

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ГАНІН ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ**

УДК 574.3.017.3:[616.36-006.327:546.56:544.41.6]:[547.837+547.587.52]-  
326(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Розробка способу одержання та оцінка гепатотропної активності  
хлорогенової кислоти**

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

\_\_\_\_\_ В.Ю. Ганін

Науковий керівник:

Анатолій БОЖКОВ, доктор біологічних наук, професор

Харків 2026

## АНОТАЦІЯ

**Ганін В.Ю. Розробка способу одержання та оцінка гепатотропної активності хлорогенової кислоти.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 Біологія). – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2026.

Процеси розвитку та старіння біологічних систем і досі займають одне з центральних місць серед нерозв'язаних біомедичних проблем. Така ситуація пояснюється тим, що в основі процесів старіння лежать складні, нелінійні процеси темпоральних взаємодій організму із сукупністю чинників навколишнього середовища — експосоною. Результати таких взаємодій проявляються у системній перебудові метаболізму, яка спрямована на збереження цілісності та життєздатності системи. Ці явища ми визначаємо як процеси динамічної адаптації.

При розгляді проблеми адаптації дослідники часто стикаються з формуванням «втрати» реактивності біологічної системи на дії експосоми, тобто формуванням таких станів, за яких біологічна система втрачає «чутливість» до подальших дій експосоми, і такі стани прийнято визначати як хронічні патології. Більшість хронічних патологій мають вік-залежний характер.

При дослідженні процесів старіння науковці стикаються з явищем збільшення кількості хронічних патологій, які не піддаються лікуванню та скорочують тривалість життя. Розуміння механізмів формування хронічних патологій та розробка способів їх профілактики й лікування є однією з найактуальніших задач на стику біології та медицини.

Вдалим прикладом темпоральних взаємодій організму з чинниками експосоми є зміна балансу міді в організмі у бік її збільшення та формування такої хронічної патології, як Cu-індукований фіброз печінки. Раніше в нашій лабораторії було показано, що послідовні дії іонів міді на організм експериментальних тварин, з одного боку, супроводжувалися формуванням стійкості таких тварин до токсичної дії цього металу та проявом гормезису, однак на тлі такого позитивного ефекту мало місце й формування фіброзу печінки.

Попри актуальність та значні зусилля щодо розробки способів лікування хронічних патологій, проблема далека від вирішення. Суть проблеми формування хронічних патологій може бути зведена до пошуку відповіді на питання: «Чому і як адаптивна відповідь організму, спрямована на виживання в нових екстремальних умовах, призводить до втрати подальшої адаптивності та формує загрозливі патологічні стани?»

**Метою роботи було:** розробка концепції механізму формування хронічних станів на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки та дослідження ролі природних поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у запобіганні формуванню таких хронічних станів.

**У зв'язку з цим вирішували такі завдання:** 1 – розробити й обґрунтувати концепцію «експосом-індукованого метаболічного ресетингу»; 2 – дослідити роль балансу міді в механізмах регуляції біологічних процесів на різних біологічних моделях (савці, дріжджі та бактерії); 3 – дослідити вплив поліфенольних сполук соняшникового шроту на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки за різних способів їх введення в організм; 4 – розробити спосіб отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками з метою стабілізації хлорогенової кислоти та надати характеристику цим комплексам; 5 –

дослідити вплив отриманих супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки; 6 – дослідити вплив отриманих супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками на деякі біохімічні показники у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.

Вибір поліфенольних сполук соняшникового шроту як засобів усунення фібротичних характеристик печінки пояснюється кількома обставинами: 1 – усі відомі класичні гепатопротекторні медичні препарати малоефективні й не дозволяють лікувати фібрози на стадії цирозу; 2 – показано, що найбільш ефективними у сповільненні розвитку патологій печінки є природні сполуки; 3 – природні поліфенольні сполуки надзвичайно різноманітні та мають дуже широкий спектр біологічної дії, крім того, вони відносно легко можуть бути отримані у великих кількостях із широко доступного соняшникового шроту; 4 – поліфенольні сполуки не набули широкого застосування через їх здатність до окиснення, у зв'язку з цим отримання супрамолекулярних комплексів із такими харчовими білками, як казеїн, і зокрема казеїн молозива, може забезпечити стабілізацію такої поліфенольної сполуки, як хлорогенова кислота, та розширити їх застосування.

Для розв'язання цих завдань використовували комплекс фізико-хімічних методів (синтез квантових точок, спосіб формування супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива, які отримували з молозива, та поліфенольними сполуками, метод отримання яких був розроблений самостійно), біофізичні методи (УФ-спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, електропровідність водних розчинів супрамолекулярних комплексів), біохімічні методи (визначення активності ряду ферментів печінки, вмісту альбуміну, креатиніну, холестерину, глюкози, тригліцеридів тощо), цитологічні методи (визначення кількості

імунокомпетентних клітин, кількості еритроцитів і тромбоцитів), мікробіологічні методи (інтенсивність росту мікроорганізмів), біотехнологічні методи (отримання та характеристика автолізатів дріжджів і мікрководоростей) та фізіологічні методи (моделювання Cu-індукованого фіброзу печінки й оцінка біологічної дії біологічних субстанцій на експериментальних тваринах).

Розроблено концепцію: «Експосом-індукованого метаболічного ресетингу», суть якої полягає в тому, що в процесі формування хронічних станів біологічна система проходить низку послідовних, взаємопов'язаних етапів: адаптація; формування метаболічної та епігенетичної пам'яті й закріплення сформованих адаптивних метаболічних патернів у формі стабільних незворотних метаболічних станів — ресетингу.

Особливістю цих стійких станів є те, що сформовані метаболічні патерни, як адаптивні варіанти на дії середовища, у даному випадку зміщення балансу міді у бік її збільшення, здатні до автозбереження навіть після усунення факторів, що їх індукували. Усунення таких домінуючих метаболічних патернів можливе лише шляхом формування нового (зворотного) ресетингу.

Висловлено припущення, що формування зворотного ресетингу може бути здійснене лише у випадку застосування природних субстанцій

Розроблено простий та ефективний спосіб отримання поліфенольних сполук із соняшникового шроту. Синтезовано квантові точки на основі фенілефрину та розроблено чутливий флуоресцентний метод визначення кількості хлорогенової кислоти в розчинах. Показано, що у складі поліфенольних сполук соняшникового шроту міститься не менше ніж 15 % хлорогенової кислоти.

Вперше розроблено спосіб отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном та поліфенольними сполуками соняшникового шроту. Доведено, що такі комплекси формуються водневими зв'язками;

методом молекулярного докінгу показано ймовірність наявності 9 потенційних центрів локалізації хлорогенової кислоти в молекулах  $\beta$ -казеїну. Усі центри зв'язування хлорогенової кислоти мали різну афінність

Вперше показано, що пероральний прийом поліфенольних сполук соняшникового шроту тваринами з Су-індукованим фіброзом печінки відновлював кількість імунокомпетентних клітин до контрольних інтактних значень на ранніх стадіях розвитку фіброзу. Такий позитивний, протизапальний ефект більшою мірою проявлявся у випадку перорального введення порівняно з внутрішньочеревним введенням поліфенольних сполук. Цей факт опосередковано вказує на те, що ще одним із можливих механізмів дії поліфенольних сполук може бути пов'язаний із участю мікробіома кишечника в реалізації біологічних ефектів поліфенолів.

Вперше показано, що отримані супрамолекулярні комплекси «казеїн-поліфеноли», які забезпечували тривале збереження хлорогенової кислоти, сприяли нормалізації кількості імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із фіброзом печінки. Активність аланінамінотрансферази, яка була інгібована у тварин із Су-індукованим фіброзом, відновлювалася до рівня інтактного контролю після перорального прийому супрамолекулярних комплексів. Доведено, що така дія супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні», збагачених хлорогеновою кислотою, є перспективними продуктами функціонального харчування, які виконують профілактичну функцію фіброзу печінки на ранніх стадіях його розвитку.

**Ключові слова:** *Експосома, метаболічний ресетинг, адаптація, епігенетична пам'ять, хронічні патології, Су-індукований фіброз, поліфенольні сполуки, хлорогенова кислота, супрамолекулярні комплекси, казеїн молозива, імунокомпетентні клітини, функціональне харчування, протизапальний ефект, квантові точки.*

## ABSTRACT

**Hanin V.Yu.** Development of a method for obtaining and evaluation of the hepatotropic activity of chlorogenic acid. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology (Field of Knowledge 09 Biology). – V.N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2026.

The processes of development and aging of biological systems still occupy one of the central positions among unresolved biomedical problems. This situation is explained by the fact that the basis of aging processes lies in complex, non-linear temporal interactions of the organism with the set of environmental factors — the exposome. The results of such interactions are manifested in systemic metabolic restructuring aimed at preserving the integrity and viability of the system. We define these phenomena as processes of dynamic adaptation.

When considering the problem of adaptation, researchers often encounter the formation of a “loss” of reactivity of the biological system to the actions of the exposome, i.e., the formation of states in which the biological system loses “sensitivity” to subsequent actions of the exposome, and such states are defined as chronic pathologies. Most chronic pathologies are age-dependent.

In studying aging processes, scientists face the phenomenon of an increase in chronic pathologies that are resistant to treatment and reduce life expectancy. Understanding the mechanisms of chronic pathology formation and developing methods for their prevention and treatment is one of the most urgent tasks at the intersection of biology and medicine.

A striking example of temporal interactions of the organism with exposome factors is the upward shift in the body's copper balance and the subsequent development of a chronic pathology such as Cu-induced liver fibrosis.

Previously, in our laboratory, it was shown that sequential actions of copper ions on the organism of experimental animals, on the one hand, were

accompanied by the formation of resistance of such animals to the toxic effects of this metal and the manifestation of hormesis, however, against the background of such a positive effect, liver fibrosis was also formed.

Despite the relevance and significant efforts to develop methods for treating chronic pathologies, the problem remains far from being solved. The essence of the problem of chronic pathology formation can be reduced to the search for an answer to the question: “Why and how does the adaptive response of the organism, aimed at survival in new extreme conditions, lead to the loss of subsequent adaptability and the formation of threatening pathological states?”

**The aim of the work was:** to develop a concept of the mechanism of chronic state formation on the model of Cu-induced liver fibrosis and to study the role of natural polyphenolic compounds enriched with chlorogenic acid in preventing the formation of such chronic states.

**To this end, the following tasks were addressed:** 1 – To develop and substantiate the concept of “exposome-induced metabolic resetting.” 2 – To investigate the role of copper balance in the mechanisms regulating biological processes in various biological models (mammals, yeast, and bacteria) 3) to investigate the effect of sunflower meal polyphenolic compounds on the number of immunocompetent cells in the bloodstream of animals with Cu-induced liver fibrosis depending on the route of administration; 4) to develop a method for obtaining supramolecular complexes of colostrum casein with polyphenolic compounds to stabilize chlorogenic acid and to characterize these complexes; 5) to study the effect of the obtained supramolecular complexes of colostrum casein with polyphenolic compounds on the number of immunocompetent cells in the bloodstream of animals with Cu-induced liver fibrosis; 6) to investigate the effect of the obtained supramolecular complexes on certain biochemical parameters in animals with Cu-induced liver fibrosis.

The choice of sunflower meal polyphenolic compounds as a means of eliminating liver fibrotic characteristics is explained by several factors: 1) all

known classical hepatoprotective medical drugs are ineffective and do not cure fibrosis at the cirrhosis stage; 2) natural compounds have been shown to be the most effective in slowing the progression of liver pathologies; 3) natural polyphenolic compounds are extremely diverse, have a very broad spectrum of biological activity, and can be relatively easily obtained in large quantities from widely available sunflower meal; 4) polyphenolic compounds have not been widely used due to their susceptibility to oxidation; thus, obtaining supramolecular complexes with food proteins such as casein, particularly colostrum casein, can stabilize polyphenolic compounds like chlorogenic acid and expand their application.

To accomplish these tasks, a combination of physicochemical methods was used (synthesis of quantum dots, a method for forming supramolecular complexes of casein obtained from colostrum with polyphenolic compounds, the extraction method for which was developed independently), alongside biophysical methods (UV spectroscopy, fluorescence spectroscopy, electrical conductivity of aqueous solutions of supramolecular complexes), biochemical methods (determination of the activity of several liver enzymes, albumin, creatinine, cholesterol, glucose, triglycerides, etc.), cytological methods (determination of immunocompetent cell, erythrocyte, and platelet counts), microbiological methods (microbial growth intensity), biotechnological methods (obtaining and characterizing autolysates of yeast and macroalgae), and physiological methods (modeling of Cu-induced liver fibrosis and evaluation of the biological effect of biological substances on experimental animals).

The concept of "exposome-induced metabolic resetting" has been developed. Its core lies in the fact that during the formation of chronic states, a biological system undergoes a series of sequential, interconnected stages: adaptation, formation of metabolic and epigenetic memory, and the consolidation of formed adaptive metabolic patterns in the form of stable irreversible metabolic states — resetting.

A specific feature of these stable states is that the formed metabolic patterns, acting as adaptive responses to environmental impacts (in this case, an upward shift in copper balance), are capable of self-preservation even after the removal of the inducing factors. The elimination of such dominant metabolic patterns is only possible through the formation of a new (reverse) resetting. It has been hypothesized that the formation of reverse resetting can only be achieved through the application of natural substances.

A simple and effective method for obtaining polyphenolic compounds from sunflower meal has been developed. Quantum dots based on phenylephrine were synthesized, and a sensitive fluorescent method for determining the amount of chlorogenic acid in solutions was developed. It was shown that sunflower meal polyphenolic compounds contain at least 15% chlorogenic acid.

For the first time, a method for obtaining supramolecular complexes of casein with sunflower meal polyphenolic compounds was developed. It was proven that such complexes are formed by hydrogen bonds; molecular docking demonstrated the probability of 9 potential localization centers for chlorogenic acid in  $\beta$ -casein molecules. All chlorogenic acid binding centers exhibited different affinities.

For the first time, it was shown that oral administration of sunflower meal polyphenolic compounds to animals with Cu-induced liver fibrosis restored the number of immunocompetent cells to intact control values at early stages of fibrosis development. This positive anti-inflammatory effect was more pronounced with oral administration compared to intraperitoneal injection. This fact indirectly indicates that another possible mechanism of action of polyphenolic compounds may be associated with the involvement of the gut microbiome in mediating their biological effects.

For the first time, it was shown that the obtained "casein-polyphenol" supramolecular complexes, which ensured long-term preservation of chlorogenic acid, facilitated the normalization of immunocompetent cells in the bloodstream

of animals with liver fibrosis. Alanine aminotransferase activity, which was inhibited in animals with Cu-induced fibrosis, was restored to the intact control level after oral administration of the supramolecular complexes. It was proven that such "casein-polyphenol" supramolecular complexes enriched with chlorogenic acid are promising functional food products that provide a prophylactic function against liver fibrosis at the early stages of its development.

**Keywords:** Exposome, metabolic resetting, adaptation, epigenetic memory, chronic pathologies, Cu-induced fibrosis, polyphenolic compounds, chlorogenic acid, supramolecular complexes, colostrum casein, immunocompetent cells, functional nutrition, anti-inflammatory effect, quantum dots.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. Bozhkov A., Ivanov E. G. Bobkov V. V., Osolodchenko T. P., Yurchenko O. I., **Ganin V. Y.**, Batuieva Y.D., ... Ponomarenko S. V. The Antibacterial Activity of the Copper for Staphylococcus Aureus 124 and Pseudomonas Aeruginosa 18 Depends on its State: Metalized, Chelated and Ionic. *Heliyon*. 2024. Vol. 10, Issue 20. e39098. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39098>. (Scopus Q1).

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

**Публікації у наукових міжнародних виданнях:**

3. Bozhkov A., Belous A., Bozhkov A., **Ganin V.**, Ivanov E. et al. Pre-Adaptation of *Saccharomyces Cerevisiae* to Low Temperatures Affects the Resistance of Yeast Cells to Subsequent Autolysis, High Temperature and Overpressure. *Journal of Food Science & Nutrition*. 2023. Vol. 9. Article 172. <http://dx.doi.org/10.24966/FSN-1076/100172>

**Список публікацій, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Клімова О. М., Лавінська О. В., **Ганін В. Ю.**, Кожешкурт В. О., Мережко О. С., Биченко К. О. Біофізичні характеристики цитотоксичних сироваткових факторів та їх взаємозв'язок з порушенням імунних маркерів при новоутвореннях підшлункової залози. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2025. (додаток № 1). С. 33–34. doi:10.37321.

2. Ivanov E., Ganin V., Kosiachenko K., Sotnykova K. Development of a method for obtaining the complex “casein polyphenolic compounds” enriched with chlorogenic acid. *Grail of Science*. 2024. Vol. 38. P. 131-137. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.12.04.2024.020>

3. Косяченко К., Сотникова К., **Ганін В.** Розробка способу отримання комплексів казеїну молозива та поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.)*. Львів: Галич-Прес, 2025. С. 137–138.

4. Сотникова К., Косяченко К., **Ганін В.** Розробка способу отримання казеїну та постказеїнової фракції білків із коров'ячого молозива. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.)*. Львів: Галич-Прес, 2025. С. 161–162.

5. Burnashov B. I., **Ganin G. V.** Automation of the process of obtaining water-soluble components. *Multidisciplinary approaches in science, technology and culture (October 21-23, 2025)*. Berlin, Germany, 2025. P. 24..

6. Косяченко К., Сотникова К., **Ганін В.** Розробка флуоресцентного методу визначення кількості хлорогенової кислоти. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 15–17 квітня 2026 р.)*. Львів: Галич-Прес, 2026. С. 100.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	19
ВСТУП .....	22
РОЗДІЛ 1. ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ ПЕЧІНКИ ТА МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ ВИНИКНЕННЯ Й РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЙ ПЕЧІНКИ (літературний огляд) .....	29
1.1. Печінка — центральний орган метаболізму .....	29
1.2. Характеристика тригерів фіброзу печінки .....	34
1.3. Фіброз печінки як тимчасова реакція організму на тривалі екстремальні фактори експосоми .....	37
1.4. «Стадійність» — базова властивість функціонування та адаптації біологічних систем .....	41
1.5. Формування фіброзу печінки — приклад експозо-індукованого метаболічного ресетингу (EMR) .....	48
1.6. Потенційні підходи в усуненні експосом-індукованого метаболічного ресетингу .....	53
1.7. Характеристика поліфенольних сполук як потенційних регуляторів експосом-індукованого метаболічного ресетингу при фіброзі печінки ..	55
1.8. Структурні особливості хлорогенової кислоти .....	56
1.9. Біологічні властивості хлорогенової кислоти .....	58
Висновок до розділу 1 .....	62
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	64
2.1 Виділення поліфенольних сполук з соняшникового шроту .....	64
2.2 Отримання супрамолекулярного комплексу «казеїну молозива-ПС соняшникового шроту» .....	65

2.3 Синтез вуглецевих квантових точок (CQDs) на основі фенілефрину	67
2.4 Визначення спектральних характеристик казеїну і супрамолекулярних комплексів «казеїн-ПС»	68
2.5 Визначення електропровідності досліджуваних зразків	68
2.6. Молекулярне моделювання та молекулярний докінг	68
2.7 Виділення та очищення хлорогенової кислоти з соняшникового шроту	70
2.8 Вплив кількості екстракцій соняшникового шроту на вихід екстрактивних речовин та хлорогенової кислоти	71
2.9 Вплив температури екстракції на вихід хлорогенової кислоти із соняшникового шроту	73
2.10. Моделювання інтоксикації експериментальних тварин шляхом введення сульфату міді	74
2.11. Дизайн дослідження біологічної активності функціональних продуктів харчування на лабораторних тваринах	76
2.12 Аналітичні методи	77
2.12.1. Загальний аналіз крові	77
2.12.2. Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові	77
2.12.3. Визначення активності $\gamma$ -глутамілтрансферази у сироватці крові	78
2.12.4. Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові	78
2.12.5. Визначення вмісту альбуміну у сироватці крові	78
2.12.6. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові	79

2.12.7. Визначення концентрації загального холестерину та тригліцеридів у сироватці крові.....	79
2.13 Статистичний аналіз даних.....	79
Висновки до розділу 2:.....	80
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	82
3.1. Дослідження деяких особливостей токсичної дії іонів міді.....	82
3.1.1 Дослідження міжорганної та внутрішньоклітинної локалізації міді при зміщенні її балансу у бік збільшення концентрації.....	84
3.1.2. Дослідження ролі міді та передадаптація <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> до подальшого автолізу клітин.....	90
3.1.3. Дослідження ролі балансу між іонною та хелатною формами міді на клітинну загибель у системі <i>in vitro</i> .....	97
Висновок до розділу 3.1:.....	104
3.2. Дія поліфенольних сполук шроту соняшнику, збагачених хлорогеновою кислотою, на кількість імунокомпетентних клітин у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.....	105
3.2.1. Дослідження впливу хлорогенової кислоти на кількісні показники та морфологічні характеристики еритроцитів у крові тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки .....	107
3.2.2. Вплив хлорогенової кислоти та ретинолу на кількісні показники імунокомпетентних клітин у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки .....	109
3.2.3. Вплив хлорогенової кислоти та ретинолу на кількість тромбоцитів у крові тварин після отруєння сульфатом міді .....	112
Висновок до розділу 3.2:.....	122

3.3 Отримання та характеристика супрамолекулярних комплексів: «казеїн-молозива-поліфенольні сполуки», збагачені хлорогеновою кислотою	122
3.3.1. Вплив температури та рН на формування супрамолекулярних комплексів казеїн-хлорогенова кислота.....	126
3.3.2. Дослідження електропровідності супрамолекулярних комплексів: «казеїн-поліфенольні сполуки».....	134
3.3.3. Визначення кількості хлорогенової кислоти у водно-спиртовому розчині .....	138
3.3.4. Визначення вмісту хлорогенової кислоти у складі супрамолекулярних комплексів «казеїном-молозива-поліфенольні сполуки» .....	142
Висновок до розділу 3.3:.....	152
3.4. Оцінка біологічної дії супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки», збагачені хлорогеновою кислотою на моделі Су-індукованого фіброзу печінки .....	153
3.4.1. Дослідження впливу супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки» на деякі морфо-фізіологічні показники тварин із Су-індукованим фіброзом печінки .....	153
3.4.2. Дослідження впливу супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки» на кількість імунокомпетентних клітин у тварин із Су-індукованим фіброзом печінки.....	157
3.4.3. Дослідження впливу супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки» на деякі біохімічні показники у тварин із Су-індукованим фіброзом печінки .....	159
Висновок до розділу 3.4:.....	165
ВИСНОВКИ .....	168

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	170
ДОДАТОК А.....	198
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	198

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ПЗК - Печінкові зірчасті клітини
- ПСМ - Позаклітинний сполучнотканинний матрикс
- TGF-бета - Трансформуючий фактор росту бета
- ММР - Матриксні металопротеїнази
- ТІМР - Тканинні інгібітори металопротеїназ
- ROS - Активні форми кисню
- DAMPs - Молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням
- PDGF - Тромбоцитарний фактор росту
- ТОП - Принцип темпоральної оптимальності
- CDK - Циклін-залежні кінази
- CDP-холін - Цитидиндифосфатхолін
- НАД+ - Нікотинамідаденіндинуклеотид (окиснена форма)
- НАДН - Нікотинамідаденіндинуклеотид (відновлена форма)
- АТФ - Аденозинтрифосфат
- АДФ - Аденозиндифосфат
- ЦТК - Цикл трикарбонних кислот
- ЕМР - Експосом-індукований метаболічний ресетинг
- ХК - Хлорогенові кислоти
- 5-CQA - 5-О-кофеїлхінна кислота
- 3-CQA - 3-О-кофеїлхінна кислота
- 4-CQA - 4-О-кофеїлхінна кислота
- КоА - Коензим А
- СО<sub>2</sub> - Діоксид вуглецю
- PAL - Фенілаланінаміакліаза
- НСТ - Гідроксициннамоїл-КоА шикілат/хінат  
гідроксициннамоїлтрансфераза
- СЗ'Н - п-кумарат-3'-гідроксилаза
- UGST - УДФ-глюкоза цинамат глюкозилтрансфераза

HCGQT- Гідроксициннамоїл-D-глюкоза хінат  
гідроксициннамоїлтрансфераза  
Nrf2 - Ядерний фактор 2, пов'язаний з еритроїдом 2  
ДНК - Дезоксирибонуклеїнова кислота  
ІСАА - Ізохлорогенова кислота А (3,5-дикафеоїлхінна кислота)  
ІСАВ - Ізохлорогенова кислота В (3,4-дикафеоїлхінна кислота)  
ІСАС - Ізохлорогенова кислота С (4,5-дикафеоїлхінна кислота)  
RAW264.7 - Лінія клітин мишачих макрофагів  
NO - Оксид азоту  
ІЛ-6 - Інтерлейкін-6  
ІЛ-1 $\beta$  - Інтерлейкін-1 бета  
TNF- $\alpha$  - Фактор некрозу пухлин альфа  
NF- $\kappa$ B - Ядерний фактор каппа-В  
iNOS - Індуцибельна синтаза оксиду азоту  
COX-2 - Циклооксигеназа-2  
ВНА - Бутильований гідроксианізол  
ВНТ - Бутильований гідрокситолуол  
 $\alpha$ -La -  $\alpha$ -лактальбумін  
 $\beta$ -Lg -  $\beta$ -лактоглобулін  
ГМП - Глікомакропептид  
UVR8 - Локус стійкості до ультрафіолету 8  
ПС - поліфенольні сполуки  
CQDs - Вуглецеві квантові точки  
ІОК - Індоліл-3-оцтова кислота  
АБК - Абсцизова кислота  
АОС - Антиоксидантна система  
АТР7А - Мідь-транспортуюча АТФаза альфа

АТР7В - Мідь-транспортуюча АТФаза бета

CTR1 - Білок транспортер міді 1

АТОХ1 - Антиоксидантний мідь-транспортуючий шаперон 1

ССС - Мідний шаперон для супероксиддисмутази

LMP - Проникність лізосомальних мембран

Ig G - Імуноглобулін G

IgA - Імуноглобулін А

IgM - Імуноглобулін М

АЛТ - Аланінамінотрансфераза

ГГТ - Гамма-глутамілтрансфераза

АСТ – Аспаргатамінотрансфераза

## ВСТУП

### **Обґрунтування вибору теми дослідження.**

Процеси розвитку та старіння біологічних систем, які є центральною проблемою біології, можуть бути зведені до проблеми взаємодії організму із сукупністю чинників навколишнього середовища — експосою. Результатом таких взаємодій є динамічна, системна перебудова метаболізму, спрямована на збереження цілісності та життєздатності системи. Ці явища ми визначаємо як процеси адаптації.

При розгляді проблеми адаптації дослідники стикаються з проблемою «втрати» реактивності біологічної системи на дії експосоми, тобто формуванням таких станів, за яких біологічна система втрачає «чутливість» до подальших дій чинників середовища, і такі стани прийнято визначати як хронічні патології.

Механізми формування хронічних станів, або проблема формування «необоротності», відсутність способів лікування таких патологій, які, як правило, мають вікзалежний характер, є найважливішою проблемою сучасної біології та медицини. Без сумніву, у проблемі формування хронічних патологій тісно переплітаються біологічні та медичні знання.

Вдалою біологічною моделлю при дослідженні деяких аспектів формування хронічних патологій є багаторазова послідовна дія іонів міді (поширеного представника важких металів) на організм. Показано, що такі впливи іонів міді супроводжуються формуванням стійкості експериментальних тварин до токсичної дії цього металу [3], при цьому у таких тварин формувалася фіброз печінки [1,2], який проходить низку послідовних стадій і формує цироз печінки, що не піддається лікуванню.

Попри значні зусилля щодо розробки способів лікування таких хронічних станів, проблема далека від вирішення. Раніше в нашій лабораторії були проведені дослідження низки природних біологічно

активних сполук, зокрема низькомолекулярних компонентів молозива [4,5], екзометаболітів грибів [6], які показали можливості часткового усунення фібротичних змін на початкових стадіях розвитку цього хронічного процесу.

Це дослідження є продовженням цього циклу робіт і присвячене вивченню впливу поліфенольних сполук, отриманих із соняшникового шроту та збагачених хлорогеновою кислотою, яка має широкий спектр біологічної активності.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконувалась в рамках держбюджетних тем науково-дослідних робіт кафедри молекулярної біології та біотехнології за темами: «Дослідження впливу компонентів молозива на прояв постковідних ускладнень» за договором № 02-22; Дослідження впливу компонентів молозива на регуляцію термогенезу у старих тварин і написання монографії» за договором № 08-22; «Дослідження здатності ліпідних компонентів молозива до утворення гелевих структур і оформлення до друку монографії «Молозиво. Еволюційні, фізіологічні та біотехнологічні аспекти» за договором № 06-23 біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

### **Мета та завдання дослідження.**

**Мета роботи** - розробка концепції механізму формування хронічних станів на моделі Си-індукованого фіброзу печінки та дослідження ролі природних поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у запобіганні формуванню таких хронічних станів.

### **Завдання роботи**

1 – розробити й обґрунтувати концепцію «експосом-індукованого метаболічного ресетингу»;

2 – дослідити роль балансу міді в механізмах регуляції біологічних процесів на різних біологічних моделях (ссавці, дріжджі та бактерії);

3 – дослідити вплив поліфенольних сполук соняшникового шроту на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки за різних способів їх введення в організм;

4 – розробити спосіб отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками з метою стабілізації хлорогенової кислоти та надати характеристику цим комплексам;

5 – дослідити вплив отриманих супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки;

6 – дослідити вплив отриманих супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками на деякі біохімічні показники у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.

**Об'єкт дослідження** – біологічні системи (експериментальні тварини, клітинні та мікробні моделі), уражені Cu-індукованим фіброзом печінки та іншими патологічними станами, що виникають внаслідок зміни балансу міді.

**Предмет дослідження** – хлорогенова кислота та поліфенольні сполуки соняшникового шроту, способи їх одержання та стабілізації (зокрема у складі супрамолекулярних комплексів із казеїном молозива), а також їх гепатотропна активність і вплив на кількість імунокомпетентних клітин та біохімічні показники у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.

**Методи дослідження** – Для розв'язання цих завдань використовували комплекс фізико-хімічних методів (синтез квантових точок, спосіб формування супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива, які отримували з молозива, та поліфенольними сполуками, метод отримання яких був розроблений самостійно), біофізичні методи (УФ-спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, електропровідність

водних розчинів супрамолекулярних комплексів), біохімічні методи (визначення активності ряду ферментів печінки, вмісту альбуміну, креатиніну, холестерину, глюкози, тригліцеридів тощо), цитологічні методи (визначення кількості імунокомпетентних клітин, кількості еритроцитів і тромбоцитів), мікробіологічні методи (інтенсивність росту мікроорганізмів), біотехнологічні методи (отримання та характеристика автолізатів дріжджів і мікродоростей) та фізіологічні методи (моделювання Си-індукованого фіброзу печінки й оцінка біологічної дії біологічних субстанцій на експериментальних тваринах).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Під час виконання роботи отримані такі наукові результати.

Розроблено концепцію: «Експосом-індукованого метаболічного ресетингу», суть якої полягає в тому, що в процесі формування хронічних станів біологічна система проходить низку послідовних, взаємопов'язаних етапів: адаптація; формування метаболічної та епігенетичної пам'яті й закріплення сформованих адаптивних метаболічних патернів — ресетингу. Сформовані метаболічні патерни здатні до автозбереження навіть після усунення факторів, що їх індукували. Усунення таких домінуючих метаболічних патернів можливе лише шляхом формування нового ресетингу.

Розроблено простий та ефективний спосіб отримання поліфенольних сполук із соняшникового шроту. Синтезовано квантові точки на основі фенілефрину та розроблено флуоресцентний метод визначення кількості хлорогенової кислоти. Показано, що у складі поліфенольних сполук соняшникового шроту міститься не менше ніж 15 % хлорогенової кислоти.

Вперше розроблено спосіб отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном та поліфенольними сполуками. Доведено, що такі комплекси формуються водневими зв'язками; методом молекулярного докінгу показано ймовірність наявності 9 потенційних центрів локалізації

хлорогенової кислоти в молекулах  $\beta$ -казеїну. Усі центри зв'язування хлорогенової кислоти мали різну афінність.

Вперше показано, що пероральний прийом поліфенольних сполук соняшникового шроту тваринами з Cu-індукованим фіброзом печінки відновлював кількість імунокомпетентних клітин до контрольних інтактних значень на ранніх стадіях розвитку фіброзу. Такий позитивний, протизапальний ефект більшою мірою проявлявся у випадку перорального введення порівняно з внутрішньочеревним введенням поліфенольних сполук, що опосередковано вказує на участь мікробіома кишечника у механізмі їх біологічної дії.

Вперше показано, що отримані супрамолекулярні комплекси «казеїн-молозива-поліфеноли», які забезпечували тривале збереження хлорогенової кислоти, сприяли нормалізації кількості імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із фіброзом печінки. Активність аланінамінотрансферази, яка була інгібована у тварин із Cu-індукованим фіброзом, відновлювалася до рівня інтактного контролю після перорального прийому супрамолекулярних комплексів. Доведено, що така дія супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки», збагачених хлорогеновою кислотою, є перспективними продуктами функціонального харчування, які виконують профілактичну функцію фіброзу печінки на ранніх стадіях його розвитку.

**Практичне значення отриманих результатів.** Cu-індукований фіброз печінки є вдалою моделлю для дослідження механізмів формування метаболічного ресетингу як необоротного або хронічного стану та може використовуватися при розробці зворотного ресетингу або способів лікування.

Встановлена залежність антибактеріальної активності від форм міді — наночастинки, іонна та хелатна — може бути рекомендована для розробки антибактеріальних субстанцій, а також для управління

внутрішньоклітинним балансом міді в клітинах дріжджів при отриманні автолізатів, багатих на мікроелементи.

Спосіб отримання поліфенольних сполук із соняшникового шроту може бути використаний як основа для розробки продуктів функціонального харчування. Розроблений флуоресцентний метод кількісного визначення хлорогенової кислоти застосовується у наукових дослідженнях співробітників кафедри молекулярної біології та біотехнології й НДІ біології Харківського національного університету.

Розроблений спосіб отримання супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфеноли» використовується як один із елементів у розробці функціональних профілактичних продуктів для попередження фіброзів печінки та формування зворотного ресетингу.

Результати роботи були впроваджені у навчальний процес і використовуються при викладанні: нормативного курсу «Харчові біотехнології для студентів біологічного факультету другого (магістерського) освітньо-кваліфікаційного рівня за освітньо-професійною програмою спеціальності 091 «Біологія; загальних курсів «Загальна біотехнологія» та «Фізична і колоїдна хімія» (лекційні та практичні заняття) для студентів першого (бакалаврського) освітньо-кваліфікаційного рівня за освітньо-професійною програмою спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

**Особистий внесок автора.** Дисертаційне дослідження було виконано аспірантом самостійно: здійснено пошук і аналіз наукової літератури, проведено експериментальну роботу, виконано статистичну обробку результатів. Усі положення та висновки роботи обґрунтовані на основі власних досліджень аспіранта.

За участі наукового керівника — д.б.н., проф. Анатолія Івановича Божкова — було визначено мету та завдання досліджень, сплановано

проведення експериментів, здійснено аналіз отриманих результатів і підготовлено рукописи наукових публікацій.

**Апробація результатів дисертації:** Представлені в роботі результати були представлені на 5 міжнародних та національних конференціях, основні з яких наступні:

- II Міжнародна науково-практична конференція «Open science nowadays: main mission, trends and instruments, path and its development» (Вінниця, Україна – Відень, Австрія, 12 квітня 2024 р.)

- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Клінічна імунологія та алергологія в умовах війни: нові вимоги та досягнення» (Харків, 6–8 березня 2025 р.)

- XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.)

- International scientific conference «Multidisciplinary approaches in science, technology and culture» (Berlin, Germany, October 21-23, 2025)

- XXII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 15–17 квітня 2026 р.)

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 9 наукових праць, що опубліковані в зарубіжних наукових журналах, 2 наукові роботи проіндексовано в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science та 6 робіт апробаційного характеру. Серед цих робіт: одна експериментальна стаття у журналі, який належить до Q3, одна експериментальна стаття у журналі, який належить до Q1.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, висновки та список використаних джерел (199 найменувань). Дисертація викладена на 199 сторінках і проілюстрована 43 рисунками та 11 таблицями.

## **РОЗДІЛ 1. ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ ПЕЧІНКИ ТА МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ ВИНИКНЕННЯ Й РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЙ ПЕЧІНКИ**

### **(літературний огляд)**

#### **1.1. Печінка — центральний орган метаболізму**

Печінка — це найбільша залоза в організмі людини, вона перевершує за розмірами мозок, легені, серце та нирки і становить до 3 % від маси тіла. Вона відіграє провідну роль у підтримці гомеостазу в організмі, що реалізується завдяки здатності печінки сприймати анаболічні, гормональні, катаболічні та імунологічні стимули й сигнали [7-9]. Ці різноманітні сигнали «гормонізуються» в печінці, що й забезпечує системну відповідь організму на дію експосоми (сукупності екзогенних та ендогенних факторів). Поряд з інтегративними функціями, печінка є одним із найбільш метаболічно активних органів, де синтезуються різноманітні біологічно активні сполуки. Печінка — це головний біохімічний «завод» організму, що виконує понад 500 функцій, спрямованих на обмін речовин, детоксикацію та підтримку гомеостазу організму (рис. 1.1).

Крім цього, печінка є центральним органом процесів детоксикації, вона постійно піддається впливу токсичних сполук різноманітної не тільки хімічної та фізичної, а й біологічної природи (віруси, токсичні метаболіти, антипоживні речовини) [10-12].

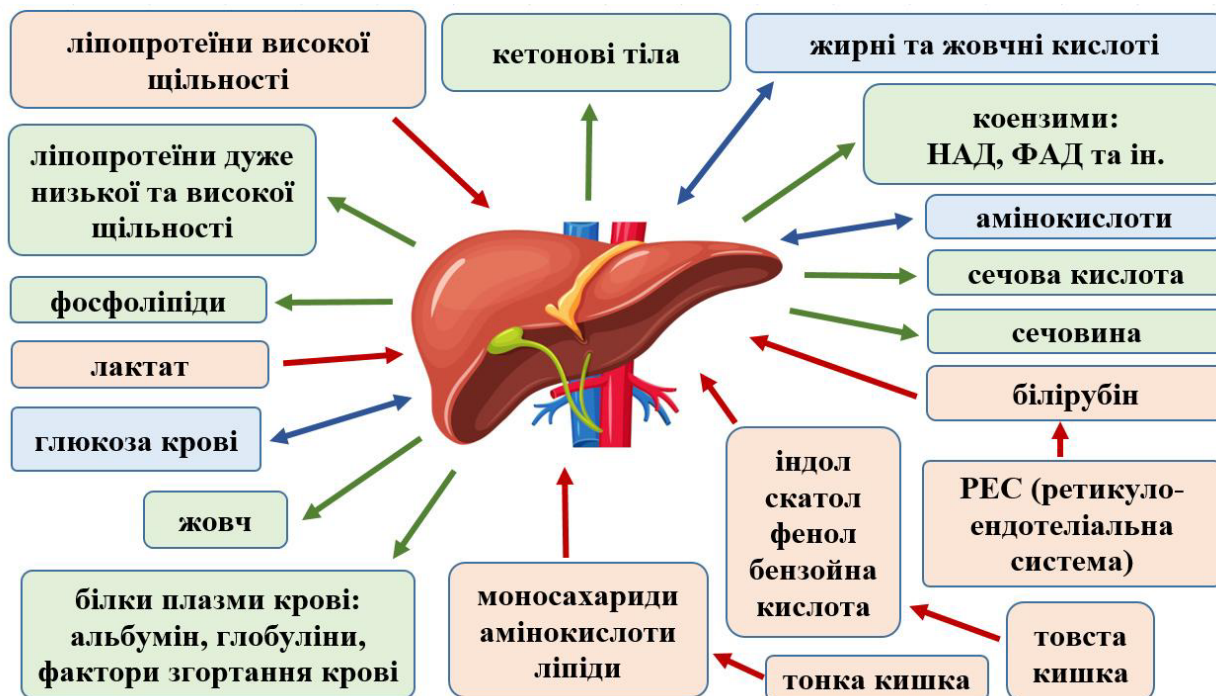


Рис. 1.1 Схема, що ілюструє різноманіття функцій, які виконує печінка. Стрілками позначено вплив низки метаболітів (червоні стрілки) на функції печінки, метаболіти, що виводяться печінкою (зелені стрілки), та метаболіти, що мають різноспрямовану дію (сині стрілки).

Отже, у печінці локалізовано три функціональні блоки: 1 — інтегративний (приймає, обробляє та формує нові метаболічні сигнали); 2 — метаболічний (синтезує та модифікує широкий набір сполук) і 3 — детоксикаційний (забезпечує катаболізм та трансформацію органічних сполук, у тому числі й ксенобіотиків) (рис. 1.2).

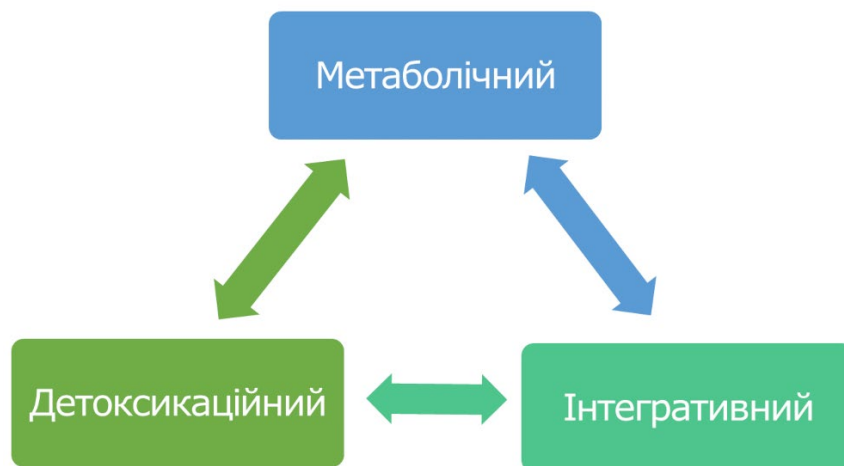


Рис. 1.2. Схема, що ілюструє взаємозв'язок трьох основних функціональних систем, які взаємодіють у печінці.

Однак поєднання в одному органі таких різних і важливих для виживання організму функцій, поряд із забезпеченням життєдіяльності, «вимагає» наявності високого рівня захисту печінки від різноманітних потенційних ушкоджень.

Процес еволюції відмінно впорався з цим складним завданням — сформував кілька рівнів систем захисту від дії негативних факторів експозиції. До таких захисних (адаптивних систем) належать: висока регенераційна здатність тканини печінки [13,14]; поліплоїдизація гепатоцитів [15]; здатність клітин печінки до гіпертрофії [16,17]; внутрішньоклітинна репарація [16] та здатність до зміни функціональної активності різних типів клітин, у випадку печінки це активація зірчастих клітин (ПЗК) [18]. Така супер-активація ПЗК забезпечує зміну не тільки функціональних особливостей печінки, але й індукує виражену перебудову її «архітектури», що проявляється у синтезі позаклітинного сполучнотканинного матриксу (ПСМ) (рис. 1.3).

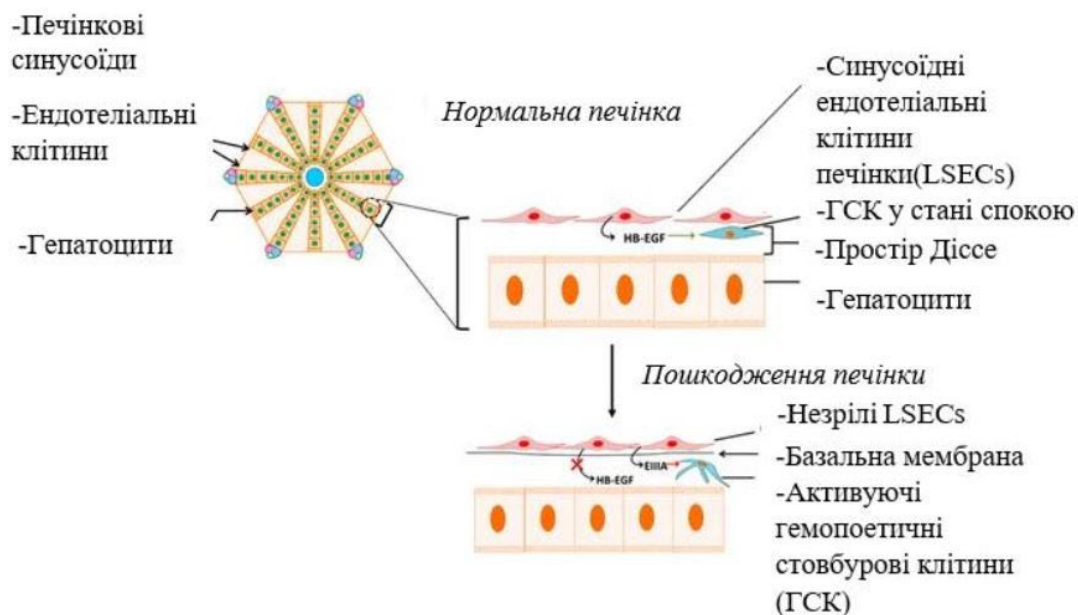


Рис. 1.3. Схема, що ілюструє будову печінки, розташування та активацію зірчастих клітин печінки в процесі розвитку фіброзу [19].

Важливо зазначити, що залежно від характеристик (природи та дози) екстремальних впливів, що діють на організм, а також особливостей функціонального стану печінки в момент впливу на неї численних факторів, організм «використовує» кілька оптимальних стратегій адаптації [1,2], які забезпечують збереження гомеостатичних характеристик в організмі. У тому випадку, якщо фактори експозиції діють тривалий час, і це призводить до масового некрозу або апоптозу гепатоцитів, то метаболічна стратегія захисту функціональної активності печінки спрямована на терміновий синтез ПСМ, який виконує кілька важливих адаптивних функцій: 1 - збереження структури печінки, що проявляється в необхідності терміново заповнити дефект після руйнування частини гепатоцитів, що запобігає розриву тканини та кровотечам; 2 - обмеження вогнища запалення (локалізація ушкоджень) шляхом запобігання поширенню медіаторів запалення в організмі [20]; 3 – сигнальна роль як «комунікатора», спрямована на Відомо, що ПСМ — це не просто механічний каркас, а депо,

в якому містяться найважливіші регулятори фіброзу — TGF-бета та інші сигнальні молекули [21].

Отже, індукція фіброгенезу на початкових стадіях порушення структурної організації печінки є одним з елементів системи захисту печінки від негативних факторів експозиції.

Підтвердженням позитивної або адаптивної ролі ПСМ при експериментальному фіброзі є: 1 — наявність прямої кореляції між ефективністю виживання та локальним збільшенням ПСМ у печінці на початкових етапах її ушкодження [1]; 2 - індукція синтезу ПСМ відбувається практично у всіх тканинах, в яких з якихось причин відбувалася загибель частини клітин і розвиток запального процесу, тобто це загальна реакція організму на масові пошкодження структури тканин [22]; 3 - у печінці існує система руйнування утвореного ПСМ після усунення запального процесу, тобто баланс між металопротеїназами та їх інгібіторами (MMP/TIMP) [23]. Поряд з цим у печінці запускається синтез білкових молекул – протекторів (GDF10, Meteorin-like) [24], які беруть участь у підтримці цього балансу.

Проблема хронічних патологій полягає в тому, що в ряді випадків відбувається порушення балансу між MMP/TIMP на користь TIMP, а також інших систем регуляції фіброгенезу, і в таких випадках відбувається перехід таких «тимчасових» станів у хронічні, тобто формуються самопідтримувані стани. Або, іншими словами, еволюційно виправдана система захисту печінки шляхом активації ПЗК переходить у новий стабільний стан, який ми визначаємо як патологічний процес, що є незворотним – не піддається лікуванню.

Проблема хронізації тих чи інших метаболічних патернів є однією з фундаментальних біомедичних проблем, оскільки вона пов'язана з глобальною проблемою «незворотності» процесів біологічного розвитку. Як свого часу зазначав лауреат Нобелівської премії І. Пригожин, повної

оборотність, або повернення до вихідного стану, у біологічних системах неможлива [25].

Наразі прийнято вважати, що хронічні патології формуються в результаті тривалого впливу негативних факторів на організм, коли механізми саморегуляції та відновлення перестають «справлятися» з функціональним навантаженням. Хронічне захворювання — це не просто тривала хвороба, а стійка зміна в організмі, яка часто супроводжує людину все життя [26].

Однак залишається незрозумілим, чому механізми підтримання гомеостазу не «справляються» з тривалими факторами експозиції. При цьому також невідомо, чому у деяких індивідів змінені метаболічні показники, які ми визначаємо як патологічні, знову підкоряються принципам регуляції гомеостазу, тобто переходять у новий (хронічний) стан і тривало зберігаються, або, іншими словами, гомеостатична система сприймає ці адаптивні зміни як нову норму? Вирішення цієї базової біологічної проблеми дозволить не тільки значно розширити наші знання про властивості біологічних систем, але й розробити підходи до усунення (лікування) хронічних станів (патологій), а можливо, і використання цих знань у практичних завданнях, які можуть бути пов'язані з біотехнологією та медициною.

Під час пошуку відповіді на такі складні питання необхідно провести аналіз наявних даних щодо відмінностей та подібностей індукторів (тригерів) фіброзу печінки.

## **1.2. Характеристика тригерів фіброзу печінки**

Тригерами фіброзу печінки можуть виступати різноманітні хімічні речовини, фізичні фактори та біологічні субстанції, які індукують процеси руйнування або спричиняють глибокі структурно-функціональні зміни клітин печінки. (масовий некроз, апоптоз, фероптоз, купруптоз або стрес

ендоплазматичного ретикулуму, порушення структури мітохондрій та ін.) і ці різноманітні прояви можуть запускати процес фіброгенезу.

Важливо зазначити, що кожен із тригерів фіброзу «використовує», а точніше впливає на різні метаболічні ланки. Більше того, різні хімічні тригери, такі відносно добре вивчені, як: чотирихлористий вуглець; сірчанокисла мідь, також впливають на різні біохімічні процеси та клітинні структури.

Отже, різні індуктори фіброзу чинять свій специфічний вплив на клітинні та позаклітинні структури та метаболічні процеси. Разом з тим, незважаючи на те, що різні тригери впливають на різні метаболічні патерни, для них характерний і прояв загальних характеристик.

1 – усі тригери в тій чи іншій мірі призводять (прямо чи опосередковано) до загибелі частини гепатоцитів, і це є сигналом розвитку запального процесу [27]. Як зазначав свого часу лауреат Нобелівської премії, випускник Харківського університету І.І. Мечников, запалення — це захисна реакція організму, яка спрямована на знищення або видалення патогенів. Він довів, що цей процес здійснюється фагоцитами, що стало основою його фагоцитарної теорії імунітету [28].

2 – у більшості випадків порушення структури гепатоцитів і розвиток запального процесу супроводжується: активацією ПЗК, в якій беруть участь ROS, TGF-бета, DAMPs, PDGF та інші сигнальні молекули (рис. 3) У деяких випадках фіброз печінки може бути індукований і без масової загибелі гепатоцитів, а в результаті стресу ендоплазматичного ретикулуму та виражених мітохондріальних дисфункцій, але в цьому випадку фіброгенез розвивається повільно [29], проте кінцевий результат однаковий. Цей приклад демонструє, що розвиток фіброзу визначається наявністю запального процесу, а природа тригера має другорядне значення.

3 – активовані ПЗК трансформуються в міофібробласти, які активно продукують ПСМ (рис. 3) [19].

4 – всі тригери підвищують активність ТІМР (інгібіторів металопротеїназ) і знижують активність металопротеїназ, тобто змінюють баланс ММР/ТІМП, що сприяє збільшенню кількості ПСМ [29], що забезпечує виживання в нових екстремальних для організму умовах.

5 – всі тригери в кінцевому підсумку забезпечують формування позитивного зворотного зв'язку, тобто після запуску фіброзу та видалення тригера система набуває здатності до самопідтримки або ресетингу. «Ресетинг» від «ре» - повторне налаштування та «сет» - фіксований метаболічний патерн. Це пояснюється тим, що сформований ПСМ і нові метаболічні патерни здатні підтримувати ПЗК в активному стані [29].

6 – найважливішою особливістю для всіх тригерів фіброзу є хронізація процесу, тобто одноразові впливи ніколи не призводять до розвитку фіброзу; для цього необхідні тривалі (тижні та місяці) послідовні впливи тригера. Час контакту (темпоральність) має принципове значення для формування нових, домінуючих метаболічних патернів (атракторів), які характерні для фіброзу [29,30].

Отже, перехід різноманітних метаболічних стратегій, які індукуються тригерними факторами, до однотипної тканинної відповіді (фіброзу) підтверджує принцип «обмеженості» репертуару тканинної відповіді [31], у тому сенсі, що різноманітні метаболічні шляхи призводять до подібних або схожих фенотипів.

Виходячи з цієї позиції, фіброз — це не патологія в еволюційному сенсі, це оптимальне метаболічне рішення організму в нових умовах або новому контексті, який сформувався під час тривалих повторюваних екстремальних впливів експосоми. Така «поведінка» організму може базуватися на принципі (ТОП) — темпоральної оптимальності [32].

Наступним логічним етапом аналізу проблеми хронізації є питання про роль часового характеру дії тригерів фіброзу печінки, або про те, чому

одноразові екстремальні впливи на організм, на відміну від багаторазових послідовних впливів, не призводять до фіброзу.

### **1.3. Фіброз печінки як тимчасова реакція організму на тривалі екстремальні фактори експозиції**

Нагадаємо, що у відповідь на дію екстремальних факторів, незалежно від їхньої природи, в організмі формуються адаптивні реакції, які завжди спрямовані на збереження гомеостазу і, як наслідок, виживання в нових умовах. Під екстремально діючими факторами розуміють дію як екзогенних, так і ендогенних факторів різноманітної природи на організм, які індукують стрес і, як наслідок, проявляються у відміченому Сельє адаптивному синдромі [33].

Важливо те, що особливості адаптивних реакцій матимуть принципові відмінності у випадку одноразової дії екстремальних факторів від послідовних тривалих (хронічних) впливів тих самих факторів.

У разі одноразової дії гепатотропних екстремальних факторів експозиції, когорта досліджуваних тварин поділиться на дві групи: частина тварин загине, і ми визначаємо це як прояв гострої токсичності; а частина тварин виживе, і це вказує на їхню здатність до адаптації.

Співвідношення між цими групами тварин визначається дозою діючого екстремального чинника та станом метаболічної системи організму в момент впливу [2,3]. Прояви стійкості частини тварин до гепатотропних токсичних сполук визначаються вищою активністю системи детоксикації печінки та здатністю до вдало «обраної» стратегії регенерації. Вона може проявлятися у посиленні проліферації частини гепатоцитів [34], диференціації стовбурових клітин [35], або ж у поліплоїдизації гепатоцитів [36], що може забезпечити компенсаторну реакцію цього органу на негативну дію.

Якщо описати реакції тварин у цих двох когортах на одноразову дію гепатотропних факторів з позицій гомеостазу, то загибель частини тварин може бути пов'язана з «виходом» життєво важливих гомеостатичних показників далеко за межі гомеостатичного коридору (метаболічного атрактора). Таке можливо при вираженому порушенні функціональної активності печінки, втраті «гормональної координації» між тими численними функціями, які виконує печінка (рис. 1.2), та недостатній активації процесів регенерації печінки у відповідь на дію екстремального фактора.

У тому випадку, якщо на тлі дії гепатотропних факторів у печінці індукується процес регенерації і, як наслідок, підвищується функціональна активність печінки, то дія того самого тригера не досягає критичного гомеостатичного порогу, тобто печінка здатна забезпечити збереження основних життєзабезпечувальних функцій. Якщо подальша дія тригера буде припинена, то система здатна повернутися до стану, близького до вихідного. Таке повернення метаболічної системи до вихідного стану пояснюється принципом гомеостазу (саморегуляцією), або, іншими словами, притяганням існуючої структури колишнім атрактором. Важливо враховувати, що атрактор — це не точка, а фазовий простір, і навіть зберігаючи колишній атрактор, він може змінювати свою геометрію, тобто мати деякі відмінності порівняно з вихідним атрактором. Якщо ці особливості перенести в аспект прийнятої медичної термінології, то після усунення тригера може спостерігатися одужання, або перехід у передпатологічний, або квазістабільний стан.

У тому випадку, якщо на організм той самий гепатотоксичний фактор буде впливати з певною періодичністю протягом тривалого часу: - протягом тижня, прикладом чого є дія іонів міді [1]; місяців – чотирихлористий вуглець [37] або кілька років – етиловий спирт [38-40], то залежно від дози, когорта досліджуваних тварин також буде представлена двома групами.

Частина тварин може загинути, а частина залишиться живою. Однак у всіх випадках у тварин, що вижили, сформується фіброз печінки. Відмінність від одноразового впливу полягає в тому, що навіть після усунення (припинення дії) тригера у всіх випадках у тварин, що вижили, збережеться фіброз печінки.

Найважливішою особливістю формування хронічних станів є проходження послідовних стадій: гепатит; фіброз; цироз або гепатоцелюлярний рак (рис. 1.4) [29,41,42].

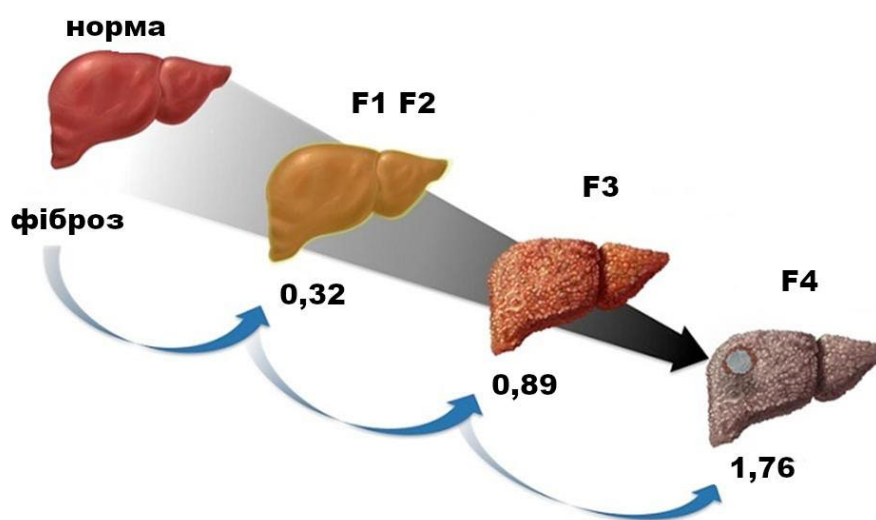


Рис. 1.4. Схема, яка демонструє стадії розвитку (еволюції) фіброзу печінки: F1 — на першій стадії фіброзу зміни спостерігаються лише в портальних і перипортальних ділянках печінки без утворення септ і часто їх важко відрізнити від F2 (другої стадії фіброзу печінки), при якій у портальних і перипортальних ділянках утворюються септи. Як на першій, так і на другій стадіях фіброзу печінки симптоми практично відсутні, і діагностувати захворювання можна лише гістологічно. При стадії F3 виявляють портальний і перипортальний фіброз з великою кількістю септ. На цьому етапі з'являються перші клінічні симптоми: підвищена

стомлюваність, сонливість, загальна слабкість, зниження працездатності, анемія, кровотечі тощо. Стадія F4 відповідає цирозу печінки. На схемі стрілками позначили смертність на 100 людино-років, що дозволяє кількісно оцінити ризики прогресування захворювання. [43].

Слід зазначити, що якщо на початкових стадіях розвитку фіброз може бути частково оборотним після усунення тригера, то на пізніх стадіях він не просто зберігається, а й не піддається лікуванню сучасними засобами. На моделі фіброзу печінки у 100 пацієнтів було показано, що модуль Юнга (жорсткість печінки) був різним для різних стадій фіброзу. Так, для F1 = 5,4, для F2 = 8,5, відповідно для F3 = 13,5 і F4 = 22,0. Коефіцієнт кореляції модуля Юнга з морфологічними показниками різних стадій фіброзу був досить високим і становив  $r = 0,81$  [44,45]. Ці результати вказують на істотні відмінності між «архітектурою» (структурною організацією) печінки на різних стадіях розвитку фіброзу.

У 2021 році було опубліковано мультицентрове дослідження (Sanyal та ін., 2021b), яке включало 1773 пацієнтів, за якими спостерігали протягом 4 років. Було показано, що смертність прогресивно збільшувалася. Так, для стадії F1,2 смертність на 100 людино-років становила 0,32, для F3 – 0,89 і для F4 – 1,76 (рис. 4).

Отже, формування хронічних патологій залежить від темпоральних особливостей дії екстремальних факторів, і важливою особливістю таких метаболічних станів є те, що після індукції хронічний процес проходить низку послідовних етапів свого розвитку.

Наявні дані переконливо вказують на те, що перехід між стадіями фіброзу не є лінійним, а скачкоподібним. Ці результати дають підстави зробити висновок: 1 — біологічна система переходить у новий метаболічний режим, здійснюючи «стрибки»; 2 – кожна наступна стадія хронізації, яка супроводжується серією метаболічних перемикань, зменшує

можливість виходу з сформованого стану, тобто вона стає незворотною; 3 – одноразовий, навіть екстремальний вплив експозому на організм не призводить до формування хронічних станів, тобто час і послідовність дій (одноразових або багаторазово повторюваних) має визначальне значення у формуванні відповіді організму на ці впливи.

#### **1.4. «Стадійність» — базова властивість функціонування та адаптації біологічних систем**

Наявність «стадійності», або етапів розвитку біологічних процесів, є фундаментальною основою і проявляється на всіх ієрархічних рівнях організації. Розуміння особливостей та механізмів «стадійності» у процесі формування фіброзу печінки може бути корисним у розробці нових стратегій лікування фіброзу, а також у визначенні підходів до лікування таких поширених хронічних процесів, як діабет, канцерогенез та ін., а також сприяти пізнанню механізмів таких фундаментальних явищ, як старіння організму та управління біотехнологічними процесами.

Розглянемо деякі приклади проявів стадійності або циклів на різних рівнях ієрархічної організації біосистем і почнемо з найбільш очевидного – організмового рівня.

*У рослин цикли розвитку поділяють на ембріональний та постембріональний*

Насіння: стадія спокою, що містить зародок і запас поживних речовин, яке може зберігатися надзвичайно довго. Після того як насіння буде зволожено і кількість води в ньому становитиме 40–45 %, воно перейде до наступної стадії.

Проростання: перехід від спокою до активного росту за сприятливих умов, і процес подальшого розвитку стає незворотним.

Молодість або вегетативна стадія, для цієї стадії характерний активний ріст коренів, стебел і листя, однак на цій стадії розвитку рослина ще не здатна до розмноження.

Зрілість або репродуктивна стадія, на цій стадії «запускаються» процеси цвітіння, запилення та запліднення. Цикл розвитку завершується настанням фінальної стадії розвитку.

Старіння та смерть: припинення росту, дозрівання плодів і поступове відмирання.

*У тварин цикли розвитку можуть бути надзвичайно різноманітними; так, у комах виділяють два типи онтогенетичного розвитку: прямий і непрямий (з метаморфозом).*

Яйце: зародковий етап.

Личинка (гусениця): стадія активного харчування та росту.

Лялечка: стадія глибокої внутрішньої перебудови організму (характерна для повного перетворення).

Імаго: доросла особина, здатна до розмноження та розселення.

У ссавців виділяють такі послідовні вікові етапи, як: пренатальний період; дитинство; юність; зрілість і старість, під час яких відбуваються якісні фізичні та психологічні зміни.

На клітинному рівні найбільш яскраво і добре досліджено клітинний цикл (рис. 1.5).

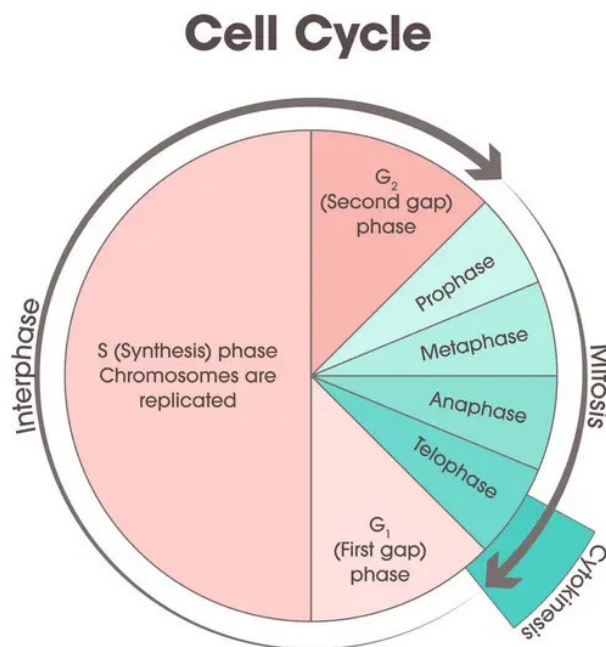


Рис. 1.5. Клітинний цикл — це послідовність стадій життя клітини, що включає інтерфазу (ріст, підготовка до поділу) та сам процес поділу (мітоз). Кожна стадія поділяється на незворотні послідовні стадії, такі як інтерфаза на: G1; S; G2; фази та мітоз як: профаза; метафаза; анафаза та телофаза.

Важливо зазначити, що синтез специфічних сигнальних молекул (циклінів) незворотньо запускає перехід від фази G1 до наступної фази S, яка завжди завершується мітозом, тобто після запуску клітинного циклу він стає незворотним. Така незворотність запобігає аномальному подвоєнню ДНК або передчасному поділу.

Незворотність клітинного циклу забезпечується тим, що основні регулятори циклу — цикліни — активують CDK-комплекси, а після переходу до наступної фази вони піддаються швидкому протеолізу, зворотний процес стає неможливим. Регулятори клітинного циклу працюють за принципом «все або нічого», гарантуючи, що фаза (наприклад, S-фаза або мітоз) завершується, перш ніж почнеться наступна фаза.

*Найбільший інтерес викликають характеристика та особливості функціонування метаболічних циклів.* Метаболічна мережа — це складна система перетворення речовин, де продукти одних реакцій (метаболіти) стають субстратами для інших. У цьому сенсі метаболічну мережу можна представити у вигляді замкнутих циклів та псевдоциклів.

Прикладом замкнутих циклів є такі добре вивчені цикли, як: цикл Кребса; цикл сечовини (виведення азоту); цикл Кальвіна (фіксація CO<sub>2</sub>). Особливістю таких циклів є те, що ключова молекула циклу не витрачається, а «прокручується». Так, оксалоацетат у циклі Кребса з'єднується з ацетил-КоА, проходить через низку перетворень і знову відновлюється в оксалоацетат. Ще однією особливістю такої циклічності метаболічних процесів є те, що цикл може бути представлений як аналог каталітичного центру. У тому сенсі, що невелика кількість ферментів, що входять до циклу, може метаболізувати (переробляти) величезну кількість субстратів, що надходять.

Багато метаболічних реакцій здаються лінійними, проте завдяки регуляції кінцевих продуктів їх можна визначити як псевдоцикли. Такий принцип функціонування створює ритмічні коливання концентрацій. Можна навести низку прикладів. Так, синтез фосфодитилхоліну (метаболічний шлях Кеннеді) складається з таких етапів: холін-фосфохолін – CDP-холін – фосфодитилхолін. Накопичення фосфодитилхоліну інгібує холінкіназу (перший етап). Якщо вміст фосфодидилового холіну падає, то синтез знову поновлюється. Отже, немає фізичного замикання в циклі, проте є регуляторна або гомеостатична петля, яка імітує цикл.

У метаболічних ланцюгах можна виділити й так звані холості або субстратні цикли. Це цикли, в яких два протилежні метаболічні шляхи протікають одночасно (наприклад, синтез і розпад глюкози). Наявність таких циклів (гліколіз — глюконеогенез) дозволяє клітині миттєво

перемикати напрямок метаболізму та підтримувати термогенез (виділення тепла).

Отже, вся метаболічна мережа складається з різних циклів, і завдяки постійній циркуляції кофакторів та енергетичних молекул (НАД<sup>+</sup>/НАДН, АТФ/АДФ) між реакціями синтезу та розпаду формується єдина пульсуюча мережа реакцій. Важливо зазначити, що під поняттям «пульсуюча метаболічна мережа» ми розуміємо динамічну зміну метаболічних патернів (в один метаболічний патерн може входити різна кількість біохімічних циклів, які в даний момент можуть формувати тимчасовий зв'язок).

Однак, на нашу думку, найважливіша особливість циклічної організації метаболізму полягає в тому, що всі цикли взаємопов'язані через загальні метаболіти або ферменти, які беруть участь у різних циклах. Більше того, велика кількість ферментів є поліфункціональними [47], тобто залежно від мінливого мікросередовища (контексту) одні й ті ж ферменти здатні виконувати різноманітні функції, і таким чином може забезпечуватися «темпоральне домінування» тих чи інших метаболічних патернів.

Прикладом взаємозв'язку між різними циклами, які забезпечують переключення метаболічних патернів і можуть бути основою формування «темпорального домінування», може слугувати класичний взаємозв'язок «аспартат-фумарат» у гепатоцитах, які через цикл трикарбонових кислот (ЦТК) і цикл сечовини об'єднані через спільний метаболіт (фумарат) і спільний фермент (фумаразу), та аспартатні мости в один темпоральний патерн.

Так, фумарат, який вивільнився з ЦТК, включається в цикл сечовини: з аргінінсукцинату утворюється аргінін і фумарат, який надходить у ЦТК і перетворюється на малат (фермент фумараза є спільним для цих двох циклів) і надалі утворює оксиацетат. У свою чергу оксиацетат трансформується в аспартат, який забезпечує синтез аргінінсукцинату.

Ще одним добре вивченим прикладом взаємозв'язку між різними циклами може слугувати цикл Коррі (глюкоза-лактат) між м'язами та печінкою. Ці два органи утворюють псевдоцикл, який запобігає ацидозу та забезпечує підтримку глюкозного гомеостазу. У м'язах у процесі гліколізу утворюється лактат, який через кров проникає в печінку і через піруват включається в глюконеогенез і може постачати глюкозу. Отже, такі метаболіти, як: лактат; піруват і глюкоза є спільними.

Прикладів взаємодій та взаємовпливів між різними метаболічними циклами та псевдо-циклами безліч. Ці приклади демонструють не тільки спільність, але й розгалуженість метаболічних процесів. Наслідком чого є можливість формування величезної кількості поєднань (патернів) з обмеженої кількості елементів (молекул).

Така циклічна організація метаболічних мереж забезпечує біологічним системам цілу низку унікальних особливостей: 1 — економію ресурсів; 2- високу точність та ефективність управління через зворотні зв'язки та високу швидкість молекулярного обміну (короткий час існування молекул) та 3- здатність фіксувати, запам'ятовувати та тривало підтримувати найбільш часто функціонуючі метаболічні патерни. Така метаболічна пам'ять, або підтримка сформованих патернів, пояснюється тим, що завдяки сполученості між різними метаболічними патернами, що входять у різні цикли, запускається механізм взаємопідтримки (притягання атракторів), навіть після усунення індуктора цих метаболічних станів, що є фундаментальною основою формування хронічних станів.

Можна припустити, що запам'ятовування метаболічних патернів забезпечує високий ступінь адаптивності організму до часто повторюваних дій експосоми, оскільки відпадає необхідність знову навчати систему або розробляти нові стратегічні рішення [48]. Однак, як відомо, пам'ять може зберігатися короткий час, що на молекулярному рівні означає формування та домінування нових адаптивних метаболічних патернів або атракторів,

але з якихось причин пам'ять може зберігатися досить довго або навіть перейти в стабільний стан, тобто стати хронічною.

Вважаємо, що таким прикладом формування тривалої або стійкої метаболічної пам'яті є фіброз печінки, для якого також, як уже було зазначено, характерна стадійність розвитку.

Як уже зазначалося, формування хронічних патологій має низку загальних властивостей і характеристик:

1 – хронічні патології формуються лише за умови відносно тривалого послідовного впливу токсикогенного чинника, тобто час має вирішальне значення;

2 – хронічні стани характеризуються формуванням стійких метаболічних патернів, відмінних від таких, що відповідають гомеостатичній нормі;

3 – процес формування хронічних станів складається з низки послідовних стадій [49], тобто має місце стадійність або дискретність.

4 – дискретність (квантованість) еволюції хронічних станів вказує на те, що перехід від однієї стадії до іншої здійснюється скачкоподібно, що відбувається лише після досягнення певних структурно-функціональних перебудов у системі;

5 – на молекулярному рівні стрибкоподібний перехід означає формування нового метаболічного патерну або атрактора;

6 – відомо, що з кожною наступною стадією розвитку фіброзу печінки, як і інших хронічних станів, характерний перехід від часткової оборотності до повної необоротності.

З метою пояснення цих особливостей формування та еволюції фіброзу печінки була висунута робоча гіпотеза, яку можна назвати «експосом-індукований метаболічний ресетинг» (EMR).

### **1.5. Формування фіброзу печінки — приклад експозо-індукованого метаболічного ресетингу (EMR)**

Як зазвичай вважається, гомеостаз — це система саморегуляції, яка забезпечує підтримку метаболічних показників у межах певних меж, які можна визначити як фізіологічні. Таке констатування одного з базових положень біології вказує на те, що лише за умови збереження певних фізико-хімічних характеристик у біологічній системі може здійснюватися метаболізм, тобто життєдіяльність. Ще одним, дуже важливим наслідком принципу гомеостазу, є те, що формування та підтримання відносної стабільності внутрішнього середовища забезпечує інтеграцію всіх його елементів у єдину систему (для всіх елементів формується єдина «мова»). Якщо виходити з принципу збереження гомеостатичної стабільності, то виникає логічне запитання: «як у рамках «жорсткої» регуляції стабільності можуть виникати нові метаболічні варіанти (патерни), які виходять за межі гомеостазу та забезпечують не тільки здатність до адаптації, а й еволюційні процеси», у тому числі й патологічні стани, які не призводять до руйнування цілісності системи (загибелі), а як мінімум призводять до відстрочки загибелі й тим самим сприяють збереженню життєздатності в умовах, далеких від фізіологічних.

Суть цього питання можна звести до пояснення механізмів заміни існуючого (гомеостатичного) метаболічного патерну на домінування нового альтернативного метаболічного патерну або формування нових атракторів, що виникли в нових умовах зовнішнього середовища (експосоми). Формування альтернативного метаболічного патерну в умовах зміненої експосоми є одним із можливих варіантів, який є «оптимальним» серед можливих метаболічних патернів (варіантів) і здатний забезпечити функціонування метаболізму в нових, не оптимальних умовах середовища.

Для пояснення механізмів формування та тривалого збереження альтернативних метаболічних патернів пропонуємо концепцію експосом-

індукованого метаболічного ресетингу (EMR). «Ресетинг» від «ре» — повторне налаштування та «сет» — фіксований метаболічний патерн. EMR визначається як темпорально-залежне, порогове та епігенетично фіксоване переключення на альтернативні метаболічні патерни, які переходять у стани домінування у разі послідовних багаторазово діючих факторів експосома. Сформовані домінуючі метаболічні патерни здатні до самозбереження, навіть після усунення факторів, що їх індукували. Усунення таких домінуючих метаболічних патернів можливе лише шляхом формування нового ресетингу.

Отже, EMR — це концепція, яка описує процес, під час якого сукупність зовнішніх впливів (експосоми) переводить метаболічну систему організму на нові, часто менш ефективні або патологічні режими роботи, але таке «перезавантаження» є єдиним адаптивним варіантом, який може забезпечити біологічній системі виживання в даний момент в екстремальних умовах (рис. 1.6).

## МОДЕЛЬ ЕКСПОСОМ-ІНДУКОВАНОГО МЕТАБОЛІЧНОГО РЕСЕТИНГУ ПРИ ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ПЕЧІНКИ

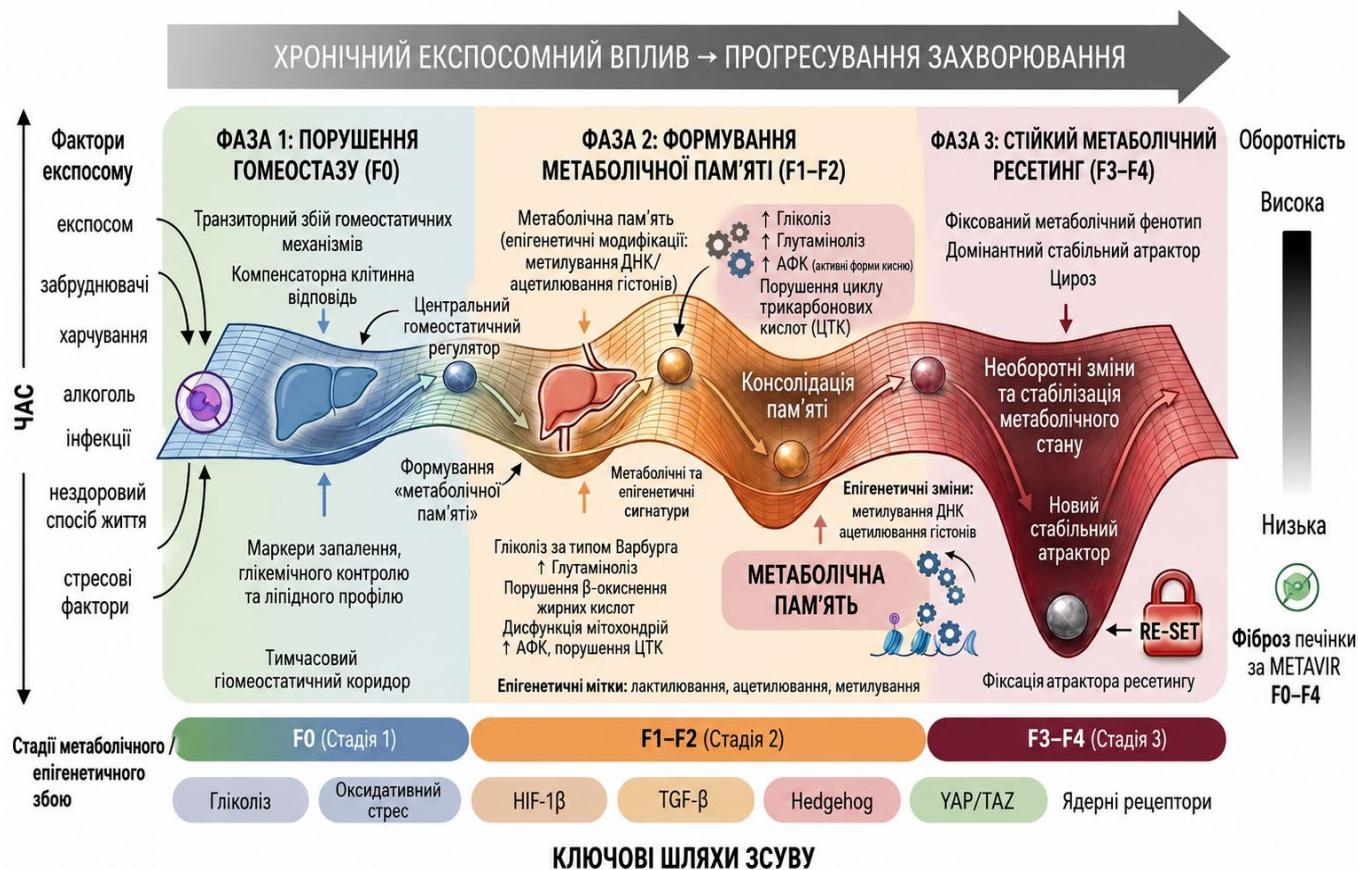


Рис. 1.6. Схема, що ілюструє етапи формування експозом-індукованого метаболічного ресетингу (Рисунок виконано у програмі Google LLC. (2026). Gemini [Multimodal generative artificial intelligence system with image generation capabilities]. <https://gemini.google.com/>).

Вважаємо, що під час формування ресетингу, зокрема у випадку фіброзу печінки, біологічна система проходить через три послідовні якісно різні стани або стадії (принцип стадійності):

1 – вихід за межі гомеостазу – реакція організму проявляється у зміні гомеостатичних показників, які можуть повертатися до вихідного або близького до вихідного гомеостатичного стану після усунення індукуючого фактора. Цей етап характеризується високим ступенем оборотного характеру. У тому випадку, якщо на біологічну систему, яка «вийшла» за межі гомеостатичного коридору, дії негативних факторів тривалі, тобто

багаторазово повторюються, то система переходить у наступну стадію, у неї формується метаболічна та епігенетична пам'ять, тобто ці метаболічні зміни «запам'ятовуються» і ймовірність оборотності зменшується (рис. 1.6);

2 – Метаболічна пам'ять — це стан, за якого сформована адаптивна реакція може певний час зберігатися (затримуватися) навіть після зникнення стимулу, але без повної оборотності. Прикладом такого стану може слугувати фіброз печінки на перших стадіях (F1–F2) свого розвитку (рис. 1.6). Такий стан метаболізму можна визначити як квазістабільний. Якщо негативні дії експосоми зберігатимуться досить довго, то така сформована метаболічно-епігенетична пам'ять, а точніше індуковані метаболічні та епігенетичні патерни «фіксуються», тобто переходять у стан домінування і система переходить у новий стабільний стан – незворотний ресет (рис. 1.6).

3 – Ресетинг – фіксація нового стійкого (домінуючого) метаболічного патерну, такий стан фіксується як новий стабільний атрактор (рис. 1.6). Для виходу зі стану ресетингу необхідне формування нового або повторного ресетингу, тобто «нав'язати нові атрактори».

Поняття «метаболічна пам'ять» було введено в науковий ужиток під час дослідження діабету. Метаболічна пам'ять, а точніше глікемічна пам'ять — це здатність клітин і тканин організму «запам'ятовувати» тривалі періоди високого рівня цукру (гіперглікемії), зберігаючи негативні наслідки (ризик судинних ускладнень) навіть після нормалізації рівня глюкози [50, 51].

Однак такий стан можна віднести до загальнобіологічних явищ, і він проявляється при тривалій дії факторів експосоми, зокрема й фіброзу печінки [1,2]. Виходячи з цього, під метаболічною пам'яттю будемо розуміти формування нових тимчасово домінуючих метаболічних патернів під впливом експосоми, які закріплюються епігенетично і зберігаються протягом певного часу, навіть після усунення дії експосомного індуктора.

Така поведінка метаболічних процесів показана експериментально на моделі тривалої дії на організм сірчаноокислої міді [52].

Під поняттям «домінуючі метаболічні патерни» ми розуміємо формування альтернативних метаболічних варіантів, які виникають на тлі дії екстремальних факторів і здатні до авторегуляції (самопідтримки). Механізм самопідтримки може слугувати біологічним аналогом математичного атрактора.

Важливо зазначити, що ресетинг, на відміну від адаптації, веде до нового стійкого патерну, тобто до переустановки метаболічної «операційної» системи з одними домінантами на інші домінанти (рис. 1.6). Для стану ресетингу характерна втрата пластичності до зворотного переходу, що й відповідає поняттю хронічного стану. Ще одним із найважливіших аспектів формування ресетингу є фактор часу. Ресетинг формується лише після досягнення критичної тривалості, і для нього характерні явища гістерезису – траєкторія «повернення» не збігається з траєкторією адаптації, а механізм його закріплення визначається метаболічною та епігенетичною пам'яттю, які йому передують (рис. 1.6). На відміну від метаболічної пам'яті, яка повільно згасає після усунення стимулу і система здатна «повертатися» до вихідного гомеостатичного рівня, ресетинг — це зміна домінанти, і для її усунення необхідний стимул для переключення на новий альтернативний метаболічний патерн. Отже, якщо метаболічна пам'ять передбачає повільне повернення до колишнього або близького до нього стану, то у випадку ресетингу необхідно «переналаштувати» метаболічну програму, тобто здійснити новий або умовно повторний ресетинг.

Необхідно зазначити, що «ресетинг» має певну схожість із такими поняттями, як «перемикання» або «перепрограмування». Однак поняття «перемикання» зазвичай означає миттєвий перехід без урахування епігенетичних і часових характеристик процесу. Поняття

«перепрограмування» вже міцно закріпилося щодо стовбурових клітин і часто асоціюється з онкологічними процесами. Натомість «ресетинг» відображає переналаштування метаболічної системи на новий рівень під впливом темпоральної дії факторів середовища. Найважливішим є те, що сформований у такий спосіб метаболічний патерн стає «новою нормою» та зберігається навіть після усунення індуктора.

### **1.6. Потенційні підходи в усуненні експосом-індукованого метаболічного ресетингу**

**Експосом-індукований метаболічний ресетинг** — це адаптація метаболічної системи організму до токсичного або агресивного середовища існування. Така адаптація забезпечує виживання в нових агресивних умовах, проте у довгостроковій перспективі переводить біологічну систему у новий стабільний атрактор, який поступово втрачає здатність до подальшої адаптивної відповіді. Це означає втрату чутливості як до зовнішніх, так і до внутрішніх чинників, що ми визначаємо як формування хронічних захворювань. Вважаємо, що подібна властивість є однією з фундаментальних характеристик усіх високоадаптивних біологічних систем.

Використання традиційних терапевтичних способів усунення таких станів або лікування хронічних патологій мало ефективні. Це може пояснюватися тим, що система стабільна і не чутлива до впливів (рис.1.6). Висока стабільність хронічних станів пов'язана з тим, що в результаті тривалої дії факторів експосоми, сформувався домінуючий атрактор, який пройшов кілька етапів «закріплення» (рис.1.6) та підтримується взаємно пов'язаними метаболічними циклами.

Вважаємо, що усунення хронічних станів, або зворотний ресетинг, може бути забезпечений лише на основі поетапного (часового) формування нових атракторів та переведення метаболічної системи у новий режим

функціонування. Такий перехід не може бути здійснено стрибкоподібним переходом, тобто, традиційними терапевтичними заходами. Процес переходу з хронічного стану в новий метаболічний стан (зворотний ресетинг) має складатися з кількох стадій як і формування ресетингу (рис.1.6). На першій стадії необхідно збільшити дисперсії траєкторій в басейні хронічного атрактора, що сформувався – ця стадія може бути названа «стадія розширення варіабельності». На другій стадії необхідно забезпечити формування декількох локальних прото-атракторів усередині розширеного басейну – це стадія коротко може бути названа гетерогенізацією. Третій етап спрямований на формування конкуренції між прото-атракторами, яка завершується вибором альтернативи між можливими варіантами. вона може бути названа точкою біфуркації. І на четвертій стадії один із атракторів займає домінуюче становище і стає стійким, тобто, домінуючим – це фіксація нового хронічного стану.

Якщо виходити з ідеї стадійності усунення хронічних станів, то для переходу в новий функціональний стан або реалізації зворотного ресетингу найважливішими є: темпоральність дії індукторів; характеристика та особливості дії індукторів та особливість функціональних станів (стадії розвитку ресетингу) у біологічного об'єкта.

Так як, вирішення такої складної біомедичної проблеми вимагає реалізації мегапроекту, у цій роботі здійснювали пошук потенційного індуктора зворотнього ресетингу. Виходили з того, що якщо індуктор має поліфункціональні властивості, то він може забезпечити реалізацію не однієї, а кількох стадій усунення ресетингу. Крім того, сила дії, яка залежить від дози, не повинна бути надмірною. У такому разі індуктор здатний забезпечити «м'яку» тривалу адаптивну дію на метаболізм. Враховуючи поліфункціональність індуктора, біологічна система проходить стадії «індукованої еволюції», спрямовані на перебудову з

урахуванням функціональних станів системи у кожний наступний момент часу.

В результаті попередніх експериментів та аналізу літературних джерел дійшли висновку, що як індуктор зворотного ресетингу можуть бути використані поліфенольні сполуки, які збагачені хлорогеновою кислотою.

### **1.7. Характеристика поліфенольних сполук як потенційних регуляторів експосом-індукованого метаболічного ресетингу при фіброзі печінки**

В останні роки ведуться інтенсивні дослідження поліфенольних сполук та, насамперед, їх участі у регуляції метаболізму [53-55].

Поліфеноли – це вторинні метаболіти рослин, які беруть участь у регуляції росту та розмноженні рослин, забезпечують їм захист від патогенів [56]. Позитивна дія (лікувальні ефекти) більшості лікарських рослин на організм тварин пов'язана з дією поліфенольних сполук [57,58]. До складу поліфенолів входять від одного до декількох ароматичних кілець, які мають одну або дві гідроксильні групи. Відомі три основні групи поліфенолів: флавоноїди, нефлавоноїди та дубильні речовини. На даний момент ідентифіковано понад 10 000 поліфенольних сполук, що мають протизапальні, імуномодулюючі та антимуутагенні властивості. Найбільш повно та детально вивчена їх антиоксидантна активність [59]. Активність поліфенольних сполук залежить від особливостей їхньої структури [60,61]. Серед величезної різноманітності поліфенольних сполук найповніше досліджено хлорогенову кислоту. Це пояснюється тим, що вона досить широко поширена в рослинному світі і має досить широкий спектр біологічних дій [60,62]. Наявні дані дозволяють припускати, що вона може розглядатися як один із природних регуляторів, здатних забезпечити формування зворотного метаболічного ресетингу при фіброзі печінки.

### 1.8. Структурні особливості хлорогенової кислоти

Хлорогенові кислоти (ХК) широко поширені в рослинному світі та містяться в багатьох продуктах рослинного походження, зокрема у фруктах, овочах, кавових зернах, чаї, яблуках, вині та інших джерелах [63–65]. За хімічною природою ХК є естером транс-кавової та хінної кислот. Ефірний зв'язок у їхній молекулі утворюється між карбоксильною групою кавової кислоти та однією з гідроксильних груп хінної кислоти (рис. 1.7).

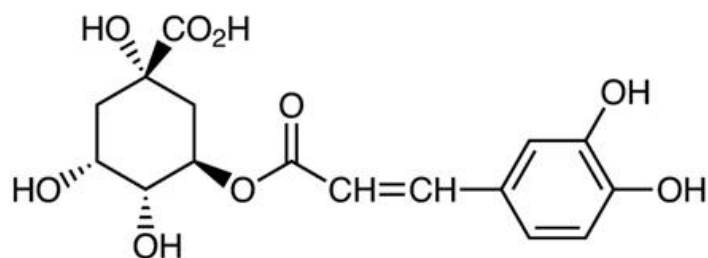


Рис.1.7 Формула хлорогенової кислоти [66]

Згідно із сучасною номенклатурою IUPAC, хлорогенова кислота має назву 5-О-кофеїлхінна кислота (5-CQA). Її молекула складається з фрагмента кавової кислоти, що містить ароматичне кільце з двома фенольними гідроксильними групами, та залишку хінної кислоти з циклічною структурою, кількома гідроксильними групами і карбоксильною групою. Така будова зумовлює високу полярність сполуки та її здатність утворювати численні водневі зв'язки з іншими молекулами.

Хлорогенова кислота в природних об'єктах представлена не однією сполукою, а комплексом структурних ізомерів, серед яких найпоширенішими є 3-кофеїлхінна (3-CQA), 4-кофеїлхінна (4-CQA) та 5-кофеїлхінна (5-CQA) кислоти. Відмінності між ними зумовлені положенням залишку кавової кислоти в молекулі хінної кислоти. Серед цих ізомерів 5-О-кофеїлхінна кислота є переважаючою формою в більшості рослинних джерел, зокрема в зернах кави [65].

Залежно від місця приєднання та кількості кофеїл-груп до хінної кислоти, теоретично існує 10 ізомерів хлорогенової кислоти, що складаються з моно- та дикофеїлхінних кислот: 1-кофеїлхінна кислота, 3-кофеїлхінна кислота, 4-кофеїлхінна кислота, 5-кофеїлхінна кислота, 1,3-дикофеїлхінна кислота, 1,4-дикофеїлхінна кислота, 1,5-дикофеїлхінна кислота, 3,4-дикофеїлхінна кислота, 3,5-дикофеїлхінна кислота, 4,5-дикофеїлхінна кислота. З рослин були виділені наступні ізомери хлорогенової кислоти: хлорогенова кислота (3-кофеїлхінна кислота), криптохлорогенова кислота (Band510) (4-кофеїлхінна кислота), неохлорогенова кислота (5-кофеїлхінна кислота), ізохлорогенова кислота А (3,5-дикофеїлхінна кислота), ізохлорогенова кислота В (3,4-дикофеїлхінна кислота), ізохлорогенова кислота С (4,5-дикофеїлхінна кислота), цинарин (1,3-дикофеїлхінна кислота).

Проте, основними представниками родини ХК є кофеїлхінові кислоти, ферулоїлхінові кислоти, п-кумароїлхінові кислоти тощо [67].

Рослинні об'єкти використовують декілька метаболічних шляхів синтезу ХК, але всі ці шляхи починаються з одного попередника – фенілаланіну, через стадію утворення шикимової кислоти. Біосинтез хлорогенової кислоти відбувається переважно в цитоплазмі та хлоропластах рослинних клітин. Після утворення кінцевих продуктів вони транспортуються до внутрішньоклітинних везикул, де можуть

накопичуватися та зберігатися. Початковим етапом синтезу є дезамінування L-фенілаланіну під дією ферменту фенілаланінамоніак-ліази (PAL), у результаті чого утворюється транс-корична кислота — ключовий проміжний метаболіт фенілпропаноїдного шляху.

У межах перших чотирьох шляхів біосинтезу транс-корична кислота за участю ферменту цинамат-4-гідроксилази (C4H) перетворюється на транс-4-кумарову (п-кумарову) кислоту. Надалі ця сполука зазнає послідовних ферментативних перетворень, які приводять до формування хлорогенової кислоти [68]. Особливістю четвертого шляху є утворення кумароїлхінової кислоти внаслідок взаємодії гідроксициннамоїл-КоА з хінною кислотою за участю гідроксициннамоїл-КоА:хінатгідроксициннамоїлтрансфери (HCT).

Подальше гідроксилювання цієї сполуки ферментом р-кумароїлестераза 3'-гідроксилазою (C3'H) приводить до утворення хлорогенової кислоти [69]. П'ятий шлях біосинтезу є менш поширеним і виявлений лише у деяких видів рослин, зокрема у батату. У цьому випадку синтез хлорогенової кислоти забезпечується узгодженою дією цинаматглюкозилтрансфери (UGCT) та хінатгідроксициннамоїлтрансфери (HCGQT), які каталізують послідовні реакції, що завершуються утворенням ХК [69].

### **1.9. Біологічні властивості хлорогенової кислоти**

Інтерес біотехнологів та фармацевтів до дослідження ХК може пояснюватись її широким спектром впливу на організм (рис. 1.8).

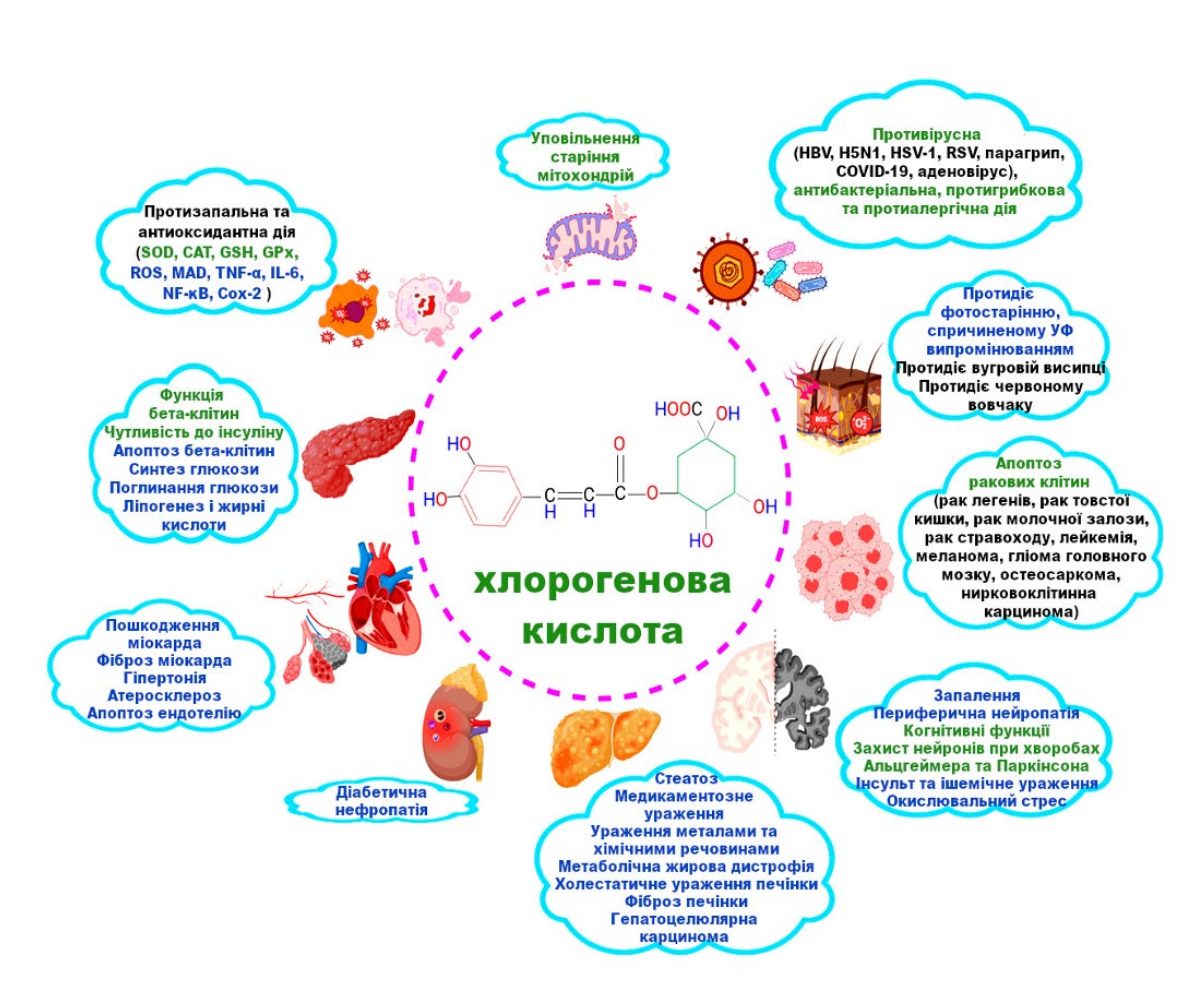


Рис. 1.8. Схема, що демонструє широкий спектр біологічної активності хлорогенової кислоти на організм [65].

Такі різноманітні дії ХК на організм можуть пояснюватися кількома важливими особливостями: 1 – в основі формування різноманітних патологій лежить єдиний молекулярний механізм, який може бути пов'язаний із запальним процесом, а він, у свою чергу, може бути індукований окислювальним стресом або ендегенними цитотоксичними факторами; 2 – тим, що різні ізоформи ХК можуть виявляти різну біологічну активність; 3 – особливостями функціонального стану організму в момент впливу ХК на біологічну систему.

Накопичено величезну кількість експериментальних даних, які вказують, що окислювальний стрес та асоційовані з ним запальні процеси мають місце при формуванні всієї різноманітності патологій [65, 70, 71].

Логічно і цілком переконливо можна стверджувати, що прийом антиоксидантів у разі окислювального стресу як основного індуктора патологічних процесів забезпечить усунення або запобігатиме подальшому розвитку захворювань.

Дослідження антиоксидантних властивостей ХК показали, що її позитивний вплив на усунення такого широкого спектру патологій, може пояснюватися її антиоксидантними властивостями, оскільки є достатня кількість експериментальних даних, які вказують на наявність виражених антиоксидантних властивостей ХК та інших поліфенольних сполук [65,70,71].

Однак, поряд з витонченістю, логічністю і навіть наявними експериментальними даними про роль вільно радикальних процесів у формуванні патологічних станів, проблема участі екзогенних антиоксидантів в усуненні патологій є набагато складнішою, ніж спрощений і дещо ідеалізований варіант їх прямої участі в цих складних процесах. Критичний аналіз існуючих даних вказує на наявність невідповідності між даними, отриманими в системі *in vitro* та теоретично очікуваною користю та їх реальною ефективністю у клінічній практиці. Це явище відоме як «антиоксидантний парадокс» [71].

Наведемо лише кілька аргументів у рамках антиоксидантного парадоксу, обмежена біодоступність та особливості кінетики екзогенних (харчових, лікарських) антиоксидантів. Більшість екзогенних антиоксидантів, у тому числі і поліфенолів, піддаються метаболізму мікробіомом травного тракту, метаболіти поліфенолів погано проникають у кровообіг та їх кінцева концентрація в організмі занадто низька порівняно з численними ендогенними антиоксидантами, щоб забезпечити зміщення балансу в редокс-системі [70,71]. З точки зору кінетики, швидкість реакцій багатьох антиоксидантів, у тому числі і поліфенолів, з вільними радикалами в організмі занадто мала для ефективного прямого пригнічення

окислювального стресу. Лауреат Нобелівської премії Дж. Вотсон зазначав, що терапевтичні дози антиоксидантів вкрай рідко можуть впливати на пухлини;

Дія екзогенних рослинних антиоксидантів зокрема і поліфенолів на організм може бути пов'язана з індукцією гормезисного ефекту. Існує думка, що поліфеноли не здатні усувати дії вільних радикалів, а їхня біологічна дія пов'язана з індукцією гормезису [72], що пояснюється, навпаки, проявом прооксидантних властивостей і як наслідок активацією власної антиоксидантної системи організму [72]. Цей механізм може реалізовуватись через активацію фактора Nrf2 [72,73].

Спрямованість біологічної дії поліфенолів залежить від дози. У малих дозах вони виконують функції горметинів, а при надмірних дозах можуть «відключати» власну антиоксидантну систему і як наслідок індукувати окислювальний стрес, що й могло пояснюватись проявом негативних дій при клінічних випробуваннях.

Отже, наявність позитивної дії хлорогенової кислоти та інших поліфенольних сполук на усунення різноманітних патологій не може пояснюватись лише їхньою здатністю перехоплювати вільні радикали (антиоксиданти). Скоріш за все, вони можуть брати участь у регуляції різних метаболічних процесів, і це може залежати від дози, ізоформ поліфенолів та особливостей функціонального стану організму в момент впливу, тобто. контексту для поліфенолів. Безсумнівно, дослідження механізмів їх впливу на біологічні системи і на організм людини становить не лише великий теоретичний інтерес, а й має важливе клінічне значення. Отримані знання є основою розробки способів профілактики та лікування.

При дослідженні механізмів дії поліфенольних сполук необхідно враховувати: склад поліфенольних сполук у тому числі і співвідношення між ізоформами поліфенольних сполук, а воно різне у різних рослинних об'єктів, що пов'язано з відмінностями в метаболічних шляхах їх синтезу.

## Висновок до розділу 1

Проведено аналіз поліфункціональності печінки в організмі та показано, що в процесі еволюції сформувався комплекс адаптивних реакцій цього органа, які забезпечують високу надійність функціонування в мінливих, у тому числі й екстремальних — стрес-індукуючих умовах експосоми. Показано, що у випадку тривалих дій одних і тих самих негативних факторів на організм у печінці формуються особливі стабільні (стійкі) хронічні функціональні стани. Такі стани ми визначаємо як патологічні. Формування хронічних станів проходить через низку взаємопов'язаних стадій, серед яких можна виділити: адаптивну відповідь; формування метаболічної-епігенетичної пам'яті та стан хронізації — ресетингу.

В еволюційному сенсі хронічні стани є адаптивною реакцією організму, оскільки забезпечують йому виживання в нових екстремальних для біологічної системи умовах. Відзначається, що хронізація, як темпоральна відповідь організму на дії експосоми, є фундаментальною властивістю всіх біологічних систем, і наводяться приклади циклічності процесів на різних рівнях організації біологічних процесів. Ці приклади слугують ще одним доказом адаптивності формування хронічних патологій. Підкреслюється, що однією з особливостей формування хронічних процесів є тривалість і «потужність» негативних факторів, що діють на організм.

Запропоновано концепцію експосом-індукованого метаболічного ресетингу, яка визначається як темпорально-залежне, порогове та епігенетично фіксоване переключення на альтернативні метаболічні патерни, що переходять у стан домінування у випадку послідовних багаторазових дій факторів експосоми. Сформовані домінуючі метаболічні патерни здатні до автозбереження навіть після усунення факторів, що їх

індукували. Усунення таких домінуючих метаболічних патернів можливе лише шляхом формування нового ресетингу.

Концепція ЕМР описує процес, при якому сукупність зовнішніх впливів (експосоми) переводить метаболічну систему організму на нові, часто менш ефективні або патологічні режими роботи, але така «перезавантаження» є єдиним адаптивним варіантом, що може забезпечити біологічній системі виживання в даний момент в екстремально діючих умовах. Запропоновано експериментальний підхід можливого усунення хронічних станів, або зворотного ресетингу, який може бути забезпечений лише на основі темпорального (поетапного) формування нових атракторів і переведення метаболічної системи в новий режим функціонування. Теоретично обґрунтовано можливість використання поліфункціональних природних сполук як індукторів усунення ресетингу, зокрема поліфенольних сполук, багатих на хлорогенову кислоту.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1 Виділення поліфенольних сполук з соняшникового шроту

Знежирений соняшниковий шрот був люб'язно наданий компанією «Потоки» (Україна). Виділення поліфенольних сполук (ПС) здійснювали методом водної екстракції за кімнатної температури (20 °С). Для цього шрот змішували з водою у співвідношенні 1:10 (100 г шроту на 1 л води) та інтенсивно перемішували протягом 5 хвилин. Отриману суспензію піддавали центрифугуванню при 1800 g упродовж 15 хвилин за температури 20 °С. Після відокремлення твердої фази екстракт об'ємом 700–750 мл концентрували на ротаційному випарнику при температурі 40 °С до кінцевого об'єму 50–55 мл. У отриманий концентрат додавався рівний об'єм етилового спирту 96%. Осад, що випав, відділяли центрифугуванням (1800 g, 15 хв). Очищений концентрат витримували у холодильнику при 5–7°С протягом 12–15 годин, після чого додатково фільтрували через фільтрувальну тканину. Отриманий зразок ПС світлого зеленувато-коричневого кольору був стабільним і не змінював зовнішнього вигляду. Спектри поглинання були характерними для поліфенолів соняшникового шроту (рис. 2.1) протягом щонайменше 3 місяців. У отриманих зразках містилося від 60 до 70 г/л ПС, з яких на хлорогенову кислоту припадало 7,4–9,5 г/л (13–15% від усіх ПС).

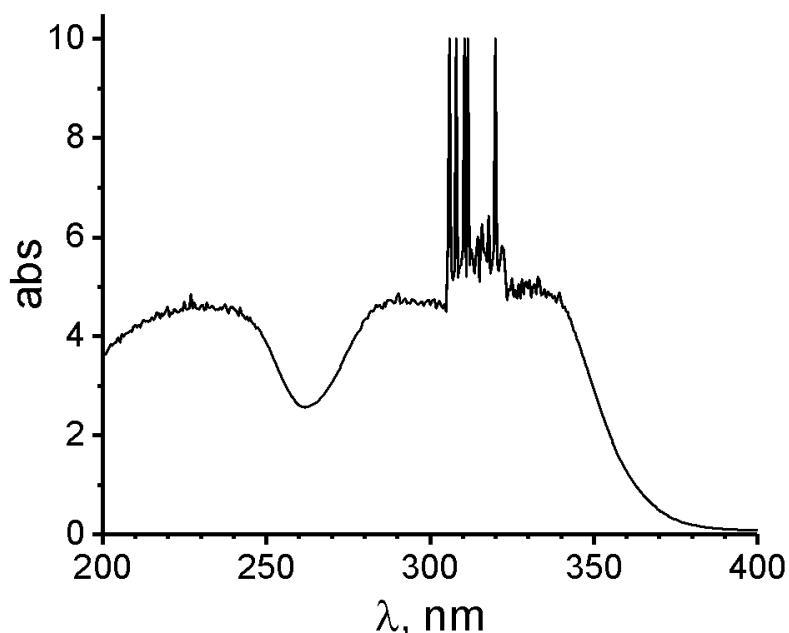


Рис. 2.1 Спектральні характеристики водно-спиртових екстрактів поліфенольних сполук, виділених із безлузгового соняшникового шроту, визначали після розведення вихідного концентрату у співвідношенні 1:100. Наведено типову УФ-спектральну картину, отриману як усереднений результат не менше ніж п'яти незалежних вимірювань, що забезпечує відтворюваність даних.

## **2.2 Отримання супрамолекулярного комплексу «казеїну молозива-ПС соняшникового шроту»**

Молозиво отримували у корів породи «Українська строката ряба», які утримувалися в агропромисловій фірмі «Альфа» (Україна), лише першого та другого удою. Молозиво попередньо знежирювали шляхом центрифугування протягом 25 хв при 3000 g після охолодження зразків до 4 °С, при цьому жирову фракцію повністю видаляли. Процедуру знежирення повторювали дворазово для підвищення ефективності відокремлення жиру.

Для одержання комплексів «казеїн–ПС» до знежиреного молозива вносили поліфенольні сполуки в концентрації 5,0–5,2 г сухих речовин на 1 л молозива, що відповідало 0,68–0,7 г хлорогенової кислоти на 1 л. У контрольні зразки додавали відповідний об’єм водно-спиртового розчину без поліфенольних сполук. Отримані системи інкубували протягом 30 хв при м’якому перемішуванні за температури 20–22 °С.

Подальше осадження комплексів «казеїн–ПС» здійснювали шляхом доведення системи до ізоелектричної точки казеїну (рН 4,6) із використанням 1 М розчину оцтової кислоти при безперервному перемішуванні. Для завершального формування агрегатів зразки витримували 12 годин при 5–7 °С, після чого повторно центрифугували протягом 25 хв при 3000 g за температури 4–6 °С. У результаті отримували постказеїнову та казеїнову фракції (рис. 2.2). З метою дослідження характеристик отриманих супрамолекулярних комплексів проводили вивчення впливу рН та температури на такі фізико-хімічні характеристики, як спектральні властивості комплексів та електропровідність водних суспензій комплексів. Для цього проводили серії промивань супрамолекулярних комплексів дистильованою водою з рН 4,6; 7,0 і 9,0 при температурах 20 та 40 °С (рис. 2.2).

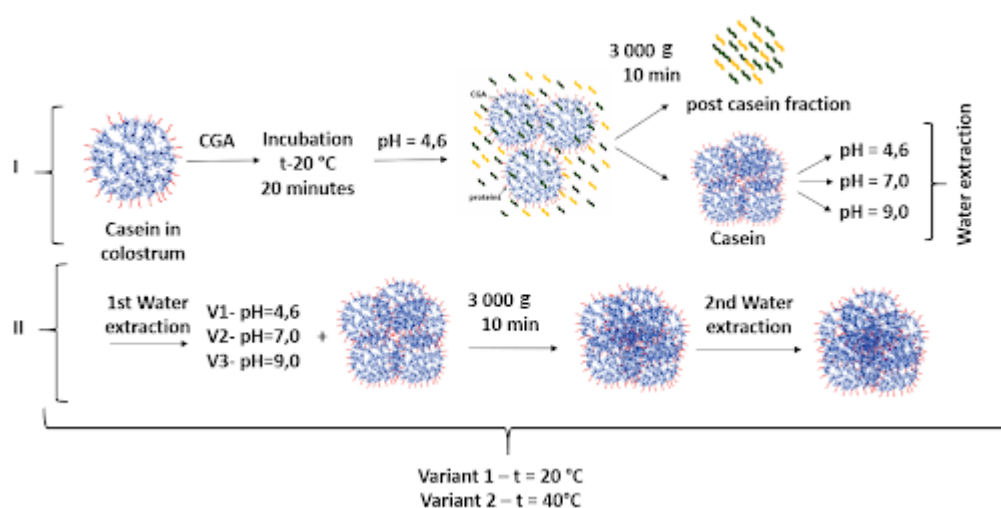


Рис.2.2 Схе́ма експериментальних процедур одержання супрамолекулярних комплексів «казеїн–ПФ» передбачала два послідовні етапи. На першому етапі (I) до вихідного молозива, що містить білкові міцели казеїну, додавали хлорогенову кислоту (CGA) та проводили інкубацію з наступним доведенням рН до 4,6. Після цього здійснювали розділення агрегатів кислого казеїну та постказеїнової фракції. На другому етапі (II) отриманий кислий казеїн двічі промивали водним розчином за різних значень рН і температур 20 °С та 40 °С, після чого зразки піддавали подальшому аналізу.

### **2.3 Синтез вуглецевих квантових точок (CQDs) на основі фенілефрину**

Синтез CQDs проводили гідротермальним методом згідно з методикою Pan та співавт. [74] із внесеними модифікаціями. До 2 мл водного розчину, що містив 20 мг гідрохлориду фенілефрину, додавали деіонізовану воду до кінцевого об'єму 10 мл. Отриману суміш переносили в герметичний реакційний контейнер та інкубували при температурі 160 °С. У порівнянні з вихідною методикою температуру інкубації знижували, а тривалість процесу збільшували до 12 годин.

Після охолодження зразки центрифугували при 17 000 g протягом 25 хв при температурі 18–28 °С. Отриманий супернатант піддавали діалізу протягом 24 годин за температури 18–28 °С при постійному перемішуванні. Синтезовані CQDs зберігали при 4–6 °С, при цьому їх флуоресцентна активність зберігалася щонайменше 60 днів.

Флуоресцентні властивості CQDs визначали за допомогою спектрофлуориметра RF-6000 (Shimadzu, Японія). Збудження флуоресценції здійснювали при довжині хвилі 363 нм, а максимум випромінювання реєстрували при 457 нм. Для визначення вмісту хлорогенової кислоти в зразках застосовували метод гасіння флуоресценції:

до однакової кількості CQDs додавали різні концентрації хлорогенової кислоти та реєстрували зміну інтенсивності сигналу.

#### **2.4 Визначення спектральних характеристик казеїну і супрамолекулярних комплексів «казеїн-ПС»**

Спектри поглинання отриманих зразків визначали на спектрофотометрі UV-2600 (Shimadzu, Японія) при довжинах хвиль 200-400 нм. Результати представляли у вигляді спектральних характеристик.

#### **2.5 Визначення електропровідності досліджуваних зразків**

Визначення електропровідності водних розчинів супрамолекулярних комплексів проводили на векторному аналізаторі ZNB 40 “Rohde & Schwarz” (Австрія) у діапазоні частот 100–10 000 кГц з інтервалом 50 кГц. Температуру зразків під час вимірювання контролювали за допомогою термопари з точністю до 0,1 °С. Вимірювання кожного аналітичного зразка повторювали не менше трьох разів, а отримані значення усереднювали.

#### **2.6. Молекулярне моделювання та молекулярний докінг**

Молекулярне моделювання та дослідження взаємодії низькомолекулярних лігандів із наноконтейнером на основі  $\beta$ -казеїну виконували за допомогою програмного комплексу SAMSON 2025 R3 (Software for Adaptive Modeling and Simulation of Open Nanosystems) із використанням інтегрованого модуля AutoDock Vina Extension.

Підготовка структури рецептора. Як рецепторну модель використовували просторову структуру  $\beta$ -казеїну великої рогатої худоби (*Bos taurus*), що відповідає білку CSN2 (UniProtKB: P02666, CASB\_BOVIN). Гексамерну структуру  $\beta$ -казеїну було отримано безпосередньо з бази даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02666/entry>) та використано

як модель наноконтейнера для подальших досліджень молекулярної взаємодії.

Перед проведенням розрахунків структуру наноконтейнера піддавали процедурі підготовки за допомогою інструмента Prepare System у середовищі SAMSON. Підготовка включала перевірку цілісності структури, оптимізацію геометрії та автоматичне додавання атомів водню (Add hydrogens) для відновлення коректного протонованого стану амінокислотних залишків за нейтрального значення рН. За необхідності також виконували перевірку наявності сторонніх молекул та коректності топології білкового комплексу.

Підготовка структури ліганда. Як модельну біоактивну сполуку використовували хлорогенову кислоту ( $C_{16}H_{18}O_9$ ; молекулярна маса 354,31 Да). Просторову структуру ліганда імпортували до середовища SAMSON та верифікували за допомогою інтегрованої системи хімічної ідентифікації сполук CACTVS. Для забезпечення конформаційної рухливості молекули під час оптимізаційного пошуку виконували автоматичне визначення та виконували автоматичне визначення та ініціалізацію торсійних зв'язків (torsions), а також енергетичну мінімізацію початкової геометрії ліганда.

Проведення молекулярного докінгу. Пошук потенційних ділянок зв'язування хлорогенової кислоти у гексамерному наноконтейнері здійснювали методом "blind docking". Область пошуку (Grid Box) у формі тривимірного паралелепіпеда орієнтували та масштабували таким чином, щоб вона повністю охоплювала весь гексамер  $\beta$ -казеїну, включаючи внутрішню порожнину та міжсубодиничні інтерфейси. Це дозволило виявити найбільш енергетично вигідні сайти взаємодії ліганда без попереднього визначення конкретного центру зв'язування.

Розрахунки виконували за алгоритмом AutoDock Vina. Для комплексу рецептор–ліганд генерували дев'ять конформаційних мод (Mode 1–Mode 9), які ранжували відповідно до прогнозованої енергії зв'язування ( $\Delta G$ ,

ккал/моль). Найбільш стабільною та термодинамічно вигідною вважали конформацію з найнижчим значенням енергії зв'язування.

Аналіз комплексів рецептор–ліганд. Просторову візуалізацію та первинний аналіз тривимірного розташування ліганда у складі комплексу здійснювали в середовищі SAMSON 2025 R3. Оцінювали геометрію міжмолекулярних контактів, просторову орієнтацію молекули хлорогенової кислоти відносно поверхні та внутрішньої порожнини наноконтейнера, а також характер її локалізації в межах передбачуваного сайту зв'язування.

Для детального аналізу міжмолекулярних взаємодій використовували програмне забезпечення BIOVIA Discovery Studio Visualizer. На основі двовимірних (2D) діаграм взаємодії ідентифікували амінокислотні залишки наноконтейнера, залучені до зв'язування ліганда, та визначали типи міжмолекулярних контактів. Аналіз охоплював такі типи взаємодій: ван-дер-ваальсові взаємодії (van der Waals); водневі зв'язки: класичні водневі зв'язки, вуглець-водневі зв'язки (Carbon Hydrogen Bond) та  $\pi$ -донорні водневі зв'язки (Pi-Donor Hydrogen Bond); гідрофобні контакти: ароматичні взаємодії типу  $\pi$ - $\pi$ -стекингу (Pi-Pi Stacked), а також алкільні (Alkyl) та  $\pi$ -алкільні (Pi-Alkyl) контакти [197-199].

## **2.7 Виділення та очищення хлорогенової кислоти з соняшникового шроту**

Було показано, що хлорогенова кислота (ХК) добре розчиняється не лише в спиртах, але й в інших розчинниках, включаючи воду [38, 39]. Враховуючи, що ХК становить понад 50% усіх поліфенольних сполук у соняшниковому шроті, необхідно спростити подальше очищення ХК від інших поліфенольних сполук та зменшити ймовірність утворення комплексів з білками. У даній роботі ми використали короткочасну водну екстракцію ХК із соняшникового шроту з подальшим

гель-хроматографічним очищенням (Sephadex G-50; висота колонки 400 мм; діаметр колонки 25 мм; швидкість елюювання 0,9–1,2 мл на хвилину) та спектральним аналізом у діапазоні 200–400 нм (спектрофотометр SHIMADZU UV-2600, Японія).

Для визначення впливу температури на вихід хлорогенової кислоти (ХК) її екстрагували стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) з перемішуванням зі швидкістю 2 об/хв протягом 2 хвилин за різних температур (від 20 до 40 °С).

## 2.8 Вплив кількості екстракцій соняшникового шроту на вихід екстрактивних речовин та хлорогенової кислоти

Короткочасна (до 2 хв) водна екстракція соняшникового шроту у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) після 4 послідовних промивань дистиллятом дозволяє вилучити загалом 23,5 % речовин. Слід зазначити, що після першої та другої екстракцій 8,6 % та 7,8 % (рис. 2.3 а,b) екстрагованих речовин перейшли у водну фазу, тобто 16,4 % від загальної кількості 23,5 %. Решта 7,1 % припадає на третю та четверту промивки (рис. 2.3 с,d).

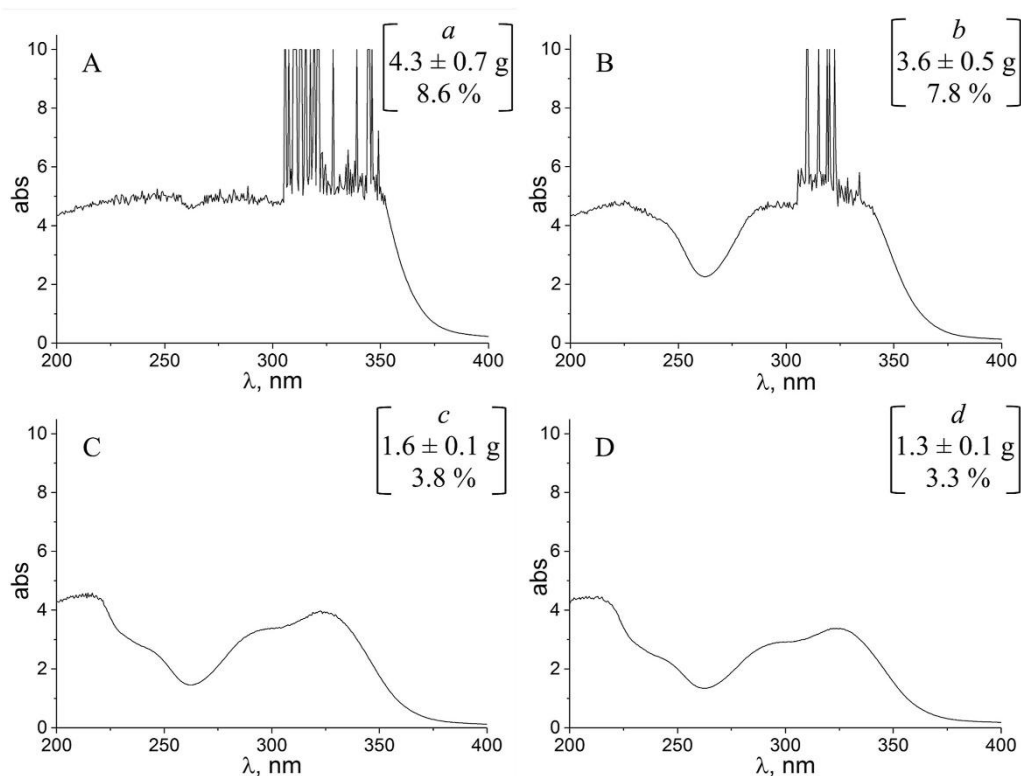


Рис. 2.3 Загальна кількість екстрагованих речовин після короткочасної (2 хв) екстракції соняшникового шроту: перша екстракція (a), друга (b), третя (c), четверта (d); та відповідні спектри поглинання екстрагованих речовин в ультрафіолетовій частині спектра (A, B, C, D). Усі зразки перед спектральним аналізом були розбавлені дистильованою водою у 50 разів, що дозволило зафіксувати поглинання в оптимальному діапазоні для всіх зразків та провести порівняльний кількісний аналіз.

Після першого промивання соняшниковий шрот піддавався водній екстракції, в результаті чого у водну фазу проникали різні поліфенольні сполуки, що поглинають світло в діапазоні від 300 до 350 нм, а також виділялася невелика кількість білків і пептидів, які поглинають світло в діапазоні 260–280 нм (рис. 2.3 A). Після другої екстракції соняшникового шроту різноманітність поліфенольних сполук, що переходили у водний розчин, значно зменшилася, а кількість екстрагованих білків також знизилася (рис. 2.3 B). Після третьої та четвертої екстракцій кількість поліфенольних сполук і білків, що проникали у водну фазу, швидко зменшувалася (рис. 2.3 C, D).

Отримані результати показують, що основна кількість поліфенольних сполук переходить у водний розчин протягом перших двох промивань корму дистильованою водою, за цих умов білки залишаються у кормі.

Крім того, екстракти, отримані після чотирьох промивань, були об'єднані та очищені на хроматографічній колонці з гелем Sephadex G-50. Для розділення використовувалася дистильована вода. Як видно зі спектра поглинання (рис. 2.4), цей простий метод дозволяє отримати ХК та її ізоформи, що поглинають у діапазоні 315–330 нм.

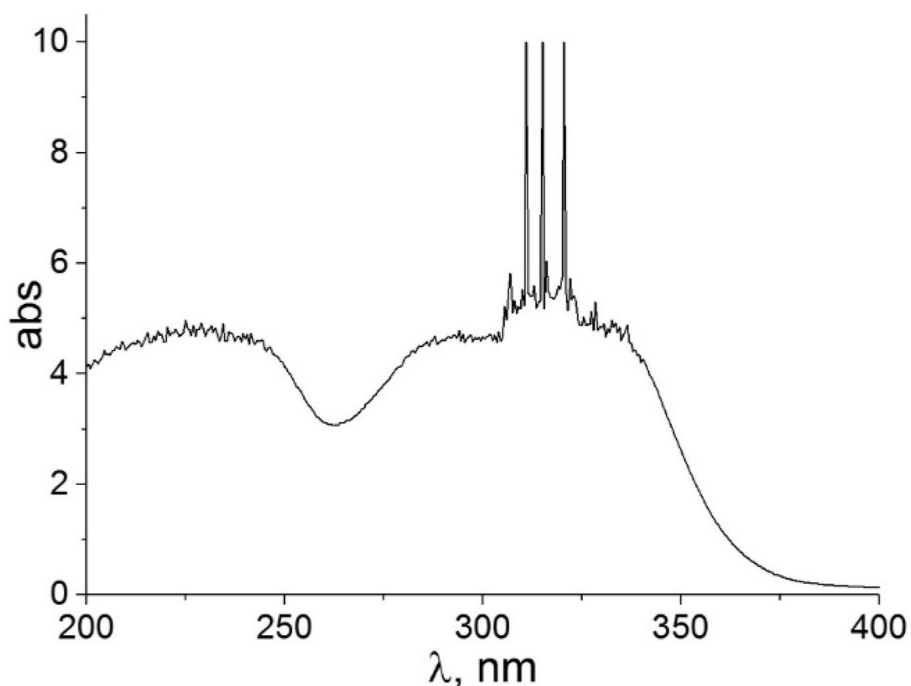


Рис. 2.4. Спектри поглинання ізоформ хлорогенової кислоти після очищення водного екстракту на колонці Sephadex G-50 (висота колонки 400 мм, діаметр 25 мм, швидкість елюювання 0,9–1,2 мл на хвилину).

В подальшому ізоформи ХК після хроматографічного очищення концентрували на роторному випарнику та використовували для оцінки їх біологічного ефекту на експериментальних тваринах (щурях *Wistar*). Водний розчин ХК вводили тваринам двома способами: внутрішньочеревно та перорально.

## 2.9 Вплив температури екстракції на вихід хлорогенової кислоти із соняшникового шроту

За температури 20 °С протягом 2 хвилин із 100 г шроту у водний розчин перейшло 29 г/л сухих речовин (табл. 2.1). Підвищення температури екстракції до 35 °С супроводжувалося незначним збільшенням вмісту поліфенольних сполук у водному розчині до 32 г/л, а підвищення температури екстракції до 40 °С не призвело до збільшення виходу хлорогенової кислоти у водну фазу (табл. 2.1). Таким чином, температура

екстракції в діапазоні 20–40 °С мала незначний вплив на вихід хлорогенової кислоти у водний розчин.

**Таблиця 2.1**

Отримання екстрактивних речовин, збагачених хлорогеновою кислотою, із соняшникового шроту проводилося протягом 2 хвилин за різних температур ( $X \pm SE$ , 5 експериментів).

\* –  $P < 0,05$  порівняно з варіантом екстракції при 20 °С (ANOVA)

Температура екстракції, °С	Концентрація сухих речовин, г/л
20	29,40 ± 0,90
30	28,80 ± 1,80
35	32,40 ± 1,20 *
40	31,35 ± 0,90

## 2.10. Моделювання інтоксикації експериментальних тварин шляхом введення сульфату міді

Щури лінії *Wistar* були розділені на п'ять експериментальних груп; кожна група включала 5 тварин (рис. 2.5).

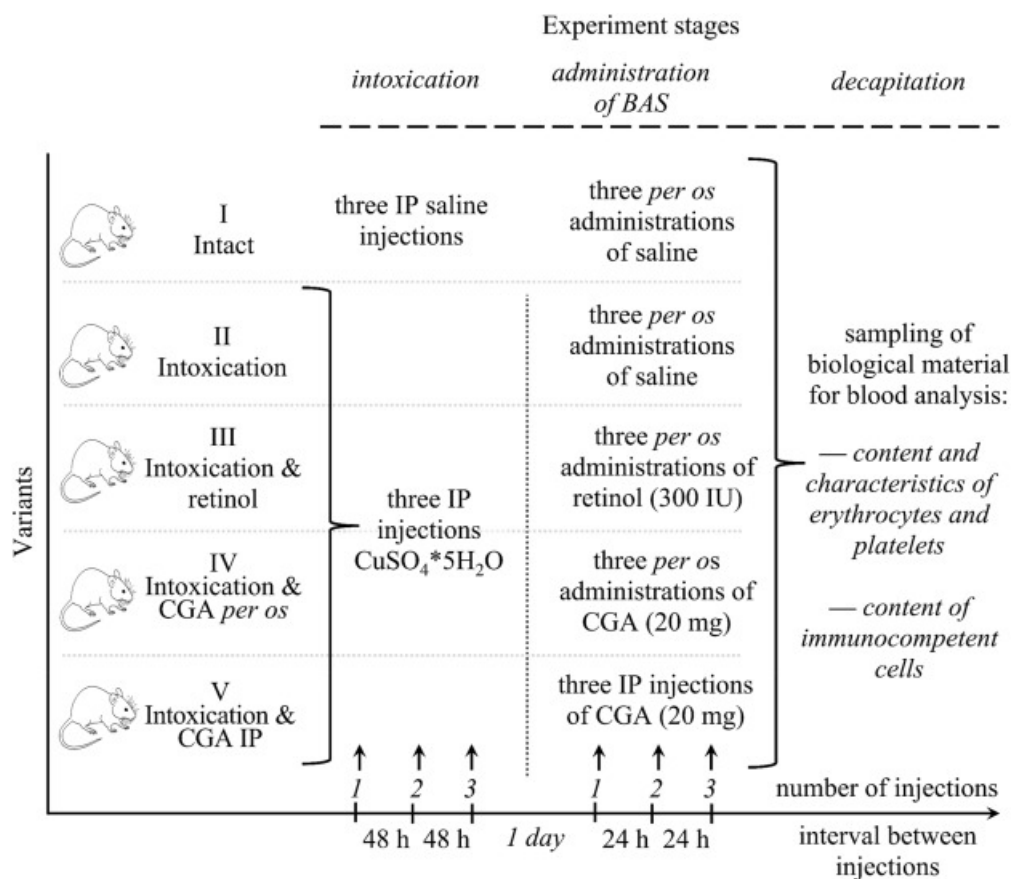


Рис. 2.5. Схема проведення процедур з інтактними тваринами та тваринами, які отримали три внутрішньочеревні ін'єкції сульфату міді у дозі 1 мг/100 г маси тіла кожні 48 годин: **Група I** – не піддавалася експериментальним впливам, отримувала відповідні дози фізіологічного розчину; **Група II** – через 24 години після ін'єкції сульфату міді перорально вводили об'єм фізіологічного розчину, що відповідав об'єму розчинів хлорогенової кислоти та ретинолу; **Група III** – через 24 години після ін'єкції сульфату міді тваринам перорально вводили ретинол у дозі 300 МО/100 г маси тіла; **Група IV** – через 24 години після ін'єкції сульфату міді тваринам перорально вводили хлорогенову кислоту у дозі 20 мг/100 г маси тіла, виділену із соняшникового шроту; **Група V** – через 24 години після ін'єкції сульфату міді тваринам внутрішньочеревно вводили хлорогенову кислоту у дозі 20 мг/100 г маси тіла, виділену із соняшникового шроту. Позначення: IP – внутрішньочеревно, BAS – біологічно активні речовини.

Через 24 години після останньої ін'єкції досліджуваних речовин (ХК та ретинолу) тварин обезголовлювали під ефірною анестезією. Усі маніпуляції та процедури з тваринами проводилися відповідно згідно із затвердженим протоколом №1 біоетичним комітетом Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна від 26 вересня 2023 року, що керується положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.) [52]. Перші краплі крові збирали у пробірки з ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для дослідження гематологічних параметрів (автоматичний аналізатор Mindray BC-2800 Vet., США) [75]. Визначали кількість еритроцитів та їх характеристики (об'єм, гематокрит, анізоцитоз і кількість гемоглобіну), кількість тромбоцитів та їх характеристики (тромбокрит, об'єм і анізоцитоз), кількість імунокомпетентних клітин (лейкоцити, лімфоцити, гранулоцити та моноцити).

### **2.11. Дизайн дослідження біологічної активності функціональних продуктів харчування на лабораторних тваринах**

Усі маніпуляції виконувались за погодженням комісії з біоетики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. У своїй роботі комісія керується положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.).

Експерименти проводили на статевозрілих самцях щурів лінії Wistar вагою 150–200 г. Упродовж усього дослідження тварин утримували поодиночі в окремих клітках за стандартних умов віварію, забезпечивши їм вільний доступ до води та корму.

Масу тіла щурів фіксували щодня вранці, перед проведенням будь-яких процедур та годуванням. Забір біоматеріалу й вилучення органів здійснювали після введення тварин у медикаментозний сон.

Одразу після евтаназії перші краплі крові збирали у пробірки з ЕДТА (для загального аналізу), а також у стерильні пробірки – для отримання сироватки та подальшого визначення біохімічних показників (АЛТ, ГГТ, альбуміну, лужної фосфатази, холестерину та креатиніну).

Під час автопсії у щурів усіх експериментальних груп визначали відносну масу печінки – як відсоток від загальної ваги тіла.

## **2.12 Аналітичні методи**

### **2.12.1. Загальний аналіз крові**

Кількісний склад клітин крові щурів досліджували за допомогою гематологічного аналізатора Mindray BC-2800 Vet (США). Робота приладу базується на двох незалежних принципах вимірювання: методі Коултера та колориметричному методі. Під час кожного робочого циклу відбір, розведення зразків та безпосередній підрахунок клітин відбуваються в автоматичному режимі. Аналізатор дозволяє оцінювати 18 параметрів із диференціацією лейкоцитів на окремі популяції. У роботі використовували оригінальні реагенти (Mindray Medical International Limited): розбавлювач M-30D Diluent, промивний розчин M-30R Rinse та лізуючий реагент Lising для гематологічного аналізатора Mindray BC-2800 Vet 52. Луккала, Дж. (2012). HemoCue WBC® ja Mindray™ BC-2800-analysaattoreiden leukosyyttien tasovertailu, leukosyyttien säilyvyys EDTA-antikoagulantissa sekä päivystystutkimuskartoitus.

### **2.12.2. Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові**

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) (ЕС 2.6.1.2) у сироватці крові вимірювали на біохімічному аналізаторі BioChem SA (НТІ, США)

відповідно до інструкцій виробника. Фермент АЛТ каталізує перенесення аміногрупи з L-аланіну на  $\alpha$ -кетоглутарат із утворенням пірувату та L-глутамату. Швидкість зниження оптичної густини (абсорбції) реакційної суміші є прямо пропорційною активності АЛТ, що і реєструється приладом.

### **2.12.3. Визначення активності $\gamma$ -глутамілтрансферази у сироватці крові**

Метод оцінки активності  $\gamma$ -глутамілтрансферази (ГГТ) базується на здатності ферменту (ЕС 2.3.2.2) каталізувати перенесення глутамільної групи з L- $\gamma$ -глутамілкарбокси-4-нітроаніліду на гліцилгліцин. У результаті реакції утворюється 5-аміно-2-нітробензоат, кількість якого є прямо пропорційною активності ГГТ. Накопичення цього продукту реєстрували кінетичним методом при довжині хвилі 405 нм за допомогою біохімічного аналізатора BioChem SA (НТІ, США).

### **2.12.4. Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові**

Активність лужної фосфатази (ЕС 3.1.3.1) у сироватці крові досліджували на біохімічному аналізаторі STAT-FAX 1908 (США) відповідно до протоколу, що додається до стандартних наборів реагентів. Принцип визначення базується на гідролізі субстрату п-нітрофенілфосфату (п-НФП) до неорганічного фосфату та п-нітрофенолу. Інтенсивність гідролізу п-НФП прямо залежить від активності лужної фосфатази. Абсорбцію реакційної суміші вимірювали при довжині хвилі 405 нм та температурі 37 °С; тривалість інкубації становила 60 секунд, час вимірювання – 60 секунд. Активність ферменту виражали в умовних одиницях.

### **2.12.5. Визначення вмісту альбуміну у сироватці крові**

Концентрацію альбуміну визначали за допомогою колориметричного методу, що базується на його здатності специфічно зв'язуватися з барвником бромкрезоловим зеленим (БКЗ) з утворенням комплексу синьо-зеленого кольору. Інтенсивність забарвлення оцінювали при довжині хвилі

630 нм після інкубації при температурі 37 °С на аналізаторі STAT FAX 1908. 29.

#### **2.12.6. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові**

Концентрацію креатиніну досліджували за допомогою кінетичного методу Яффе. Принцип аналізу базується на взаємодії креатиніну з пікриною кислотою в лужному середовищі, що призводить до утворення забарвленого комплексу. Інтенсивність накопичення цього продукту, яка є прямо пропорційною вмісту креатиніну в досліджуваному зразку, реєстрували за допомогою біохімічного аналізатора STAT FAX 1908 (США) при довжині хвилі 510 нм.

#### **2.12.7. Визначення концентрації загального холестерину та тригліцеридів у сироватці крові**

Вміст холестерину та тригліцеридів у сироватці крові визначали за допомогою комерційних тест-систем на біохімічному аналізаторі STAT FAX 1908 (США) відповідно до протоколів виробника.

### **2.13 Статистичний аналіз даних**

Дані представлені у вигляді середнього значення по групах та стандартних помилок середнього ( $\bar{x} \pm SE$ ). Аналіз і візуалізація даних проводилися з використанням Excel 2013 (Microsoft Corporation, США). Відмінності між контрольною та експериментальною групами вважалися статистично значущими при  $P < 0,05$  (тест ANOVA).

Усі експерименти повторювали не менше 5 разів. Значення оптичних густин для різних довжин хвиль усереднювали та визначали стандартну похибку середнього. Достовірність відмінностей між контрольними та експериментальними варіантами визначали з використанням непараметричного критерію Манна-Вітні [75,76]. Достовірними вважали відмінності, при яких  $p \leq 0,05$ .

При визначенні відносної залежності зміщення максимумів флуоресценції від концентрації хлорогенової кислоти щодо контрольних значень використовували метод [75].

Моделювання міжмолекулярної взаємодії між бета-казеїном (*Bos taurus*, UniProt ID: P02666) та хлорогеновою кислотою (*Chlorogenic Acid*, PubChem CID: 1794427) проводили з використанням програмного забезпечення AutoDock Vina. Область пошуку (grid box) була задана таким чином, щоб охопити найбільш ймовірні ділянки зв'язування у структурі бета-казеїну.

Для детального аналізу отриманих результатів використовували пакети SAMSON та BIOVIA Discovery Studio Visualizer. Візуалізацію білка виконували у стилі вторинної структури зі спектральним забарвленням. Типи хімічних зв'язків та специфічні контакти ідентифікували за допомогою побудови 2D-діаграм взаємодій.

## **Висновки до розділу 2:**

У розділі охарактеризовано дизайн проведеного експериментального дослідження, що включав опис моделей та етапів, а також застосовані схеми. У роботі наведено детальний опис цитогенетичних, мікроскопічних, біохімічних та статистичних методів, використаних для оцінки впливу компонентів молозива на біологічні системи. Застосовано комплекс фізико-хімічних методів (синтез квантових точок, формування супрамолекулярних комплексів «казеїн молозива – поліфенольні сполуки»), біофізичні методи (УФ-спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, вимірювання електропровідності водних розчинів комплексів), біохімічні методи (визначення активності ферментів печінки, вмісту альбуміну, креатиніну, холестерину, глюкози, тригліцеридів), цитологічні методи (оцінка кількості імунокомпетентних клітин, еритроцитів і тромбоцитів), мікробіологічні методи (визначення

інтенсивності росту мікроорганізмів), біотехнологічні методи (отримання та характеристика автолізатів дріжджів і мікроводоростей) та фізіологічні методи (моделювання Си-індукованого фіброзу печінки й оцінка біологічної дії субстанцій на експериментальних тваринах). Використання такого комплексного підходу забезпечило всебічну характеристику впливу досліджуваних сполук на метаболічні, цитологічні та біохімічні параметри, що підвищило достовірність результатів та їх інтерпретацію у контексті гепатотропної активності хлорогенової кислоти.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1. Дослідження деяких особливостей токсичної дії іонів міді

Як було зазначено, фіброз печінки може бути індукований широким набором як ендогенних, так і екзогенних факторів. При моделюванні фіброзу печінки особливий інтерес становить роль ендогенних факторів, які можуть бути індукторами фіброзу, зокрема порушення балансу міді. Так, іони міді, будучи есенціальними елементами біологічних систем, забезпечують регуляцію активності понад 40 ферментів, беруть участь у синтезі колагену та регуляції редокс-системи організму. Однак, у разі виходу концентрації міді за нижні межі гомеостатичного рівня, в організмі формується ціла низка патологічних станів. Найбільш відомим і яскравим прикладом нестачі міді в організмі є хвороба Менкеса, яка пов'язана з порушенням всмоктування міді, що обумовлено мутацією гена *ATP7A* [77,78]. Нестача міді в організмі призводить до затримки розвитку і навіть ранньої смерті.

Не менш небезпечним є вихід кількісних характеристик міді за верхні межі гомеостатичного коридору. Так, у разі блокування механізму виведення міді з організму, яке здійснюється з жовчу, мідь накопичується в печінці та мозку і це проявляється у формі фіброзу печінки і навіть цирозу, а також тяжких неврологічних порушень. Такі стани визначаються як хвороба Вільсона-Коновалова, і вона пов'язана з мутацією гена *ATP7B* [79].

Отже, підтримання балансу міді в організмі є важливою гомеостатичною характеристикою та його порушення, незалежно від механізмів, призводить до глибокої перебудови метаболічних та фенотипічних характеристик організму. Надлишок міді в організмі можна легко моделювати збільшенням швидкості надходження іонів міді в організм, що супроводжується розвитком фіброзу печінки [80].

Баланс іонів міді в організмі може служити моделлю при дослідженні фундаментальних механізмів гомеостатичного регулювання метаболізму та формуванні фенотипічних варіантів таких перебудов.

На важливість підтримки балансу міді в організмі вказує те, що в клітині функціонує не один, а кілька метаболічних ланок, що беруть участь у контролі за балансом міді. Так, у разі дефіциту міді відбувається активація білка CTR1, який прискорює імпорт (введення) міді всередину клітини. Мідь, що надійшла всередину клітини, зв'язується з білками-шаперонами, такими як ATOX1, CCS, які доставляють мідь до мідь-залежних ферментів.

У разі надлишку, мідь депонується шляхом зв'язування зі специфічними білками-металотіонеїнами. При цьому виконуються як мінімум дві функції: мідь накопичується в клітині, при цьому запобігається її токсична дія. У тому випадку, якщо міді з якихось причин занадто багато і металотіонеїни не можуть забезпечити її утримання, то білки-насоси, такі як АТР7А і АТР7В прискорюють її виведення з організму через жовч [81-83]. Отже, в організмі функціонує складна система контролю за балансом міді.

Інтерес до дослідження балансової (гомеостатичної) моделі регуляції метаболізму пов'язаний з тим, що мідь бере участь у розвитку досить великої кількості таких важких патологій, як рак [84], нейродегенерація [85] та ангіогенна дисфункція [86] тощо.

В останні роки іони міді стали привабливою мішенню для лікарських препаратів, а також розглядаються як потенційний інструмент, у якості нових зондів для медичних втручань [87,88]. Значний інтерес становить використання міді як альтернативи антибіотикам, оскільки описані антимікробні ефекти комплексів міді на грамнегативні [89], грампозитивні бактерії [90] і навіть мікобактерії [91,92].

При практичному використанні міді необхідно враховувати те, що іони міді можуть знаходитися в різних станах:  $\text{Cu}^0$  (наночастки),  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$

і Су-ліганд (хелатна форма), більше того, іони міді утворюють комплекси з різними типами макромолекул, та їх біологічна активність, може залежати від балансу в організмі [93].

У зв'язку з цим у першому розділі цієї роботи було досліджено деякі аспекти загальнобіологічних механізмів дії надлишку іонів міді на клітинні та молекулярні механізми як індуктори фіброзу печінки.

### **3.1.1 Дослідження міжорганної та внутрішньоклітинної локалізації міді при зміщенні її балансу у бік збільшення концентрації**

Відомо, що у разі зміщення балансу міді у бік її збільшення, як при формуванні хвороби Вільсона-Коновалова, вони депонуються у печінці та мозку [94]. Однак не можна виключати того, що характер міжорганної локалізації міді може залежати від цілого ряду причин і насамперед від механізму, що визначає порушення іонного гомеостазу міді.

Виявили, що після трьох послідовних введень щурам сірчаноокислої міді у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 годин між введеннями і з наступним введенням великої сублетальної дози в 2,5 мг/100 г маси тіла, через 45 хв після останнього введення, найбільша кількість міді (від 110 до 120 мкг іонів міді на мг тканини) містилась у нирках (рис. 3.1). У печінці містилося від 7 до 10 мкг/г тканини, як і в селезінці та серці, при цьому в мозку її було в 3 рази менше, ніж у печінці (рис. 3.1).

Раніше було показано, що за такої схеми введення сірчаноокислої міді експериментальним тваринам у них формувалася резистентність до сублетальних доз сірчаноокислої міді і вони відносно легко переносили такі великі навантаження міддю. Така резистентність принаймні частково пояснюється накопиченням її в металотіонеїнах [95].

Ці результати вказують на те, що при зміщенні балансу міді в організмі шляхом внутрішньочеревного введення екзогенної, у даному випадку, у вигляді сірчаноокислої, міді, гомеостатична система регуляції

включає декілька механізмів утримання балансу: прискорює процес екскреції іонів міді з організму через нирки; виключає органо-специфічність локалізації надлишку міді, що супроводжується розподілом надлишку по кількох життєво важливим органам, знижуючи «навантаження» на печінку, що призводить до системних змін в організмі. Поряд з цим, на такому тлі великих доз міді, можуть відбуватися і зміни в локалізації іонів міді в різних компартментах клітин печінки.

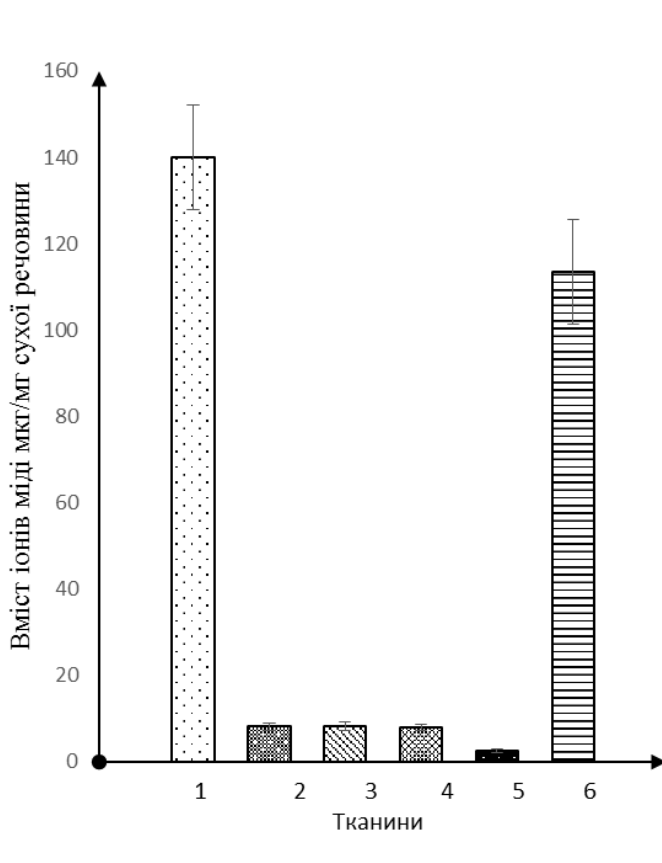


Рис. 3.1 Сумарна кількість іонів міді у досліджуваних тканинах (1), та її кількість у: печінці (2), селезінці (3), серці (4), мозку (5) та нирках (6) після послідовних триразових введеннях (1 мг на 100 г маси тіла)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  у дозі 1 мг на 100 г маси тіла, з інтервалом 48 годин між введеннями та наступним введенням дози : 2,5 мг на 100 г маси тіла за 45 хв до визначення. Представлені середні значення з трьох незалежних експериментів та їх стандартні помилки.

Так, за такої схеми надходження іонів міді в організм і при таких дозах, відбувалося найбільше надходження іонів міді в клітинні ядра та мітохондрії печінки (рис. 3.2).

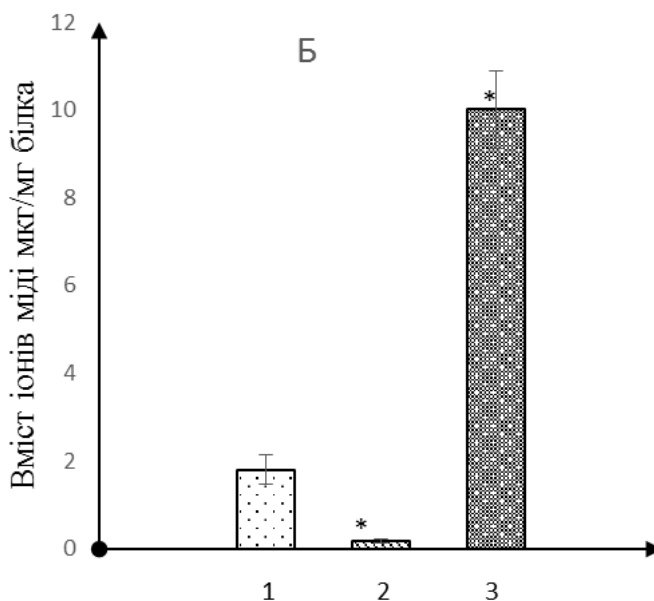


Рис. 3.2 Вміст іонів міді в мітохондріях (1), мікосомах (2) та клітинних ядрах (3) печінки, після попереднього триразового введення  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  у дозі в 1 мг/100 г маси тіла з наступним введенням дози 2,5 мг на 100 г маси тіла за 45 хв до визначення. Представлені середні значення з трьох незалежних експериментів та їх стандартні помилки.

Отже, у разі послідовних багаторазових надходжень іонів міді до організму у відносно високих концентраціях (1 мг/100 г маси), гомеостатична система змінює характер органного та внутрішньоклітинного розподілу міді і це забезпечує виживання навіть після введення таким тваринам сублетальних доз сірчаноокислої міді.

Однак наслідком такого виживання є формування нового гомеостатичного рівня, для якого характерно формування нових балансових характеристик між елементами біологічної системи. Оскільки печінка є центральним органом метаболізму і ключовою ланкою гомеостатичних перебудов адаптивного характеру, які забезпечують

виживання організму в умовах порушення балансу міді, розглянемо особливості змін, що виникають у печінці за таких умов.

По-перше змінювалася «архітектура» і морфологія печінки, що виявлялося у формуванні навколо долей печінки сполучної тканини і це призводило до об'єднання долей печінки в єдине морфологічне утворення (рис. 3.3). На відміну від контрольного варіанту (рис.), краї долей печінки «закруглялися», що свідчить про зміну форми (архітектури) печінки.

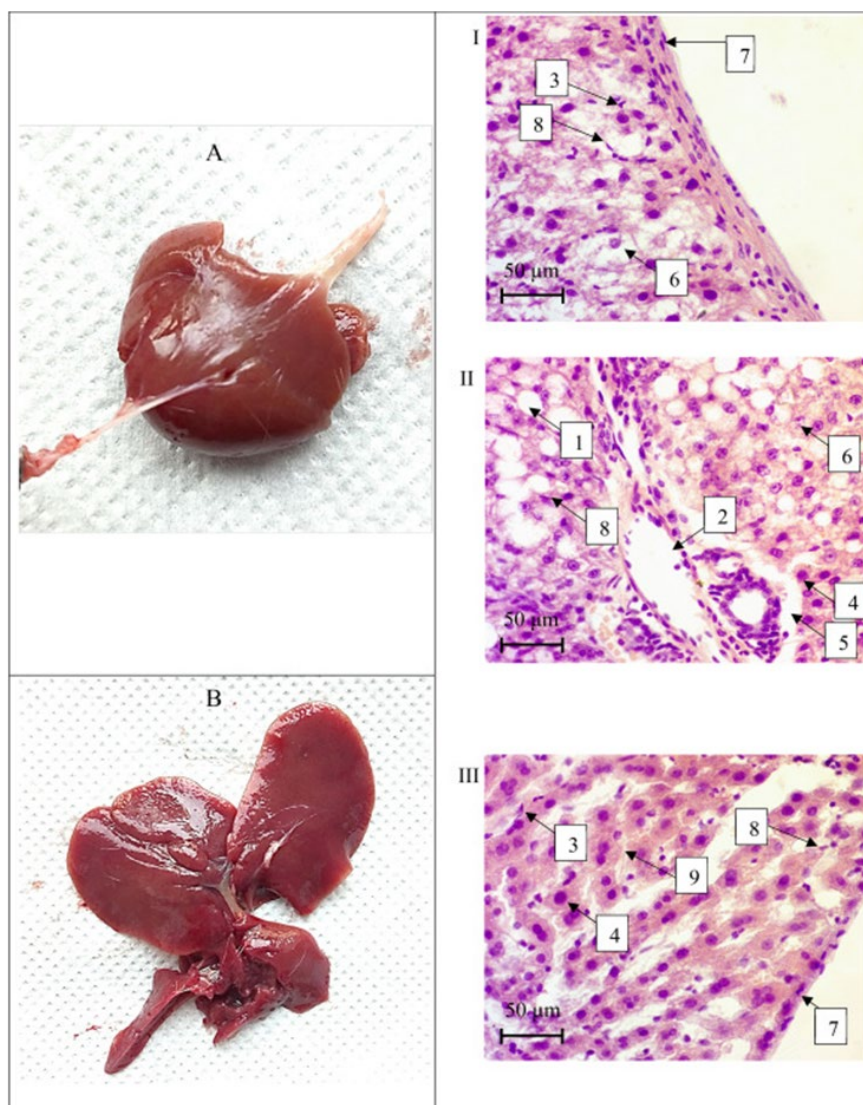


Рис 3.3 Після інтоксикації сульфатом міді у печінці тварин утворюється сполучна тканина, що охоплює орган, змінює форму його часток та спричиняє їх злиття зі сполучною тканиною (А). Для порівняння наведено вигляд печінки контрольної групи тварин (В). На гістологічних препаратах

печінки щура представлено модель фіброзу (I, II) та інтактну печінку (III): Позначення на рисунку: **1** – декомплексація печінкових пучків, **2** – кровоносна судина, **3** – клітини Іто, **4** – лімфоцити, **5** – множинні розриви тканини, **6** – аутоліз гепатоцитів, **7** – капсула печінки, **8** – ендотеліоцити, **9** – простір Діссе.Методика: забарвлення гематоксиліном та еозином; мікроскоп Carl Zeiss, **камера SIGETA M3CVOS 14000**, збільшення  $\times 400$ .

На морфологічному рівні спостерігали значне потовщення капсули Гліссона (рис. 3.3). Спостерігалася часткова руйнація гепатоцитів (нещодавно описане явище купроптозу), часткове розгалуження печінкових пучків (рис. 3.3). Така морфологічна реструктуризація тканини печінки на фоні багаторазових послідовних введень експериментальним тваринам сірчанокислої міді свідчить про початкові стадії розвитку фіброзу печінки.

Раніше в нашій лабораторії було показано, що накопичення іонів міді в мітохондріях супроводжувалося зміщенням балансу в системі прооксиданти-антиоксиданти у бік прооксидантів, що виявилось у збільшенні гідроперекисів ліпідів не тільки в мітохондріях, а й у фракції мікросом та сироватці крові, тобто. в організмі в цілому виявлявся окислювальний стрес [1,96].

Результати цих та цілого ряду інших досліджень, підтверджують участь іонів міді в реакціях Фентона і Хабера-Вайса, що супроводжується утворенням високотоксичного гідроксильного радикалу, який ушкоджує всі типи біомолекул і бере участь у циклічних окислювально-відновних реакціях [97,98].

Найбільш активні вільні радикали, які індуковані міддю, атакують поліненасичені жирні кислоти у складі клітинних мембран. Зокрема, порушення структури мембран мітохондрій та лізосом, які й запускають купроптоз клітини.

Явище купроптозу було відкрито 2022 року, як один із видів клітинної смерті, який індукується при надмірному накопиченні іонів міді у клітині і безпосередньо залежить від мітохондріального дихання [99].

На відміну від апоптозу або ферроптозу цей процес не пов'язаний з каспазами або перекисним окисленням ліпідів, а індукує протеотоксичний стрес через зв'язування міді з білками циклу Кребса [99-101].

Показано, що іони міді, проникаючи в мітохондрії, зв'язуються з ліпоїльованими ферментами мітохондріального матриксу, головною мішенню, серед яких є дигідроліпоамід-сукцинілтрансфераза, що входить до піруватдегідрогеназного комплексу [99,101].

Ліпоїлювання – це ковалентне приєднання ліпоєвої кислоти (ліпоат) до білків. При такій взаємодії міді з білками відбувається агрегація цих білків, що в кінцевому результаті призводить до дестабілізації і руйнування залізо-сірчаних кластерів в дихальному ланцюгу мітохондрій [99, 100].

Важливо зазначити, що клітини багатьох пухлин містять досить велику кількість ліпоїльованих білків. Наразі досліджуються можливості використання іонофорів міді, які при виборчому зв'язуванні з раковими клітинами можуть запускати у них купроптоз і знищувати клітини стійкі до стандартної хіміотерапії [102, 103].

Отже, зв'язування відносно великої кількості міді з мітохондріями клітин печінки, інактивація ряду ферментів, зміщення існуючого балансу в редокс-системі у бік прооксидантів може супроводжуватися вибірковою загибеллю частини клітин. Загибель клітин може здійснюватися як прояв некрозу, апоптозу, купрптозу, аутофагії та автолізу. Загальною ланкою в цих начебто різних механізмах загибелі клітин є так званий LMP-шлях (Lysosomal Membrane Permeabilization – проникність мембран лізосом). Лізосоми є головним матеріальним і сигнальним мостом, який поєднує ці концептуально різні форми клітинної загибелі.

У всіх випадках загибелі клітини критичною точкою є втрата цілісності лізосомальних мембран, а відмінності лише в тому, що при апоптозі та купроптозі реалізується вибіркоче підвищення проникності лізосомальних мембран, а при автолізі – тотальний розпад лізосом.

Важливо відзначити, що лізосоми багаті на залізо, а при збільшенні міді в організмі, вона здатна накопичуватися в лізосомах [104] і є одним з факторів ліпідного стресу, який ушкоджує мембрану лізосоми і є загальним сигналом для загибелі клітини.

Отже, окислювальний стрес є не специфічною відповіддю клітини на порушення гомеостазу, який запускає специфічне (програмоване) «виключення» (загибель) зміненої клітини з популяції, що є однією з фундаментальних стратегій адаптації, яка спрямована на збереження популяції клітин, органу (функціональної активності органу у випадку фіброзу) чи організму як системи .

Ці фундаментальні особливості адаптивних реакцій можуть бути використані не тільки у вирішенні медичних проблем, але й у розвитку біотехнології, зокрема при отриманні білків, вітамінів та нуклеїнових кислот із біомаси *Saccharomyces cerevisiae*. Як практичне використання цих особливостей клітинної загибелі було розроблено новий підхід використання поєднання попередньої адаптації *Saccharomyces cerevisiae* з подальшою індукцією руйнування клітин.

### **3.1.2. Дослідження ролі міді та передаптація *Saccharomyces Cerevisiae* до подальшого автолізу клітин**

При виконанні цієї частини роботи виходили з того, що зміна умов культивування індукує в клітині комплекс послідовних реакцій, спрямованих на збереження гомеостатичних характеристик. Якщо вплив факторів середовища є настільки значним, що не може бути компенсований зміною гомеостатичних характеристик, то в клітині формуються нові

гомеостатичні взаємовідносини, які забезпечують збереження цілісності біологічної системи в нових умовах. Це проявляється в індукції синтезу нових функціональних компонентів, прикладом яких є синтез групи стрес-білків, зміна фізико-хімічних характеристик (величини рН, осмотичності та ін.), а також іонного складу, у тому числі й іонів міді, заліза та інших есенціальних елементів. У тому випадку, якщо ці досить глибокі перебудови метаболізму, так само не можуть забезпечити збереження функціональних особливостей клітин, тоді «включається» наступний цикл адаптивних змін, який спрямований на видалення таких змінених клітин з популяції. Адаптивність цього етапу виявляється в тому, що компоненти зруйнованої клітини використовуються на ресинтез і зрештою сприяють збереженню популяції або функціональних характеристик органу, як у разі фіброзу печінки.

Виходячи зі стадійності розвитку процесу адаптації, як і у разі стадійності розвитку фіброзу печінки, висловили припущення, що якщо забезпечити проходження популяцією дріжджів усіх етапів послідовної адаптації, то можна забезпечити повніше та ефективніше руйнування клітин порівняно з реалізацією лише процесу автолізу, як прийнято це в даний час. Крім того, важливо зрозуміти роль балансу міді у процесах автолізу.

З метою експериментальної перевірки цього використовували багатостадійну обробку дріжджів та визначали ефективність руйнування клітин (рис. 3.4). Була приготовлена 33% суспензія дріжджових клітин *S. cerevisiae* у дистильованій воді (з розрахунку на сухий залишок). З отриманої суспензії були виготовлені різні варіанти зразків для подальшої обробки (рис. 3.4).

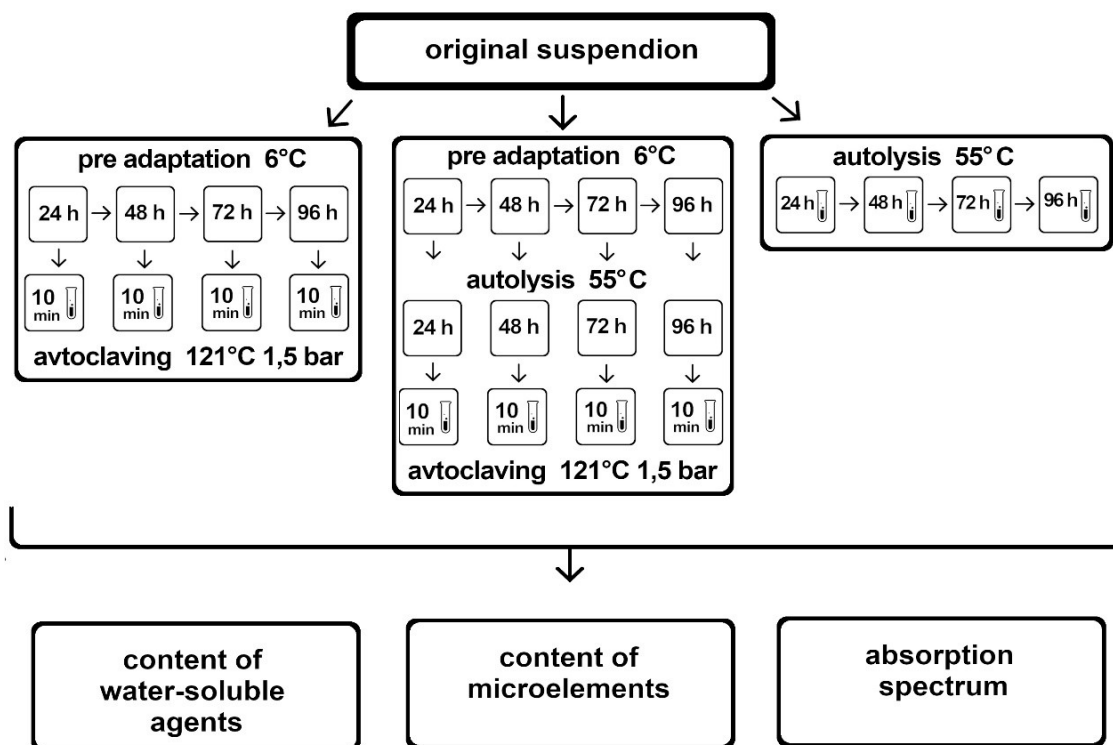


Рис. 3.4 Схема експериментальних варіантів обробки дріжджів для оцінки ступеня руйнування клітин по виходу водорозчинних компонентів, на якій показані різні режими обробки дріжджової суспензії та показники, які визначали кожні 24 години протягом 4 днів; для цього із зразків відбирали 10 мл суспензії.

Виявили, що після інкубації дріжджової суспензії при 6°C протягом 24 годин (етап передаптації) у водному середовищі була присутня невелика кількість амінокислот і пептидів (слабке поглинання в області 200-205 нм), яка лінійно зменшувалася до 240 нм, і невелика кількість нуклеїнових кислот (поглинання в області 260 нм) (рис. 3.5, контроль). Якщо етап передаптації тривав 96 годин, то кількість зруйнованих клітин збільшувалася, про що свідчить збільшення інтенсивності поглинання в УФ-області (рис. 3.5, контроль).

Ці результати вказують на те, що після 96 годин попередньої адаптації, у дріжджових клітинах відбулися структурні та функціональні

перебудови, які можуть призвести до збільшення виходу водорозчинних компонентів клітин після автолізу та автоклавування.

Проведення автолізу дріжджів протягом 24 годин при температурі 55°C після попередньої адаптації при 6°C протягом 24 годин супроводжувалося активним автолізом, про що свідчить значне збільшення у водному середовищі амінокислот, білків і нуклеїнових кислот (рис. 3.5, аутоліз). Збільшення часу проведення автолізу не впливало на зміну кількості водорозчинних компонентів дріжджів, що утворюються (рис. 3.5). Однак найбільший інтерес представляє кількісний та якісний склад водорозчинних компонентів дріжджів після 96 годин попередньої інкубації та 96 годин автолізу з подальшим автоклавуванням при 121°C (1,5 атм.) протягом 10 хв. (рис. 3.5).

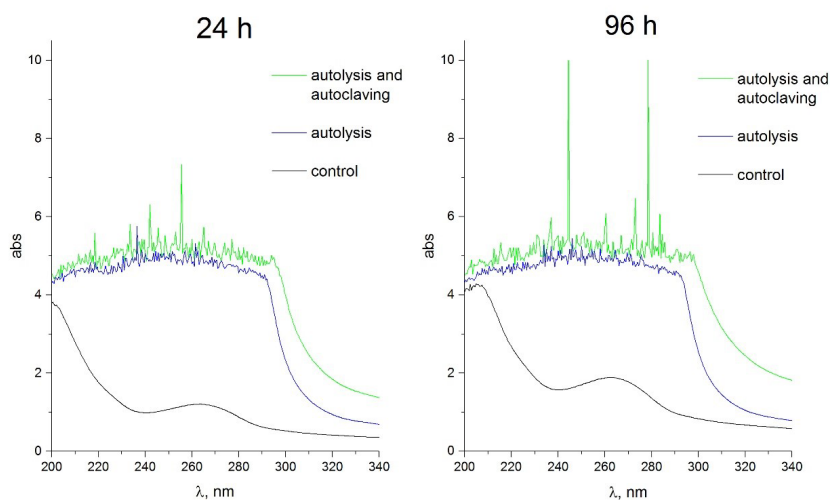


Рис 3.5. Типові спектри поглинання водорозчинних компонентів дріжджів для зразків, отриманих після попередньої адаптації дріжджової суспензії при 6°C протягом 24 і 96 годин (контроль), а також після автолізу, який проводився при 55 °C протягом 24 і 96 годин, і після адаптації, автолізу з подальшим автоклавуванням при 121°C (1,5 атм.) протягом 10 хвилин.

Слід зазначити, що компоненти, одержані в таких умовах, відрізнялися від компонентів традиційного автолізу і по органолептичним властивостям. Тому послідовна процедура обробки суспензії дріжджових

клітин, що складається з трьох етапів: попередньої адаптації, автолізу та автоклавування, дозволяє перевести до 70% компонентів дріжджових клітин, що містять вільні амінокислоти, пептиди, білки і нуклеїнові кислоти, у водну фазу, підтверджує висловлене припущення щодо ефективності поетапного розбирання клітини на складові компоненти.

Великий інтерес представляє дослідження ролі міді та інших іонів у процесах деградації клітин на тлі формування стрес-умов. Визначення складу мікроелементів у дріжджовій біомасі та отриманих автолізатах показало несподіваний та важливий результат. З'ясувалося, що високотоксичні важкі метали, такі як кадмій та свинець, відсутні як у вихідній біомасі дріжджів, так і в отриманих водорозчинних компонентах (табл. 3.1).

У варіанті зразків, які були отримані після передаптації та наступного автолізу, кількість іонів міді було збільшено в порівнянні з вихідною біомасою клітин (табл. 3.1). При цьому, в автолізаті, отриманому запропонованим багатоетапним руйнуванням клітин, було збільшено і кількість цинку і марганцю (табл. 3.1).

Така специфічна зміна мікроелементного складу продуктів руйнування клітин може пояснюватися тим, що в процесі передаптації дріжджів має місце зміна не тільки складу білків і нуклеїнових кислот (рис. 3.5), але і мінерального обміну. З цих даних випливають два важливих узагальнення: 1 у процесі індукованого руйнування клітин як у разі клітин печінки, так і клітин дріжджів важливу роль відіграє баланс міді та інших мінеральних компонентів; 2 – використовуючи концепцію стадійності формування адаптивних реакцій у відповідь, можна отримувати компоненти клітин, зокрема дріжджів, з різним складом цільових біотехнологічних продуктів.

Таблиця 3.1

Вміст деяких іонів металів (г/л) у вихідній дріжджовій суспензії ( $X \pm SE$ ) у водорозчинних компонентах дріжджів, отриманих після 96 годин переадаптації з наступним 96 годинами автолізу ( $55\text{ }^\circ\text{C}$ ) і подальшого автоклавування при  $121\text{ }^\circ\text{C}$  (1,5 атм.) протягом 10 хвилин.

Групи		Cu	Zn	Fe	Mn	Ni	Cd	Pb
Контроль	X	0,0097	0,6267	0,4267	0,0500	0,0335	н/д	н/д
	$\pm$	0,0012	0,0491	0,1994	0,0064	0,0061		
Автоліз	X	0,0273*	1,7000*	0,5300	0,1503*	0,0307	н/д	н/д
	$\pm$	0,0034	0,0100	0,1762	0,0047	0,0044		
Автоліз та автоклавування	X	0,0183*	1,7100*	0,4800	0,1423*	0,0400	н/д	н/д
	$\pm$	0,0027	0,0173	0,0115	0,0017	0,0038		

Представлені середні значення трьох незалежних експериментів та стандартні похибки;

\* – позначені варіанти, для яких  $P < 0,05$  в порівнянні з вихідною біомасою; n/d – варіанти іонів, не виявлені у зразках, тобто. їх концентрація менше  $10^{-4}$  г/л.

Зупиняючись на короткому обговоренні отриманих результатів, зазначимо, що перенесення клітин *Saccharomyces cerevisiae* зі стандартної для них температури  $20\text{-}22\text{ }^\circ\text{C}$  в температурний режим в  $6\text{ }^\circ\text{C}$ , індукує у них стресову реакцію, яка проявляється в порушенні неспецифічних міжмолекулярних взаємодій, макроструктурних змін білків та зміні співвідношення компонентів клітини та в частині іонного складу.

Після попередньої адаптації клітин до стресових умов автолізу індукували шляхом підвищення температури до  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , що забезпечувало більш повне вивільнення водорозчинних компонентів із дріжджових клітин як в результаті порушення міжмолекулярних взаємодій, порушення

мембран лізосом, а також – підвищення доступності гідролітичних ферментів до субстратів (рис. 3.6).

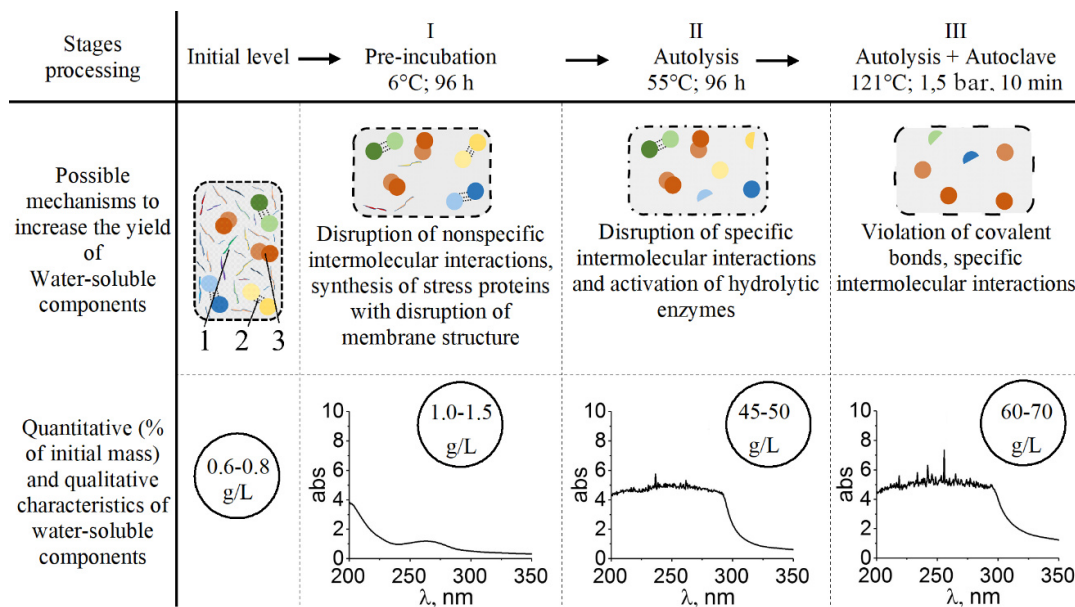


Рис 3.6 Схема, що демонструє можливі механізми руйнування міжмолекулярних (1 – неспецифічних, 2 – специфічних) та ковалентних зв'язків (3) у дріжджових клітинах при різних методах обробки дріжджів, а також кількісний вихід водорозчинних компонентів та їх якісні (спектральні) характеристики [105].

У випадку, якщо суспензія клітин після автолізу піддавалася додатковому впливу високої температури та надлишковому тиску, вихід водорозчинних компонентів значно збільшувався та змінювався склад отриманих компонентів (рис. 3.6).

Цей ефект можна пояснити тим, що за таких умов забезпечується дія комплексу факторів. Насамперед, руйнація специфічних міжмолекулярних взаємодій та втрата специфічних структур макромолекул, порушення деяких ковалентних взаємодій та системна зміна фізико-хімічних характеристик у клітині. Найбільш відомим з яких є утворення вільних радикалів (ОН та Н), які сприятимуть частковому окисленню білків та

нуклеїнових кислот [105], зміна мікроелементного складу. Можна припустити, що зрештою ці процеси призведуть до додаткових якісних та кількісних змін водорозчинних компонентів дріжджових клітин (рис. 3.6).

Отже, іони міді, залежно від концентрації, а точніше – від балансу між вільними іонами та хелатованими формами можуть виявляти різноманітні функції. Розширення знань про механізми їх впливу на різні об'єкти має велике теоретичне та практичне значення. У зв'язку з цим на наступному етапі роботи були досліджені механізми дії міді, яка знаходилася в різних станах (у вигляді наночастинок, іонної та хелатної форм) на бактеріальних культурах (*Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18), так як, в клітині мідь може змінювати свою валентність і стан і зазвичай знаходиться в хелатованій формі.

### **3.1.3. Дослідження ролі балансу між іонною та хелатною формами міді на клітинну загибель у системі *in vitro***

На цьому етапі роботи, перевіряли гіпотезу згідно з якою біологічна дія міді залежить від формування балансу між іонною та хелатною формами. Для отримання міді в хелатній формі, використовували два штами культури мікрободорів *Dunaliella viridis*: природний штам, у складі якого була присутня мідь тільки в хелатній формі і в дуже малих кількостях і спеціально отриманий штам цих мікрободоростей, резистентний до міді (Dv-Cu.R), який містив у сотні разів більше міді переважно у хелатній формі.

З метою усунення рівноваги у бік іонних форм міді до гомогенатів цих двох штамів мікрободоростей додавали додатково високі дози сірчанокислої міді, що призводило до зміщення балансу у бік іонних форм міді, яке мало місце для штаму Dv-Cu.R. Вплив балансу міді на клітинну загибель тестували за оцінкою інтенсивності росту *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 у системі *in vitro*.

Було виявлено, що наночастинки міді у стані  $\text{Cu}^0$ , нанесені на тканину, виявляли виражену антибактеріальну активність проти *Staphylococcus* (85 % порівняно з антибіотиком меропенемом) та менш виражену активність проти *Pseudomonas* (рис. 3.7).

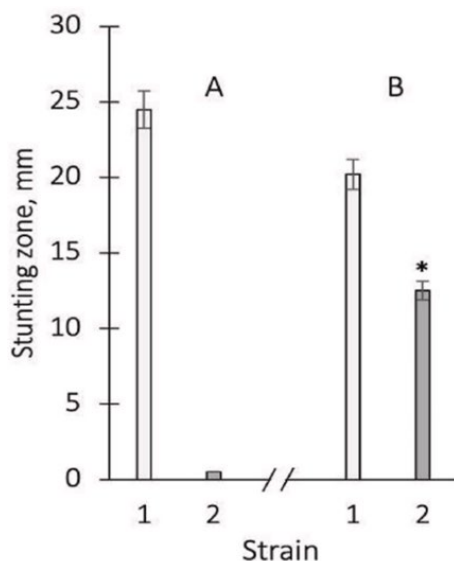


Рис. 3.7 Зони уповільненого росту *S. aureus* 124 (1) та *P. aeruginosa* 18 (2) при використанні дискового дифузійного тесту з антибіотиком меропенемом (А), а також тканини з нанесеним шаром наночастинок міді товщиною 3 мкм (В). Представлені середні значення з 3–5 експериментів та їх стандартні похибки.

\* – позначено різницю між антибіотиком і тканиною, яка є статистично значущою при  $P < 0,05$ .

Мідь в іонній формі пригнічувала ріст *Staphylococcus aureus* 124 так само ефективно, як і антибіотик, а *Pseudomonas aeruginosa* 18 виявляли дещо більшу стійкість до іонів міді при відносно невеликих дозах і ця видова специфічність не виявлялася при великих дозах (рис. 3.8)

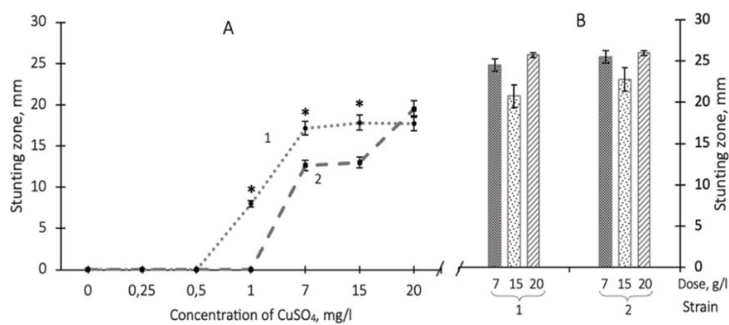


Рис. 3.8. Зони уповільненого росту *S. aureus* 124 (1) і *P. aeruginosa* 18 (2) при нанесенні сульфату міді на паперові диски в різних дозах після культивування протягом 24 годин при температурі 37°C (А) і при нанесенні сульфату міді на лунки агару в дозах 7,15 та 20 г/л – для *S. aureus* 124 (1) та *P. aeruginosa* 18 (2) (В). Наведено середні значення та їх стандартні помилки за результатами трьох незалежних експериментів.

\* – різниця між варіантами *S. aureus* 124 та *P. aeruginosa* 18 є статистично значущою при  $P < 0,05$ .

Отже, іони міді здатні інгібувати ріст *S. aureus* 124 і *P. aeruginosa* 18. Ефективність інгібування зростає зі збільшенням концентрації міді до досягнення рівня насичення. *P. aeruginosa* 18 виявляла меншу чутливість у порівнянні з *S. aureus* 124 при відносно низьких концентраціях, а при досягненні високих концентрацій міді (7-20 г/л) ефективність інгібування росту іонами міді була однаковою для обох штамів бактерій.

При визначенні біологічної дії міді у хелатній формі використовували два штами мікробдоростей, які відрізнялися між собою за вмістом міді. Природний штам мікробдоростей *D. viridis* (Dv-Cu.S), який містив лише сліди міді у хелатній формі та спеціальний штам адаптований до іонів міді (Dv-Cu.R), який містив велику кількість міді в хелатній формі (рис. 3.9).

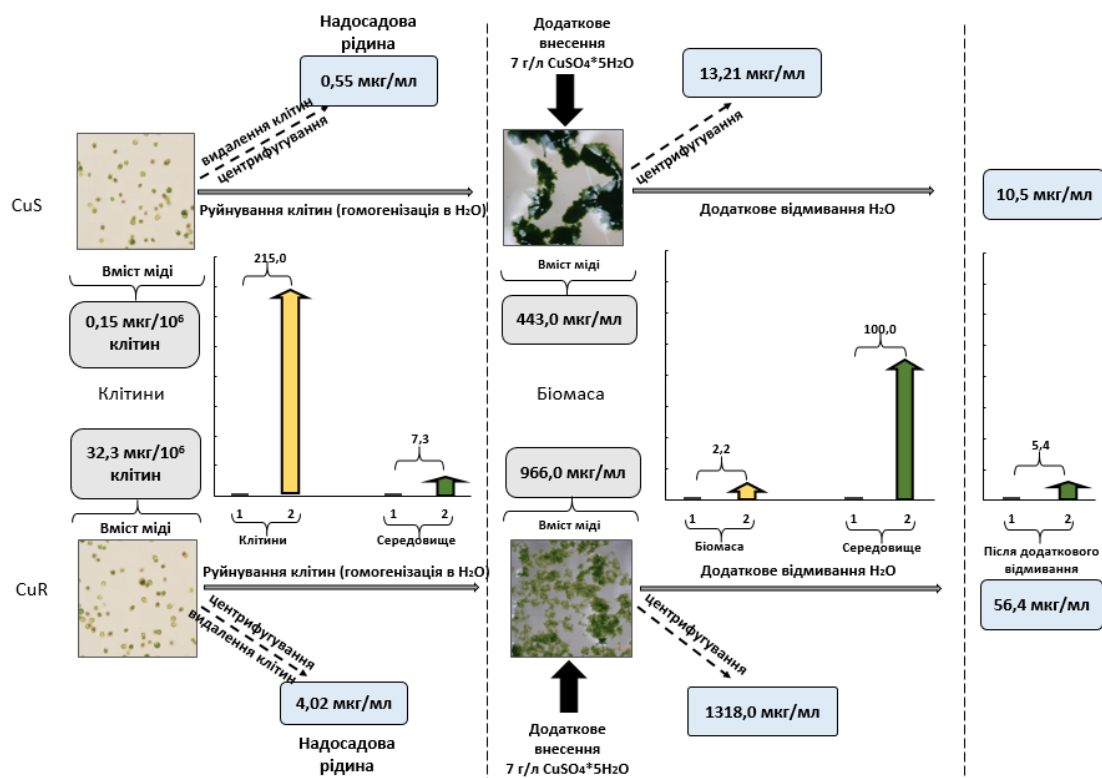


Рис. 3.9. Етапи визначення вмісту іонів міді у досліджуваних зразках. На першому етапі аналізували кількість іонів міді у нативних клітинах штамів Dv-Cu.S та Dv-Cu.R (кількість клітин у суспензії була однаковою —  $3,9 \times 10^9$ , об'єм суспензій також вирівняний), а також у їхньому культуральному середовищі. На другому етапі клітини руйнували, до біомаси додавали 7 г/л сульфату міді (однакова доза для обох штамів), після чого визначали кількість міді, що зв'язалася з біомасою, та кількість незв'язаної міді у середовищі. На третьому етапі оцінювали частку міді, яка легко видаляється з біомаси («слабко зв'язана»), використовуючи метод водної екстракції. Квадрати на схемі відображають середні значення за результатами трьох вимірювань, а гістограми показують порівняльні відмінності у кількості іонів міді між штамми Dv-Cu.S та Dv-Cu.R.

Були отримані клітинні гомогенати двох штамів *D. viridis*, один із яких характеризувався низьким, тобто фізіологічним, рівнем вмісту іонів міді, природного штамів мікроводоростей *D. viridis* (Dv-Cu.S) та штамів з

високим вмістом іонів міді в хелатній формі (Dv-Cu.R). Визначення здатності таких гомогенатів з різним вмістом міді в хелатній формі пригнічувати ріст бактеріальних культур показало, що вони викликали слабо виражену антибактеріальну активність і це не залежало від концентрації міді в хелатній формі, принаймні в діапазоні концентрацій, які використовувалися в даній роботі (рис. 3.9, табл. 3.2).

**Таблиця 3.2**

Зони уповільненого росту (мм) для *S. aureus* 124 і *P. aeruginosa* 18 після нанесення клітинного гомогенату двох штамів мікрободоростей: чутливого (Dv-Cu.S) і стійкого (Dv-Cu.R) до іонів міді, на паперові диски та лунки

Метод випробування	Зразок для тестування	Штам бактерій	
		<i>S. aureus</i> 124	<i>P. aeruginosa</i> 18
Дисковий дифузійний тест	Dv-CuS	11,7 ± 0,42	11,5 ± 0,50
	Dv-CuR	12,2 ± 0,60	12,0 ± 0,63
Метод дифузії в агарі	Dv-CuS	14,0 ± 0,41	14,5 ± 1,19
	Dv-CuR	13,0 ± 0,41	14,8 ± 0,75

Представлені середні значення трьох експериментів та їх стандартні помилки.

Клітинна біомаса *D. viridis* двох штамів, що містять іони міді у хелатній формі в різних кількостях, проявляла слабку антибактеріальну активність, яка однаково виявлялася проти *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18.

З метою з'ясування залежності антибактеріальної дії від співвідношення між хелатними та іонними формами міді у наступній серії дослідів до біомаси мікрободоростей Dv-Cu.S і Dv-Cu.R додавали сульфат

міді у підвищених концентраціях — 7, 15 і 20 г/л на однакову кількість клітин ( $3,9 \times 10^9$ ). У результаті були отримані біомаси, де мідний баланс у штамі Dv-Cu.R зміщувався у бік іонних форм міді (рис. 3.9).

Було встановлено, що додаткове додавання сульфату міді до кінцевих концентрацій 7, 15 і 20 г/л до гомогенатів клітин мікрободоростей супроводжувалося збільшенням антибактеріальної активності біомаси Dv-Cu.S і Dv-Cu.R проти *S. aureus* 124 порівняно з біомасою цих клітин без додавання міді (рис. 3.10 А). При тестуванні цих зразків проти *P. aeruginosa* 18 ефект збільшення антибактеріальної активності після додаткового додавання сульфату міді проявився тільки для зразків Dv-Cu.R і після додавання сульфату міді у великих концентраціях - 15 та 20 г/л (рис. 3.10 В).

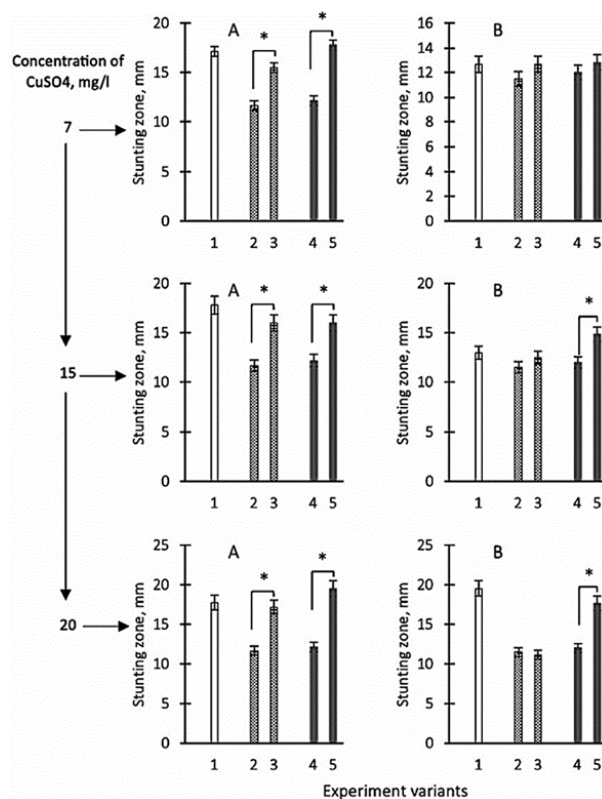


Рис. 3.10 Зони пригнічення росту *Staphylococcus aureus* 124 (А) та *Pseudomonas aeruginosa* 18 (В) визначали методом диско-дифузії після нанесення на паперові диски розчину сульфату міді (іонна форма) у концентраціях 7, 15 та 20 г/л (значення наведені на додатковій шкалі). На

осі ординат відображені варіанти: 1, 2 – зони уповільнення росту після нанесення гомогенатів клітин Dv-Cu.S з низьким вмістом міді у хелатній формі; 3 – зони уповільнення росту після нанесення гомогенатів Dv-Cu.S із попереднім додаванням сульфату міді у концентраціях 7, 15 та 20 г/л; 4 – зони уповільнення росту після нанесення гомогенатів клітин Dv-Cu.R, які спочатку містили відносно високий рівень міді у хелатній формі; 5 – зони уповільнення росту після нанесення гомогенатів Dv-Cu.R із додатковим введенням сульфату міді у тих самих концентраціях (7, 15 та 20 г/л). Наведені дані відображають середні значення трьох незалежних експериментів та стандартні похибки.

\* – позначено різницю між варіантами 2 – 3 і 4 – 5 є статистично значущими при  $P < 0,05$ .

Отримані результати дозволяють зробити такий висновок: біологічна дія міді залежить від її станів (наночастки, іони міді та хелатні форми міді); додаткове внесення сульфату міді до біомаси клітин Dv-Cu.S та Dv-Cu.R призводило до зміщення балансу у бік збільшення іонних форм міді та інгібуючої дії на зростання досліджуваних штамів бактерій з 20 до 110 %. Ці результати підтверджують наявні дані про те, що біологічна дія міді залежить від її стану, що необхідно враховувати при її використанні не тільки при моделюванні фіброзу або інших патологій, але і при використанні її як антибактеріальний засіб або біотехнологічні процеси.

Можна стверджувати, що у процесі еволюції сформувалися досить складні циклічні механізми регуляції балансу міді у організмі (рис. 3.11).

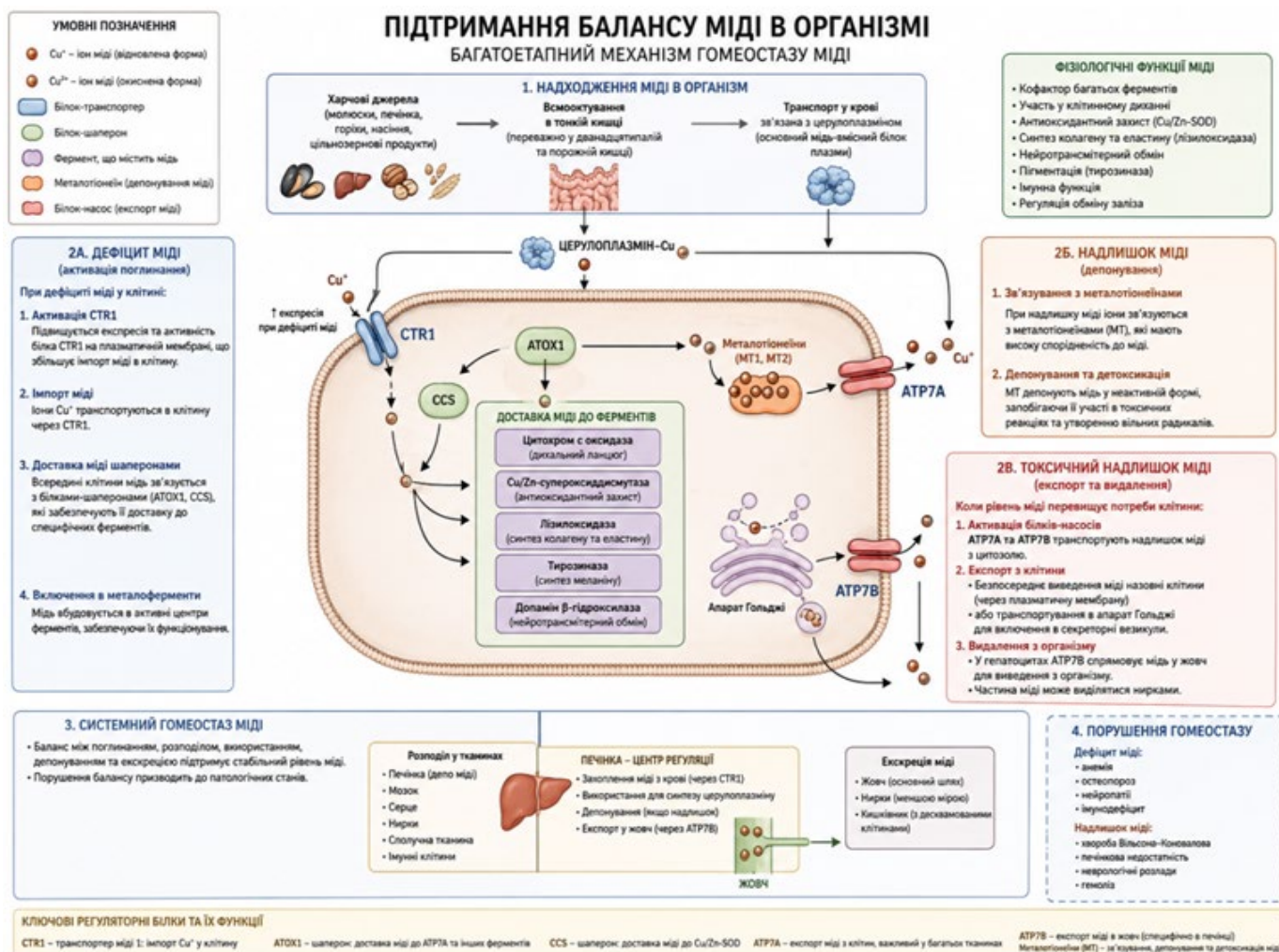


Рис. 3.11 Схема, яка демонструє фізіологічні функції, можливі механізми регуляції міді в організмі (Рисунок виконано у програмі OpenAI (2026), *GPT-5.5* [Large language model with image generation capabilities]. Available at: <https://chatgpt.com> ).

### Висновок до розділу 3.1:

Було встановлено, що багаторазове послідовне введення експериментальним тваринам (не менше 3 з інтервалом між введеннями 48 годин) сірчаноокислої міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла супроводжувалося порушенням балансу між процесами накопичення та виведенням міді з організму. Порушення балансу міді запускало багатоетапний процес формування  $\text{Cu}$ -індукованого фіброзу печінки у ссавців, що може бути

пов'язане з реалізацією не тільки механізму регуляції редокс-системи на фоні дії міді, а й купроптозу, що підтверджується накопиченням міді в мітохондріях. Автоліз клітин дріжджів, так само супроводжувався зміщенням балансу міді у бік її накопичення, а збільшення кількості міді в культуральному середовищі бактерій призводило до вираженого антибактеріального ефекту. Експериментально доведено, що біологічна дія міді залежить не тільки від балансу міді, але й її характеристик: наночастки; іонна форма та хелатна форма міді. Ці дані розширюють можливість коректного практичного використання солей міді.

### **3.2. Дія поліфенольних сполук шроту соняшнику, збагачених хлорогеновою кислотою, на кількість імунокомпетентних клітин у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки**

Очікувана тривалість життя як показник здоров'я населення є найважливішим критерієм економічного та культурного розвитку країни [106-110]. Пошук альтернативних методів лікування та збереження здоров'я та довголіття є невідкладними завданнями біомедичних та фармацевтичних наук [111-118].

Багато експертів вважають, що біоактивні природні сполуки можуть стати такою альтернативою [119-124]; і збільшення тривалості життя, що спостерігається, в економічно розвинених країнах пов'язане з широким використанням цих природних сполук як біоактивних харчових добавок [106, 125].

Деякі експерти вважають, що збільшення тривалості життя, що спостерігається, в економічно розвинених країнах пов'язане з широким використанням біоактивних харчових добавок [106, 125].

Поліфенольні сполуки, зокрема флавоноїди, становлять значний інтерес як біологічно активні речовини. Вони синтезуються у рослинах, де виконують захисну функцію від оксидативного стресу та запобігають

вірусним і бактеріальним інфекціям. Потрапляючи з їжею в організм, більшість флавоноїдів метаболізуються в ентероцитах, проходять процеси метилювання та сульфатування, потрапляють у кровотік, досягають печінки, де зазнають додаткових модифікацій, і знову повертаються у системний кровообіг [126]. Завдяки великій природній різноманітності та подальшим перетворенням у тілі, поліфеноли характеризуються надзвичайно широким спектром біологічної активності [127–130].

За даними ряду дослідників [122, 131, 132], хлорогенова кислота (складний ефір кавової кислоти — 3,4-діоксикоричної — та одного зі стереоізомерів хінної кислоти) становить значний інтерес як біологічно активна сполука. Одним із найбагатших рослинних джерел ХК є насіння соняшнику, де загальний вміст поліфенольних сполук сягає 2–4% від маси, а частка хлорогенової кислоти становить 43–73% усіх поліфенолів [133].

Незважаючи на перспективи та актуальність розробки біологічно активних сполук на основі ХК, біологічно активних добавок на її основі досі мало. Це пов'язано з тим, що при отриманні ХК дослідники стикаються з тим, що вона утворює комплекси з білками та вуглеводами, є нестабільною, а її екстракція та очищення з рослинних об'єктів досить трудомісткі та дорогі [133].

У зв'язку з цим, завданням даної роботи було розробити швидкий, простий та ефективний метод отримання ХК із соняшникового шроту, багатого на ХК, та оцінити її біологічну активність. Активність оцінювали на експериментальній моделі фіброзу печінки, викликаного міддю, оскільки відомо, що серед хімічних речовин, які є глобальними та широко поширеними забруднювачами довкілля – важкі метали [134-136].

Виходячи з цього, ми перевірили гіпотезу про те, що хлорогенова кислота, завдяки багатофункціональним властивостям, може сприяти відновленню кровотворної системи після інтоксикації організму іонами міді, враховуючи, що її ефективність може залежати від способу введення

[137]. Дія ХК може бути обумовлена її антиоксидантними властивостями і тому було цікаво порівняти її вплив на кровотворну систему з впливом відомого антиоксиданту, такого як ретинол [138]. Використання ХК як нутрицевтика може вирішити цю проблему.

Оцінюючи біологічну активність ХК, ми визначили її пероральний та внутрішньочеревний вплив на кількість імунокомпетентних клітин крові (лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів), кількість та деякі характеристики тромбоцитів та еритроцитів як індикатори реакції кісткового мозку у тварин (щурі *Wistar*) після індукції Cu-індукованого фіброзу печінки.

### 3.2.1. Дослідження впливу хлорогенової кислоти на кількісні показники та морфологічні характеристики еритроцитів у крові тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки

Вплив хлорогенової кислоти та ретинолу (у якості порівняння) на кількість та характеристики еритроцитів у тварин, які зазнали отруєння сульфатом міді.

У групі інтактних щурів кількість еритроцитів становила  $8,5\text{--}9,0 \times 10^{12}/\text{л}$ . Середній об'єм еритроцитів дорівнював 52,6 фл, гематокрит — 47,7%, показник анізоцитозу (ширина розподілу) — 11,9%, а середній вміст гемоглобіну в еритроцитах складав 315,3 г/л. Усі отримані значення відповідають прийнятим референтним показникам для щурів (табл. 3.3).

**Таблиця 3.3**

Склад та основні характеристики еритроцитів у різних експериментальних групах тварин ( $X \pm SE$ ,  $n = 5$ )

Групи	Кількість еритроцитів, $10^{12}/\text{л}$	Об'єм еритроцитів, фл	Гематокрит, %	Анізоцитоз, %	Концентрація гемоглобіну в еритроцитах, г/л
Контроль	$8,50 \pm 0,30$	$52,60 \pm 0,31$	$47,70 \pm 1,40$	$11,90 \pm 0,68$	$315,30 \pm 8,35$

Інтоксикація	8,00 ± 0,34	56,30 ± 3,26	44,90 ± 0,35	14,80 ± 1,04*	313,70 ± 4,06
Інтоксикація та ретинол перорально	6,70 ± 0,49*	61,40 ± 1,60*	41,00 ± 2,32	18,00 ± 1,13*	300,30 ± 3,84
Інтоксикація та ХГК перорально	7,10 ± 0,38	58,70 ± 3,55	41,10 ± 1,12	16,50 ± 1,37*	306,70 ± 6,06
Інтоксикація та ХГК внутрішньочеревно	6,80 ± 0,17*	59,90 ± 1,71*	40,90 ± 1,65*	17,40 ± 1,01*	305,70 ± 2,33

\* –  $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем (ANOVA).

Інтоксикація організму іонами міді не спричинила суттєвих змін у кількості еритроцитів та їхніх характеристиках порівняно з контрольною групою, за винятком показника анізоцитозу, який зріс на 24% (табл. 3.3).

Триденне введення ретинолу у дозі 300 МО/100 г маси тіла після інтоксикації супроводжувалося збільшенням середнього об'єму еритроцитів на 16% порівняно з контрольною групою, зниженням їх загальної кількості на 22%, а також підвищенням рівня анізоцитозу на 50% (табл. 3.3). Таким чином, підвищення рівня ретинолу у тварин після інтоксикації не усунуло зміни в еритроні, а навпаки — посилило їх, що можна розглядати як прояв анемії

У тварин, яким після інтоксикації сульфатом міді перорально вводили хлорогенову кислоту, спостерігалось помірне зниження кількості еритроцитів (на 17%), при цьому рівень гематокриту залишався на рівні контролю, а показник анізоцитозу зріс на 38%. Вміст гемоглобіну не відрізнявся від контрольних значень (табл. 3.3). Таким чином, у групі тварин, які отримували ХК перорально, зміни в еритроцитарній системі були менш виражені порівняно з тими, що отримували ретинол.

При внутрішньочеревному введенні хлорогенової кислоти тваринам із фіброзом печінки, індукованим іонами міді, відзначалося зниження кількості еритроцитів на 20%, підвищення рівня анізоцитозу на 46%, а

гематокрит був на 15% нижчим порівняно з контрольною групою (табл. 3.3).

Таким чином, різні способи введення ХК в організм мали різний вплив на параметри еритроцитів у тварин з фіброзом печінки, викликаним міддю. Після внутрішньочеревного введення ХК зміни параметрів еритроцитів були більш вираженими та системними порівняно з пероральним введенням ХК, і ці зміни були аналогічні тим, що викликав ретинол.

### 3.2.2. Вплив хлорогенової кислоти та ретинолу на кількісні показники імунокомпетентних клітин у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки

Кількість лейкоцитів. Вміст лейкоцитів у крові інтактних контрольних тварин становив  $(9,8 \pm 0,75) \times 10^9/\text{л}$ . Після інтоксикації сульфатом міді їх кількість зросла на 74% порівняно з контролем (табл. 3.4). Отримані результати свідчать про активацію клітинного компонента імунної відповіді у тварин після дії міді.

**Таблиця 3.4**

Кількість імунокомпетентних клітин у крові різних експериментальних груп тварин ( $X \pm SE$ ,  $n=5$ )

Групи	Лейкоцити, 10 <sup>9</sup> /л	Гранулоцити, 10 <sup>9</sup> /л	Лімфоцити, 10 <sup>9</sup> /л	Моноцити, 10 <sup>9</sup> /л
Контроль	9,80 ± 0,75	3,70 ± 0,36	5,70 ± 0,42	0,40 ± 0,10
Інтоксикація	17,07 ± 1,41*	8,60 ± 1,47*	7,27 ± 1,07*	1,13 ± 0,26*
Інтоксикація та ретинол перорально	17,10 ± 3,85*	9,40 ± 2,40*	6,63 ± 2,04	1,07 ± 0,13*

Інтоксикація та ХГК перорально	10,90 ± 3,29	4,60 ± 1,60	5,57 ± 1,62	0,70 ± 0,29*
Інтоксикація та ХГК внутрішньочеревно	13,90 ± 2,95*	7,17 ± 0,99*	5,30 ± 1,51	1,43 ± 0,55*

\* –  $P < 0,05$  у порівнянні з вихідним рівнем (ANOVA).

Введення ретинолу тваринам під час інтоксикації не спричинило змін у рівні лейкоцитів порівняно з групою «Інтоксикація» — їх кількість залишалася на 74% вищою за контрольні значення (табл. 3.4).

У той же час після перорального введення ХК тваринам з інтоксикацією сульфатом міді, кількість лейкоцитів відновилася до контрольного рівня (табл. 3.4). Однак після внутрішньочеревного введення ХК вміст лейкоцитів також знизився, але всього на 20% порівняно з їх вмістом у тварин після інтоксикації і залишався на 41% вище контрольного рівня (табл. 3.4).

*Кількість лімфоцитів.* Після інтоксикації сульфатом міді кількість лімфоцитів зросла лише на 26% порівняно з контрольною групою (табл. 3.4). Введення ретинолу та хлорогенової кислоти (як перорально, так і внутрішньочеревно) тваринам із інтоксикацією сульфатом міді не спричинило змін у кількості лімфоцитів (табл. 3.4).

*Кількість гранулоцитів.* Визначення кількості гранулоцитів у експериментальних тварин показало, що після інтоксикації сульфатом міді їх рівень зріс більш ніж удвічі порівняно з контрольною групою (табл. 3.4). Водночас введення ретинолу після отруєння не мало істотного впливу на цей показник, і кількість гранулоцитів залишалася на рівні, характерному для стану після інтоксикації (табл. 3.4). У той же час, пероральна ін'єкція ХК отруєним тваринам призвела до нормалізації кількості гранулоцитів, тоді як внутрішньочеревна ін'єкція ХК не вплинула на цей параметр, як і у

випадку з ретинолом, і його рівень залишився на 93% вище, ніж у контрольній групі (табл. 3.4).

*Кількість моноцитів.* Концентрація моноцитів найбільшою мірою змінилася у ряді імунокомпетентних клітин у досліджуваних групах. Так, їх кількість після інтоксикації збільшилась у 2,8 рази порівняно з контрольною групою (таблиця 3). Введення ретинолу тваринам з інтоксикацією сульфатом міді не вплинуло на рівень моноцитів у крові, і він залишався у 2,6 разу вище, ніж в інтактній контрольній групі (табл. 3.4).

Пероральне введення хлорогенової кислоти тваринам після інтоксикації сульфатом міді супроводжувалося зниженням кількості моноцитів на 39% порівняно з групою «Інтоксикація», хоча їх рівень залишався у 1,7 раза вищим за контрольні значення (табл. 3.4). При внутрішньочеревному введенні ХК після інтоксикації кількість моноцитів залишалася такою ж високою, як і після дії міді (табл. 3.4). Таким чином, найбільш виражений вплив ХК на зниження числа моноцитів спостерігався саме при пероральному введенні.

Варто підкреслити, що для оцінки імунової відповіді важливими є не лише абсолютна чисельність імунокомпетентних клітин, а й співвідношення їхніх різних морфологічних типів у досліджуваних групах тварин, оскільки разом вони формують єдину клітинну імуно систему.

Було встановлено, що співвідношення між досліджуваними типами імунокомпетентних клітин, яке оцінювалося за їх приростом відносно контролю (контроль приймався за рівень 0), відрізнялося у тварин, які отримували хлорогенову кислоту перорально, порівняно з групою з фіброзом печінки (рис. 5). При цьому ретинол не мав суттєвого впливу на співвідношення між кількістю імунокомпетентних клітин порівняно з тваринами після інтоксикації (рис. 3.12). Якщо тварини отримували ХК внутрішньочеревно на тлі інтоксикації, то у них формувалася різний

розподіл імунокомпетентних клітин, який відрізнявся від інших експериментальних груп (рис. 3.12).

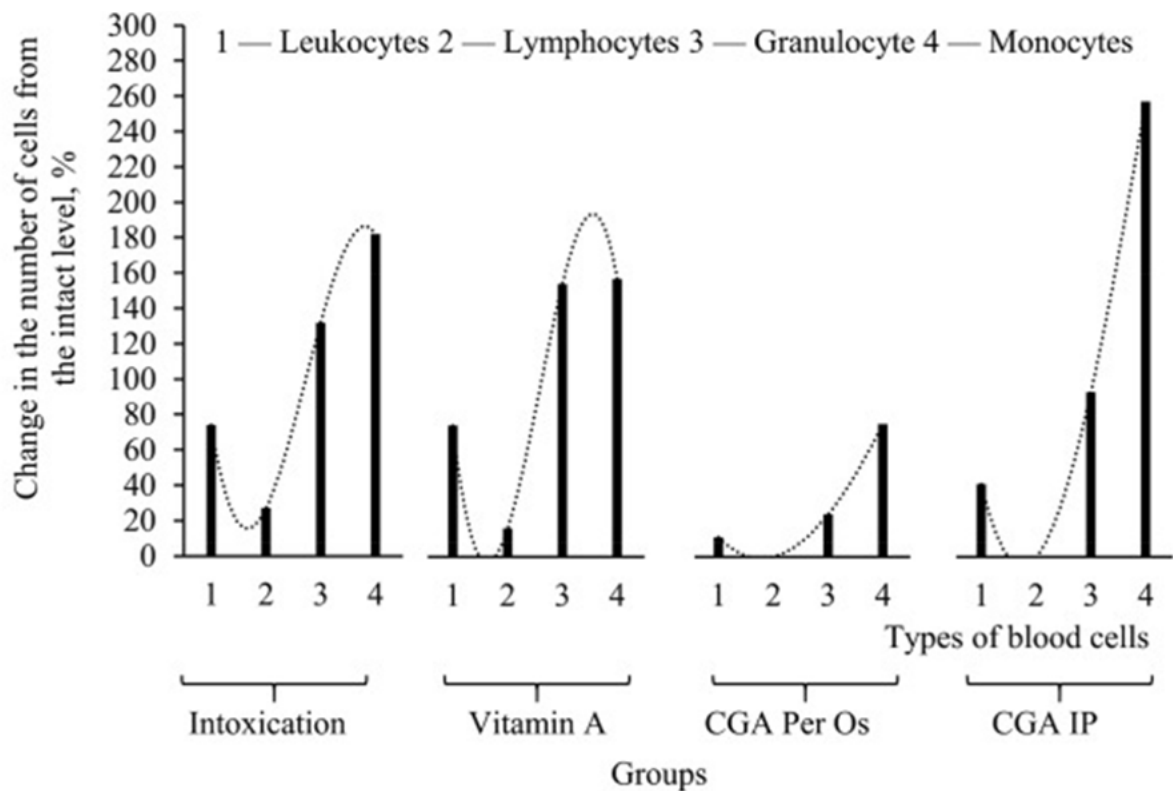


Рис. 3.12. Патерни, сформовані імунокомпетентними клітинами (лейкоцитами, лімфоцитами, гранулоцитами та моноцитами) у різних групах експериментальних тварин; оцінка здійснювалася за приростом кількості відповідних типів клітин відносно контрольної групи, прийнятої за базовий рівень.

Ці результати свідчать, що ефект ХК відрізняється від ефекту ретинолу на лімфопоез, і цей ефект проявляється по-різному залежно від способу введення ХК в організм.

### 3.2.3. Вплив хлорогенової кислоти та ретинолу на кількість тромбоцитів у крові тварин після отруєння сульфатом міді

*Концентрація тромбоцитів.* Інтоксикація організму сульфатом міді супроводжувалася 2,3-кратним збільшенням кількості тромбоцитів порівняно з інтактним контролем (рис. 3.13 А).

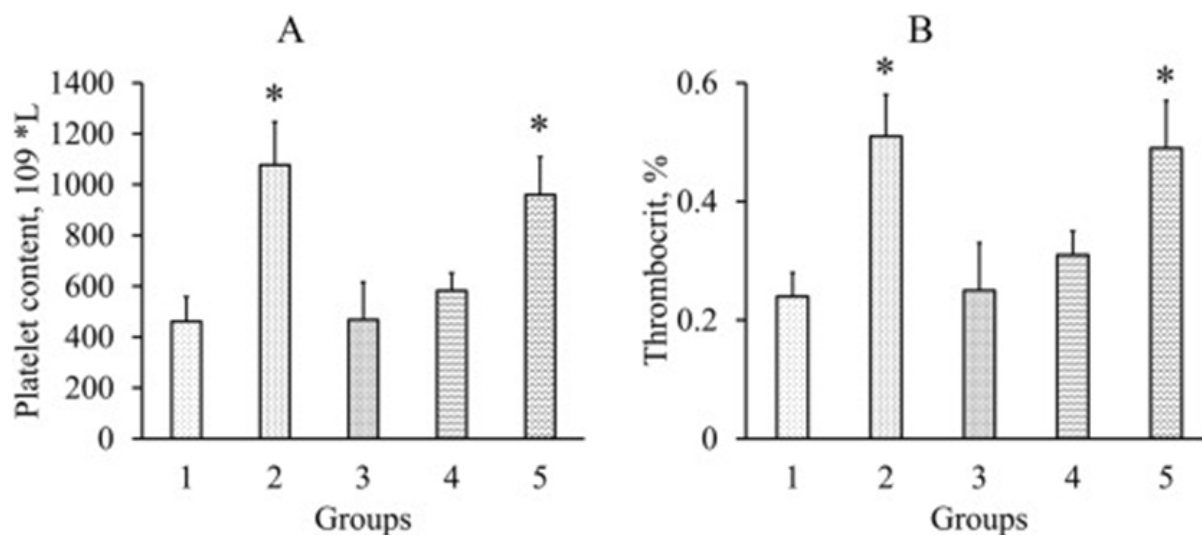


Рис. 3.13. Вміст тромбоцитів (А) і тромбокриту (В) у інтактних тварин і тварин, які отримали три внутрішньочеревні ін'єкції сульфату міді у дозуванні 1 мг/100 г маси тіла кожні 48 годин ( $X \pm SE$ ,  $n = 5$ ): група I – не піддавалася експериментальним впливам, отримувала відповідні дози фізіологічного розчину; II – через 24 години після ін'єкції сульфату міді перорально вводили об'єм фізіологічного розчину, відповідний обсягу ХК та ретинолу; III – через 24 години після ін'єкції сульфату міді тваринам перорально вводили ретинол у дозі 300 МО/100 г маси тіла; IV – через 24 години після ін'єкції сульфату міді тваринам перорально вводили ХК у дозі 20 мг/100 г маси тіла, виділену із соняшникового шроту; V – через 24 години після ін'єкції сульфату міді тваринам внутрішньочеревно вводили ХК у дозі 20 мг/100 г маси тіла, виділену із соняшникового шроту;  
\* –  $P < 0,05$  у порівнянні з вихідним рівнем (ANOVA).

У тварин, яким після інтоксикації вводили ретинол, рівень тромбоцитів не відрізнявся від контрольних значень (рис. 3.13 А).

Якщо тваринам після отруєння сульфатом міді вводили ХК у дозуванні 20 мг/100 г маси тіла перорально, кількість тромбоцитів також відновлювалася до контрольного рівня (рис. 3.13 А). Однак, якщо ХК вводили тваринам у тій же дозі, але внутрішньочеревно, кількість

тромбоцитів залишалася в 2 рази збільшеною порівняно з інтактним контролем і не відрізнялася від кількості після отруєння (рис. 3.13 А).

Таким чином, пероральне введення ХК тваринам на тлі запального процесу забезпечувало нормалізацію кількості тромбоцитів у крові до контрольних значень, як і у випадку з ретинолом.

*Тромбокрит*, який залежить від кількості та обсягу тромбоцитів, змінювався аналогічно кількості тромбоцитів у досліджуваних групах. Так, після інтоксикації він збільшився у 2,1 рази, не відрізнявся від контролю після ін'єкції ретинолу та ХК (при пероральному введенні) та залишався збільшеним у 2 рази (при внутрішньочеревному введенні ХК) (рис. 3.13 В). При цьому середній об'єм тромбоцитів у всіх експериментальних варіантах був однаковим, як і ширина розподілу тромбоцитів (рис. 3.13).

**Таблиця 3.5**

Середній об'єм та відносна ширина розподілу тромбоцитів у експериментальних тварин ( $X \pm SE$ ,  $n=5$ )

Групи	Середній обсяг тромбоцитів, фл	Відносна ширина розподілу тромбоцитів
Контроль	$5,60 \pm 0,36$	$17,00 \pm 0,57$
Інтоксикація	$5,50 \pm 0,02$	$16,57 \pm 0,09$
Інтоксикація та ретинол перорально	$5,40 \pm 0,15$	$16,77 \pm 0,20$
Інтоксикація та ХК перорально	$5,27 \pm 0,15$	$16,57 \pm 0,03$
Інтоксикація та ХК внутрішньочеревно	$5,13 \pm 0,23$	$16,37 \pm 0,12$

Отже, вплив ХК на кількість тромбоцитів у крові тварин після отруєння сульфатом міді залежить від способу введення її в організм. При пероральному введенні кількість тромбоцитів і тромбокриту відновлювалися до контрольних значень, як після ін'єкції ретинолу; при цьому внутрішньочеревне введення ХК тваринам не впливало на ці параметри.

Наразі виділяють декілька основних механізмів токсикогенної дії іонів важких металів: оксидативний стрес, токсичність мембран та порушення активності ферментів [139,140]. При вирішенні проблеми токсичності визначальним чинником є розуміння «вибору» тієї чи іншої стратегії реакції організму на токсикант. Ця стратегія може виявлятися у розвитку гострої токсичності (швидка смерть); хронічної токсичності (відстрочене настання смерті) та відновлення структурно-функціональних характеристик (здатність усувати хронічні патології) [140,141].

Було показано, що прояв токсикогенного ефекту іонів міді залежить не лише від дози токсичної речовини, а й від часової характеристики накопичення токсину в організмі [95]. Так, якщо летальна доза токсичної сполуки вводилася в організм не один раз, а поділялася на три послідовні ін'єкції, то летальний ефект спостерігався у меншості тварин (40%), а у більшості тварин (60%) спостерігалася адаптивна стратегія, але у них формувалася хронічна патологія печінки, тобто виникли дві різні стратегії реагування. Таким чином, результати цієї роботи та отримані нами раніше дані показали, що у таких тварин формувався специфічний метаболічний патерн, що забезпечує виживання; тобто у більшості тварин розвивалася хронічна токсичність (рис. 3.14) [2, 95, 141, 142].

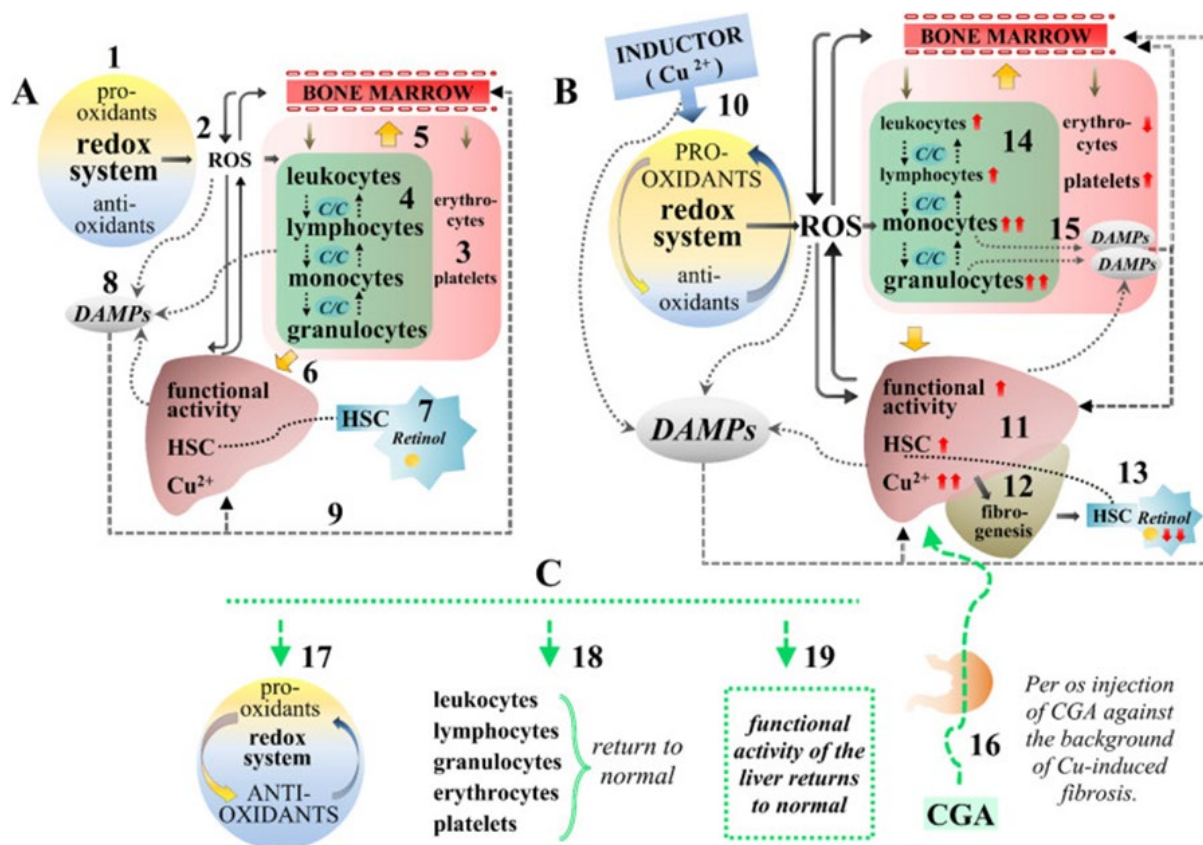


Рис. 3.14. Схема, що демонструє можливий взаємозв'язок між функціональною активністю печінки і кісткового мозку, опосередкованим клітинами крові, і окисно-відновною системою організму: А – в нормальному стані окисно-відновна система (1) знаходиться у відносній рівновазі (антиоксиданти з прооксидантами забезпечують фізіологічний рівень продукції АФК (2), які беруть участь у регуляції метаболічних процесів); кількість еритроцитів та тромбоцитів у крові (3) знаходиться під суворим гомеостатичним контролем; та імунокомпетентні клітини (лейкоцити, лімфоцити, моноцити та гранулоцити) (4) утворюють єдину динамічно функціонувальну систему завдяки прямим взаємозв'язкам між собою та продукції різних цитокінів та хемокінів (с/с); у свою чергу, ці цитокіни та хемокіни чинять регулюючий вплив на функції кісткового мозку (5) та печінки (6); У нормі в печінці функціонує депо вітаміну А, локалізоване у зірчастих клітинах (ЗСК) (7), а також утворюється певна кількість регуляторних цитотоксичних низькомолекулярних сполук —

DAMPs (8), які, у свою чергу, чинять регуляторний вплив на печінку і кістковий мозок (9); В – багаторазове послідовне введення сульфату міді (10) в організм призводить до зміщення балансу у бік прооксидантів, збільшення продукції АФК та збільшення кількості іонів міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ) у печінці (11) (але не в кістковому мозку); АФК впливають на функцію печінки і в першу чергу активують ЗСК, що супроводжується індукцією фіброгенезу (12) та зниженням вмісту вітаміну А (13) у клітинних депо; АФК також впливають на функцію кісткового мозку, що проявляється у зменшенні кількості еритроцитів та збільшенні кількості тромбоцитів у крові, а також у збільшенні вмісту лейкоцитів та лімфоцитів, значному збільшенні кількості моноцитів та гранулоцитів (14), що призвело до збільшення продукції DAMP (15) та їх (DAMP) додаткового впливу на функцію кісткового мозку та печінки (15); У результаті сформувалися нові специфічні метаболічні та імунологічні патерни, характерні для початкових стадій фіброзу печінки; С – при пероральному введенні протягом 3 днів хлорогенової кислоти (CGA) тваринам з індукованим міддю фіброзом печінки (16), спостерігалось незначне зниження продукції АФК (17), нормалізація кількості імунокомпетентних клітин (18) (за винятком моноцитів, які залишалися трохи вище норми) та відновлення еритроцитів та тромбоцитів у крові; спостерігалась нормалізація функцій печінки за вивченими параметрами (19);

Зображення 1 – незначне кількісне збільшення порівняно з нормою. Зображення 2 – виражене збільшення порівняно з нормою (аналогічні стрілки вниз – відповідно, зниження цих показників); DAMPs – молекулярні патерни, пов'язані з ушкодженням; ROS – активні форми кисню; с/с – цитокіни та хемокіни; HSC – зірчасті клітини печінки.

Слід зазначити, що співвідношення різних форм лейкоцитів після інтоксикації іонами міді змінилося порівняно з контрольними тваринами, і це найбільш характерно для моноцитів та гранулоцитів (рис. 3.12).

Сучасні дослідження показують, що моноцити та гранулоцити, як і інші імунокомпетентні клітини, мають високу гетерогенність і здатні забезпечувати багатоспрямовані процеси в організмі, як розвиток патологій, так і процеси регенерації та відновлення пошкоджених тканин. Є також дані, що вказують на те, що напрямок дії моноцитів залежить від їх чисельності та фенотипного розмаїття, на які, у свою чергу, впливає їх локальне мікрооточення [143].

Результати цієї роботи показали досить виражене збільшення кількості моноцитів (у 2,8 рази) після інтоксикації організму сульфатом міді порівняно з контролем. Така гіперактивація може призвести до формування аутоімунних процесів та переходу запальних процесів у хронічний стан. Було показано, що збільшення кількості периферичних моноцитів та збільшення числа CD16<sup>+</sup> моноцитів корелює з тяжкістю фіброзу [144,145]. Водночас, активовані моноцити виділяють різні цитокіни, включаючи фактор росту тромбоцитів (PDGF) [146,147], що корелювало зі збільшенням числа тромбоцитів у нашому експерименті (табл. 3.5 і рис. 3.13).

Не менш важливим та цікавим було виражене збільшення числа гранулоцитів (у 2,3 рази) у тварин після інтоксикації. Відносно нещодавно було показано, що гранулоцити здатні не тільки швидко мігрувати до вогнищ запалення і проникати в різні тканини через пори діаметром 3-5 мкм, а й здійснювати зворотні рухи з тканин назад у кровотік, при цьому гранулоцити, що пройшли такий шлях, набувають нового фенотипу [148].

Гранулоцити з цим новим фенотипом характеризуються підвищеною продукцією АФК, повільнішою швидкістю апоптозу та збільшенням тривалості життя таких клітин [148-150]. Наявні дані свідчать про те, що гранулоцити виконують координуючу та регуляторну роль для всієї імунної

системи, використовуючи як прямі взаємодії між клітинами імунної системи (міжклітинні взаємодії), так і непрямі, вивільняючи в навколишнє середовище різні цитокіни і хемокіни (рис. 3.14 В) [151].

Збільшення кількості гранулоцитів і моноцитів у тварин після інтоксикації іонами міді може також вказувати на те, що у таких тварин спостерігаються генералізовані зміни по всій імунній системі, і це має вирішальне значення для утворення цитотоксичних компонентів. Однак, якщо така гіперактивність зберігається протягом тривалого часу, це також може призвести до формування патологічних процесів, в даному випадку фіброзу печінки [152].

Як відомо, тяжкість та тривалість гострого запалення в організмі жорстко контролюються різними системами. Це необхідно, з одного боку, для усунення причинних факторів (або їх видалення), а з іншого – для запобігання значному пошкодженню навколишніх тканин, не допускаючи переходу запалення в хронічний стан та запобігання розвитку патологічних станів. Щодо цього здатність контролювати часовий характер розвитку запального процесу, що є природною реакцією організму на різні пошкодження біологічних структур, є найважливішою умовою для усунення патологічних процесів, спричинених токсичними сполуками. Оскільки оксидативний стрес є одним з токсигенних факторів, можна очікувати, що ретинол, що має також антиоксидантні властивості, також може впливати на розвиток запального процесу.

Якщо тваринам вводили ретинол після інтоксикації сульфатом міді, кількість імунокомпетентних клітин залишалася такою ж, як у тварин після інтоксикації. При цьому параметри еритрона (кількість еритроцитів, їх об'єм та анізоцитоз) після ін'єкції ретинолу демонстрували ознаки анемії навіть більшою мірою, ніж у тварин після інтоксикації. Проте введення ретинолу на фоні інтоксикації забезпечувало відновлення кількості тромбоцитів і тромбокрити до рівня інтактної норми. Раніше було показано,

що ін'єкція ретинолу в дозі 300 МО/100 г маси тіла на ранніх стадіях фіброзу печінки, спричиненого високим вмістом іонів міді, посилювала прояв фіброзних змін у печінці та пригнічувала проліферативну активність в органотипічній культурі печінки [142].

Ці результати можна пояснити дією ретинолу не стільки як антиоксиданту, скільки як активатора клітин Іто і, як наслідок, як підсилювача фіброгенезу, що супроводжується прозапальним ефектом імунокомпетентних клітин. Можна припустити, що поряд із цим відбулася зміна напряму дії моноцитів, і в таких умовах вони знизили вироблення тромбоцитарного фактора росту. В результаті після ін'єкції ретинолу спостерігалася нормалізація кількості тромбоцитів.

Відомо, що ХГК має протизапальну, антиоксидантну та низку інших властивостей [122, 131, 132, 153].

Було показано, що ХК, потрапляючи в організм з їжею, тобто перорально, проникає в ентероцити, де піддається метилюванню, сульфатуванню і потрапляє в кровообіг, перш ніж транспортуватися в печінку і піддаватися додатковій модифікації. Потім ХК знову потрапляє в кров і може знову потрапити до печінки, але вже в модифікованому вигляді [153]. У тому ж випадку, якщо ХК вводиться в організм внутрішньочеревно, вона швидко потрапляє в кровообіг і потрапляє до печінки, минаючи етапи модифікації в ентероцитах. Водночас, є дані про те, що ХК у травному тракті впливає на мікробіом, який, у свою чергу, має виражену регулюючу дію на весь метаболізм організму [154].

Виходячи з цього можна припустити, що напрямок дії ХК в організмі визначається функціональними характеристиками метаболізму на момент його дії.

Таким чином, пероральне введення ХК тваринам після інтоксикації супроводжувалося нормалізацією кількості імунокомпетентних клітин, за винятком кількості моноцитів, які, хоч і залишалися підвищеними, були

лише на 75% вище контрольної групи, а не в 2,8 рази вище, ніж у групі без цієї сполуки (табл. 3.4). Кількість тромбоцитів і тромбокрит після перорального введення ХК також відповідали нормі, а кількість та характеристики еритроцитів незначною мірою відрізнялися від контрольного рівня (табл. 3.3).

Внутрішньочеревне введення ХК тваринам після інтоксикації чинило аналогічну дію на кількість та характеристики еритроцитів та імунокомпетентних клітин, подібно до дії ретинолу, при цьому кількість тромбоцитів у таких тварин залишалася високою, як і у тварин після інтоксикації.

Як одного разу зауважив І.І. Мечников: «Запальний процес – це захисна реакція організму на різні пошкоджуючі чинники». Однак, якщо ці реакції надто виражені і затяжні, вони призводять до формування патологічних станів. У зв'язку з цим контроль рівня прояву запальних реакцій, включаючи рівень клітинного компонента імунної системи, є важливою і до кінця не вирішеною біомедичною проблемою.

Можна припустити, що, таким чином, пероральне введення ХГК тваринам з фіброзом печінки супроводжувалося нормалізацією кількості імунокомпетентних клітин, за винятком кількості моноцитів, які, хоч і залишалися підвищеними, були лише на 75% вищими за контрольну групу, а не в 2,8 рази вищими, ніж у групі без цієї сполуки (таблиця 3).

Кількість тромбоцитів і тромбокрит після перорального введення ХК також відповідали нормі, а кількість та характеристики еритроцитів не суттєво відрізнялися від контрольного рівня (табл. 3.3). Це може впливати на зміну стратегії реагування на тлі фіброзу печінки організму, обмежуючи надмірну активність імунокомпетентних клітин та формуючи новий патерн цих клітин.

### **Висновок до розділу 3.2:**

Результати показали, що поліфенольні сполуки, виділені з соняшникового шроту, виявляли імуномодулюючу дію на моделі Су-індукованого фіброзу печінки, шляхом регуляції функцій кісткового мозку. Таким чином, пероральне введення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, супроводжувалося нормалізацією кількості імунокомпетентних клітин, які були збільшені у тварин з Су-індукованим фіброзом печінки, за винятком кількості моноцитів, які, хоча і залишалися підвищеними, однак тільки на 75%, а не в 2,8 рази вище, порівняно з фіброзом. Кількість тромбоцитів і тромбокриту після перорального введення ХК також відповідали нормі, а кількість та характеристики еритроцитів незначно відрізнялися від контрольного рівня. Біологічні ефекти залежали від способів введення поліфенольних сполук в організм. Найбільш виражений біологічний ефект на клітини крові був виявлений у разі перорального введення, порівняно з внутрішньочеревним введенням поліфенольних сполук, що можна пов'язувати з поясненням додаткової дії цих сполук на кишковий мікробіом та їх модифікаціями в ентероцитах.

### **3.3 Отримання та характеристика супрамолекулярних комплексів: «казеїн молозива–поліфенольні сполуки», збагачені хлорогеновою кислотою**

Розробка способів отримання продуктів функціонального харчування є актуальним завданням біоінженерії [155]. Сучасний інтерес до продуктів медичного призначення зокрема продуктів функціонального харчування, пояснюється низкою причин: 1 – можуть забезпечити зменшення ризику виникнення хронічних патологій, тобто, виконувати профілактичні, в деяких випадках і лікувальні функції; 2 – можуть значною мірою зменшувати витрати на охорону здоров'я; 3 – покращувати якість, а, можливо, і тривалість життя людей.

Одним із підходів одержання продуктів функціонального харчування є розробка способів формування супрамолекулярних комплексів між різноманітними біологічно активними субстанціями. Показано, що супрамолекулярні комплекси мають специфічні властивості, які відрізняються від властивостей складових їх компонентів [156,157]. В даний час супрамолекулярні комплекси використовуються в нанотехнологіях, харчових технологіях, медицині та як біологічні моделі при дослідженні фундаментальних механізмів міжмолекулярних взаємодій [158-160], що розширює можливості отримання нових біоматеріалів.

У цьому контексті значний інтерес становить отримання супрамолекулярних комплексів поліфенольних сполук та білків, зокрема білків молока та/або молозива [161-163]. Вибір таких полімерів в біоінженерії пояснюються рядом фактів: 1 – поліфеноли (ПФ) – це вторинні метаболіти рослин, що містять ароматичне бензольне кільце і гідроксильну групу [164]. Вони виявляють антиоксидантні, гепатозахисні, антиканцерогенні властивості, що позитивно впливають на кишковий мікробіом, а це потенційно може знизити ризик розвитку цілого ряду захворювань [165,166]; 2 – завдяки наявності функціональних груп ПФ здатні формувати комплекси з білками, які можуть виконувати функцію матриць та забезпечувати систему доставки та ефективного засвоєння таких комплексів [167-169]; 3 – у складі супрамолекулярних комплексів можуть змінюватися як властивості ПФ, так і білків, отже, можна отримувати продукти з новими функціональними властивостями [170].

Можна стверджувати, що розробка способів одержання супрамолекулярних комплексів є надзвичайно перспективним напрямком сучасної біоінженерії. Незважаючи на перспективи і зокрема, унікальні властивості ПФ їх практичне використання ускладнюється цілим рядом особливостей: 1- хоча визнано, що ПФ безпечні (GRAS), є дані, які вказують на те, що великі дози можуть призводити до побічних ефектів [171].

Надмірне споживання поліфенольних сполук пов'язане з проявом нефротоксичності та гепатотоксичності, не виключена індукція мутацій, які потенційно здатні індукувати онкопроцеси, негативно вплинути на регуляцію гормонів щитоподібної залози [172] та ін, що необхідно враховувати при розробці медичних продуктів; 2 – ПФ чутливі до окиснення, а під час травлення, через злегка лужні умови в тонкому кишечнику, може мати місце зниження їх біодоступності [173,174]. Вони більш стабільні при низькому рН і це супроводжується їх низьким засвоєнням у системі травлення людини [175]; 3 – обробка та зберігання харчових продуктів, багатих ПФ може призводити до епімеризації і як наслідок зміни їх властивостей [176]; 4 – за наявності кисню ПФ можуть піддаватися автоокисненню, яке є основним фактором їх нестабільності та в результаті автоокиснення утворюються гідропероксиди та пероксиди [177]; 5 – ще однією причиною деградації ПФ є дія світла і це може індукувати ефекти батохромного та гіперхромного зсувів [65].

Виходячи з того, що супрамолекулярні комплекси – це ансамблі, що самоорганізуються, з двох або більше молекул, які, як правило, утримуються разом не ковалентними, слабкими зв'язками (водневі зв'язки, сили Ван-дер-Ваальса, гідрофобні та електростатичні взаємодії). Характеристики та біологічна активність може залежати від складу «партнерів» та фізико-хімічних умов за яких формуються супрамолекулярні комплекси.

При виборі «партнерів» ми виходили з того, що субстанцією для виділення ПФ має задовольняти такі вимоги як доступність вихідної сировини, кількість ПФ у сировині, спосіб виділення ПФ та наявність унікальних біологічних характеристик «партнерів».

Відомо, що шрот соняшника є побічним продуктом при отриманні рослинної олії і використовується на корм худобі, при цьому містить досить велику кількість поліфенольних сполук (до 4% фенольних сполук від усіх

сухих речовин). Унікальність шроту як сировини не тільки в низькій вартості та доступності, а й у тому, що на хлорогенову кислоту (5-кофеоілхінінова кислота; 5-CQA) припадає до 70% від загальної кількості фенольних сполук, а решта 30% складають інші ізоформи хлорогенових кислот [178,179]. Біологічна активність хлорогенової кислоти добре вивчена і показано, що вона виявляє антиоксидантні, антиканцерогенні, протизапальні, антифібротичні активності [180,181]. ПФ із шроту можуть бути відносно легко отримані та не вимагають глибокого очищення.

Як другий партнер, або матриця для ПФ найчастіше використовується казеїн молока [182-184]. Незважаючи на цілу низку переваг і зокрема, здатність цих білків до самозбирання у формі міцел, казеїн молока належить до повільно перетравлюваних і досить стабільних білків. Поряд з цим, казеїн коров'ячого молозива відрізняється від казеїну молока за низкою структурних особливостей [6], які роблять його унікальною біологічно активною матрицею для зв'язування та доставки інших активних субстанцій, зокрема ПФ. Таким чином, якщо казеїн молока формує великі, щільні та стабільні міцели (наявність гідрофобного ядра та гідрофільної оболонки), то казеїн молозива, це пористі нестабільні субміцели, які мають більшу ємність. В них переважає бета-казеїн й у такій структурі більше активних центрів зв'язування. Міцели казеїну молозива на відміну від такого молока характеризуються вищою біодоступністю. Є відомості, що казеїн молозива відіграє важливу роль у функціонуванні мікробіома кишечника і може розглядатися як «розумна» нутрицевтична матриця з власною біоактивністю та регулюючи активність мікробіома організму, він може опосередковано проявляти поліфункціональну біологічну активність.

Метою даного етапу роботи стало дослідження можливостей отримання супрамолекулярних комплексів між поліфенолами шроту соняшнику та казеїном молозива, характеристика постказеїнової фракції

після отримання казеїну та розробка методу визначення кількості хлорогенової кислоти в цих комплексах.

### 3.3.1. Вплив температури та рН на формування супрамолекулярних комплексів казеїн-хлорогенова кислота

#### 3.3.1.1. Спектральна характеристика пост-казеїнової фракції молозива

З 50 мл молозива було отримано 4,9 г казеїну у перерахунку на суху речовину, що становило 72% сухих компонентів молозива. Вихід пост-казеїнової фракції (рис. 2), яку виділяли після осадження казеїну, складав 1,95 г, тобто близько 28% усіх білків молозива. До складу пост-казеїнової фракції входять глобуліни ( $\beta$ - та  $\alpha$ -), імуноглобуліни (IgG, IgA, IgM), сироватковий альбумін, лактоферин, різні ферменти, фактори росту та інші біологічно активні сполуки з вираженою функціональною активністю. Спектри поглинання пост-казеїнової фракції демонстрували наявність амінокислот (200–220 нм), пептидів (220–250 нм), нуклеїнових кислот та їх фрагментів (260 нм), а також білків (280 нм) (рис. 3.15 А). Раніше, за допомогою мас-спектроскопії, було показано, що пептиди та білки цієї фракції мають молекулярні маси в діапазоні 4–18 кДа [4].

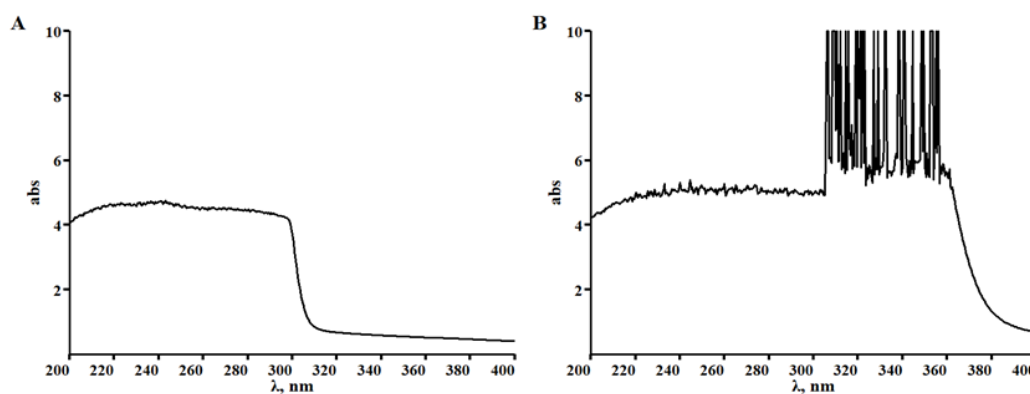


Рис. 3.15 Типові спектри поглинання пост-казеїнової фракції молозива у контрольному варіанті (А) та після внесення до його складу поліфенольних сполук соняшникового шроту (В). До 50 мл молозива додавали 1,25 г сухої речовини поліфенолів. Наведено типову спектральну

характеристику, отриману за результатами не менше ніж п'яти незалежних визначень.

У випадку внесення до 50 мл молозива 1,25 г сухої речовини поліфенольних сполук спостерігалось підвищення оптичної щільності в діапазоні 220–280 нм на 0,40–0,76 оптичних одиниць (рис. 3.15 В). При цьому відзначалися незначні зміни спектра поглинання, що може свідчити про невеликі модифікації білкового складу після додавання ПФ. Це могло бути зумовлено як присутністю невеликої кількості білків соняшникового шроту у складі ПФ (рис. 3.15 А), так і їх взаємодією з білками молозива. Найбільш виражені зміни проявлялися у зростанні оптичної щільності при довжинах хвиль 315–355 нм, що вказує на значний вміст ПФ-сполук у пост-казеїновій фракції, які поглинають у діапазоні 310–360 нм (рис. 3.15 В).

Після внесення до 50 мл молозива 1,25 г поліфенольних сполук кількісний вихід сухих речовин пост-казеїнової фракції становив 2,15 г, що на 0,2 г перевищувало контрольний варіант (без додавання ПФ).

Таким чином, додавання ПФ супроводжувалося: (1) зміною кількісного та якісного складу білків пост-казеїнової фракції; (2) збільшенням загальної кількості сухих речовин на 0,2 г порівняно з контролем; (3) накопиченням значної кількості ПФ у пост-казеїновій фракції, які могли перебувати як у вільному стані, так і утворювати комплекси із сироватковими білками молозива.

Це питання потребує окремого дослідження, оскільки білки пост-казеїнової фракції, що містять різноманітні фактори росту та характеризуються вираженою біологічною активністю, зокрема антифібротичною, можуть змінювати свої властивості [39, 40].

### **3.3.1.2.Спектральна характеристика супрамолекулярних комплексів: «казеїн-поліфенольні сполуки»**

Як було зазначено, із 50 мл молозива отримували 4,9 г казеїну. У випадку додавання 1,25 г поліфенольних сполук перед осадженням, маса речовин, що випадали в ізоелектричній точці казеїну, становила 5,4 г, тобто на 0,5 г більше порівняно з контрольним зразком. Це може свідчити як про формування комплексів казеїну з ПФ, так і про підвищення повноти його осадження, або ж про поєднання обох процесів.

Відомо, що осаджений у молоці кислий казеїн є малорозчинним, тоді як кислий казеїн молозива завдяки менш щільній упаковці має більшу здатність до розчинення.

Якщо ПФ-сполуки не утворюють комплексів із казеїном і залишаються у розчиненому стані, то при промиванні осадів водою з рН 4,6 вони повинні переходити у водний розчин, зміщуючи співвідношення казеїн/ПФ у бік збільшення кількості вільних ПФ.

Було встановлено, що промивання осаду кислого казеїну молозива (контрольний варіант без ПФ), проведене при 20 °С за рН 4,6, супроводжувалося переходом частини казеїну у водний розчин (рис. 3.16, I, А).

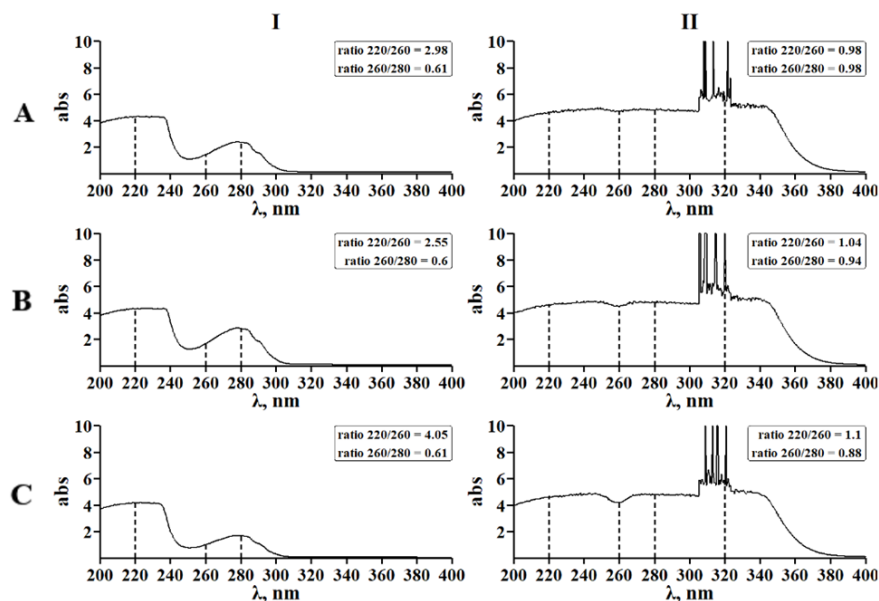


Рис. 3.16. Типові спектри поглинання казеїну, який переходив у водний розчин після першого промивання осадженого казеїну в ізоелектричній точці (I), та спектри поглинання зразків після першого промивання казеїну з поліфенольними сполуками (II). Для промивання використовували воду з рН 4,6 (А), рН 7,0 (В) та рН 9,0 (С). Усі процедури проводили при температурі 20 °С. Наведено типові варіанти спектрів, отримані щонайменше з п'яти незалежних серій експериментів.

Для казеїну характерне інтенсивне поглинання у діапазоні 210–240 нм, що зумовлено наявністю пептидних зв'язків, а також менш виражене поглинання при 280 нм, пов'язане з присутністю триптофану, тирозину та частково фенілаланіну (рис. 3.16). У складі казеїну відсутні нуклеїнові кислоти, про що свідчить співвідношення оптичної щільності 260/280, яке дорівнювало 0,6 незалежно від рН середовища (рис. 3.16, I). Розчинність казеїну при 20 °С залишалася подібною за рН 4,5; 7,0 та 9,0 (рис. 3.16, I, А, В).

У випадку промивання осадів казеїну при 20 °С у присутності поліфенольних сполук спектральні характеристики істотно відрізнялися від контрольних зразків чистого казеїну (рис. 3.16 II).

По-перше, у досліджуваних зразках виявлялася значна кількість ПФ, що поглинали у діапазоні 310–325 нм, хоча їх рівень був нижчим порівняно з пост-казеїною фракцією (рис. 3.16 П та 3.16 В).

По-друге, спостерігалися зміни білкової частини спектра відносно чистого казеїну (рис. 3.16 П). Важливо зазначити, що співвідношення  $A_{220}/A_{260}$  та  $A_{260}/A_{280}$  було близьким до одиниці (рис. 3.16 П). Спектральні характеристики цих зразків майже не залежали від рН у межах 4,6–9,0, якщо процедури проводилися при 20 °С (рис. 3.16 П А, В, С).

При повторному промиванні залишкового осаду казеїну у водний розчин переходило у п'ять разів менше білка, який поглинав при 280 нм, порівняно з першим промиванням (рис. 3.16 І А; рис. 3.17 І А).

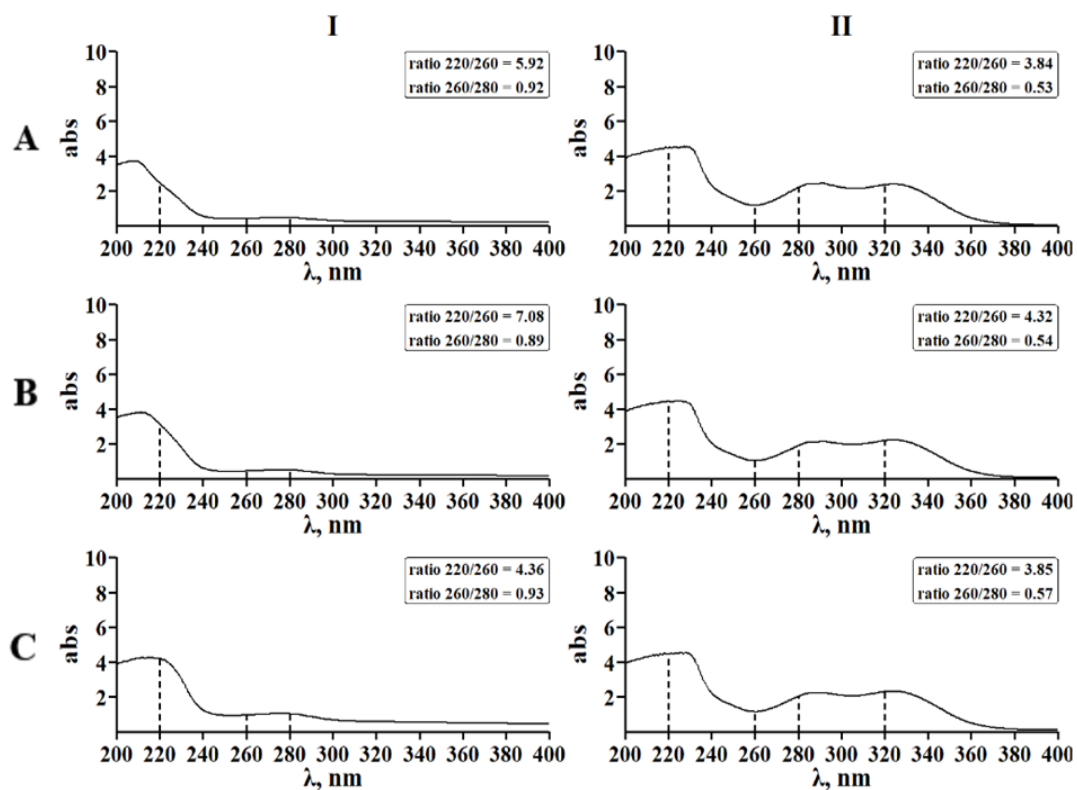


Рис. 3.17. Спектри поглинання казеїну, який переходив у водний розчин після другого промивання контрольного зразка осадженого казеїну в ізоелектричній точці (І), та спектри поглинання зразків після другого промивання казеїну з поліфенольними сполуками (ІІ). Для промивання використовували воду з рН 4,6 (А), рН 7,0 (В) та рН 9,0 (С). Усі процедури

проводили при температурі 20 °С. Наведено типові варіанти спектрів, отримані щонайменше з п'яти незалежних серій експериментів.

У разі другого промивання контрольного зразку казеїну при температурі 20 °С, мало місце збільшення кількості казеїну, що екстрагується, при рН 9,0 в порівнянні з 4,5 і 7,0 (рис. 3.17, I). Це може пояснюватися тим, що після повторного промивання осаду казеїну відбувалося більше диспергування осаду за рахунок збільшення негативного заряду молекул казеїну при рН 9,0.

Цікавим виявився результат повторного промивання зразка казеїну у присутності поліфенольних сполук, який можна узагальнити кількома положеннями: (1) у присутності ПФ розчинність казеїну була значно вищою порівняно з чистим казеїном; (2) кількість ПФ у водному середовищі після другого промивання знижувалася до слідових концентрацій відносно першого промивання (рис. 3.17, II, A–C). Отримані дані дозволяють припустити, що ПФ утворюють супрамолекулярні комплекси з білками казеїну молозива, що супроводжується як присутністю ПФ, так і зміною спектральних характеристик білків.

Важливим чинником, який визначає поведінку таких комплексів, є температура середовища під час екстракції.

Результати впливу підвищеної температури можна узагальнити так: (1) після першого промивання кислого казеїну при 40 °С відзначалися невеликі відмінності спектральних характеристик порівняно з 20 °С (рис. 3.18); (2) після повторного промивання при 40 °С розчинність казеїну була значно більшою, ніж при 20 °С (рис. 3.19 I та 3.17 I); (3) після першого промивання агрегатів казеїну з ПФ при 40 °С у водну фазу переходила більша кількість поліфенолів порівняно з 20 °С, що супроводжувалося невеликими змінами спектральних характеристик білків (рис. 3.16 I та 3.18 I); (4) після другого промивання при 40 °С вихід ПФ був таким самим, як і

при 20 °С, і визначався лише у слідових концентраціях (рис. 3.19 II та 3.17 II).

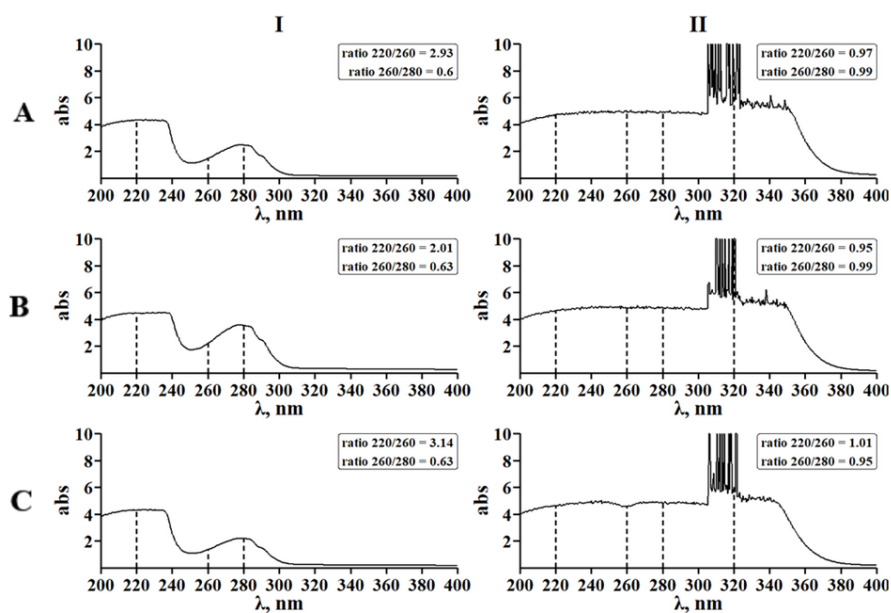


Рис. 3.18. Типові спектри поглинання казеїну, який переходив у водний розчин у результаті першого промивання осадженого казеїну в ізоелектричній точці (I), та спектри поглинання зразків після першого промивання казеїну з поліфенольними сполуками (II). При промиванні казеїну використовували воду з рН = 4,6 (А), рН = 7,0 (В) та рН = 9,0 (С). Усі процедури проводили при температурі 40 °С. Представлені типові варіанти спектрів, отримані щонайменше з п'яти незалежних серій експериментів.

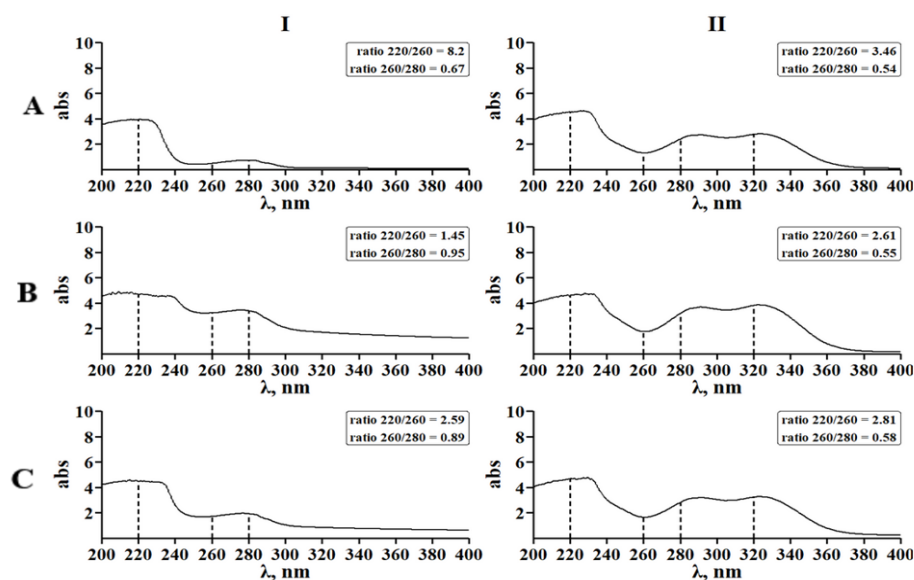


Рис. 3.19. Типові спектри поглинання казеїну, який переходив у водний розчин у результаті другого промивання осадженого казеїну в ізоелектричній точці (I), та спектри поглинання зразків після другого промивання казеїну з поліфенольними сполуками (II). Для промивання використовували воду з рН = 4,6 (А), рН = 7,0 (В) та рН = 9,0 (С). Усі процедури проводили при температурі 40 °С. Представлені типові варіанти спектрів, отримані щонайменше з п'яти незалежних серій експериментів.

Отже, дія підвищеної температури на комплекси «Казеїн-ПФ» може мати подвійний ефект. З одного боку, вона сприяє збільшенню розчинності утворених комплексів, про що побічно свідчить зміна білкового спектра порівняно з чистим казеїном.

З іншого боку, підвищена температура може призводити до руйнування цих комплексів і збільшення кількості «вільних ПФ» у порівнянні з умовами при 20 °С.

Ці результати підтверджують, що супрамолекулярні комплекси формуються переважно завдяки водневим та гідрофобним взаємодіям..

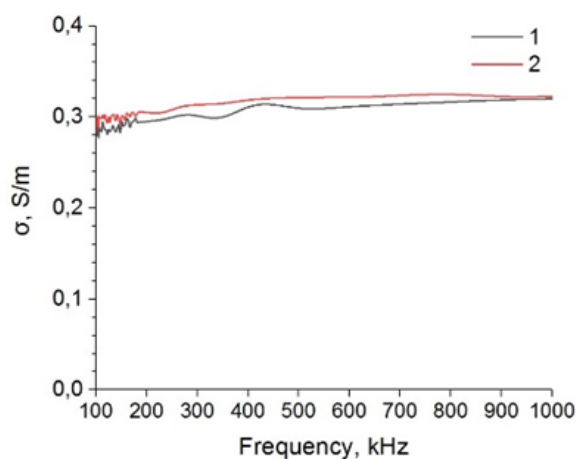
### 3.3.2. Дослідження електропровідності супрамолекулярних комплексів: «казеїн-поліфенольні сполуки»

Відомо, що електропровідність у біологічних рідинах визначається низкою чинників: наявністю іонів та їх характеристик (різницею іонної провідності); присутністю заряджених органічних молекул (вільних амінокислот, білків тощо); співвідношенням між зарядженими частинками (провідниками) та незарядженими молекулами (діелектриками); а також температурою, за якої проводяться вимірювання. Тому електропровідність може використовуватися як інтегральний показник фізико-хімічних характеристик розчинів [185].

Можна припускати, що у разі утворення супрамолекулярних комплексів між казеїном і поліфенольними сполуками відбувається зміна вихідних структур та загального заряду. Це, своєю чергою, може позначатися на електропровідності, і даний показник може слугувати додатковим індикатором формування таких комплексів.

Видалення ліпідів та казеїну з молозива (пост-казеїнова фракція) супроводжувалося добре вираженою електропровідністю, яка залишалася стабільною та не залежала від частоти електричного струму в діапазоні 100–1000 кГц (рис. 3.20).

Внесення до 50 мл молозива 1,25 г поліфенольних сполук не впливало на електропровідність порівняно з чистим казеїном (рис. 3.20).



N	S/m, 280 kHz
1	0,3022 +0,02
2	0,3124+ 0,01

Рис. 3.20. Показники електропровідності пост-казеїнової фракції молозива у широкому діапазоні частот (А) та їх значення при частоті 280 kHz (В) наведені для контрольного варіанту (1) та для варіанту з внесенням до складу молозива поліфенольних сполук у кількості 1,25 г на 50 мл молозива (2). Представлено типову спектральну характеристику для серій зразків, а також середні значення та стандартні помилки при частоті 280 kHz.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що поліфенольні сполуки не формують стабільних комплексів із білками пост-казеїнової фракції молозива, або ж такі комплекси не впливають на показник електропровідності.

Це узгоджується з даними спектроскопічних характеристик, які підтверджують відсутність суттєвих змін у білковому складі та його оптичних властивостях (рис. 3.15).

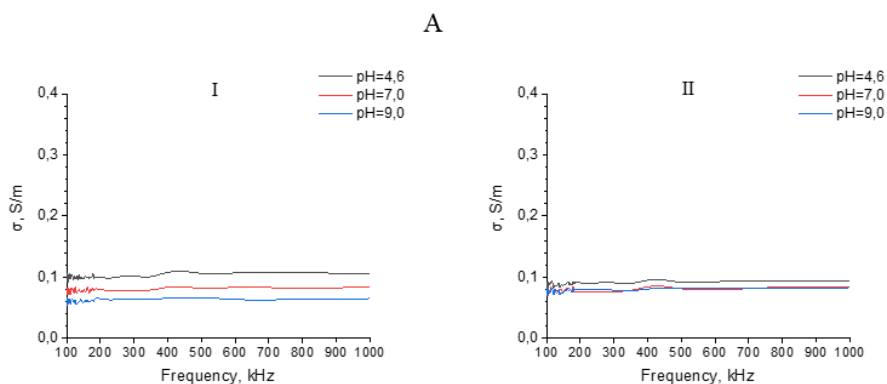
Як відомо, молекула казеїну в ізоелектричній точці не має заряду, а при збільшенні рН до 7,0, молекула казеїну набуває відносно невеликого негативного заряду, за рахунок депротонування СОО-груп, і внесенням у зразки невеликої кількості NaOH, що так само може вплинути на електропровідність розчину казеїну, порівняно з рН 4,6, коли казеїн не має заряду.

Було виявлено, невелике зменшення електропровідності розчину казеїну зі збільшенням рН до 7,0 та 9,0 відповідно на 24 та 48% порівняно зі значенням електропровідності при 4,6 за температури 20°C (рис. 3.21 А).

У тому випадку, якщо до молозива вносили ПФ, осаджували казеїн в ізоелектричній точці, а потім промивали його водою при рН 4,6; 7,0 і 9,0 при температурі 20°C, то відмінності в електропровідності зразків, яка виявлялася в чистому казеїні були відсутні (рис.3.21).

Можна припустити, що поліфенольні сполуки формують комплекси з казеїном, що проявляється у зникненні впливу рН на показники електропровідності порівняно з контрольним варіантом.

Цікавий результат отримали при дослідженні впливу високої температури (40°C) на електропровідність чистого розчину казеїну за різних значень рН (рис. 3.21).



pH	S/m, 280 kHz
4,6	0,1023 + 0,005
7,0	0,0779 + 0,002
9,0	0,0638+ 0,001

pH	S/m, 280 kHz
4,6	0,0914+ 0,004
7,0	0,0758 + 0,002
9,0	0,0793 + 0,002

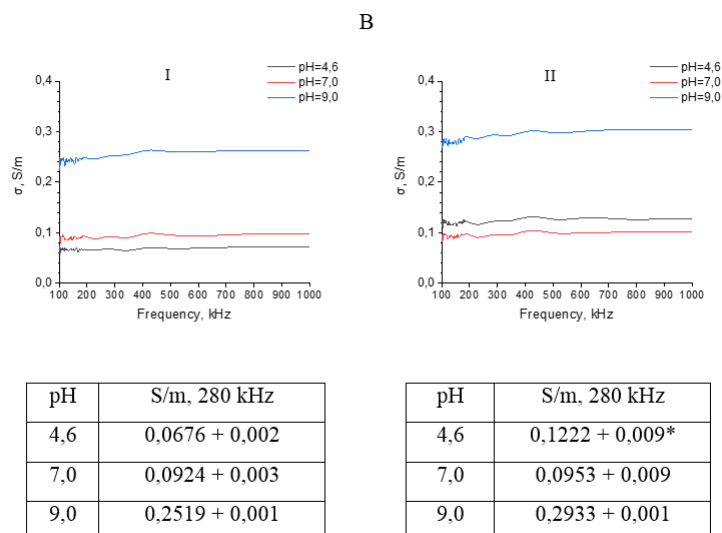


Рис. 3.21. Показники електропровідності контрольного зразка казеїну, який переходив у водний розчин після промивання осадженого казеїну в ізоелектричній точці (I), та показники електропровідності казеїну з поліфенольними сполуками (II). Промивання зразків проводили при температурі 20 °С (А) та 40 °С (В). У таблицях представлені середні значення електропровідності при частоті 280 kHz для відповідних контрольних варіантів та дослідних зразків з внесенням до складу молозива поліфенольних сполук у кількості 1,25 г на 50 мл молозива.

\* - відзначений варіант для якого  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Таким чином, підвищення температури розчину до 40 °С та рН до 9,0 супроводжувалося збільшенням електропровідності розчину чистого казеїну в 4 рази порівняно з температурою 20 °С (рис. 3.21, I, В та II, А). Однак, при температурі 40 °С для варіанта з рН 7,0 електропровідність збільшувалася лише на 19%, а при рН 4,6 навпаки зменшувалася на 34% порівняно з температурою 20 °С (рис. 3.21, I, В та II, А).

Однак найцікавішими виявилися зміни електропровідності при різних значеннях рН і при температурі 40 °С, коли до складу молозива до формування міцел казеїну вносили ПФ. Так, найбільше збільшення

електропровідності у присутності ПФ відбувалося при рН 4,6, вона збільшувалася на 80% порівняно з розчином чистого казеїну (рис. 3.21, П, В та П, А). Тоді як при рН 7,0 і 9,0 електропровідність не змінювалася в порівнянні з розчином чистого казеїну (рис. 3.21 П, В і П, А).

Таким чином, включення поліфенольних сполук до складу молозива супроводжується формуванням комплексів «казеїн-ПФ». Їхні структурні особливості визначаються температурою та рН середовища, а найбільш виражений ефект спостерігається при рН 4,6, що робить ці умови найбільш перспективними для отримання стабільних супрамолекулярних комплексів.

### **3.3.3. Визначення кількості хлорогенової кислоти у водно-спиртовому розчині**

Внесення 10 мкл отриманого зразка вуглецевих квантових точок (ВКТ) до 2 мл буферного розчину давало добре виражений пік флуоресценції (інтенсивність понад 4000 відносних одиниць) з максимумом поглинання при 457 нм, після збудження при довжині хвилі 363 нм (рис. 3.22 А). Інтенсивність флуоресценції ВКТ залежала від концентрації хлорогенової кислоти (рис. 3.22 В).

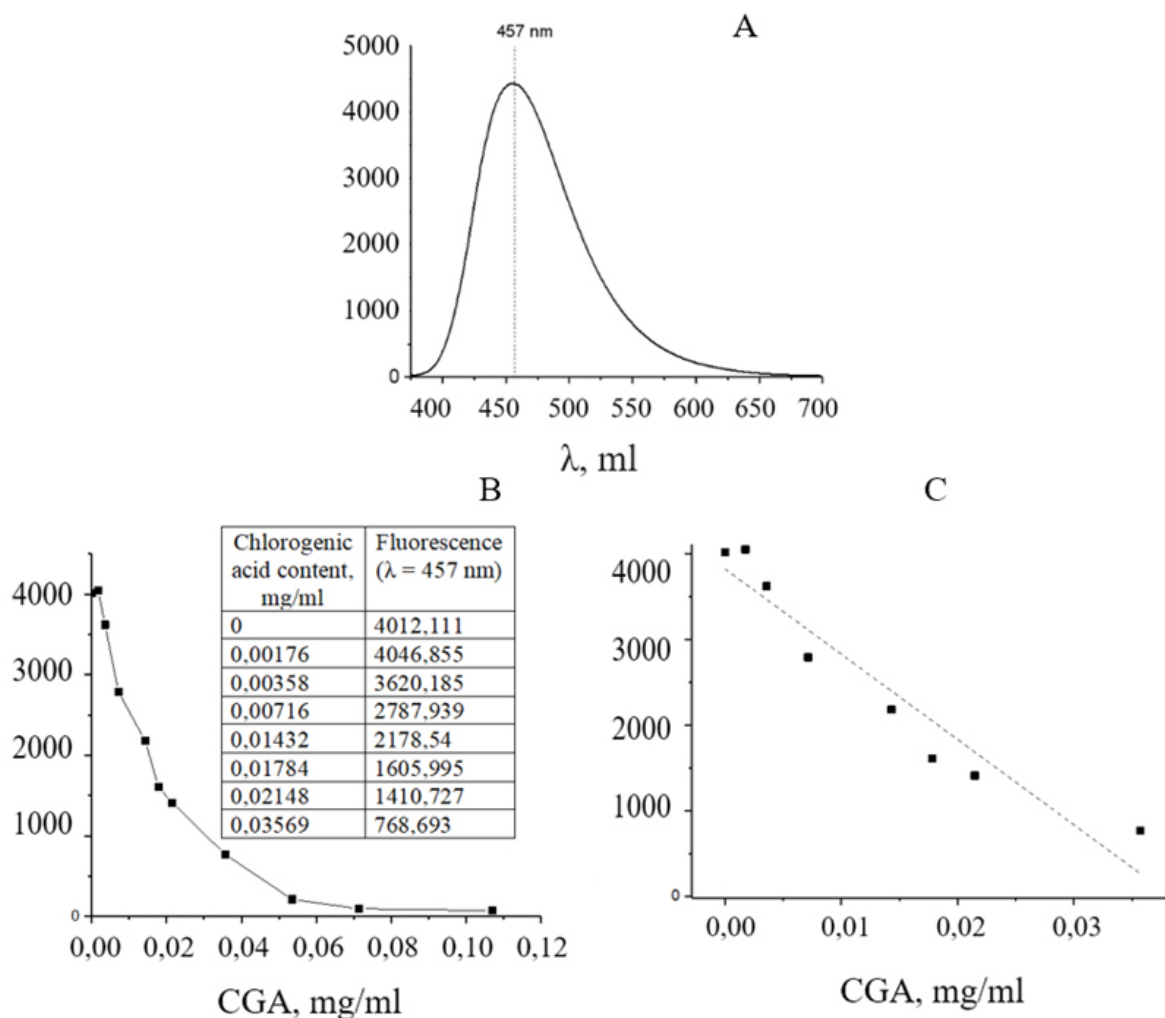


Рис. 3.22. Інтенсивність флуоресценції ВКТ у 10 мкл синтезованих зразків (А); калібрувальна залежність гасіння флуоресценції ВКТ від концентрації хлорогенової кислоти (В); лінійна ділянка процесу гасіння флуоресценції ВКТ хлорогеновою кислотою (С).

У діапазоні концентрацій від 0,00176 до 0,025 мг/мл хлорогенової кислоти спостерігається лінійна залежність між ступенем гасіння флуоресценції вуглецевих квантових точок та концентрацією кислоти у розчині (рис. 3.22 С). Це дозволяє проводити кількісне визначення ХК у зазначеному діапазоні.

Таким чином, ВКТ взаємодіють із молекулами хлорогенової кислоти, яка має поєднані зв'язки, і характер цих взаємодій може змінюватися залежно від концентрації. Для підтвердження цього були визначені спектри

флуоресценції комплексів CQD-ХК при збудженні довжиною хвилі 363 нм, що показали два взаємопов'язані ефекти: гасіння інтенсивності флуоресценції, усунення максимуму флуоресценції залежно від концентрації ХК (рис. 3.23 А, В).

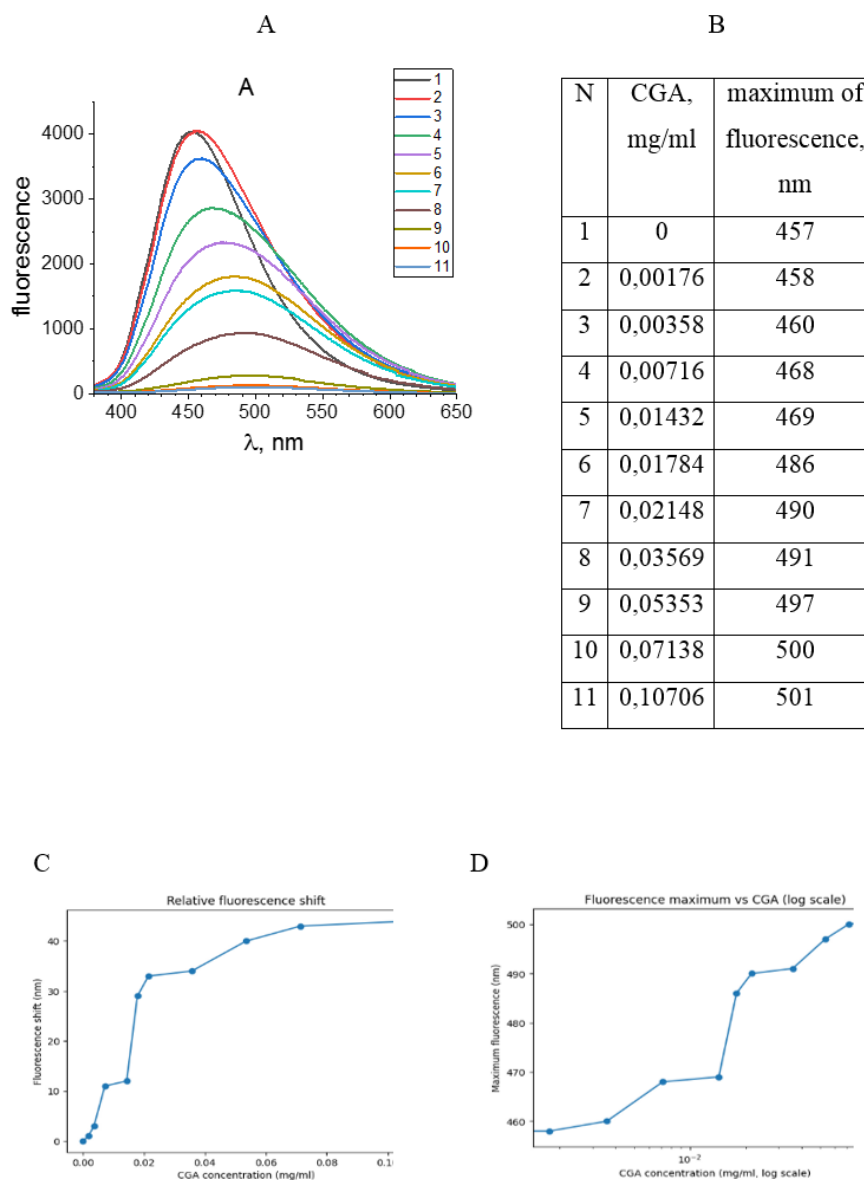


Рис. 3.23. Спектри флуоресценції комплексів ВКТ-ХК після збудження при 363 нм залежно від концентрації хлорогенової кислоти (А); значення максимумів поглинання для різних концентрацій ХК (В); відносна залежність зміщення максимумів флуоресценції від концентрації ХК порівняно з контрольними значеннями, які мають максимум при 457 нм для ВКТ (С); а також залежність у логарифмічному масштабі (D). Наведено

типовий спектр флуоресценції та середні значення, отримані з п'яти аналітичних визначень.

Аналіз зміщення максимуму флуоресценції ВКТ при різних концентраціях хлорогенової кислоти показав кілька ключових закономірностей.

1 – при максимальній концентрації ХК спостерігається батохромне зміщення на 44 нм (рис. 3.23 С), що є доказом формування комплексів ВКТ-ХК та перебудови їх електронних станів;

2 – залежність не є лінійною й складається з двох ділянок (рис. 3.23 С, D):

у діапазоні низьких концентрацій (0,0025–0,025 мг/мл) відбувається монотонне зміщення максимуму у довгохвильову область, що свідчить про високу чутливість вуглецевих квантових точок до ХК;

при подальшому збільшенні концентрації швидкість зміщення максимуму знижується, що може вказувати на кумулятивний ефект зв'язування та вихід на стаціонарний рівень флуоресценції.

Ці результати дозволяють припускати наявність кількох різних центрів зв'язування CQD з ХК.

Таким чином, ВКТ можуть бути використані як інформативний сенсор для визначення концентрації ХК та дослідження механізмів комплексоутворення між ХК і ВКТ. Враховуючи, що найбільший інтерес серед поліфенольних сполук становить саме ХК, на наступному етапі було визначено її вміст у супрамолекулярних комплексах «казеїн-ПФ» методом гасіння флуоресценції ВКТ.

### 3.3.4. Визначення вмісту хлорогенової кислоти у складі супромолекулярних комплексів «казеїном молозива-поліфенольні сполуки»

Було встановлено, що чистий казеїн при збудженні довжиною хвилі 363 нм, яка використовується для активації флуоресценції вуглецевих квантових точок, проявляє власну інтенсивну флуоресценцію з максимумом світіння при 525 нм. Це відрізняється від спектра ВКТ, для яких максимум становить 467 нм (рис. 3.24 А). Водночас поліфенольні сполуки, що містять хлорогенову кислоту, не мали власної флуоресценції при збудженні 363 нм (рис. 3.24 А).

У випадку внесення ВКТ до розчину казеїну інтенсивність та спектр флуоресценції відповідали характеристикам «чистих» ВКТ, із незначним зменшенням сигналу (рис. 3.24 В). При цьому власна флуоресценція казеїну на 525 нм зникла (рис. 3.24 В, спектральна крива 2). Це свідчить про дві важливі обставини:

1 – ВКТ не зв'язуються з молекулами казеїну або зв'язування є неспецифічним, що проявляється лише у слабкому гасінні флуоресценції;

2 – може мати місце конкуренція за поглинання збуджуючого світла (363 нм), коли основна його частина поглинається ВКТ, а казеїн не збуджується в їх присутності, тобто фактично «екранується» квантовими точками.

У випадку внесення ВКТ до розчину, що містив супромолекулярні комплекси «казеїн-ПФ» з хлорогеновою кислотою, спостерігалось добре виражене гасіння флуоресценції залежно від концентрації (рис. 3.24, спектральні криві 3, 4, 5). При цьому, аналогічно до зразків із ХК, відбувалося батохромне зміщення максимуму флуоресценції (рис. 3.24, спектральні криві 3, 4, 5).

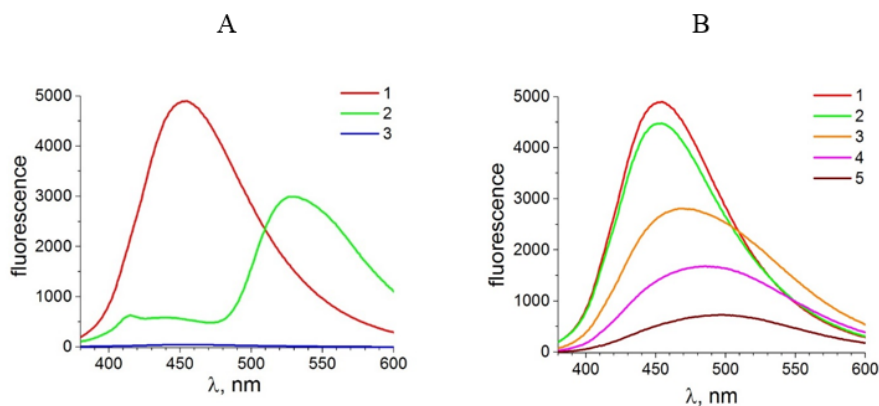


Рис. 3.24. А – інтенсивність флуоресценції вуглецевих квантових точок після збудження при довжині хвилі 363 нм, з максимумом при 457 нм (1); флуоресценція чистого казеїну (без внесення ВКТ) після збудження при тій самій довжині хвилі, з максимумом при 525 нм (2); відсутність сигналу від поліфенольних сполук після збудження при 363 нм без внесення ВКТ (3). В – інтенсивність флуоресценції ВКТ (1); інтенсивність флуоресценції ВКТ у присутності казеїну (2); інтенсивність флуоресценції супрамолекулярного комплексу «казеїн-ПФ» з ВКТ, що містив 5,25 мг/л ХК (3); інтенсивність флуоресценції комплексу «казеїн-ПФ» з ВКТ, що містив 10,5 мг/л ХК (4); інтенсивність флуоресценції комплексу «казеїн-ПФ» з ВКТ, що містив 21,0 мг/л ХК (5). Представлено типові спектри, отримані з п'яти незалежних визначень.

Таким чином, хлорогенова кислота утворює специфічні комплекси з синтезованими вуглецевими квантовими точками. Присутність казеїну не впливає на можливість визначення ХК, а застосування методу гасіння флуоресценції ВКТ забезпечує кількісне визначення її вмісту у супрамолекулярних комплексах «казеїн молозива – поліфенольні сполуки соняшникового шроту».

Зупиняючись на обговоренні отриманих результатів, слід зазначити, що концепцію формування «супрамолекулярних одиниць» у біологічних системах було запропоновано лауреатом Нобелівської премії Альбертом

Сент-Дьордї у 1960-х роках [186]. Він писав, що білкові структури взаємодіють одна з одною та утворюють супрамолекулярні одиниці. Така збірка супрамолекулярних одиниць, є «співробітництво водневих і гідрофобних зв'язків».

Фундаментальні дослідження механізмів самоскладання супрамолекулярних комплексів у біологічних системах стали основою сучасного, що активно розвивається нового напрямку біоінженірингу. За останні 5 років опубліковано досить велику кількість оглядів та експериментальних робіт, які обґрунтовують перспективність цього підходу у вирішенні різних питань біомедицини [187-189]. Успіх у розвитку цього напрямку залежить від цілого ряду причин і, зокрема, від підбору партнерів, визначення їх характеристик та експериментальної оцінки їхньої біологічної дії.

Результати цієї роботи вперше показали: 1 – казеїн молозива та поліфенольні сполуки соняшникового шроту є вдалим поєднанням при отриманні супрамолекулярних комплексів біомедичного призначення; 2 – супрамолекулярні комплекси «казеїн-ПФ» чутливі до змін рН та температури середовища, що вказує на участь у їх формуванні не ковалентних (слабких) зв'язків між партнерами; 3 – модифікований спосіб визначення вмісту хлорогенової кислоти, яка включена до складу супрамолекулярних комплексів, на основі простого та ефективного методу гасіння флуоресценції вуглецевих квантових точок та показано, що на її частку припадає до 15 % від складу поліфенольних сполук, що входять до складу супрамолекулярних комплексів.

Зупиняючись на обговоренні цих положень, слід зазначити, що молозиво корів є унікальним природним продуктом з широким спектром біологічної активності. Необхідно відзначити, що вміст загального білка в коров'ячому молозиві в перші дві доби після отелення дуже високий і становить від 15% до 25%, що значно перевищує рівень білка в зрілому

молоці, на частку якого припадає 3,2–3,6%. Вся різноманітність білків молозива може бути умовно розділена на казеїн та пост-казеїнову фракцію або сироваткову фракцію. Раніше було показано, що пост-казеїнова фракція молозива, до складу якої входять імуноглобуліни та низькомолекулярні пептиди [62,190] забезпечувала корекцію функціональної активності редокс-системи у тварин з фіброзом печінки, брала участь у регуляції активності імунної системи як наслідок уповільнювала швидкість розвитку експериментального фіброзу печінки.. Зміна білкового складу пост-казеїнової фракції молозива після внесення в молозиво ПФ соняшникового шроту, яка показано в цій роботі (рис. 3.15), може супроводжуватися модифікацією біологічної активності цієї фракції білків. Подальші дослідження можливості використання пост-казеїнової фракції білків молозива, до складу якого включені ПФ, становлять самостійний практичний інтерес. Отже, при використанні молозива з метою отримання супрамолекулярних комплексів «казеїн-ПФ» має великі переваги в порівнянні з молоком, оскільки дозволяє додатково отримувати цінні білки сироваткові.

Не менший інтерес викликає і використання казеїну молозива як потенційний носій (молекулярний контейнер) біологічно активних субстанцій, у тому числі і поліфенольних сполук. По-перше, у перші дві доби після отелення кількість казеїну в молозиві багаторазово перевищує кількість казеїну в зрілому молоці. По-друге, розмір міцел казеїну в молозива менше (в середньому 42 нм), тоді як у молоці близько 100 нм. Білки у складі міцел молозива менш щільно «упаковані», порівняно з міцелами молока, що може забезпечувати більш надійне включення партнерів до їх складу. Така структурна організація міцел молозива забезпечує швидший гідроліз у травному тракті і як наслідок більш ефективного засвоєння компонентів, порівняно з казеїновими міцелами молока. Важливою перевагою казеїнових міцел казеїну молозива є й те, що

вони беруть активну участь у функціонуванні мікрофлори кишківника [159, 188, 190]. Поряд з цим, казеїн молозива може розглядатися як «додатковий продукт» при комплексній переробці молозива, зокрема при отриманні з молозива низькомолекулярних білків, факторів росту та ліпідів та його вартість відносно невелика [62,159, 190].

Як уже зазначалося, шрот соняшника є побічним продуктом при отриманні олії, при цьому він надзвичайно багатий на поліфеноли, які містять відносно велику кількість хлорогенової кислоти. Біологічна дія хлорогенової кислоти відносно добре вивчена [191] і її включення до продуктів біомедичного призначення є добре обґрунтованим та перспективним.

При розгляді можливих механізмів формування супрамолекулярних комплексів між казеїном та поліфенольними сполуками необхідно враховувати особливості структурної організації казеїнових міцел, які забезпечують реалізацію механізмів самоскладання. Формування міцел казеїну відбувається поетапно : 1 – спочатку синтезуються поліпептидні ланцюги  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - та  $\kappa$ -казеїнів; 2 – після досягнення необхідної концентрації всіх чотирьох білкових фракцій за участю іонів кальцію та на основі принципу самоскладання формуються дрібні субміцели із середнім діаметром близько 10 нм, які характеризуються різним співвідношенням казеїнових фракцій; 3 – надалі за участю колоїдного фосфату кальцію ( $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ ) субміцели самоорганізуються у великі міцели, середній діаметр яких може коливатися від 20 до 300 нм. Такі міцели являють собою складний комплекс казеїнату кальцію з колоїдним фосфатом кальцію [192].

Необхідно відзначити, що стійкість казеїнових міцел забезпечується наявністю заряду у білків і як наслідок формуванням гідратної оболонки навколо білкових комплексів. Стабільність білкових міцел казеїну здебільшого залежить від особливостей гідратної оболонки. У тому випадку, якщо в середовище з міцелами казеїну внести відносно велику

кількість поліфенольних сполук, у тому числі і хлорогенову кислоту, яка в фізіологічних умовах має сумарний негативний заряд і дуже добре розчинна у воді, то вона здатна модифікувати гідратну оболонку навколо міцел казеїну і проникати у вільні «кишені» таких міцел, що може супроводжуватися формуванням водневих зв'язків між поліфенолами і білками [193].

Як відомо, на молекули  $\beta$ -казеїну припадає найбільша частка серед інших ізоформ казеїну, що входять до складу міцел. Використання молекулярного докінгу показало можливість наявності 9 потенційних центрів локалізації хлорогенової кислоти в молекулах  $\beta$ -казеїну (рис. 3.25).

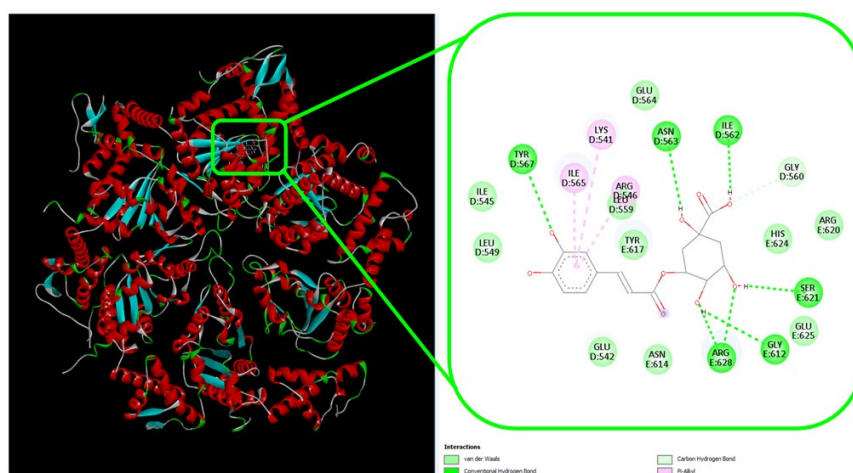


Рис. 3.25. Найбільш імовірні ділянки зв'язування хлорогенової кислоти з молекулами бета-казеїну. Виділено ділянку Mode 1, котрій характерна найбільш стабільна конфігурація зв'язування.

Усі центри зв'язування хлорогенової кислоти мали різну афінність (табл.1). Найбільш стабільна конфігурація (Mode 1, рис. 3.25) характеризується мінімальною енергією Гіббса, яка становила -8.66 ккал/моль. Розрахована на основі цих даних константа інгібування (K<sub>i</sub>) складала 0.44 мкмоль, що свідчить про формування міцного та термодинамічно стійкого комплексу. Інші 8 конформаційних варіантів

зв'язування мали нижчу афінність, що варіюється в діапазоні від -7.99 до -7.04 ккал/моль та високі константи інгібування (табл. 3.6).

**Таблиця 3.6**

Значення афінності, константи інгібування та межі середньоквадратичних відхилень для 9 центрів зв'язування хлорогенової кислоти як ліганда з казеїном

Конформаційний варіант зв'язування (ligand's mode)	Афінність, ккал/моль	Кі, мкмоль	Нижня межа середньоквадратичного відхилення від найкращого варіанта зв'язування ліганда	Верхня межа середньоквадратичного відхилення від найкращого варіанта зв'язування ліганда	Молекулярна маса, Да
1	-8.6611	0.448099	0	0	0.0
2	-7.99928	1.36926	2.03182	4.14419	0.0
3	-7.99408	1.38134	60.1871	62.0961	0.0
4	-7.79927	1.91908	59.1178	62.0554	0.0
5	-7.61689	2.61086	58.7094	61.6946	0.0
6	-7.44509	3.48906	60.1977	63.8516	0.0
7	-7.3959	3.79113	33.6725	36.6369	0.0
8	-7.29641	4.48429	59.7663	62.6577	0.0
9	-7.04445	6.86094	60.1818	62.6301	0.0

На підставі геометрії зв'язування найбільш стабільного положення (Mode 1) можна вважати, що фіксація хлорогенової кислоти в білковій порожнині забезпечується складною мережею взаємодій. Основний внесок у стабілізацію роблять класичні водневі зв'язки з амінокислотними залишками TYR D:567, ASN D:563, ILE D:562, SER E:621, ARG E:628 і GLY

E:612. Гідроксильні групи ліганду виступають у ролі ключових вузлів, що формують міцні контакти з амінокислотними залишками.

Додаткова стабілізація супрамолекулярного комплексу досягається за рахунок гідрофобних взаємодій типу Pi-Alkyl із залишками ILE D:565, LYS D:541 та ARG D:546. Також спостерігається стекінг-взаємодія (Amide-Pi Stacked) із залишком LEU D:559.

Ці результати добре узгоджуються із дослідженнями інших авторів [194]. Важливо відзначити, що реалізація ефективності комплексоутворення залежатиме від: 1 – концентрації компонентів; 2 – температури та рН середовища; 3 – розміру міцел, «щільності упаковки» міцел казеїну, які залежать від співвідношення білкових фракцій, що входять до складу міцел. Незважаючи на те, що кількість к-казеїну у складі міцел значно менша в порівнянні з  $\alpha$ S1-,  $\beta$ -фракцій він займає ключове положення у формуванні особливостей структур міцел [195]. Важливо, що якщо у складі міцел молока на к-казеїн припадає загалом близько 10-15% від загальної кількості казеїнів, то в молозиві перших двох удоїв його у 2-3 разу його більше [64]. По-перше, він забезпечує електростатичну стабілізацію міцел. Його молекула має сильно гідратований "хвіст" (глікомакропептид), який виступає назовні, створюючи негативно заряджений "ворс". Це заважає міцелам злипатися між собою. По-друге, він обмежує ріст міцел, тобто, визначає їх розмір. Як тільки поверхня субміцели покривається цією фракцією білка, зростання міцел припиняється. Цим пояснюється значно менший розмір казеїнових міцел у молозиві порівняно з молоком. У разі вибіркового гідролізу казеїну такими ферментами як хімозин, міцели втрачають стабільність і формують потік (утворення сиру). Отже, така структурна особливість міцел казеїну молозива забезпечує їм «підвищену ємність» порівняно з міцелами молока, за рахунок більш рихлої структури та меншого розміру. При більшій площі

поверхні міцелл не тільки може збільшуватись адсорбція поліфенолів, але й змінюватись властивості отриманих супрамолекулярних комплексів.

Використання методу визначення електропровідності суспензії супрамолекулярних комплексів (рис. 3.21) показало, що молекули води, а точніше гідратні оболонки, які формуються навколо комплексів, відіграють важливу роль в їх стабілізації. Зміна електропровідності суспензій супрамолекулярних комплексів при зміні температури супроводжується перебудовою водневої сітки води, а як відомо іони  $H^+$  та  $OH^-$  забезпечують електропровідність, за так званим естафетним механізмом (механізм Гроттуса) [196]. Отримані результати дозволяють припускати, що гідратні оболонки навколо міцел казеїну та супрамолекулярних комплексів розрізняються і це свідчить, з одного боку, про відмінності у структурних особливостях між міцелами казеїну та супрамолекулярними комплексами, а з іншого, що вони можуть відрізнятися і за біологічною активністю. Дослідження цих важливих аспектів триває нині. Важливим аспектом цих досліджень є розробка простого та ефективного методу визначення таких добре вивчених сполук як хлорогенова кислота, яка має цілу низку унікальних властивостей.

Отримання супрамолекулярних комплексів і дослідження можливості їх використання у фармації, медицині, харчових технологіях, у розробці біосенсорів та інших галузях є одним із перспективних напрямів сучасної біоінженерії. Характеристика та біологічна активність таких комплексів залежить від структурно-функціональних особливостей партнерів, що входять до складу комплексу.

Мета дослідження : отримання та характеристика супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками соняшникового шроту, багатими на хлорогенову кислоту, а також модифікація флуоресцентного методу визначення хлорогенової кислоти у цих комплексах.

Методи дослідження включали синтез супрамолекулярних комплексів, який здійснювали на основі принципу самоскладання; експериментальні методи: УФ-спектроскопію, дослідження електропровідності та флуоресценції, а також моделювання молекулярної взаємодії з використанням молекулярного докінгу.

Результати : модифікували метод гасіння флуоресценції вуглецевих квантових точок хлорогеновою кислотою, показали високу чутливість методу та можливість його використання для її визначення у складі комплексів із казеїном. Показали, що казеїн молозива та поліфеноли соняшникового шроту є вдалими партнерами при отриманні супрамолекулярних комплексів. Ці комплекси підтримуються насамперед класичними водневими зв'язками у їх додатковій стабілізації беруть участь гідрофобні і стекінгові взаємодії між молекулами казеїну та хлорогеновою кислотою, на частку якої припадає до 15% від інших поліфенольних сполук. Методом молекулярного докінгу показано, що між казеїном та хлорогеновою кислотою може бути утворено до 9 центрів зв'язування, які мали різну афінність. Обґрунтували, що використання міцел казеїну молозива має ряд переваг у порівнянні з казеїном молока, що пов'язано з особливостями казеїнових міцел (менший розмір і більша ємність) і крім цього, з молозива можна додатково отримувати комплекси поліфенольних сполук з численними білками пост-казеїнової фракції, які проявляла високу біологічну активність та забезпечувала комплексну переробку молозива.

На закінчення зауважимо, що розроблений спосіб отримання супрамолекулярних комплексів «казеїн молозива-поліфеноли соняшникового шроту» до складу яких входить до 13% хлорогенової кислоти можуть знайти застосування як продукти функціонального харчування.

### **Висновок до розділу 3.3:**

Обґрунтовано доцільність отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками соняшникового шроту з метою корекції змінених метаболічних станів при фіброзі печінки за допомогою функціональних продуктів харчування. Розроблено технологію отримання супрамолекулярних комплексів «Казеїн-поліфеноли». Доведено, що ці комплекси утримуються переважно водневими зв'язками, які виявляли чутливість до температури. Вперше використано метод зміни електропровідності водних розчинів супрамолекулярних комплексів для їх фізико-хімічних характеристик. Синтезовано квантові точки на основі фенілефрину та розроблено метод флуоресцентного гасіння квантових точок хлорогеновою кислотою. Показано пряму залежність ефективності гасіння флуоресценції у широкому діапазоні концентрації хлорогенової кислоти (від 0,00176 до 0,025 мг/мл). Встановлено, що до складу поліфенольних сполук соняшникового шроту входить до 15% хлорогенової кислоти. Використання молекулярного докінгу показало можливість наявності 9 потенційних центрів локалізації хлорогенової кислоти в молекулах  $\beta$ -казеїну. Усі центри зв'язування хлорогенової кислоти мали різну афінність. Найбільш стабільна конфігурація характеризувалася мінімальною енергією Гіббса, яка становила -8.66 ккал/моль.

### 3.4. Оцінка біологічної дії супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки», збагачені хлорогеновою кислотою на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки

#### 3.4.1. Дослідження впливу супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки» на деякі морфо-фізіологічні показники тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки

Оцінку біологічної активності супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою» проводили на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки. Для цього було використано 15 дорослих самців щурів віком 6–8 місяців, яких розподілили на три групи: контрольну (3 особини), групу порівняння (4 особини з індукованим фіброзом) та дослідну (8 особин). У дослідній групі після завершення другого циклу ін'єкцій сірчаною кислотою міді тваринам щоденно вводили *per os* комплекси «К-ПФ» у дозі 1,5 мг/100 г маси тіла за хлорогеновою кислотою. Після завершення експериментального циклу всі тварини були декапітовані відповідно до біоетичних норм.

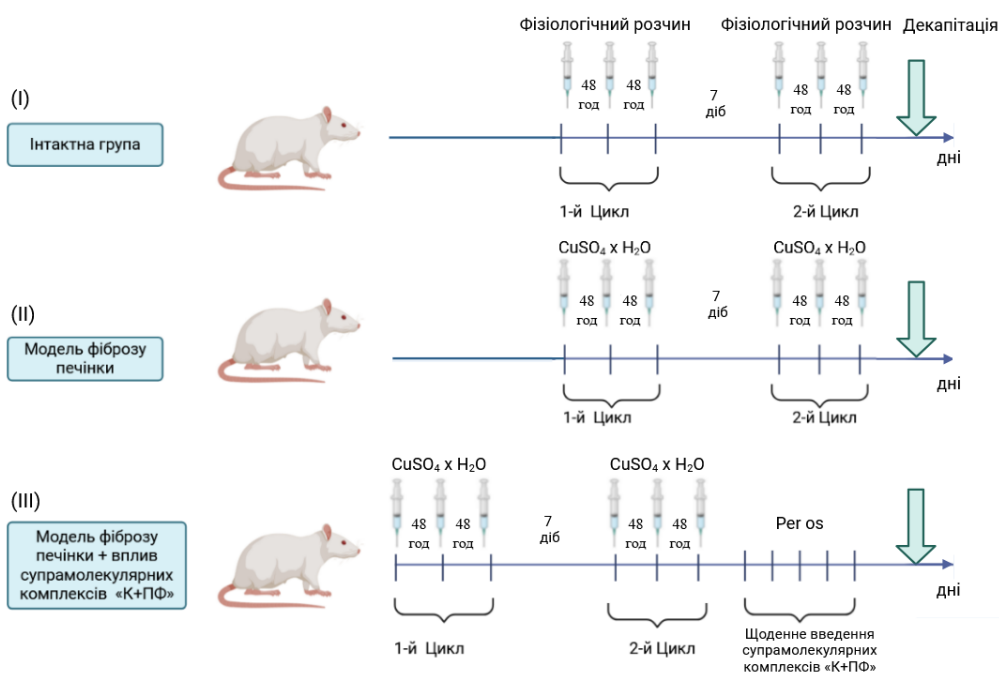


Рис. 3.26. Схема, яка демонструє підготовку трьох експериментальних груп тварин: контрольна група (3 щури), отримували

два цикли введення фізіологічного розчину по 1 мл/100 г маси, кожен цикл складався з трьох послідовних внутрішньочеревних введеннь з інтервалом між введеннями 48 годин, а інтервал між самими циклами введеннь становив 7 діб; друга група – модель фіброзу (4 щури), замість фізіологічного розчину отримувала, за тією ж схемою отримували розчин міді сірчанокислої у дозуванні 1 мг/100 г маси тіла; третя група (8 щурів), так само отримувала, за тією ж схемою, сірчанокислу мідь, після чого їм щодня вводили *per os* супрамолекулярні комплекси К-ПФ у дозуванні 1,5 мг/100 г маси тіла в розрахунку на хлорогенову кислоту.

Багаторазові введення сірчанокислої міді у дозі 1 мг/100 г маси тіла (за схемою, наведеною на рис. 1) призводили до формування навколо печінки щільної сполучної тканини, яка утворювала спайки та змінювала архітектуру її долей, перетворюючи їх на єдиний асоціат (рис. 3.27 А).

Важливо, що у таких тварин селезінка також опинялася оточеною сполучною тканиною й фактично «об'єднувалася» з печінкою в єдине утворення (рис. 3.27 В).

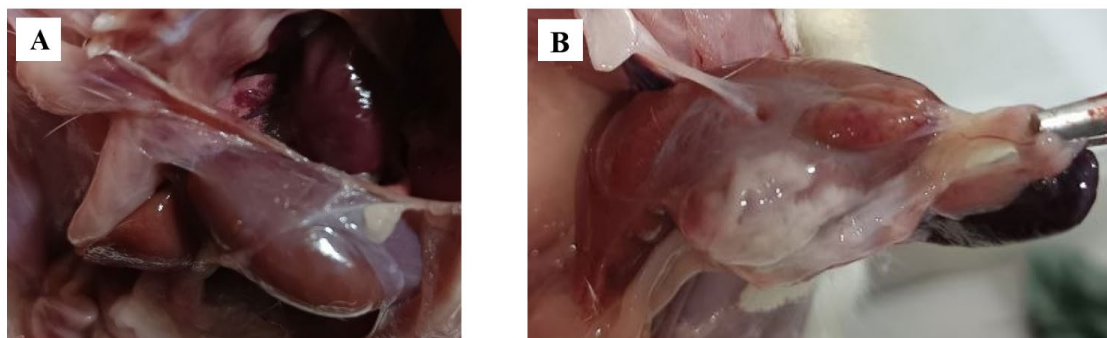


Рис. 3.27. Фото, яке демонструє формування сполучнотканинних спайок між лопатями печінки : у щурів печінка має 4 незалежні лопасті (А) та зміну селезінки (В), у щурів після двох послідовних циклів введення їм сірчанокислої міді у дозуванні 1 мг/100 г маси тіла, як описано на рис. 3.26

Отже, у тварин другої та третьої експериментальних груп було зафіксовано морфологічні зміни печінки та селезінки, що свідчить про розвиток фібротичних змін.

У щурів із Си-індукованим фіброзом печінки (друга та третя групи) до введення супрамолекулярних комплексів «К-ПФ» спостерігали втрату маси тіла після першого циклу введення сірчаноокислої міді протягом першої доби, з подальшим відновленням (рис. 3.28). Після другого циклу введення міді знову відзначалося зниження маси тіла, однак менш виражене порівняно з першим циклом інтоксикації (рис. 3.28).

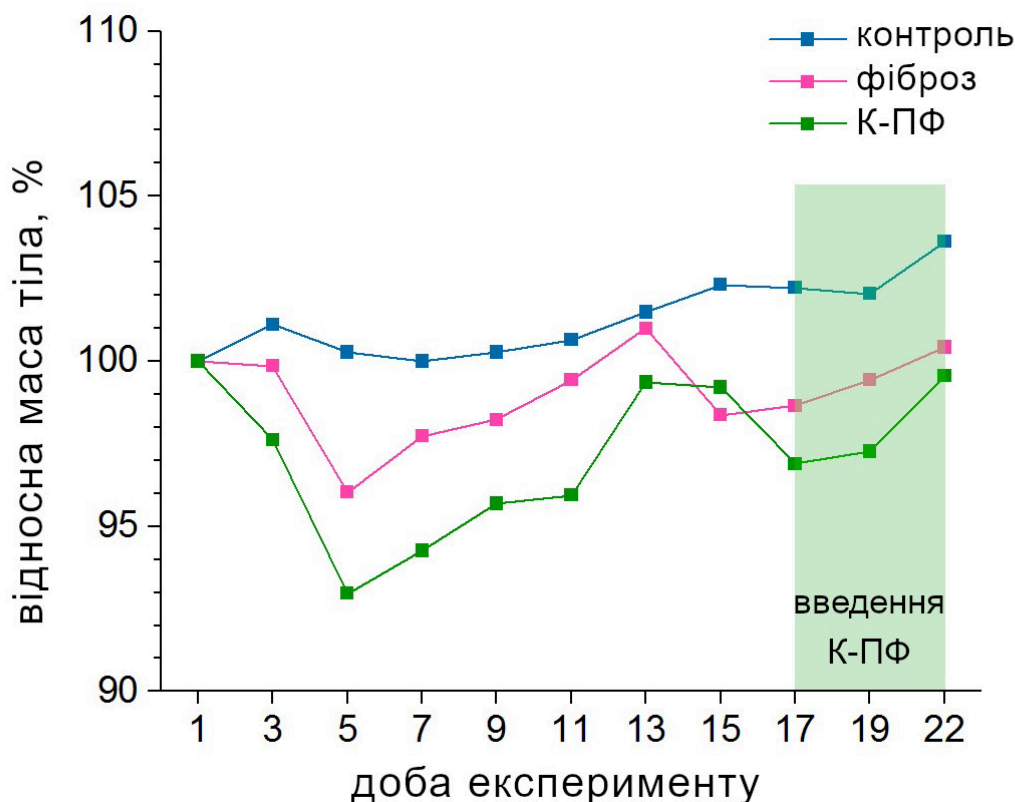


Рис. 3.28 Динаміка маси тіла наведена для трьох груп щурів: контрольної (контроль), групи з двома циклами інтоксикації сірчаноокислою міддю (фіброз), та групи з Си-індукованим фіброзом печінки, якій після інтоксикації протягом 5 днів вводили комплекси «К-ПФ» (позначена як К-ПФ).

Введення супрамолекулярних комплексів «К-ПФ» дослідній групі сприяло помірному прискоренню відновлення маси тіла порівняно з тваринами, які не отримували ці комплекси (рис. 3.28).

Таким чином, інтоксикація сірчаною кислотою міддю супроводжувалася втратою маси тіла та морфологічними змінами печінки. При цьому відносна маса печінки у щурів після введення міді залишалася на рівні контролю (табл. 3.7). Водночас маса селезінки була збільшена на 40 % порівняно з контролем, а дія супрамолекулярних комплексів «К-ПФ» додатково підвищувала її масу ще на 26 % (табл. 3.7).

**Таблиця 3.7**

Відносна маса печінки та селезінки у контрольних щурів, тварин із фіброзом печінки та у групі з фіброзом після 5-денного введення комплексів «К-ПФ»

Група	Маса печінки, % від загальної маси	Маса селезінки, % від загальної маси
Контроль	3,52 ± 0,10	0,27 ± 0,058
Фіброз	3,63 ± 0,07	0,38 ± 0,035*
ХК	3,75 ± 0,14	0,48 ± 0,042 **

Представлені середні значення та їх стандартні похибки.

\* -позначені варіанти для яких  $P < 0.05$  у порівнянні з контролем, а

\*\* -варіанти для яких  $P < 0.05$  у порівнянні з групою фіброзу печінки.

На підставі отриманих морфо-фізіологічних показників можна зробити висновок, що багаторазові послідовні введення сірчаною кислотою міді експериментальним тваринам за схемою (рис. 3.26) супроводжувалися розростанням сполучної тканини навколо печінки та селезінки, тимчасовою втратою маси тіла з подальшим її відновленням, а також збільшенням маси селезінки.

### **3.4.2. Дослідження впливу супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки» на кількість імунокомпетентних клітин у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки**

Такі зміни маси селезінки свідчать про активацію імунної системи у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.

Визначення кількості імунокомпетентних клітин у кровообігу показало збільшення загальної кількості лейкоцитів на 25 % порівняно з контролем (рис. 3.29). При цьому спостерігалися значні індивідуальні відмінності, що зумовлювало високу варіабельність показника.

Кількість лімфоцитів у щурів із фіброзом була більшою на 23 % відносно контрольної групи, тоді як рівень моноцитів та гранулоцитів зростав відповідно на 27 % та 40 % (рис. 3.29).

У випадку, коли щури з фіброзом печінки протягом 5 днів отримували супрамолекулярні комплекси «К-ПФ», кількість імунокомпетентних клітин у їхньому кровообігу зменшувалася відповідно на 24 %, 27 % та 34 % порівняно з групою порівняння. Ці показники повністю відповідали рівням контрольної групи щурів (рис. 3.29).

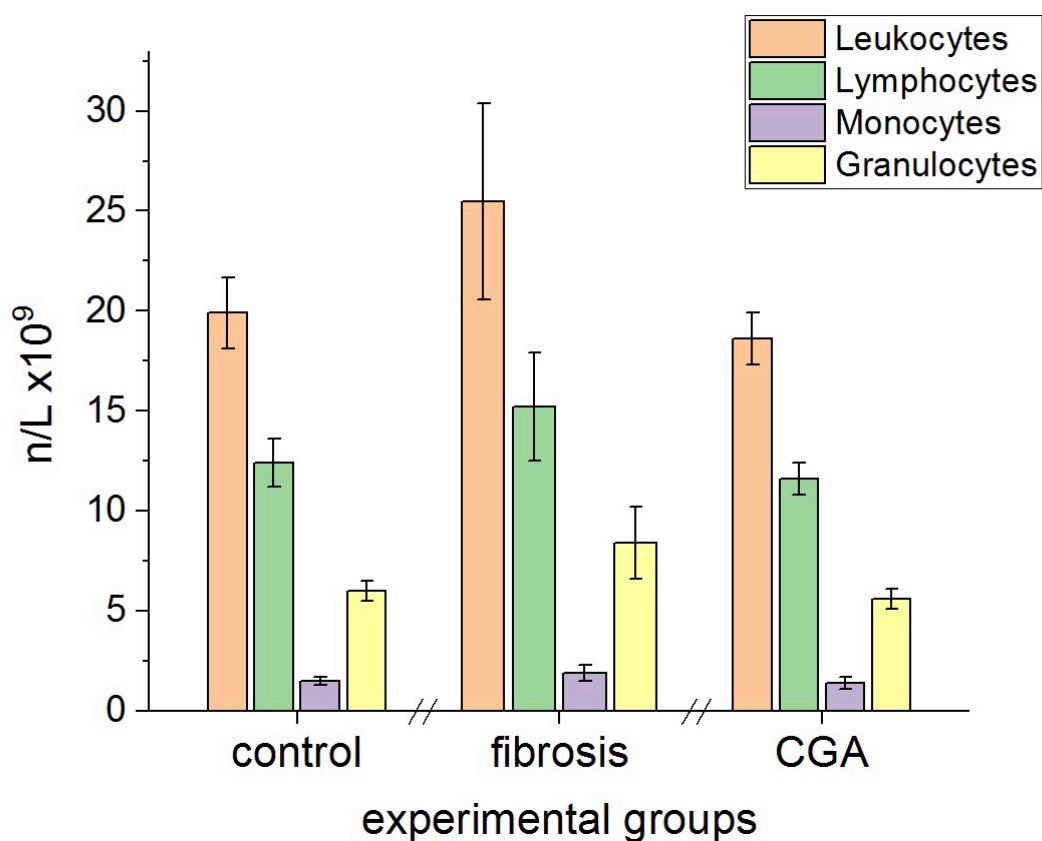


Рис. 3.29. Загальна кількість лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів у кровообігу наведена для трьох груп щурів: контрольної (Control), групи з фіброзом печінки (Fibrosis) та групи з фіброзом, які протягом 5 днів щоденно отримували супрамолекулярні комплекси «К-ПФ» у дозі 1,5 мг/100 г маси тіла за хлорогеновою кислотою (CGA). Подано середні значення та їх стандартні похибки (табл. 3.8).

Необхідно відзначити, що варіабельність кількості імунокомпетентних клітин, тварин з фіброзом печінки була в 2-3 рази більш вираженою порівняно з контрольною групою та групою тварин, які отримували хлорогенову кислоту (рис. 3.29), що не показувало статистично достовірної різниці між експериментальними групами тварин.

Отже, супрамолекулярні комплекси «К-ПФ», збагачені хлорогеновою кислотою, проявляють помірну протизапальну дію на моделі

Cu-індукованого фіброзу печінки. Це дозволяє розглядати їх як перспективну субстанцію для створення функціональних продуктів харчування, спрямованих на профілактику фіброзів, індукованих дією важких металів.

### 3.4.3. Дослідження впливу супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні сполуки» на деякі біохімічні показники у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки

Як відомо, печінка відіграє ключову роль у білковому обміні, який може змінюватися при патологіях. На моделі Cu-індукованого фіброзу печінки загальна кількість білка та рівень альбуміну у сироватці крові достовірно не відрізнялися від контрольної групи (табл. 3.8). Введення супрамолекулярних комплексів «К-ПФ» також не впливало на ці показники, їх рівень залишався у межах норми, що можна оцінювати як позитивний ефект.

Водночас у групі щурів із фіброзом відзначалася висока варіабельність кількості білка, що свідчить про значні індивідуальні відмінності між тваринами. У контрольній групі та у щурів із фіброзом, які отримували комплекси «К-ПФ», таких коливань не спостерігалось.

**Таблиця 3.8.**

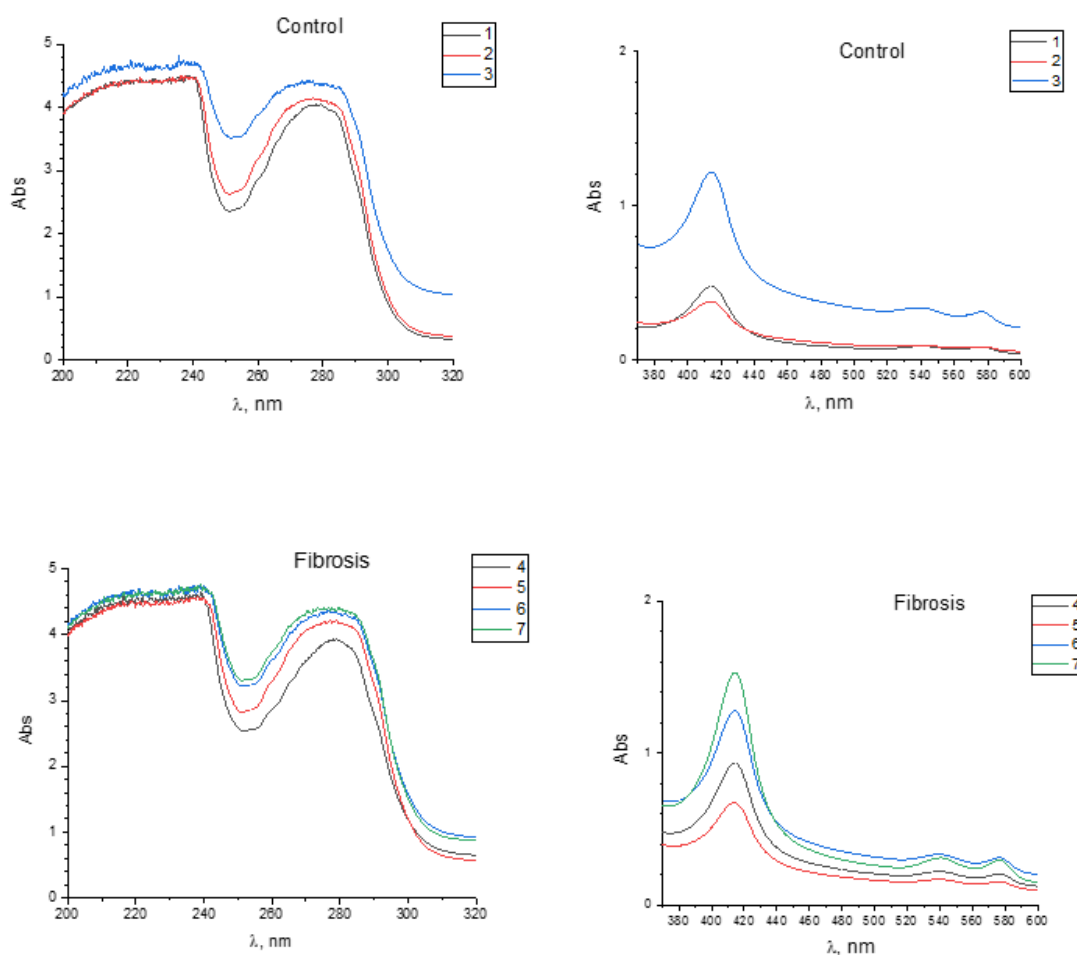
Вміст загального білка та альбуміну у сироватці крові щурів контрольної групи, тварин із фіброзом печінки та щурів із фіброзом після 5-денного введення комплексів «К-ПФ»

Експериментальні групи	Білок, г/л	Альбумін, г/л
Контроль	72,9 ± 1,01	34,6 ± 0,1
Фіброз	66,9 ± 4,26	32,3 ± 1,37

К-ПФ	$65,4 \pm 0,97$	$30,8 \pm 0,38$
------	-----------------	-----------------

Представлені середні значення та їх стандартні похибки

На відносну стабільність функціонування білоксинтезуючого апарату у досліджуваних групах експериментальних тварин вказують спектральні характеристики сироватки. Основний максимум поглинання компонентів сироватки припадає на діапазон 200–240 нм (рис. 3.30), що зумовлено наявністю великої кількості пептидних зв'язків.



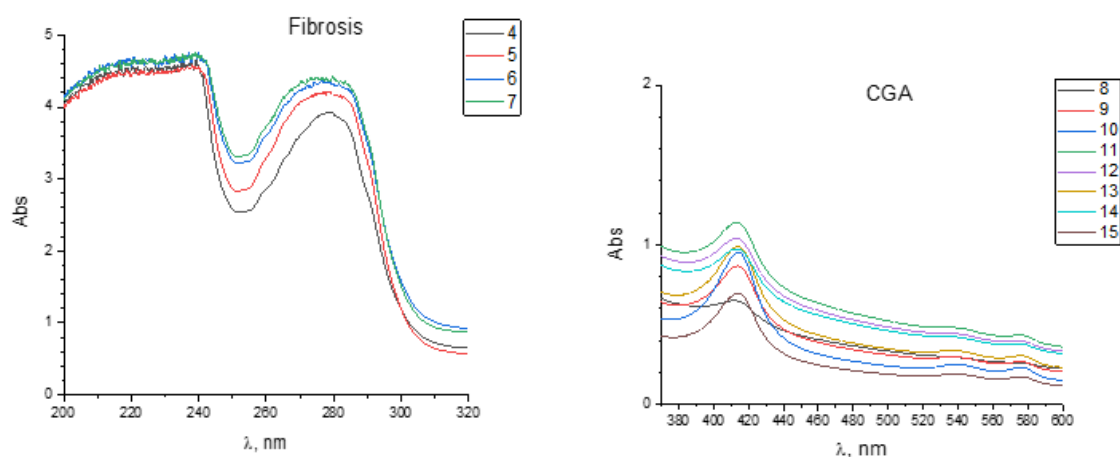


Рис. 3.30. Спектри поглинання сироватки крові щурів контрольної групи, тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки та групи з фіброзом після щоденного введення комплексів «К-ПФ» (CGA) у дозі 1,5 мг/100 г маси тіла.

Судячи з інтенсивності поглинання світла пептидними зв'язками, їх кількість залишалася подібною у всіх трьох досліджених групах тварин (рис. 3.30, табл. 3.9).

**Таблиця 3.9**

Середньогрупові значення максимумів поглинання сироватки крові щурів контрольної групи, тварин із фіброзом печінки та щурів із фіброзом після 5-денного введення комплексів «К-ПФ» (1,5 мг/100 г маси тіла за хлорогеновою кислотою)

Довжина хвилі, нм	контроль	фіброз	К-ПФ
220	4,490	4,554	4,601
250	2,867	3,010	3,271
280	4,158	4,201	4,246
410	0,666	1,056 *	0,897
540	0,174	0,258	0,338

580	0,154	0,230	0,297
-----	-------	-------	-------

Подано середні значення та їх стандартні помилки. \* -позначені варіанти для яких  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Необхідно відзначити наявність провалу на спектральних кривих при довжині хвилі 260 нм (рис. 3.30). Такий характер спектра є типовим для сироватки крові та пов'язаний із низьким вмістом нуклеїнових кислот.

У цьому діапазоні спостерігалися добре виражені індивідуальні відмінності між зразками, однак середньогрупові значення залишалися подібними, що підтверджує стабільність показника.

Виражений пік у спектрі поглинання при довжині хвилі 280 нм (рис. 3.30) свідчить про наявність значної кількості білків у сироватці крові, до складу яких входять ароматичні амінокислоти — передусім триптофан і тирозин, меншою мірою фенілаланін. Зміщення піку або його розширення у бік 290–300 нм пояснюється присутністю інших хромофорів, таких як сечова кислота, білірубін або пов'язані нуклеотиди. Кількісних відмінностей у цьому діапазоні спектра між досліджуваними групами не виявлено (рис. 3.30), що підтверджує стабільність білкового складу сироватки незалежно від наявності фіброзу печінки чи введення комплексів «К-ПФ».

Як видно з рис. 1, на спектральних кривих присутній чітко виражений пік при довжині хвилі 410 нм — так звана смуга Соре.

Поява цього піку в сироватці крові, де еритроцитів бути не повинно, свідчить про гемоліз частини еритроцитів під час забору або центрифугування крові, коли вільний гемоглобін виходить у плазму. Чим вищий цей пік, тим інтенсивніший гемоліз.

Виявлено, що площа цього піку в сироватці крові щурів із Си-індукованим фіброзом печінки була на 59 % більшою порівняно з контрольною групою (рис. 3.30, табл. 3.9). У випадку, коли тварини з

фіброзом отримували комплекси «К-ПФ», смуга Соре перевищувала контроль лише на 35 % (рис. 3.30, табл. 3.9).

Ці результати свідчать, що еритроцити щурів із фіброзом печінки більш схильні до гемолізу, який може реалізуватися як під час забору крові, так і під впливом відцентрового прискорення при центрифугуванні. Однак ці припущення потребують додаткового експериментального підтвердження.

Важливим показником стану метаболізму є вміст глюкози у сироватці крові. Виявлено, що рівень глюкози у всіх досліджуваних групах тварин залишався однаковим (табл. 3.10), що свідчить про відносну стабільність цього показника незалежно від наявності Си-індукованого фіброзу чи введення комплексів «К-ПФ».

**Таблиця 3.10**

Вміст глюкози, холестерину, тригліцеридів (ТГ) та креатиніну у сироватці крові трьох експериментальних груп тварин

Експеримент. групи	Глюкоза, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Креатинін, ммоль/л
Контроль	9,4 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,82 ± 0,31	57,4 ± 1,07
Фіброз	8,75 ± 0,85	1,5 ± 0,22	1,28 ± 0,15	58,97 ± 3,93
К-ПФ	8,90 ± 0,21	1,3 ± 0,1	1,44 ± 0,17	56,6 ± 1,83

Подано середні значення та їх стандартні похибки.

Ліпідний обмін, судячи з рівня холестерину та триацилгліцеридів у сироватці крові, залишався в межах норми як у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки, так і після введення комплексів «К-ПФ» (табл. 3).

Креатинін — продукт розпаду м'язового білка, який у нормі фільтрується та виводиться нирками. Його рівень використовується як показник ефективності функції нирок. Оскільки у щурів із фіброзом та після введення комплексів «К-ПФ» рівень креатиніну не відрізнявся від контролю, можна вважати, що функція детоксикації залишалася збереженою.

Активність печінкових ферментів-трансфераз (АЛТ, ГГТ, АСТ) традиційно використовують як діагностичні тести при фіброзі печінки, адже зміни їх активності відображають ступінь запалення та цитолізу. Водночас ці показники не є прямими маркерами ушкодження гепатоцитів чи стадій фіброзу:

при уповільненому фіброзі рівні АЛТ і АСТ можуть залишатися нормальними;

при активному запаленні (наприклад, гепатиті) ферменти підвищуються через руйнування клітин;

при переході в цироз активність може знижуватися через втрату функціонально активних клітин.

У дослідженні визначено, що активність ГГТ у сироватці крові щурів із Су-індукованим фіброзом та після введення комплексів «К-ПФ» залишалася в межах контрольних значень (табл. 3.11).

### Таблиця 3.11.

Активність гаммаглутаміламінотрансферази (ГГТ), аланінамінотрансферази (АЛТ) та лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові трьох експериментальних груп щурів

Експеримент. групи	ГГТ, МЕ/л	АЛТ, МЕ/л	ЛФ, МЕ/л
Контроль	3,316 ± 1,2	101,5 ± 4,32	497,3 ± 25,01

Фіброз	3,493 ± 0,79	63,4 ± 19,82*	525,3 ± 146,32
К-ПФ	4,193 ± 0,64	81,3 ± 3,04	592,9 ± 70,01

Подано середні значення та їх стандартні похибки.

\*-позначені варіанти для яких  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Активність АЛТ у сироватці крові щурів із Cu-індукованим фіброзом печінки була знижена на 38 % порівняно з контролем (табл. 3.11). Водночас варіабельність цього показника перевищувала відповідну у інших групах, що свідчить про значні індивідуальні відмінності у розвитку фіброзу.

У випадку, коли тварини з фіброзом отримували протягом 5 днів комплекси «К-ПФ», активність АЛТ достовірно не відрізнялася від контрольних значень (табл. 3.11).

Активність лужної фосфатази, яка є маркером холестазу, залишалася стабільною у всіх досліджуваних групах (табл. 3.11).

Отже, незважаючи на виражені морфологічні зміни тканини печінки, зумовлені формуванням сполучнотканинних спайок, функціональна активність печінки змінювалася незначно. Введення супрамолекулярних комплексів «К-ПФ», збагачених хлорогеновою кислотою, мало «м'яку» нормалізуючу дію на активність печінки.

#### **Висновок до розділу 3.4:**

Показали, що багаторазове послідовне внутрішньочеревне введення сірчанокислої міді (від 3 до 6 введень) у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 годин супроводжувалося зміною морфології печінки та збільшенням маса селезінки на 40 % порівняно з контролем. Виявили невеликі, але стійкі збільшення кількості імунокомпетентних клітин у кровообігу у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки (лейкоцити на 28%; лімфоцити на 22; моноцити на 26, а нейтрофіли на 40% порівняно з контролем). Якщо тварини з фіброзом печінки протягом 5 днів

щодня отримували супрамолекулярні комплекси «Казеїн-поліфеноли», збагачені хлорогеновою кислотою в дозі 2,7% за хлорогеновою кислотою, то кількість усіх досліджених імунокомпетентних клітин не відрізнялася від інтактного контролю. Це підтверджує дані щодо регуляторного впливу поліфенольних сполук на кількість імунокомпетентних клітин не тільки у вільній формі, а й формі супрамолекулярних комплексів, і цей вплив можна визначити як «м'яку» модифікуючу дію. Виявили виражений пік поглинання за довжини хвилі 410 нм., що відповідає так званій смузі Соре. Поява цього піку в спектральних кривих сироватці крові вказує на гемоліз частини еритроцитів під час забору крові або процесу центрифугування зразків. Виявили, що площа цього піку поглинання у сироватці крові щурів із Cu-індукованим фіброзом печінки була на 59 % більшою порівняно з сироваткою, отриманою у контрольній групі тварин. У тому випадку, якщо тварини з фіброзом печінки отримували комплекси «К-ПФ» протягом 5 днів, то відмінності в площі піку лінії Соре була близька до такого контролю. Ці результати вказують на те, що у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки могла мати місце деяка зміна структури мембран еритроцитів, що виявлялося в невеликому гемолізі еритроцитів при гідродинамічних навантаженнях. Такі зміни могли частково усунути у тварин з фіброзом, які отримували комплекси «казеїн-ПФ», тобто, мала місце невелика мембранотропна дія хлорогенової кислоти, якщо вона надходила в організм як продукт функціонального харчування. Виявили, що активність АЛТ у сироватці крові тварин із Cu-індукованим фіброзом була знижена порівняно з контролем на 38%, що вказує на інгібування активності цієї, але не інших трансфераз, зокрема ГГТ. Важливо зазначити, що варіабельність в активності АЛТ у сироватці крові у тварин з фіброзом була більш вираженою в порівнянні з іншими групами експериментальних тварин, що вказує на високий ступінь вираженості індивідуальних відмінностей у ступені прояву фіброзу. У випадку, якщо тварини з фіброзом

печінки отримували протягом 5 днів комплекси «К-ПФ», то активність АЛТ достовірно не відрізнялася від контрольного варіанту, що також підтверджує «м'яку» коригуючу дію на ряд гомеостатично змінених показників у тварин з фіброзом. Прийшли до висновку, що хлорогенова кислота як у чистому вигляді, так і у формі супрамолекулярних комплексів з казеїном молозива може бути використана як продукти функціонального харчування для формування зворотного ресетингу.

## ВИСНОВКИ

Показано, що поліфенольні сполуки, отримані із соняшникового шроту та збагачені хлорогеновою кислотою, є перспективним інгредієнтом продуктів функціонального харчування, які можуть усувати Cu-індукований фіброз печінки принаймні на початкових стадіях розвитку цієї хронічної патології.

1. Розроблено концепцію «експосом-індукованого метаболічного ресетингу» як темпорально-залежного, порогового та епігенетично фіксованого переключення на альтернативні метаболічні патерни, що переходять у стан домінування у випадку послідовних багаторазових дій факторів експосом.

2. Доведено, що зміна балансу міді в біологічних системах є одним із фундаментальних механізмів регуляції метаболізму: зміщення балансу у бік збільшення шляхом багаторазових послідовних введень у організм експериментальних тварин сульфату міді в дозі 1 мг/100 г маси супроводжується розвитком Cu-індукованого фіброзу, який є одним з альтернативних метаболічних варіантів, що забезпечують виживання в екстремальних умовах. Це супроводжувалося послідовним формуванням метаболічно-епігенетичної пам'яті з переходом у хронічний стан (ресетинг). Автоліз дріжджів також корелював зі зміною балансу міді, а збільшення її концентрації у середовищі культивування бактерій призводило до вираженого прояву антибактеріальної активності.

3. Встановлено, що поліфенольні сполуки, отримані із соняшникового шроту та збагачені хлорогеновою кислотою, здатні модулювати кількість імунокомпетентних клітин у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки на ранніх стадіях розвитку цієї патології. Ефект дії поліфенольних сполук залежить від способу їх введення в організм. Найкращий результат було отримано після введення

поліфенольних сполук *per os* порівняно з внутрішньочеревним способом введення, що вказує на можливість їх використання як продуктів функціонального харчування.

4. Розроблено спосіб отримання супрамолекулярних комплексів «казеїн молозива – поліфенольні сполуки» та експериментально показано, що ці комплекси формуються переважно водневими зв'язками. Вперше застосовано метод вимірювання електропровідності водних розчинів супрамолекулярних комплексів для їх фізико-хімічної характеристики. Синтезовано квантові точки на основі фенілефрину та розроблено метод флуоресцентного гасіння квантових точок хлорогеновою кислотою. Показано пряму залежність ефективності гасіння флуоресценції у широкому діапазоні концентрацій хлорогенової кислоти (0,00176–0,025 мг/мл). Встановлено, що у складі поліфенольних сполук соняшникового шроту міститься до 15 % хлорогенової кислоти. Молекулярний докінг показав ймовірність наявності 9 потенційних центрів локалізації хлорогенової кислоти у молекулах  $\beta$ -казеїну. Усі центри зв'язування мали різну афінність, а найбільш стабільна конфігурація характеризувалася мінімальною енергією Гіббса –8,66 ккал/моль.

5. Показано, що супрамолекулярні комплекси «казеїн молозива – поліфенольні сполуки» чинять «м'яку» модулюючу дію на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці експериментальних тварин із *Cu*-індукованим фіброзом печінки.

6. Поліфенольні сполуки у складі супрамолекулярних комплексів із казеїном молозива модулювали змінені біохімічні показники у тварин із *Cu*-індукованим фіброзом печінки на ранніх стадіях розвитку цієї хронічної патології.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bozhkov, A. I., Klimova, O. M., Nikitchenko, Y. V., Kurguzova, N. I., Linkevych, O. S., Lebid, K. M., Protsenko, O. S., Remneva, N. A., Al-Bahadly, A. M. M., & Al-Begai, M. A. Y. (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>
2. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Yu. 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(1), 41—50. <https://doi.org/10.1134/S2079057017010040>
3. 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*, 157—162. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.15.09.2023.26>
4. Bozhkov, A. I., Ohiienko, S. L., Bondar, A. Y., Ivanov, E. G., & Kurguzova, N. I. (2020). Low-molecular weight components of cow colostrum regulate bone marrow functions by modelling the redox-system of the organism. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(2), 272—277. <https://doi.org/10.15421/022040>
5. Ivanov, E. G., Klimova, E. M., Bozhkov, A. A., Kovalova, M. K., & Bozhkov, A. I. (2025). Components of colostrum regulate the activity of the immune system in animals with liver fibrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 16(4), e25176—e25176. <https://doi.org/10.15421/0225176>
6. Ai, B., YuV, N., Km, L., Eg, I., Ni, K., Ss, G., Mo, S., Mohammad Ma, A., & Mohammad Ay, A. B. (2017). Low Molecular Weight Components from Various Sources Eliminate Oxidative Stress and Restore Physiological

Characteristic of Animals at Early Stages of Cu- Induced Liver Fibrosis Development. *Translational Biomedicine*, 08(02). <https://doi.org/10.21767/2172-0479.1000107>

7. Fan, Y.-H., Zhang, S., Wang, Y., Wang, H., Li, H., & Bai, L. (2025). Inter-organ metabolic interaction networks in non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Endocrinology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1494560>

8. Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177—197. <https://doi.org/10.1002/j.2040-4603.2014.tb00548.x>

9. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147—R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

10. Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L. R., & Scaldaferri, F. (2024). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: A narrative review. *Internal and Emergency Medicine*, 19(2), 275—293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>

11. Santos, A. A., Delgado, T. C., Marques, V., Ramirez-Moncayo, C., Alonso, C., Vidal-Puig, A., Hall, Z., Martínez-Chantar, M. L., & Rodrigues, C. M. P. (2024). Spatial metabolomics and its application in the liver. *Hepatology*, 79(5), 1158. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000341>

12. Yang, M., Massad, K., Kimchi, E. T., Staveley-O'Carroll, K. F., & Li, G. (2024). Gut microbiota and metabolite interface-mediated hepatic inflammation. *Immunometabolism*, 6(1), e00037. <https://doi.org/10.1097/IN9.0000000000000037>

13. Hora, S., & Wuestefeld, T. (2023). Liver Injury and Regeneration: Current Understanding, New Approaches, and Future Perspectives. *Cells*, 12(17), 2129. <https://doi.org/10.3390/cells12172129>

14. Martins, P., & Baptista, P. (2025). *Regenerative Hepatology and Liver Transplantation*. Academic Press.

<https://www.perlego.com/book/5205286/regenerative-hepatology-and-liver-transplantation-pdf>

15. Zhou, Y., Shi, S., Luo, M., Zhang, X., & Zheng, S. (2026). Polyploid Hepatocytes in Liver Regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, 22(3), 1519—1522. <https://doi.org/10.1007/s12015-026-11081-0>

16. Pu, W., & Zhou, B. (2022). Correction to: Hepatocyte generation in liver homeostasis, repair, and regeneration. *Cell Regeneration*, 11(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13619-022-00115-w>

17. Tian, J., Wang, R., Yang, X., Yang, J., Zhang, Y., Li, X., Liang, H., Fan, S., Gao, Y., Zhang, S., Qu, X., Huang, M., & Bi, H. (2022). Pregnane X receptor promotes liver enlargement in mice through the spatial induction of hepatocyte hypertrophy and proliferation. *Chemico-Biological Interactions*, 367, 110133. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110133>

18. Albanis, E., & Friedman, S. L. (2001). HEPATIC FIBROSIS: Pathogenesis and Principles of Therapy. *Clinics in Liver Disease*, 5(2), 315—334. [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(05\)70168-9](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(05)70168-9)

19. Rajapaksha, I. G., Gunarathne, L. S., Angus, P. W., & Herath, C. B. (2021). Update on New Aspects of the Renin-Angiotensin System in Hepatic Fibrosis and Portal Hypertension: Implications for Novel Therapeutic Options. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4), 702. <https://doi.org/10.3390/jcm10040702>

20. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P., & Fallowfield, J. A. (2014). Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 181—194. <https://doi.org/10.1038/nri3623>

21. Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: Role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(3), 49—98. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(00\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(00)00004-2)

22. Diller, R. B., & Tabor, A. J. (2022). The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics*, 7(3), 87. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087>

23. Takahara, T., Furui, K., Yata, Y., Jin, B., Zhang, L. P., Nambu, S., Sato, H., Seiki, M., & Watanabe, A. (1997). Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology*, 26(6), 1521—1529. <https://doi.org/10.1002/hep.510260620>

24. Zhou, Y., Wang, G., Liu, L., Song, L., Hu, L., Liu, L., Xu, L., Wang, T., Liu, L., Wang, Y., Zhang, T., & Guo, B. (2025). Cellular crosstalk mediated by Meteorin-like regulating hepatic stellate cell activation during hepatic fibrosis. *Cell Death & Disease*, 16(1), 405. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07734-6>

25. Prigogine, I., & Stengers, I. (2018). *Order Out of Chaos: Man's New Dialogue with Nature*. Verso Books.

26. Schett, G., & Neurath, M. F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: Universal and tissue-specific concepts. *Nature Communications*, 9(1), 3261. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05800-6>

27. Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology*, 6, 425—456. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>

28. Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908. (б. д.). NobelPrize.Org. Вилучено 2026. 12чер.,із [https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/lecture/?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/lecture/?utm_source=chatgpt.com)

29. 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>

30. Huang, S. (2009). Reprogramming cell fates: Reconciling rarity with robustness. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 31(5), 546—560. <https://doi.org/10.1002/bies.200800189>
31. Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, 18(7), 1028—1040. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>
32. 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>
33. Selye, H. (1984). *The Stress of Life*. McGraw-Hill Education.
34. Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science*, 276(5309), 60—66. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.60>
35. Liu, S., Cheng, C., Zhu, L., Zhao, T., Wang, Z., Yi, X., Yan, F., Wang, X., Li, C., Cui, T., & Yang, B. (2024). Liver organoids: Updates on generation strategies and biomedical applications. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03865-3>
36. Matsumoto, T. (2022). Implications of Polyploidy and Ploidy Alterations in Hepatocytes in Liver Injuries and Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9409. <https://doi.org/10.3390/ijms23169409>
37. Fareed, M. M., Khalid, H., Khalid, S., & Shityakov, S. (2024). Deciphering Molecular Mechanisms of Carbon Tetrachloride- Induced Hepatotoxicity: A Brief Systematic Review. *Current Molecular Medicine*, 24(9), 1124—1134. <https://doi.org/10.2174/0115665240257603230919103539>
38. Díaz, L. A., Arab, J. P., Louvet, A., Bataller, R., & Arrese, M. (2023). The intersection between alcohol-related liver disease and nonalcoholic

fatty liver disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 20(12), 764—783. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00822-y>

39. Thiele, M., & Moreno, C. (2024). Novel interventions against alcohol-related liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 21(2), 78—79. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00877-x>

40. Yan, C., Hu, W., Tu, J., Li, J., Liang, Q., & Han, S. (2023). Pathogenic mechanisms and regulatory factors involved in alcoholic liver disease. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 300. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04166-8>

41. Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1), 151—171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>

42. Vogel, A., Meyer, T., Sapisochin, G., Salem, R., & Saborowski, A. (2022). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 400(10360), 1345—1362. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01200-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01200-4)

43. Sanyal, A. J., Natta, M. L. V., Clark, J., Neuschwander-Tetri, B. A., Diehl, A., Dasarathy, S., Loomba, R., Chalasani, N., Kowdley, K., Hameed, B., Wilson, L. A., Yates, K. P., Belt, P., Lazo, M., Kleiner, D. E., Behling, C., & Tonascia, J. (2021). Prospective Study of Outcomes in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *New England Journal of Medicine*, 385(17), 1559—1569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2029349>

44. Castera, L., Forns, X., & Alberti, A. (2008). Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *Journal of Hepatology*, 48(5), 835—847. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.02.008>

45. Eddowes, P. J., Sasso, M., Allison, M., Tsochatzis, E., Anstee, Q. M., Sheridan, D., Guha, I. N., Cobbold, J. F., Deeks, J. J., Paradis, V., Bedossa, P., & Newsome, P. N. (2019). Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis

in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 156(6), 1717—1730. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.042>

46. Sanyal, A. J., Natta, M. L. V., Clark, J., Neuschwander-Tetri, B. A., Diehl, A., Dasarathy, S., Loomba, R., Chalasani, N., Kowdley, K., Hameed, B., Wilson, L. A., Yates, K. P., Belt, P., Lazo, M., Kleiner, D. E., Behling, C., & Tonascia, J. (2021). Prospective Study of Outcomes in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *New England Journal of Medicine*, 385(17), 1559—1569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2029349>

47. Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N., & Barabási, A.-L. (2000). The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*, 407(6804), 651—654. <https://doi.org/10.1038/35036627>

48. 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>

49. Karsdal, M. A., Nielsen, S. H., Leeming, D. J., Langholm, L. L., Nielsen, M. J., Manon-Jensen, T., Siebuhr, A., Gudmann, N. S., Rønnow, S., Sand, J. M., Daniels, S. J., Mortensen, J. H., & Schuppan, D. (2017). The good and the bad collagens of fibrosis—Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 43—56. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.014>

50. Niedowicz, D. M., & Daleke, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 43(2), 289—330. <https://doi.org/10.1385/CBB:43:2:289>

51. null, null. (2005). Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 353(25), 2643—2653. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052187>

52. Bozhkov, A. I., Dlubovskaya, V. L., Dmitriev, Yu. 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(1), 63—71.

<https://doi.org/10.1134/S2079057011010048>

53. Bešlo, D., Golubić, N., Rastija, V., Agić, D., Karnaš, M., Šubarić, D., & Lučić, B. (2023). Antioxidant Activity, Metabolism, and Bioavailability of Polyphenols in the Diet of Animals. *Antioxidants*, 12(6), 1141.

<https://doi.org/10.3390/antiox12061141>

54. Khan, M. Z., Belhan, S., Cetin, N., Ayan, A., Khan, A., Ahmad, I., Ma, Y., Xiao, J., Khan, J. M., Shah, M. K., Ullah, S., & Cao, Z. (2022). Mining for the association of bovine mastitis linked genes to pathological signatures and pathways. *Annals of Animal Science*, 22(2), 583—591.

<https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0049>

55. Tufarelli, V., Casalino, E., D’Alessandro, A. G., & Laudadio, V. (2017). Dietary Phenolic Compounds: Biochemistry, Metabolism and Significance in Animal and Human Health. *Current Drug Metabolism*, 18(10), 905—913.

<https://doi.org/10.2174/1389200218666170925124004>

56. Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317—333.

<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

57. Abdel-Moneim, A.-M. E., Shehata, A. M., Alzahrani, S. O., Shafi, M. E., Mesalam, N. M., Taha, A. E., Swelum, A. A., Arif, M., Fayyaz, M., & Abd El-Hack, M. E. (2020). The role of polyphenols in poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(6), 1851—1866.

<https://doi.org/10.1111/jpn.13455>

58. Lipiński, K., Mazur, M., Antoszkiewicz, Z., & Purwin, C. (2017). Polyphenols in Monogastric Nutrition – A Review. *Annals of Animal Science*, 17(1), 41—58.

<https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0042>

59. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The*

Journal of Nutritional Biochemistry, 13(10), 572—584.  
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

60. Ciupei, D., Colișar, A., Leopold, L., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. M. (2024). Polyphenols: From Classification to Therapeutic Potential and Bioavailability. *Foods*, 13(24), 4131. <https://doi.org/10.3390/foods13244131>

61. Saad, A. M., Mohammed, D. M., Alkafaas, S. S., Ghosh, S., Negm, S. H., Salem, H. M., Fahmy, M. A., Semary, H. E., Ibrahim, E. H., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., & El-Saadony, M. T. (2025). Dietary polyphenols and human health: Sources, biological activities, nutritional and immunological aspects, and bioavailability- a comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 16, 1653378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1653378>

62. Poonia, A. & Shiva. (2022). Bioactive compounds, nutritional profile and health benefits of colostrum: A review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 4(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00104-1>

63. Ciupei, D., Colișar, A., Leopold, L., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. M. (2024). Polyphenols: From Classification to Therapeutic Potential and Bioavailability. *Foods*, 13(24), 4131. <https://doi.org/10.3390/foods13244131>

64. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 97, 67—74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>

65. Nguyen, V., Taine, E. G., Meng, D., Cui, T., & Tan, W. (2024). Chlorogenic Acid: A Systematic Review on the Biological Functions, Mechanistic Actions, and Therapeutic Potentials. *Nutrients*, 16(7), 924. <https://doi.org/10.3390/nu16070924>

66. Nguyen, V., Taine, E. G., Meng, D., Cui, T., & Tan, W. (2024). Chlorogenic acid: A systematic review on the biological functions, mechanistic

actions, and therapeutic potentials. *Nutrients*, 16(7), 924.  
<https://doi.org/10.3390/nu16070924>

67. He, Y., Mao, S., Zhao, Y., & Yang, J. (2025). Research Advances in the Synthesis, Metabolism, and Function of Chlorogenic Acid. *Foods*, 14(11), 1914. <https://doi.org/10.3390/foods14111914>

68. He, Y., Mao, S., Zhao, Y., & Yang, J. (2025). Research Advances in the Synthesis, Metabolism, and Function of Chlorogenic Acid. *Foods*, 14(11), 1914. <https://doi.org/10.3390/foods14111914>

69. He, Y., Mao, S., Zhao, Y., & Yang, J. (2025). Research Advances in the Synthesis, Metabolism, and Function of Chlorogenic Acid. *Foods*, 14(11), 1914. <https://doi.org/10.3390/foods14111914>

70. Ciupei, D., Colișar, A., Leopold, L., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. M. (2024). Polyphenols: From Classification to Therapeutic Potential and Bioavailability. *Foods*, 13(24), 4131. <https://doi.org/10.3390/foods13244131>

71. Saad, A. M. M., Mohammed, D. M., Alkafaas, S. S. S., Ghosh, S., Negm, S. H. H., Salem, H. M., Fahmy, M. A., Semary, H. E., Ibrahim, E. H., AbuQamar, S. F. F., El-Tarabily, K. A. A., & El-Saadony, M. T. T. (2025). Dietary polyphenols and human health: Sources, biological activities, nutritional and immunological aspects, and bioavailability— a comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1653378>

72. Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A. T., Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2010). Cellular Stress Responses, The Hormesis Paradigm, and Vitagenes: Novel Targets for Therapeutic Intervention in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1763—1811. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3074>

73. Kanner, J. (2020). Polyphenols by Generating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Affect Cell Redox Signaling, Inhibit PTPs and Activate Nrf2 Axis for Adaptation and Cell Surviving: In Vitro, In Vivo and Human Health. *Antioxidants*, 9(9), 797. <https://doi.org/10.3390/antiox9090797>

74. Pan, C.-J., Deng, X.-X., Lu, M.-C., & Qin, X.-Z. (2023). Preparation of bright blue fluorescent carbon dots and their application in highly sensitive chlorogenic acid detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 51(12), 100334. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2023.100334>
75. Bozhkov, A. A., Ganin, V. Yu., 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>
76. Ivanov, E. G., Klimova, E. M., Bozhkov, A. A., Kovalova, M. K., & Bozhkov, A. I. (2025). Components of colostrum regulate the activity of the immune system in animals with liver fibrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 16(4), e25176—e25176. <https://doi.org/10.15421/0225176>
77. De Feyter, S., Beyens, A., & Callewaert, B. (2023). ATP7A-related copper transport disorders: A systematic review and definition of the clinical subtypes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 46(2), 163—173. <https://doi.org/10.1002/jimd.12590>
78. Horn, N., & Wittung-Stafshede, P. (2021). ATP7A-Regulated Enzyme Metalation and Trafficking in the Menkes Disease Puzzle. *Biomedicines*, 9(4), 391. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040391>
79. Schilsky, M. L. (2017). Wilson Disease: Diagnosis, Treatment, and Follow-up. *Clinics in Liver Disease*, 21(4), 755—767. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.06.011>
80. Fuentealba, I. C., & Aburto, E. M. (2003). Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-5>
81. Foster, A. W., Young, T. R., Chivers, P. T., & Robinson, N. J. (2022). Protein metalation in biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 66, 102095. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.102095>

82. Theophanides, T., & Anastassopoulou, J. (2002). Copper and carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1), 57—64. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(02\)00007-0](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(02)00007-0)

83. Zambelli, B., Basak, P., Hu, H., Piccioli, M., Musiani, F., Broll, V., Imbert, L., Boisbouvier, J., Maroney, M. J., & Ciurli, S. (2023). The structure of the high-affinity nickel-binding site in the Ni,Zn-HypA•UreE2 complex. *Metallomics*, 15(3), mfad003. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfad003>

84. Denoyer, D., Pearson, H. B., Clatworthy, S. A. S., Smith, Z. M., Francis, P. S., Llanos, R. M., Volitakis, I., Phillips, W. A., Meggyesy, P. M., Masaldan, S., & Cater, M. A. (2016). Copper as a target for prostate cancer therapeutics: Copper-ionophore pharmacology and altering systemic copper distribution. *Oncotarget*, 7(24), 37064—37080. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9245>

85. White, A. R., Kanninen, K. M., & Crouch, P. J. (2015). Editorial: Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00127>

86. Urso, E., & Maffia, M. (2015). Behind the Link between Copper and Angiogenesis: Established Mechanisms and an Overview on the Role of Vascular Copper Transport Systems. *Journal of Vascular Research*, 52(3), 172—196. <https://doi.org/10.1159/000438485>

87. Denoyer, D., Pearson, H. B., Clatworthy, S. A. S., Smith, Z. M., Francis, P. S., Llanos, R. M., Volitakis, I., Phillips, W. A., Meggyesy, P. M., Masaldan, S., & Cater, M. A. (2016). Copper as a target for prostate cancer therapeutics: Copper-ionophore pharmacology and altering systemic copper distribution. *Oncotarget*, 7(24), 37064—37080. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9245>

88. Djoko, K. Y., Ong, C. Y., Walker, M. J., & McEwan, A. G. (2015). The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against

Bacterial Pathogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(31), 18954—18961. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.647099>

89. Djoko, K. Y., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., & McEwan, A. G. (2014). Antimicrobial effects of copper(II) bis(thiosemicarbazonato) complexes provide new insight into their biochemical mode of action. *Metallomics*, 6(4), 854—863. <https://doi.org/10.1039/C3MT00348E>

90. Haeili, M., Moore, C., Davis, C. J. C., Cochran, J. B., Shah, S., Shrestha, T. B., Zhang, Y., Bossmann, S. H., Benjamin, W. H., Kutsch, O., & Wolschendorf, F. (2014). Copper Complexation Screen Reveals Compounds with Potent Antibiotic Properties against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3727—3736. <https://doi.org/10.1128/AAC.02316-13>

91. Dalecki, A. G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., & Wolschendorf, F. (2015). Disulfiram and Copper Ions Kill *Mycobacterium tuberculosis* in a Synergistic Manner. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4835—4844. <https://doi.org/10.1128/AAC.00692-15>

92. Shah, S., Dalecki, A. G., Malalasekera, A. P., Crawford, C. L., Michalek, S. M., Kutsch, O., Sun, J., Bossmann, S. H., & Wolschendorf, F. (2016). 8-Hydroxyquinolines Are Boosting Agents of Copper-Related Toxicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 5765—5776. <https://doi.org/10.1128/AAC.00325-16>

93. Bozhkov, A. I., Bobkov, V. V., Osolodchenko, T. P., Yurchenko, O. I., Ganin, V. Y., Ivanov, E. G., Batuieva, Y. D., Minukhin, V. V., Goltvyanskiy, A. V., Kozheshkurt, V. A., & Ponomarenko, S. V. (2024). The antibacterial activity of the copper for *Staphylococcus aureus* 124 and *Pseudomonas aeruginosa* 18 depends on its state: Metalized, chelated and ionic. *Heliyon*, 10(20), e39098. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39098>

94. Czlonkowska, A., Litwin, T., Dusek, P., Ferenci, P., Lutsenko, S., Medici, V., Rybakowski, J. K., Weiss, K. H., & Schilsky, M. L. (2018). *Nature*

Reviews Disease Primers article: Wilson disease. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>

95. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., Akzhyhitov, R. A., Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., Albegai, M. A. Y., & Gromovoi, T. Yu. (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>

96. Bozhkov, A. I., Klimova, E. M., Nikitchenko, Y. V., Davydov, V. V., Zvyagintseva, O. V., Kurguzova, N. I., Sidorov, V. I., & Naglov, A. V. (2014). Stem Cells Take Part in Regulation of Prooxidant Activity and Immunity at Liver Fibrosis. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, 2(6), 5—12. <https://doi.org/10.11648/j.ajbls.s.2014020601.12>

97. Cadet, J., & Davies, K. J. A. (2017). Oxidative DNA Damage & Repair: An Introduction. *Free radical biology & medicine*, 107, 2—12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030>

98. Meyerstein, D. (2021). Re-examining Fenton and Fenton-like reactions. *Nature Reviews Chemistry*, 5(9), 595—597. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00310-4>

99. Tsvetkov, P., Coy, S., Petrova, B., Dreishpoon, M., Verma, A., Abdusamad, M., Rossen, J., Joesch-Cohen, L., Humeidi, R., Spangler, R. D., Eaton, J. K., Frenkel, E., Kocak, M., Corsello, S. M., Lutsenko, S., Kanarek, N., Santagata, S., & Golub, T. R. (2022). Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, 375(6586), 1254—1261. <https://doi.org/10.1126/science.abf0529>

100. Cobine, P. A., & Brady, D. C. (2022). Cuproptosis: Cellular and molecular mechanisms underlying copper-induced cell death. *Molecular Cell*, 82(10), 1786—1787. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.001>

101. Li, S.-R., Bu, L.-L., & Cai, L. (2022). Cuproptosis: Lipoylated TCA cycle proteins-mediated novel cell death pathway. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 158. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01014-x>

102. Feng, Q., Huo, C., Wang, M., Huang, H., Zheng, X., & Xie, M. (2024). Research progress on cuproptosis in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1290592. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1290592>

103. Xie, J., Yang, Y., Gao, Y., & He, J. (2023). Cuproptosis: Mechanisms and links with cancers. *Molecular Cancer*, 22(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01732-y>

104. Jiao, Y., Wang, H., Zhu, M., Liu, T., Li, Y., Yang, S., Zhang, M., & Zhang, L. (2025). Copper-induced cell death mechanisms and their role in the tumor microenvironment. *Frontiers in Cell Death*, 4. <https://doi.org/10.3389/fceld.2025.1628470>

105. Pre-Adaptation of *Saccharomyces Cerevisiae* to Low Temperatures Affects the Resistance of Yeast Cells to Subsequent Autolysis, High Temperature and Overpressure. (б. д.). ResearchGate. <https://doi.org/10.24966/FSN-1076/100172>

106. Berg, B. N., & Simms, H. S. (1960). Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake. *The Journal of Nutrition*, 71, 255—263.

107. Govindaraju, D., Atzmon, G., & Barzilai, N. (2015). Genetics, lifestyle and longevity: Lessons from centenarians. *Applied & Translational Genomics*, 4, 23—32. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2015.01.001>

108. Lind, N. (2002). Social and economic criteria of acceptable risk. *Reliability Engineering & System Safety*, 78(1), 21—25. [https://doi.org/10.1016/S0951-8320\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0951-8320(02)00051-0)

109. Pickett, K. E., & Wilkinson, R. G. (2015). Income inequality and health: A causal review. *Social Science & Medicine*, 128, 316—326. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2014.12.031>

110. Zhang, J., Zhang, J., & Lee, R. (2003). Rising longevity, education, savings, and growth. *Journal of Development Economics*, 70(1), 83—101. [https://doi.org/10.1016/S0304-3878\(02\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3878(02)00088-3)

111. Бенца, Т. М. (2021). Фармакотерапія цирозу печінки та його ускладнень. *Ліки України*, (2(248)), 23—27. [https://doi.org/10.37987/1997-9894.2021.2\(248\).229010](https://doi.org/10.37987/1997-9894.2021.2(248).229010)

112. Barsky, A. J., Saintfort, R., Rogers, M. P., & Borus, J. F. (2002). Nonspecific medication side effects and the nocebo phenomenon. *JAMA*, 287(5), 622—627. <https://doi.org/10.1001/jama.287.5.622>

113. Bessone, F., Dirchwolf, M., Rodil, M. A., Razori, M. V., & Roma, M. G. (2018). Review article: Drug-induced liver injury in the context of nonalcoholic fatty liver disease - a physiopathological and clinical integrated view. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 48(9), 892—913. <https://doi.org/10.1111/apt.14952>

114. Daliu, P., Santini, A., & Novellino, E. (2019). From pharmaceuticals to nutraceuticals: Bridging disease prevention and management. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(1), 1—7. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1552135>

115. Essa, M., Sabry, A., Abdelsameea, E., Tharwa, E.-S., & Salama, M. (2019). Impact of new direct-acting antiviral drugs on hepatitis C virus-related decompensated liver cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 31(1), 53—58. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001250>

116. Guengerich, F. P. (2011). Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(1), 3—14. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-062>

117. Hall, A. M., Trepiccione, F., & Unwin, R. J. (2022). Drug toxicity in the proximal tubule: New models, methods and mechanisms. *Pediatric Nephrology*, 37(5), 973—982. <https://doi.org/10.1007/s00467-021-05121-9>

118. Rockey, D. C. (2015). *Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*. Y Yamada' s Textbook of Gastroenterology (C. 2070—2086). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118512074.ch105>

119. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., International Natural Product Sciences Taskforce, & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(3), 200—216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

120. Boyko, T. V., Chaunina, E. A., Buzmakova, N. A., & Zharikova, E. A. (2021). Biologically active additives for cows as a factor in the production of environmentally friendly products in animal husbandry. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 624(1), 012063. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/624/1/012063>

121. Gallo, M., Aterini, S., Bandini, S., Bergesio, F., Ciciani, A. M., Aterini, L., Calderini, F., & Balboni, F. (2021). Severa ipocalcemia conseguente all'assunzione orale di citrato in un paziente in emodialisi cronica. *Giornale di Clinica Nefrologica e Dialisi*, 33, 91—94. <https://doi.org/10.33393/gcnd.2021.2322>

122. Nwafor, E.-O., Lu, P., Zhang, Y., Liu, R., Peng, H., Xing, B., Liu, Y., Li, Z., Zhang, K., Zhang, Y., & Liu, Z. (2022). Chlorogenic acid: Potential source of natural drugs for the therapeutics of fibrosis and cancer. *Translational Oncology*, 15(1), 101294. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101294>

123. Polozyuk, O. N., Zabelina, M. V., Polozyuk, E. S., Rubanova, M. E., Kulagina, O. V., & Stupina, L. V. (2022). The influence of biologically active substances on safety of pigs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 965(1), 012032. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/965/1/012032>

124. Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512—531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>

125. Noce, A., Romani, A., & Bernini, R. (2021). Dietary Intake and Chronic Disease Prevention. *Nutrients*, 13(4), 1358. <https://doi.org/10.3390/nu13041358>

126. Seyed Hameed, A. S., Rawat, P. S., Meng, X., & Liu, W. (2020). Biotransformation of dietary phytoestrogens by gut microbes: A review on bidirectional interaction between phytoestrogen metabolism and gut microbiota. *Biotechnology Advances*, 43, 107576. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107576>

127. Delgado, A. M., Issaoui, M., & Chammem, N. (2019). Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1356—1364. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0128>

128. Jantan, I., Haque, M. A., Arshad, L., Harikrishnan, H., Septama, A. W., & Mohamed-Hussein, Z.-A. (2021). Dietary polyphenols suppress chronic inflammation by modulation of multiple inflammation-associated cell signaling pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 93, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108634>

129. Oršolić, N., & Jazvinščak Jembrek, M. (2022). Molecular and Cellular Mechanisms of Propolis and Its Polyphenolic Compounds against Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10479. <https://doi.org/10.3390/ijms231810479>

130. Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>

131. Miao, M., & Xiang, L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Advances in Pharmacology*, 87, 71—88. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.002>

132. Zhang, W., Liu, X., & Piao, L. (2020). Chlorogenic acid-enriched extract of *Ilex kudingcha* C.J. Tseng tea inhibits neutrophil recruitment in injured

zebrafish by promoting reverse migration via the focal adhesion pathway. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), e13279. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13279>

133. Daraee, A., Ghoreishi, S. M., & Hedayati, A. (2019). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of chlorogenic acid from sunflower (*Helianthus annuus*) seed kernels: Modeling and optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 144, 19—27. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.001>

134. de Souza, I. D., de Andrade, A. S., & Dalmolin, R. J. S. (2018). Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(5), 375—386. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>

135. Engwa, G. A., Ferdinand, P. U., Nwalo, F. N., & Unachukwu, M. N. (2019). Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. *Y Poisoning in the Modern World—New Tricks for an Old Dog?* IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82511>

136. Zwolak, A., Sarzyńska, M., Szyrka, E., & Stawarczyk, K. (2019). Sources of Soil Pollution by Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(7), 164. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4221-y>

137. Obrenovich, M., Li, Y., Tayahi, M., & Reddy, V. P. (2022). Polyphenols and Small Phenolic Acids as Cellular Metabolic Regulators. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(9), 4152—4166. <https://doi.org/10.3390/cimb44090285>

138. Wolf, G. (1984). Multiple functions of vitamin A. *Physiological Reviews*, 64(3), 873—937. <https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.3.873>

139. Duruibe, J., M.O.C, O., & Egwurugwu, J. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Heavy-metal-pollution-and-human->

[biotoxic-effects-Duruibe-](#)

[M.O.C./56f5b680f3a7bc77011562be171b0a59730ed77f](#)

140. Schweigert, N., Zehnder, A. J., & Eggen, R. I. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology*, 3(2), 81—91. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00176.x>

141. 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>

142. 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>

143. Crawford, L., Wyatt, M., Bryers, J., & Ratner, B. (2021). Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 10(11), e2002153. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002153>

144. Laurent, P., Sisirak, V., Lazaro, E., Richez, C., Duffau, P., Blanco, P., Truchetet, M.-E., & Contin-Bordes, C. (2018). Innate Immunity in Systemic Sclerosis Fibrosis: Recent Advances. *Frontiers in Immunology*, 9, 1702. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01702>

145. Lescoat, A., Lecureur, V., Roussel, M., Sunnaram, B. L., Ballerie, A., Coiffier, G., Jouneau, S., Fardel, O., Fest, T., & Jégo, P. (2017). CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*, 36(7), 1649—1654. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3597-6>

146. Braga, T. T., Agudelo, J. S. H., & Camara, N. O. S. (2015). Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Frontiers in Immunology*, 6, 602. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00602>

147. Ma, W.-T., Gao, F., Gu, K., & Chen, D.-K. (2019). The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Frontiers in Immunology*, 10, 1140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01140>

148. Jenne, C. N., Liao, S., & Singh, B. (2018). Neutrophils: Multitasking first responders of immunity and tissue homeostasis. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 395—397. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2802-5>

149. López-Lago, M. A., Posner, S., Thodima, V. J., Molina, A. M., Motzer, R. J., & Chaganti, R. S. K. (2013). Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*, 32(14), 1752—1760. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.201>

150. Pillay, J., Kamp, V. M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L. H., Leenen, L. P., Pickkers, P., & Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 327—336. <https://doi.org/10.1172/JCI57990>

151. Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., & Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathogens*, 11(3), e1004651. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>

152. Członkowska, A., Litwin, T., Dusek, P., Ferenci, P., Lutsenko, S., Medici, V., Rybakowski, J. K., Weiss, K. H., & Schilsky, M. L. (2018). Wilson disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>

153. Clifford, M. N., Kerimi, A., & Williamson, G. (2020). Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1299—1352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12518>

154. Nishitsuji, K., Watanabe, S., Xiao, J., Nagatomo, R., Ogawa, H., Tsunematsu, T., Umemoto, H., Morimoto, Y., Akatsu, H., Inoue, K., & Tsuneyama, K. (2018). Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. *Scientific Reports*, 8(1), 16173. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34571-9>

155. Yuan, X., Zhong, M., Huang, X., Hussain, Z., Ren, M., & Xie, X. (2024). Industrial Production of Functional Foods for Human Health and Sustainability. *Foods*, 13(22), 3546. <https://doi.org/10.3390/foods13223546>

156. Sadiq, U., Gill, H., & Chandrapala, J. (2021). Casein Micelles as an Emerging Delivery System for Bioactive Food Components. *Foods*, 10(8), 1965. <https://doi.org/10.3390/foods10081965>

157. Yang, Y., Xu, Q., Wang, X., Bai, Z., Xu, X., & Ma, J. (2024). Casein-based hydrogels: Advances and prospects. *Food Chemistry*, 447, 138956. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138956>

158. Ivanov, E., Ganin, V., Kosiachenko, K., & Sotnykova, K. (2024). DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OBTAINING THE COMPLEX “CASEIN POLYPHENOLIC COMPOUNDS” ENRICHED WITH CHLOROGENIC ACID. *Grail of Science*, (38), 131—137. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.12.04.2024.020>

159. van de Langerijt, T. M., O’Mahony, J. A., & Crowley, S. V. (2023). Structural, Binding and Functional Properties of Milk Protein-Polyphenol Systems: A Review. *Molecules*, 28(5), 2288. <https://doi.org/10.3390/molecules28052288>

160. Wang, X., Chen, C., Bao, Y., Wang, Y., & Leonidovna Strakh, Y. (2024). Encapsulation of three different types of polyphenols in casein using a

customized pH-driven method: Preparation and characterization. *Food Research International*, 189, 114547. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114547>

161. Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., & Roy, D. (2021). Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Frontiers in Nutrition*, 8, 689456. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.689456>

162. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287—306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>

163. Zagorskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>

164. Hamzalioglu, A., Tagliamonte, S., Gökmen, V., & Vitaglione, P. (2023). Casein–phenol interactions occur during digestion and affect bioactive peptide and phenol bioaccessibility. *Food & Function*, 14(20), 9457—9469. <https://doi.org/10.1039/D3FO02630B>

165. Feng, Y., Jin, C., Lv, S., Zhang, H., Ren, F., & Wang, J. (2023). Molecular Mechanisms and Applications of Polyphenol-Protein Complexes with Antioxidant Properties: A Review. *Antioxidants*, 12(8), 1577. <https://doi.org/10.3390/antiox12081577>

166. Li, M., Ritzoulis, C., Du, Q., Liu, Y., Ding, Y., Liu, W., & Liu, J. (2021). Recent Progress on Protein-Polyphenol Complexes: Effect on Stability and Nutrients Delivery of Oil-in-Water Emulsion System. *Frontiers in Nutrition*, 8, 765589. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.765589>

167. Ebrahimi, P., Hoxha, L., Mihaylova, D., Nicoletto, M., & Lante, A. (2024). UV-A treatment of phenolic extracts impacts colour, bioactive

compounds and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(15), 9559—9568. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13780>

168. Huynh, H. D., Thi, T. H. T., Thi, T. X. T., Nargotra, P., Wang, H.-M. D., Liu, Y.-C., & Kuo, C.-H. (2026). Recent Insights into Protein-Polyphenol Complexes: Molecular Mechanisms, Processing Technologies, Synergistic Bioactivities, and Food Applications. *Molecules*, 31(2), 287. <https://doi.org/10.3390/molecules31020287>

169. Pinto, M. del C., & Macias, P. (2005). Oxidation of dietary polyphenolics by hydroperoxidase activity of lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9225—9230. <https://doi.org/10.1021/jf051559r>

170. Zhang, H., Wang, M., & Xiao, J. (2022). Stability of polyphenols in food processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 102, 1—45. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.006>

171. Elzoghby, A. O., El-Fotoh, W. S. A., & Elgindy, N. A. (2011). Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 153(3), 206—216. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.010>

172. Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21-32. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>

173. Gomes, A., Cangussu, L. B., Cunha, R. L., Oliveira, L. S. de, Franca, A. S., & Costa, A. L. R. (2025). Investigating the Impact of Chlorogenic Acid Content and Cellulose Nanoparticles on Sunflower Protein-Based Emulsions and Films. *Foods*, 14(5), 824. <https://doi.org/10.3390/foods14050824>

174. Rudrapal, M., Rakshit, G., Singh, R. P., Garse, S., Khan, J., & Chakraborty, S. (2024). Dietary Polyphenols: Review on Chemistry/Sources, Bioavailability/Metabolism, Antioxidant Effects, and Their Role in Disease Management. *Antioxidants*, 13(4), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox13040429>

175. Laguna, O., Barakat, A., Alhamada, H., Durand, E., Baréa, B., Fine, F., Villeneuve, P., Citeau, M., Dauguet, S., & Lecomte, J. (2018). Production of proteins and phenolic compounds enriched fractions from rapeseed and sunflower meals by dry fractionation processes. *Industrial Crops and Products*, 118, 160—172. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.045>

176. Shchekoldina, T., & Aider, M. (2014). Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2331—2343. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0780-2>

177. Huang, J., Xie, M., He, L., Song, X., & Cao, T. (2023). Chlorogenic acid: A review on its mechanisms of anti-inflammation, disease treatment, and related delivery systems. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1218015. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1218015>

178. Bourassa, P., Côté, R., Hutchandani, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2013). The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 128, 43—49. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.021>

179. Horita, K., Kameda, T., Suga, H., & Hirano, A. (2025). Molecular mechanism of the interactions between coffee polyphenols and milk proteins. *Food Research International*, 202, 115573. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115573>

180. Ma, B., Al-Wraikat, M., Shu, Q., Yang, X., & Liu, Y. (2024). An Overview of Interactions between Goat Milk Casein and Other Food Components: Polysaccharides, Polyphenols, and Metal Ions. *Foods*, 13(18), 2903. <https://doi.org/10.3390/foods13182903>

181. Mao, T., Akshit, F., Matiwalage, I., Sasidharan, S., Alvarez, C. M., Wescombe, P., & Mohan, M. S. (2024). Preferential Binding of Polyphenols in Blackcurrant Extracts with Milk Proteins and the Effects on the Bioaccessibility

and Antioxidant Activity of Polyphenols. *Foods*, 13(4), 515.  
<https://doi.org/10.3390/foods13040515>

182. Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50—60.  
<https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>

183. Pan, C.-J., Deng, X.-X., Lu, M.-C., & Qin, X.-Z. (2023). Preparation of bright blue fluorescent carbon dots and their application in highly sensitive chlorogenic acid detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 51(12), 100334. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2023.100334>

184. Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second Edition. Wiley-VCH.  
<https://doi.org/10.1002/9783527650002>

185. Bozhkov, A. I., Ohienko, S. L., Bondar, A. Y., Katrich, V. O., Kozheshkurt, V. O., Antonenko, Y. O., Haiovyi, S. S., & Kot, Y. H. (2021). The Electrical Conductivity of Bone Marrow Cells Suspension Associated with Proliferative Activity and Depends on the Donor's Age and the Functional Activity of the Liver. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 79(4), 823—831.  
<https://doi.org/10.1007/s12013-021-00981-2>

186. Pérez-Pedroza, R., Ávila-Ramírez, A., Khan, Z., Moretti, M., & Hauser, C. A. E. (2021). Supramolecular Biopolymers for Tissue Engineering. *Advances in Polymer Technology*, 2021(1), 8815006.  
<https://doi.org/10.1155/2021/8815006>

187. Bunik, V. I. (2024). Supramolecular Protein Assemblies: Building Blocks, Organism- or Cell-Specific Varieties, and Significance. *Biomolecules*, 14(11), 1342. <https://doi.org/10.3390/biom14111342>

188. Ji, T., Han, K., & Wang, H. (2021). Editorial: Supramolecular Assembly Based Functional Nanostructures for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*, 8, 637926. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.637926>

189. Kim, J.-E., Kang, J. H., Kwon, W. H., Lee, I., Park, S. J., Kim, C.-H., Jeong, W.-J., Choi, J. S., & Kim, K. (2023). Self-assembling biomolecules for biosensor applications. *Biomaterials Research*, 27(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00466-8>

190. Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442—474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>

191. Náthia-Neves, G., & Alonso, E. (2021). Valorization of sunflower by-product using microwave-assisted extraction to obtain a rich protein flour: Recovery of chlorogenic acid, phenolic content and antioxidant capacity. *Food and Bioproducts Processing*, 125, 57—67. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.008>

192. Martin, P., Ollivier-Bousquet, M., & Grosclaude, F. (1999). Genetic polymorphism of caseins: A tool to investigate casein micelle organization. *International Dairy Journal*, 9(3), 163—171. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00055-2)

193. Liu, J., Wang, Q., Zhang, H., Yu, D., Jin, S., & Ren, F. (2016). Interaction of chlorogenic acid with milk proteins analyzed by spectroscopic and modeling methods. *Spectroscopy Letters*, 49(1), 44—50. <https://doi.org/10.1080/00387010.2015.1066826>

194. Liao, M., Chen, F., Hu, X., Miao, S., Ma, L., & Ji, J. (2022). The in-vitro digestion behaviors of micellar casein acting as wall materials in spray-dried microparticles: The relationships between colloidal calcium phosphate and the release of loaded blueberry anthocyanins. *Food Chemistry*, 375, 131864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131864>

195. Ivanov, I., Goltvjansky, A., Bozhkov, A., & Gromovoy, T. (2024). Selective-Integrative Technology for the Separation of Colostrum Into Components and the Possibilities of Obtaining Protein Substances From Different

Sources. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 8(3), 60—70.  
<https://doi.org/10.20535/ibb.2024.8.3.299293>

196. Miyake, T., & Rolandi, M. (2015). Grotthuss mechanisms: From proton transport in proton wires to bioprotonic devices. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 28(2), 023001. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/28/2/023001>

197. OpenAI. (2026). SAMSON 2025 R3 [Software for Adaptive Modeling and Simulation of Open Nanosystems, with AutoDock Vina Extension]. Retrieved from <https://www.samson-connect.net> (Accessed: Day Month Year).

198. UniProtKB. (2023). CSN2 – Beta-casein (*Bos taurus*) [Protein entry P02666]. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02666/entry> (Accessed: Day Month Year).

199. BIOVIA. (2025). Discovery Studio Visualizer [Software for molecular visualization and interaction analysis]. Retrieved from <https://www.3ds.com/products-services/biovia/> (3ds.com in Bing) (Accessed: Day Month Year).

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

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

1. Bozhkov A., Ivanov E. G. Bobkov V. V., Osolodchenko T. P., Yurchenko O. I., **Ganin V. Y.**, Batuieva Y.D., ... Ponomarenko S. V. The Antibacterial Activity of the Copper for Staphylococcus Aureus 124 and Pseudomonas Aeruginosa 18 Depends on its State: Metalized, Chelated and Ionic. *Heliyon*. 2024. Vol. 10, Issue 20. e39098. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39098>. (Scopus Q1).

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

**Публікації у наукових міжнародних виданнях:**

3. Bozhkov A., Belous A., Bozhkov A., **Ganin V.**, Ivanov E. et al. Pre-Adaptation of Saccharomyces Cerevisiae to Low Temperatures Affects the Resistance of Yeast Cells to Subsequent Autolysis, High Temperature and Overpressure. *Journal of Food Science & Nutrition*. 2023. Vol. 9. Article 172. <http://dx.doi.org/10.24966/FSN-1076/100172>

**Список публікацій, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Клімова О. М., Лавінська О. В., **Ганін В. Ю.**, Кожешкурт В. О., Мережко О. С., Биченко К. О. Біофізичні характеристики цитотоксичних сироваткових факторів та їх взаємозв'язок з порушенням імунних маркерів

при новоутвореннях підшлункової залози. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2025. (додаток № 1). С. 33–34. doi:10.37321.

2. Ivanov E., Ganin V., Kosiachenko K., Sotnykova K. Development of a method for obtaining the complex “casein polyphenolic compounds” enriched with chlorogenic acid. *Grail of Science*. 2024. Vol. 38. P. 131-137. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.12.04.2024.020>

3. Косяченко К., Сотникова К., **Ганін В.** Розробка способу отримання комплексів казеїну молозива та поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.)*. Львів: Галич-Прес, 2025. С. 137–138.

4. Сотникова К., Косяченко К., **Ганін В.** Розробка способу отримання казеїну та постказеїнової фракції білків із коров'ячого молозива. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.)*. Львів: Галич-Прес, 2025. С. 161–162.

5. Burnashov V. I., **Ganin G. V.** Automation of the process of obtaining water-soluble components. *Multidisciplinary approaches in science, technology and culture (October 21-23, 2025)*. Berlin, Germany, 2025. P. 24..

6. Косяченко К., Сотникова К., **Ганін В.** Розробка флуоресцентного методу визначення кількості хлорогенової кислоти. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 15–17 квітня 2026 р.)*. Львів: Галич-Прес, 2026. С. 100.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ  
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 15:27:02 25.06.2026

Назва файлу з підписом: Ганін В.Ю.\_ Дисертація.pdf.asice  
Розмір файлу з підписом: 6.2 МБ

Перевірені файли:  
Назва файлу без підпису: Ганін В.Ю.\_ Дисертація.pdf  
Розмір файлу без підпису: 6.3 МБ

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

Підписувач: Ганін Володимир Юрійович  
П.І.Б.: Ганін Володимир Юрійович  
Країна: Україна  
РНОКПП: 2692615417  
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 15:26:54  
25.06.2026  
Сертифікат виданий: КНЕДП АТ "УКРСИББАНК"  
Серійний номер: 4723196C41B46DB60400000024C60300653A1000  
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145  
Тип підпису: Удосконалений  
Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)  
Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)  
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2026.05.15 13:00