же негативний токсичний фактор навколишнього середовища, і це явище чітко проявляється в вікових відмінностях (Рис. 3.25, принцип темпоральної оптимальності). Однак при цьому це явище характерне не тільки для тварин різного віку: дані, які показують розділення старих тварин на дві когорти після переведення їх на щоденне випаювання розчином 6–15% етанолу (Рис. 3.14), свідчать про значні відмінності

в механізмах реакції відповіді, які відбуваються в межах тільки цієї вікової групи: неможливість перебудови метаболізму частини тварин під дією токсичного хронічного фактора середовища показує, що чим краще ми зможемо зрозуміти механізми адаптивного потенціалу, тим ефективніше зможемо підтримувати здоров'я і підвищувати тривалість життя.

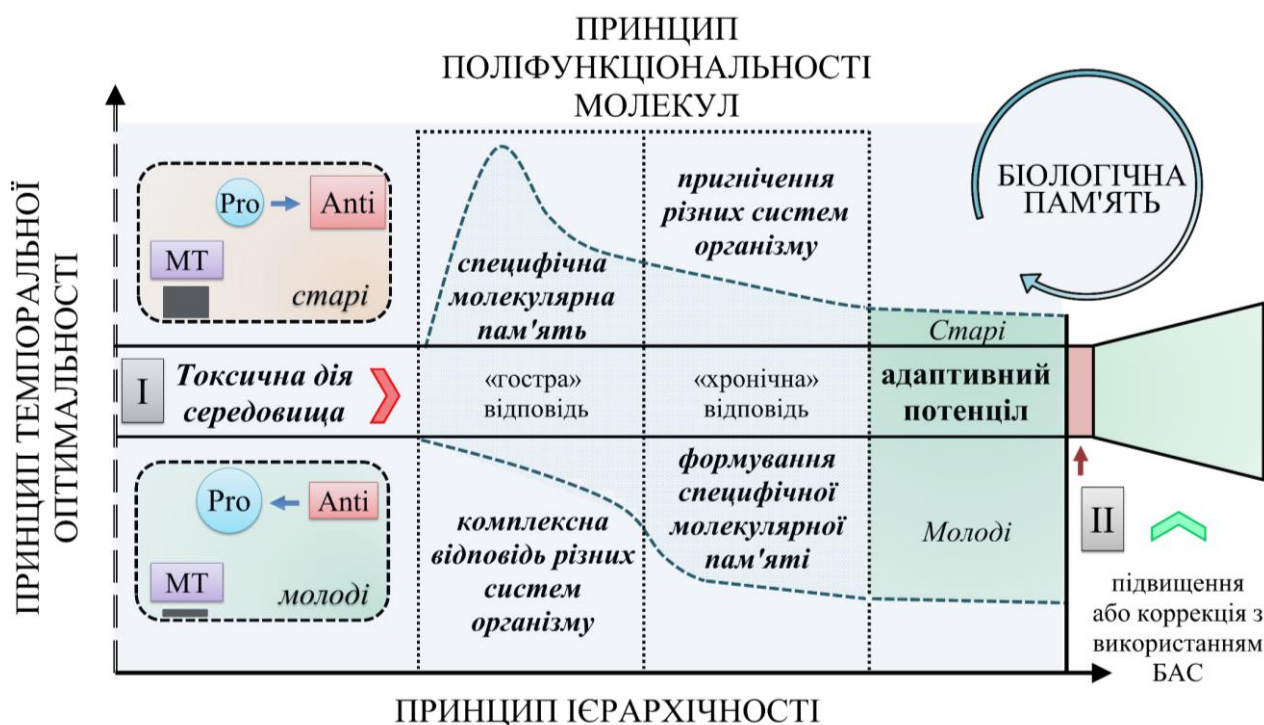


Рис. 3.25. Єдність 4 базових принципів структурно-функціональної організації біосистем в контексті зв'язку з вік-залежними особливостями адаптивного потенціалу при дії токсичного фактора середовища (I) або дії біологічно активних сполук (БАС) для підвищення адаптивного потенціалу тварин (II), де **темпоральна оптимальність** віддзеркалює важливість стану організму у даний момент часу при дії негативного фактора середовища; **принцип ієрархічності** — взаємозв'язок та підпорядкованість одних систем організму іншим; **поліфункціональність молекул** — здатність одних і тих же молекул в різних умовах виконувати різні функції, а при токсичній дії негативного фактора середовища — брати участь у знешкодженні ціною своєї функціональності; **біологічна пам'ять** — зберігати пам'ять адаптивної відповіді, однак, вірогідно, ціною зниження адаптивного потенціалу до нових

негативних факторів з віком; МТ — металотіонеїни; Pro —прооксиданти; Anti — антиоксиданти.

При цьому старіння є природнім і невід'ємним процесом живого, і отримані дані, які вказують, що адаптивна відповідь старих тварин базується на спеціалізованих молекулярних механізмах (коли це можливо), лише підтверджують це: з одного боку, це енергоефективно і дозволяє не навантажувати інші системи організму, однак, з іншого боку, пасивність систем або їх нездатність брати участь у адаптивному потенціалі свідчить про обмеженість старих тварин у виборі варіантів адаптації до нових і/або постійно діючих негативних факторів навколишнього середовища (Рис. 3.25), наприклад, коли в процесі онтогенезу елементи захисту до них не сформовані або коли існуючі вже не можуть впоратися з навантаженням.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 3.2, були опубліковані в:

Bozhkov, A. I., Bozhkov, A. A., Ponomarenko, I. E., Kurguzova, N. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Goltvyanskii, A. V., Klimova, E.M., Shapovalov, S. O. (2021). Elimination of the toxic effect of copper sulfate is accompanied by the normalization of liver function in fibrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 655-663. <https://doi.org/10.15421/022190> (*Web of Science*)

Bozhkov, A. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Bilovetska, S. G., Ivanov, E. G., Dobrianska, N. I., & Bondar, A. Y. (2024). The effect of retinol acetate on liver fibrosis depends on the temporal features of the development of pathology. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 14(3), 101338. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2023.101338> (*Scopus, Q2*)

Bozhkov, A. A., Ganin, V. Y., **Akzhyhitov, R. A.**, Ivanov, E. G., Bilovetska, S. G., Dobrianska, N. I., Novikova A.V., Bozhkov, A. I. (2024). Chlorogenic acid from sunflower meal regulates the number of immunocompetent cells in animals with toxic liver fibrosis. *Clinical Nutrition Open Science*, 53, 78-94. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2023.12.007> (*Scopus, Q3*)

Ivanov, E., **Akzhyhitov, R.**, & Bozhkov, A. (2024). COMPONENTS FROM VARIOUS BIOLOGICAL SOURCES REDUCES THE TOXIC EFFECTS OF COPPER SULPHATE IN OLD ANIMALS. Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ» (V міжнародній науково-практичній конференції «Ricerche Scientifiche e Metodi della Loro Realizzazione: Esperienza Mondiale e Realtà Domestiche»), (April 26, 2024; Bologna, Italy), 191-199. <https://doi.org/10.36074/logos-26.04.2024.039>

ВИСНОВКИ

На різних експериментальних моделях дії токсичних факторів середовища: 1 цикл (3 введення 5-водної сірчаної кислоти міді $1/3$ від летальної дози кожні 48 годин) і 2 цикли (повторне введення 1 циклу через 30 днів), а також на моделі хронічної дії 6–15% етанолу показано, що темпоральна адаптивна відповідь організму на ці негативні токсичні впливи залежить від функціональних характеристик систем організму, які беруть участь у формуванні відповіді, що прямо впливає на адаптивний потенціал тварин різного віку.

1. В цитоплазмі клітин печінки старих пацюків (20 місяців) в початковому стані (до впливу експериментального негативного фактора середовища) міститься більше металотіонеїнів (МТ) з молекулярною масою приблизно 6200 Да у порівнянні з молодими пацюками (3 місяці). Введення тваринам 1 циклу 5-водної сірчаної кислоти міді призводить до збільшення кількості МТ. Зв'язування іонів міді з МТ відбувається некооперативно, а інші білки можуть конкурувати з МТ за зв'язування з іонами міді.

2. Наряду зі фракцією низькомолекулярних білків цитозоля, іони міді також зв'язувались з компонентами мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума та іншими компонентами цитозоля кліток печінки. При цьому характер внутрішньоклітинного розподілу іонів міді залежав від віку тварин.

3. Введення 5-водної сірчаної кислоти міді (два цикли з інтервалом між ними 30 днів) спричиняло розвиток фіброзу печінки. Цей процес супроводжувався збільшенням ступеня зв'язування іонів міді з МТ («специфічністю зв'язування»), вираженим як у старих тварин (більше в 5 разів порівняно з першим циклом), так і у молодих (більше в 3 разів порівняно з першим циклом). Однак більш виражене інгібування антиоксидантної системи та інших систем організму у старих тварин в онтогенезі призводило до збільшення летальності у подальшому.

4. Хронічний вплив 6–15% етанолу підтвердив наявність вік-залежних механізмів адаптивного потенціалу, який був менш вираженими у старих тварин порівняно з молодими. Молоді та старі тварини відрізняються за початковими

показниками, які беруть участь у метаболізмі етанолу, що впливає на вибір подальших стратегій адаптації.

5. Попередні введення низькомолекулярних компонентів грибів (*Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*) 6 днів у дозі 0,05 мл/100 г маси тіла здатні модифікувати адаптивну відповідь тварин різного віку на гостро-продовжану дію токсичного фактора середовища, що підтверджує вплив початкових функціональних характеристик систем організму на адаптивний потенціал тварин різного віку на токсичні дію іонів міді.

6. Попередні введення Вітаміну А 3 дні у трикратній, десятикратній та тридцятикратній від добової норми дози не здатний модифікувати адаптивну відповідь на подальшу токсичну дію іонів міді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Geoghegan, B. L., Liu, Y., Peredkov, S., Dechert, S., Meyer, F., DeBeer, S., & Cutsail III, G. E. (2022). Combining valence-to-core x-ray emission and Cu k-edge x-ray absorption spectroscopies to experimentally assess oxidation state in organometallic Cu (I)/(II)/(III) complexes. *Journal of the American Chemical Society*, *144*(6), 2520-2534. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c09505>
2. Jernigan, G. G., & Somorjai, G. A. (1994). Carbon monoxide oxidation over three different oxidation states of copper: metallic copper, copper (I) oxide, and copper (II) oxide-a surface science and kinetic study. *Journal of Catalysis*, *147*(2), 567-577. <https://doi.org/10.1006/jcat.1994.1173>
3. Ji, P., Wang, P., Chen, H., Xu, Y., Ge, J., Tian, Z., & Yan, Z. (2023). Potential of copper and copper compounds for anticancer applications. *Pharmaceuticals*, *16*(2), 234. <https://doi.org/10.3390/ph16020234>
4. Ruiz, L. M., Libedinsky, A., & Elorza, A. A. (2021). Role of copper on mitochondrial function and metabolism. *Frontiers in molecular biosciences*, *8*, 711227. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.711227>
5. Mir, A. R., Pichtel, J., & Hayat, S. (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *Biometals*, *34*(4), 737-759. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>
6. Wang, L., Sathuvan, M., Chen, S., Cai, K., Chen, S., & Liu, Y. (2021). Purification and stability analysis of antimicrobial proteins from Varuna litterata. *Microbial Pathogenesis*, *153*, 104637. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104637>
7. Magnus, K. A., Ton-That, H., & Carpenter, J. E. (1994). Recent structural work on the oxygen transport protein hemocyanin. *Chemical reviews*, *94*(3), 727-735. <https://doi.org/10.1021/cr00027a009>
8. Hsia, C. C., Schmitz, A., Lambertz, M., Perry, S. F., & Maina, J. N. (2013). Evolution of air breathing: oxygen homeostasis and the transitions from water to land and sky. *Comprehensive Physiology*, *3*(2), 849. <https://doi.org/10.1002%2Fcp.phy.c120003>

9. Lutsenko, S., Washington-Hughes, C., Ralle, M., & Schmidt, K. (2019). Copper and the brain noradrenergic system. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *24*, 1179-1188. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01737-3>
10. Gaier, E. D., Eipper, B. A., & Mains, R. E. (2013). Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects. *Journal of neuroscience research*, *91*(1), 2-19. <https://doi.org/10.1002/jnr.23143>
11. Chen, J., Jiang, Y., Shi, H., Peng, Y., Fan, X., & Li, C. (2020). The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *472*, 1415-1429. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02412-2>
12. Li, J., Shi, C., Wang, X., Liu, C., Ding, X., Ma, P., ... & Jia, H. (2020). Hydrogen sulfide regulates the activity of antioxidant enzymes through persulfidation and improves the resistance of tomato seedling to copper oxide nanoparticles (CuO NPs)-induced oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *156*, 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.020>
13. Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y., & Dmitriev, O. Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological reviews*, *87*(3), 1011-1046. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2006>
14. Scheiber, I. F., Mercer, J. F., & Dringen, R. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in neurobiology*, *116*, 33-57. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.01.002>
15. Kornblatt, A. P., Nicoletti, V. G., & Travaglia, A. (2016). The neglected role of copper ions in wound healing. *Journal of inorganic biochemistry*, *161*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.012>
16. Chung, K. W., Song, S. H., & Kim, M. S. (2021). Synergistic effect of copper and amino acid mixtures on the production of extracellular matrix proteins in skin fibroblasts. *Molecular Biology Reports*, *48*(4), 3277-3284. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06403-z>
17. Chen, Z., Li, Y. Y., & Liu, X. (2023). Copper homeostasis and copper-induced cell death: Novel targeting for intervention in the pathogenesis of vascular

aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 169, 115839.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115839>

18. Gromadzka, G., Tarnacka, B., Flaga, A., & Adamczyk, A. (2020). Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases—therapeutic implications. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9259. <https://doi.org/10.3390/ijms21239259>

19. Collins, J. F. (2021). Copper nutrition and biochemistry and human (patho) physiology. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 96, pp. 311-364). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.01.005>

20. Kaler, S. G. (2021). Inherited disorders of human copper metabolism. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics* (pp. 413-443). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812535-9.00011-X>

21. Chatterjee, S., Kumari, S., Rath, S., Priyadarshane, M., & Das, S. (2020). Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: Metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*, 12(11), 1637-1655. <https://doi.org/10.1039/d0mt00140f>

22. Giménez, V. M. M., Bergam, I., Reiter, R. J., & Manucha, W. (2021). Metal ion homeostasis with emphasis on zinc and copper: Potential crucial link to explain the non-classical antioxidative properties of vitamin D and melatonin. *Life sciences*, 281, 119770. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119770>

23. Meshchaninov, V. N., Tsyvian, P. B., Myakotnykh, V. S., Kovtun, O. P., Shcherbakov, D. L., & Blagodareva, M. S. (2022). Ontogenetic Principles of Accelerated Aging and the Prospects for Its Prevention and Treatment. *Advances in Gerontology*, 12(3), 294-304. <https://doi.org/10.1134/S2079057022030080>

24. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Klimova, E. M., Linkevych, O. S., Lebid, K. M., Al-Bahadli, A. M. M., & Alsardia, M. M. A. (2016). Young and old animals use various strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis. *Advances in Gerontology*, 29(4), 555-566. <https://doi.org/10.1134/S2079057017010040>

25. Bozhkov, A. I., Klimova, O. M., Nikitchenko, Y. V., Kurguzova, N. I., Linkevych, O. S., Lebid, K. M., ... & Al-Begai, M. A. (2017). Ontogenetic approach to the study of mechanisms of copper-induced liver fibrosis. *Advances in Aging Research*, 6(3), 39-54. <https://doi.org/10.4236/aar.2017.63005>
26. Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E., & Sturmberg, J. P. (2018). Inflammation—nature's way to efficiently respond to all types of challenges: implications for understanding and managing “the epidemic” of chronic diseases. *Frontiers in medicine*, 5, 316. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
27. Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., & Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology*, 88, 1929-1938. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1355-y>
28. Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol research & health*, 27(4), 277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc6668865/>
29. Pisano, M. B., Giadans, C. G., Flichman, D. M., Ré, V. E., Preciado, M. V., & Valva, P. (2021). Viral hepatitis update: Progress and perspectives. *World journal of gastroenterology*, 27(26), 4018. <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v27.i26.4018>
30. Gracey, E., Burssens, A., Cambre, I., Schett, G., Lories, R., McInnes, I. B., ... & Elewaut, D. (2020). Tendon and ligament mechanical loading in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Nature reviews rheumatology*, 16(4), 193-207. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0364-x>
31. Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 151-166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
32. Alemany, M. (2024). The Metabolic Syndrome, a Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2251. <https://doi.org/10.3390/ijms25042251>
33. Sharma, V., & Mehdi, M. M. (2023). Oxidative stress, inflammation and hormesis: The role of dietary and lifestyle modifications on aging. *Neurochemistry international*, 164, 105490. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105490>

34. Yu, L. (2021). Pathogenesis of liver injury and hepatic failure. *Artificial liver*, 105-166. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5984-6_6
35. Tanwar, S., Rhodes, F., Srivastava, A., Trembling, P. M., & Rosenberg, W. M. (2020). Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World journal of gastroenterology*, 26(2), 109. <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v26.i2.109>
36. Michalopoulos, G. K., & Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 18(1), 40-55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>
37. Calabrese, E. J., & Agathokleous, E. (2022). Hormesis: Transforming disciplines that rely on the dose response. *Iubmb Life*, 74(1), 8-23. <https://doi.org/10.1002/iub.2529>
38. Schirmacher, V. (2021). Less can be more: the hormesis theory of stress adaptation in the global biosphere and its implications. *Biomedicines*, 9(3), 293. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030293>
39. Berry III, R., & López-Martínez, G. (2020). A dose of experimental hormesis: When mild stress protects and improves animal performance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 242, 110658. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110658>
40. Haiovyi, S., & Bozhkov, A. (2023). Hormetic effect on the toxic action of copper ions depends on the tissue distribution of copper ions. *Grail of Science*, (31), 157-162. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.15.09.2023.26>
41. Stefan, N., & Cusi, K. (2022). A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 10(4), 284-296. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00003-1)
42. Dewidar, B., Kahl, S., Pafili, K., & Roden, M. (2020). Metabolic liver disease in diabetes—from mechanisms to clinical trials. *Metabolism*, 111, 154299. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154299>

43. Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2020). Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(2), 96-108. <https://doi.org/10.1177/1535370219898141>
44. Trivedi, P. J., & Hirschfield, G. M. (2021). Recent advances in clinical practice: epidemiology of autoimmune liver diseases. *Gut*, 70(10), 1989-2003. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322362>
45. Dawood, R. M., El-Meguid, M. A., Salum, G. M., & El Awady, M. K. (2020). Key players of hepatic fibrosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 40(10), 472-489. <https://doi.org/10.1089/jir.2020.0059>
46. Liu, X., Xu, J., Rosenthal, S., Zhang, L. J., McCubbin, R., Meshgin, N., ... & Kisseleva, T. (2020). Identification of lineage-specific transcription factors that prevent activation of hepatic stellate cells and promote fibrosis resolution. *Gastroenterology*, 158(6), 1728-1744. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.027>
47. An, S. Y., Petrescu, A. D., & DeMorrow, S. (2021). Targeting certain interleukins as novel treatment options for liver fibrosis. *Frontiers in pharmacology*, 12, 645703. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.645703>
48. Luo, L., Zhang, W., You, S., Cui, X., Tu, H., Yi, Q., ... & Liu, O. (2024). The role of epithelial cells in fibrosis: mechanisms and treatment. *Pharmacological Research*, 107144. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107144>
49. Duca, G., & Travin, S. (2020). Reactions' mechanisms and applications of hydrogen peroxide. *American Journal of Physical Chemistry*, 9(2), 36-44. <https://doi.org/10.11648/j.ajpc.20200902.13>
50. Chen, L., Min, J., & Wang, F. (2022). Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 378. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01229-y>
51. Maung, M. T., Carlson, A., Olea-Flores, M., Elkhadragey, L., Schachtschneider, K. M., Navarro-Tito, N., & Padilla-Benavides, T. (2021). The molecular and cellular basis of copper dysregulation and its relationship with human

pathologies. *The FASEB Journal*, 35(9), e21810.
<https://doi.org/10.1096/fj.202100273RR>

52. Kang, N. L., Zhang, J. M., Liu, Y. R., Lin, S., Dong, J., Jiang, J. J., ... & Zeng, D. W. (2020). Novel predictive models using serum ceruloplasmin levels for hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis B infection. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 44(1), 57-65.
<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.04.001>

53. Zhalsanova, I. Z., Fonova, E. A., Zhigalina, D. I., & Skryabin, N. A. (2023). The ATOX1 Gene Role in Copper Metabolism and the Pathogenesis of Copper-Induced Diseases. *Russian Journal of Genetics*, 59(3), 242-250.
<https://doi.org/10.1134/S1022795423030122>

54. Gudekar, N., Shanbhag, V., Wang, Y., Ralle, M., Weisman, G. A., & Petris, M. J. (2020). Metallothioneins regulate ATP7A trafficking and control cell viability during copper deficiency and excess. *Scientific reports*, 10(1), 7856.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64521-3>

55. Mandal, T., Kar, S., Maji, S., Sen, S., & Gupta, A. (2020). Structural and functional diversity among the members of CTR, the membrane copper transporter family. *The Journal of membrane biology*, 253, 459-468.
<https://doi.org/10.1007/s00232-020-00139-w>

56. Lutsenko, S. (2021). Dynamic and cell-specific transport networks for intracellular copper ions. *Journal of cell science*, 134(21), jcs240523.
<https://doi.org/10.1242/jcs.240523>

57. Grasso, M., Bond, G. J., Kim, Y. J., Boyd, S., Dzebo, M. M., Valenzuela, S., ... & Brady, D. C. (2021). The copper chaperone CCS facilitates copper binding to MEK1/2 to promote kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6), 101314. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101314>

58. Swaminathan, A. B., & Gohil, V. M. (2022). The role of COA6 in the mitochondrial copper delivery pathway to cytochrome c oxidase. *Biomolecules*, 12(1), 125. <https://doi.org/10.3390/biom12010125>

59. Bonaccorsi, M., Knight, M. J., Le Marchand, T., Dannatt, H. R., Schubeis, T., Salmon, L., ... & Pintacuda, G. (2020). Multimodal response to copper binding in superoxide dismutase dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(46), 19660-19667. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c09242>
60. Jayawardena, D.P., Heinemann, I.U., Stillman, M.J., 2017. Zinc binds non-cooperatively to human liver metallothionein 2a at physiological pH. *Biochemical and biophysical research communications*, *493* (1), 650-653. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.137>
61. Krężel, A., Maret, W., 2017. The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, *18*, 1237, <https://doi.org/10.3390/ijms18061237>
62. Krezel, A., & Maret, W. (2021). The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins. *Chemical reviews*, *121*(23), 14594-14648. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00371>
63. Ho, T., Ahmadi, S., & Kerman, K. (2022). Do glutathione and copper interact to modify Alzheimer's disease pathogenesis?. *Free Radical Biology and Medicine*, *181*, 180-196. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.025>
64. Dai, H., Wang, L., Li, L., Huang, Z., & Ye, L. (2021). Metallothionein 1: A new spotlight on inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*, *12*, 739918. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739918>
65. Pretsch, D., Rollinger, J. M., Schmid, A., Genov, M., Wöhrer, T., Krenn, L., ... & Pretsch, A. (2020). Prolongation of metallothionein induction combats A β and α -synuclein toxicity in aged transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, *10*(1), 11707. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68561-7>
66. Suzuki, K. T., Someya, A., Komada, Y., & Ogra, Y. (2002). Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of inorganic biochemistry*, *88*(2), 173-182. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00376-2](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00376-2)

67. Jia, R., Song, Z., Lin, J., Li, Z., Shan, G., & Huang, C. (2021). Gawky modulates MTF-1-mediated transcription activation and metal discrimination. *Nucleic Acids Research*, 49(11), 6296-6314. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab474>
68. Yiwen, W., Xiaohan, T., Chunfeng, Z., Xiaoyu, Y., Yaodong, M., & Huanhuan, Q. (2022). Genetics of metallothioneins in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 288, 132562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132562>
69. Meng, C., Wang, K., Zhang, X., & Zhu, X. (2021). Purification, secondary structure and antioxidant activity of metallothionein zinc-binding proteins from *Arca subcrenata*. *Protein Expression and Purification*, 182, 105838. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105838>
70. Mehdi, M. M., Solanki, P., & Singh, P. (2021). Oxidative stress, antioxidants, hormesis and calorie restriction: The current perspective in the biology of aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 95, 104413. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2021.104413>
71. Becker, H.C., Lopez, M.F. (2024). Animal Models of Excessive Alcohol Consumption in Rodents. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 1–32. https://doi.org/10.1007/7854_2024_461
72. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., Haiovyi, S. S. (2023). Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006>
73. Zaretsky, J. Z., & Wreschner, D. H. (2008). Protein multifunctionality: principles and mechanisms. *Translational oncogenomics*, 3, 99–136. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21566747>
74. Rothschild, L. J. (2006). The role of emergence in biology. *The re-emergence of emergence: The emergentist hypothesis from science to religion*, 151-165. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199544318.003.0006>

75. Umerez, J. (2016). Biological Organization from a Hierarchical Perspective. *Evolutionary theory: A hierarchical perspective*, 63. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226426198.001.0001>
76. Whitty, A. (2008). Cooperativity and biological complexity. *Nature chemical biology*, 4(8), 435-439. <https://doi.org/10.1038/nchembio0808-435>
77. Wu, T. M., & Austin, S. (1978). Cooperative behavior in biological systems. *Physics Letters A*, 65(1), 74-76. [https://doi.org/10.1016/0375-9601\(78\)90137-8](https://doi.org/10.1016/0375-9601(78)90137-8)
78. Solomatin, S. V., Greenfeld, M., & Herschlag, D. (2011). Implications of molecular heterogeneity for the cooperativity of biological macromolecules. *Nature structural & molecular biology*, 18(6), 732-734. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2052>
79. Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, 58(10), 465-523. <https://doi.org/10.1007/BF00623322>
80. Brestoff, J. R., & Artis, D. (2015). Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell*, 161(1), 146-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.022>
81. Smith, E. (2013). Emergent order in processes: The interplay of complexity, robustness, correlation, and hierarchy in the biosphere. *Complexity and the arrow of time*, 191-223. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139225700.012>
82. Natoli, G., & Ostuni, R. (2019). Adaptation and memory in immune responses. *Nature immunology*, 20(7), 783-792. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0399-9>
83. Wilson, D. F., & Matschinsky, F. M. (2020). Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Medical hypotheses*, 140, 109638. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109638>
84. Truxell, E. M., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2007). Ethanol intake in the juvenile, adolescent, and adult rat: effects of age and prior exposure to ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 31(5), 755-765. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00358.x>

85. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Kurguzova, N. I., & Dlubovskaya, V. L. (2014). Metabolic memory enhances hormesis effect to the copper ions in age-depended manner. *Adv Gerontol*, 27(1), 72-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051761/>

86. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Klimova, E. M., Linkevych, O. S., Lebid, K. M., Al-Bahadli, A. M. M., & Alsardia, M. M. A. (2017). Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis. *Advances in Gerontology*, 7, 41-50. <https://doi.org/10.1134/S2079057017010040>

87. Нормативно-правовой акт № 416/20729. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text> (дата звернення: 27.05.2024).

88. Leib, S. A. (2021). Hämatologische Parameter bei Haarschafen während zweier physiologischer Reproduktionszustände im Amazonasgebiet Ecuadors. *Berichte über Landwirtschaft-Zeitschrift für Agrarpolitik und Landwirtschaft*. <https://doi.org/10.12767/buel.v99i1.253>

89. Arion, W. J., Schulz, L. O., Lange, A. J., Telford, J. N., & Walls, H. E. (1983). The characteristics of liver glucose-6-phosphatase in the envelope of isolated nuclei and microsomes are identical. *Journal of Biological Chemistry*, 258(20), 12661-12669. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44227-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44227-X)

90. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>

91. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Kurguzova, N. I., & Dlubovskaia, V. L. (2014). Metabolic memory enhances hormesis effect to the copper ions in age-depended manner. *Advances in Gerontology*, 27(1), 72-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051761/>

92. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70(1), 158-169. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6066618/>

93. Carlberg, I. N. C. E. R., & Mannervik, B. E. N. G. T. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of biological chemistry*, 250(14), 5475-5480. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41206-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41206-4)
94. Varghese, S., Tang, Y., & Imlay, J. A. (2003). Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *Journal of bacteriology*, 185(1), 221-230. <https://doi.org/10.1128/jb.185.1.221-230.2003>
95. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
96. Asakawa, T., & Matsushita, S. (1980). Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 15(3), 137-140. <https://doi.org/10.1007/BF02540959>
97. Massie, H. R., Aiello, V. R., & Banziger, V. (1983). Iron accumulation and lipid peroxidation in aging C57BL/6J mice. *Experimental gerontology*, 18(4), 277-285. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(83\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0531-5565(83)90038-4)
98. Schutte, R., Smith, L., & Wannamethee, G. (2022). Alcohol—The myth of cardiovascular protection. *Clinical Nutrition*, 41(2), 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.12.009>
99. Arora, M., ElSayed, A., Beger, B., Naidoo, P., Shilton, T., Jain, N., ... & Champagne, B. M. (2022). The impact of alcohol consumption on cardiovascular health: myths and measures. *Global Heart*, 17(1). <https://doi.org/10.5334%2Fgh.1132>
100. Bozhkov, A. I., Kurguzova, N. I., Krivoruchko, T. V., Lebed', E. N., Mikhailets, A. O., Danladi, S. D., ... & Girich, M. S. (2014). A cyclic feeding regime: A new model in experimental gerontology. *Advances in gerontology*, 4, 252-259. <https://doi.org/10.1134/S2079057014040079>
101. Bozhkov, A., Ivanov, I., Klimova, E., Kurguzova, N., Bozhkov, A., Goltvyanskiy, A., & Nikitchenko, Y. (2021). “Mix-Factor” is involved in the regulation of the organism's redox systems in the late stages of ontogenesis and affects

the lifespan of animals. *Ageing and longevity*, 2(2), 24-36.
<https://doi.org/10.47855/jal9020-2021-2-4>

102. Nikitchenko, Y. V., Klochkov, V. K., Kavok, N. S., Karpenko, N. A., Sedyh, O. O., Bozhkov, A. I., ... & Semynozhenko, V. P. (2020). Gadolinium orthovanadate nanoparticles increase survival of old rats. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.02.029>

103. Nikitchenko, Y. V., Klochkov, V. K., Kavok, N. S., Karpenko, N. A., Sedyh, O. O., Bozhkov, A. I., ... & Seminozhenko, V. P. (2020). Orthovanadate nanoparticles delay the accelerated aging in rats via the prevention of oxidative disturbances. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.043>

104. Lu, Y., & George, J. (2024). Interaction between fatty acid oxidation and ethanol metabolism in liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 326(5), G483-G494. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00281.2023>

105. Pannala, V. R., Estes, S. K., Rahim, M., Trenary, I., O'Brien, T. P., Shiota, C., ... & Wallqvist, A. (2020). Mechanism-based identification of plasma metabolites associated with liver toxicity. *Toxicology*, 441, 152493. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152493>

106. Kashani, K., Rosner, M. H., & Ostermann, M. (2020). Creatinine: from physiology to clinical application. *European journal of internal medicine*, 72, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.10.025>

107. Balestrino, M. (2021). Role of creatine in the heart: Health and disease. *Nutrients*, 13(4), 1215. <https://doi.org/10.3390/nu13041215>

108. Kaplan, E.L. and Meier, P. (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457-481. <https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452>

109. Bonnichsen RK, Brink NG (1955) Liver alcohol dehydrogenase. In: Colowick SP, Kaplan N (eds) *Methods of enzymology*, vol 1. Academic Press, New York, p 496

110. Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, *36*(9), 1495-1502. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00135-8)
111. Haugen, H. N. (1953). The determination of endogenous creatinine in plasma and urine. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *5*(1), 48-57. <https://doi.org/10.3109/00365515309093511>
112. Bozhkov, A., Ionov, I., Kurhuzova, N., Novikova, A., Katerynych, O., & Akzhyhitov, R. (2022). Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver. *Clinical Nutrition Open Science*, *41*, 82-97. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.12.003>
113. Wang, F. D., Zhou, J., & Chen, E. Q. (2022). Molecular mechanisms and potential new therapeutic drugs for liver fibrosis. *Frontiers in pharmacology*, *13*, 787748. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.787748>
114. Kurguzova, N. I., Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Begai, M. A. Y., Goltvyansky, A. V., Alsardia, M. M. A., & Bozhkov, A. A. (2015). 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*, *2*(6-1), 25-32. <https://doi.org/10.11648/j.ajbls.s.2014020601.15>
115. Bozhkov, A. I., Ivanov, E. G., Kuznetsova, Y. A., Ohiienko, S. L., & Bondar', A. Y. (2017). Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture. *Frontiers in biology*, *12*, 271-279. <https://doi.org/10.1007/s11515-017-1458-y>
116. Klimova, E. M., Bozhkov, A. I., Lavinska, O. V., Drozdova, L. A., & Kurhuzova, N. I. (2023). Low molecular weight cytotoxic components (DAMPs) form the post-COVID-19 syndrome. *obiology*, *228*(1), 152316. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152316>
117. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., ... & Haiovy, S. S. (2023). Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense

system. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48-63.
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006>

118. Сурай, П. Ф., Іонов, І. А., Рошаль, А. Д. (1991). Спосіб кількісного визначення вітаміну А. № 1684661. *БІ*, (38).

119. Wieser, M. E., Holden, N., Coplen, T. B., Böhlke, J. K., Berglund, M., Brand, W. A., ... & Zhu, X. K. (2013). Atomic weights of the elements 2011 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 1047-1078.
<https://doi.org/10.1351/PAC-REP-13-03-02>

120. Li, D., Yi, J., Han, G., & Qiao, L. (2022). MALDI-TOF mass spectrometry in clinical analysis and research. *ACS Measurement Science Au*, 2(5), 385-404.
<https://doi.org/10.1021/acsmesuresciau.2c00019>

121. Peris-Díaz, M. D., Guran, R., Zitka, O., Adam, V., & Krężel, A. (2020). Metal- and affinity-specific dual labeling of cysteine-rich proteins for identification of metal-binding sites. *Analytical Chemistry*, 92(19), 12950-12958.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01604>

122. Chainy, G. B. N., Paital, B., & Dandapat, J. (2016). An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/6126570>

123. Mailloux, R. J. (2020). An update on mitochondrial reactive oxygen species production. *Antioxidants*, 9(6), 472. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>

124. Bozhkov, A. I., Klimova, O. M., Nikitchenko, Y. V., Kurguzova, N. I., Linkevych, O. S., Lebid, K. M., ... & Al-Begai, M. A. (2017). Ontogenetic approach to the study of mechanisms of copper-induced liver fibrosis. *Advances in Aging Research*, 6(3), 39-54. <https://doi.org/10.4236/aar.2017.63005>

125. Caserta, S., & Pera, A. (2021). Immune Responses to Persistent or Recurrent Antigens: Implications for Immunological Memory and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12, 643989.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643989>

126. Bozhkov, A. I., Dlubovskaya, V. L., Dmitriev, Y. V., Meshaikina, N. I., Maleev, V. A., & Klimova, E. M. (2011). Supposed role of “Metabolic memory” in formation of response reaction to stress factors in young and adult organisms. *Advances in Gerontology, 1*, 63-71. <https://doi.org/10.1134/S2079057011010048>

127. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., Akzhyhitov, R. A., Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., ... & Gromovoi, T. Y. (2021). The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging, 5*, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.11.001>

128. Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biology and Medicine 14* (3), 325-337. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90029-T](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90029-T).

129. Angelova, P. R., Esteras, N., & Abramov, A. Y. (2021). Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Medicinal Research Reviews, 41*(2), 770-784. <https://doi.org/10.1002/med.21712>

130. Xue, Q., Kang, R., Klionsky, D. J., Tang, D., Liu, J., & Chen, X. (2023). Copper metabolism in cell death and autophagy. *Autophagy, 19*(8), 2175-2195. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2200554>

131. Jena, A. B., Samal, R. R., Bhol, N. K., & Duttaroy, A. K. (2023). Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 162*, 114606. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114606>

132. Gasmi, A., Peana, M., Arshad, M., Butnariu, M., Menzel, A., & Bjørklund, G. (2021). Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Archives of Toxicology, 95*(4), 1161-1178. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02974-9>

133. Molotkov, A., Deltour, L., Foglio, M. H., Cuenca, A. E., & Duester, G. (2002). Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes Adh1 and Adh4 in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null

mutant mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13804-13811.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112039200>

134. Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews*, 80(3), 1107-1213.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107>

135. Bozhkov, A. I., & Nikitchenko, Y. V. (2014). Thermogenesis and longevity in mammals. Thyroxin model of accelerated aging. *Experimental gerontology*, 60, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.10.017>

136. Weiskirchen, R., & Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 3(6), 344. [10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03](https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03)

137. Bozhkov, A. I., Bozhkov, A. A., Ponomarenko, I. E., Kurguzova, N. I., Akzhyhitov, R. A., Goltvyanskii, A. V., ... & Shapovalov, S. O. (2021). Elimination of the toxic effect of copper sulfate is accompanied by the normalization of liver function in fibrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 655-663.
<https://doi.org/10.15421/022190>

138. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 7, 757-772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>

139. Borel, P., Troadec, R., Damiani, M., Halimi, C., Nowicki, M., Guichard, P., ... & Desmarchelier, C. (2023). Vitamin A deficiency during the perinatal period induces changes in vitamin A metabolism in the offspring. The regulation of intestinal vitamin A metabolism via ISX occurs only in male rats severely vitamin A-deficient. *European Journal of Nutrition*, 62(2), 633-646.
<https://doi.org/10.1007/s00394-022-03019-2>

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Публікації у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science:

1. Bozhkov, A. I., Bozhkov, A. A., Ponomarenko, I. E., Kurguzova, N. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Goltvyanskii, A. V., Klimova, E.M., Shapovalov, S. O. (2021). Elimination of the toxic effect of copper sulfate is accompanied by the normalization of liver function in fibrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 655-663. DOI: <https://doi.org/10.15421/022190> (*Scopus, Web of Science*)

Публікації у періодичному науковому виданні, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу (Нідерланди):

1. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., **Akzhyhitov, R. A.**, Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., Albegai, M. A., Gromovoi, T. Y. (2021). The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*, 5, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.11.001> (*Scopus, Q3*)

2. Bozhkov, A., Ionov, I., Kurhuzova, N., Novikova, A., Katerynych, O., & **Akzhyhitov, R. A.** (2022). Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver. *Clinical Nutrition Open Science*, 41, 82-97. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.12.003> (*Scopus, Q3*)

3. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., **Akzhyhitov, R. A.**, Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., Haiovy, S. S. (2023). Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense system. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006> (*Scopus, Q2*)

4. Bozhkov, A. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Bilovetska, S. G., Ivanov, E. G., Dobrianska, N. I., & Bondar, A. Y. (2024). The effect of retinol acetate on liver

fibrosis depends on the temporal features of the development of pathology. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 14(3), 101338.

<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2023.101338> (Scopus, Q2)

5. Bozhkov, A. A., Ganin, V. Y., **Akzhyhitov, R. A.**, Ivanov, E. G., Bilovetska, S. G., Dobrianska, N. I., Novikova A.V., Bozhkov, A. I. (2024). Chlorogenic acid from sunflower meal regulates the number of immunocompetent cells in animals with toxic liver fibrosis. *Clinical Nutrition Open Science*, 53, 78-94.

<https://doi.org/10.1016/j.nutos.2023.12.007> (Scopus, Q3)

6. Bozhkov, A. I., Dobrianska, N. I., **Akzhyhitov, R. A.**, Novikova, A. V., Haiovyi, S. S., Pankratova, A. O., Ivanova, O. O., Onipko, I. R., Komburlei, Y. O. (2024). Young and old animals “use” different strategies for adapting to the chronic effects of ethanol. *Translational Medicine of Aging*, 8, 1-11.

<https://doi.org/10.1016/j.tma.2024.01.001> (Scopus, Q3)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

Akzhyhitov R. A. «Metallothionein: brief overview»: *X Всеукраїнській науковій конференції з міжнародною участю: «Academic and scientific challenges of diverse fields of knowledge in the 21st century. CLIL in action»*. P. 228–235

Ivanov, E., Akzhyhitov, R., & Bozhkov, A. (2024). COMPONENTS FROM VARIOUS BIOLOGICAL SOURCES REDUCES THE TOXIC EFFECTS OF COPPER SULPHATE IN OLD ANIMALS. Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ» (V міжнародній науково-практичній конференції «Ricerche Scientifiche e Metodi della Loro Realizzazione: Esperienza Mondiale e Realtà Domestiche»), (April 26, 2024; Bologna, Italy), 191-199. <https://doi.org/10.36074/logos-26.04.2024.039>

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 04:08:37 10.06.2024

Назва файлу з підписом: Akzhyhitov_diss.pdf
Розмір файлу з підписом: 5.0 МБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Akzhyhitov_diss.pdf
Розмір файлу без підпису: 5.0 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: АКЖИГІТОВ РУСТАМ АНВЯРОВИЧ
П.І.Б.: АКЖИГІТОВ РУСТАМ АНВЯРОВИЧ
Країна: Україна
РНОКПП: 3508112172
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 04:07:35
10.06.2024
Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"
Серійний номер: 5E984D526F82F38F040000006A65680166022505
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підписаний PDF-файл (PAdES)
Формат підпису: З повними даними для перевірки (PAdES-B-LT)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2024.04.15 13:00