

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

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України «Київський політехнічний
інститут імені Ігоря Сікорського»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ІВАНОВ ЄВГЕН ГЕННАДІЙОВИЧ

УДК 602.44:[613.292:612.664.3]:612.017(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБЛЕННЯ СПОСОБІВ ОДЕРЖАННЯ РІЗНИХ СУБСТАНЦІЙ ІЗ
МОЛОЗИВА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХНЬОЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ**

Спеціальність 03.00.20 – Біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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



Є.Г. Іванов

Київ 2025

АНОТАЦІЯ

Іванов Є.Г. Розроблення способів отримання різних субстанцій із молозива та дослідження їхньої біологічної активності – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – Біотехнологія. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, 2025.

Дисертацію присвячено розробці технології одержання та стандартизації різноманітних біологічно активних субстанцій із молозива, вивченню біологічних властивостей цих субстанцій. А саме дослідженню механізмів дії низькомолекулярних компонентів молозива на організм, та можливості їхнього використання як продуктів функціонального харчування, що сприяють усуненню токсичної дії іонів міді та покращують здатність тварин виконувати фізичні навантаження; дослідженню гепатотропної дії низькомолекулярних компонентів молозива на моделі фіброзу печінки; можливості використання отриманих комплексів міцел казеїну з поліфенольними сполуками у якості продуктів функціонального харчування.

Молозиво отримували завжди в одному фермерському господарстві - "Альфа", що розташоване у с. Одноробівка, Золочівського району, Харківської області України, у корів породи "Українська чорно-ряба" у весняно-літній період, у яких не зафіксовано патологій, та після першого і другого надою. Після отримання молозиво охолоджували та доставляли в лабораторію, де воно охолоджувалося до - 15 °C та зберігалось не більше місяця. Розробили технологію яка дозволяла отримувати ліпідну фракцію, фракцію казеїну, яку висушували та зберігали за температури 4°C. Фракцію низькомолекулярних компонентів молозива та "ультрафільтрату", які висушували в ротаційному випаровувачі й так само зберігали в сухому вигляді. Перед використанням готували водні розчини відповідних субстанцій молозива. Харчову добавку "Мікс-фактор" одержували з клітинних культур *Sacharomyces cerevisiae* та *Pleurotus ostreatus* згідно з технічними умовами (www.miks.org/engine.com/engine.ua), який являє собою

низькомолекулярні компоненти екзометаболітів цих культур та використовувався як аналог низькомолекулярних компонентів молозива при перевірці гіпотези про неспецифічну дію низькомолекулярних компонентів з різних біологічних джерел. Поліфенольні сполуки виділяли зі шроту соняшникового, як розроблено у нашій лабораторії [Bozhkov et al., 2024].

Дослідження біологічних властивостей отриманих субстанцій молозива були проведені на самцях щурів лінії Wistar, молодих 3 місячного і старих 20 місячного віку, а в спеціальних експериментах із дослідження "Мікс-фактору" дуже старих щурів - 22 і 33 місяців. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з дотриманням загальних біоетичних принципів проведення експериментів на тваринах відповідно до "Загальних принципів роботи на тваринах", затверджених I Національним конгресом з біоетики [Київ, Україна, 2001] та узгоджених із положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" [Страсбург, Франція, 1985] та після схвалення біоетичним комітетом Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Дослідження на клітинному рівні проводили на первинних культурах клітин кісткового мозку щурів. При розробці методів біотестування компонентів молозива використовували культури мікроводоростей *Dunaliella viridis*. Оцінку антибактеріальної активності проводили за стандартними мікробіологічними методами на культурах *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 [Bozhkov et al., 2024].

У роботі використовували фізіологічні методи дослідження: визначення динаміки маси тіла; температури тіла; здатності тварин виконувати роботу в тестах плавання з вантажем і час бігу в тредбані; поведінки тварин; динаміки маси внутрішніх органів і деяких їхніх анатомічних особливостей (наявність сполучнотканинних спайок). Гістологічні зміни в тканині печінки. Під час аналізу складу білків молозива та його фракцій використовували метод мас-спектроскопії, а під час визначення кількості кальцію та ROS у клітинах кісткового мозку використовували конфокальну мікроскопію (мікроскоп

конфокальний Olympus FV10i). Аналіз кількості іонів міді в досліджуваних зразках проводили за допомогою атомно-абсорбційної спектрометрії з електротермічною атомізацією на спектрофотометрі КАС-120 типу С-115-МІ.

У роботі використовували різні біохімічні методи дослідження: визначення кількості білка, вуглеводів, нуклеїнових кислот, гідропероксидів ліпідів, тригліцеридів, холестерину та інші показники, активність ряду антиоксидантних ферментів.

Статистичний аналіз результатів дослідження проводили з використанням t-критерію Стюдента і критерію ANOVA (для непараметричних даних). Вірогідною вважали різницю при $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P \leq 0,05$).

Показано високу варіабельність білкового складу молозива та запропоновано "селективно-інтегративну" технологію під час отримання базових субстанцій молозива (ліпіди, казеїн, низькомолекулярні компоненти молозива та "ультрафільтрата"), що дає змогу зменшити природну варіабельність складу субстанцій молозива, що є важливим за їхнього практичного використання. Розроблена технологія дозволяє часткову забезпечити стандартизацію отриманих компонентів молозива

Результати роботи розширюють наші знання про механізми дії багатокомпонентних субстанцій на біологічні системи, які перебувають у різних функціональних станах (вікові особливості, токсикози, фібрози), і на прикладі низькомолекулярних компонентів молозива показано їхню поліфункціональність дії. Встановлено, що низькомолекулярні компоненти молозива здатні виконувати як специфічну, так і неспецифічну - горметичну дію на біологічні системи та це залежить від функціонального стану організму під час дії цих субстанцій.

Встановлено відсутність токсичної дії низькомолекулярних компонентів молозива і лише за супервеликих доз (1-5 г/100г маси) має місце індивідуальна непереносимість, що проявляється в порушенні функції травлення. У роботі доведено, що низькомолекулярні компоненти молозива можуть проявляти властивості як прооксидантів, так і антиоксидантів і це залежить від їх дози. Важливо підкреслити, що в малих дозах (0,01-0,1 г/100 г маса тіла)

низькомолекулярні компоненти молозива можуть виконувати функції антиоксидантів, а у великих дозах(1-3 г/100 г) прооксидантів. Такі здібності можуть пояснювати специфічність дії на патологічні стани організму і відсутність їх дії на організм якій перебував у тривалому гомеостатичному стані.

Доведено, що механізм дії низькомолекулярних компонентів молозива реалізується шляхом корекції характеристик редокс-системи та запуску ієрархічної системи, регуляції на рівні функції печінки та кісткового мозку, а можливо й інших функціональних систем організму. Така системна регуляція метаболізму забезпечує поліфункціональну дію низькомолекулярних компонентів молозива. Доведено, що спрямованість дії компонентів молозива залежить не тільки від дози, а й від функціональних характеристик біологічної системи на момент дії біологічно активних компонентів молозива.

Розроблено модель Cu-індукованого фіброзу печінки та доведено, що іони міді після багаторазових послідовних введень у організм, у дозі близько 30% від летальної, так само як і відома модель тетраклорметану, спричиняють прояв окисного стресу, що й запускає розвиток фіброзу.

Довели роль низькомолекулярних компонентів молозива в регуляції якісних і кількісних характеристик клітин кісткового мозку на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки, що забезпечує корекцію функціональної активності клітинної ланки імунної системи при фіброзі печінки.

Виявили взаємозв'язок між показниками редокс-системи, клітинної ланки імунітету та такими фізіологічними показниками, як відновлення росту маси тіла, температури тіла та працездатності у тварин з Cu-індукованого фіброзу печінки якій має місце у випадку дії низькомолекулярних компонентів молозива.

Встановлено, що низькомолекулярні компоненти з інших біологічних джерел (*Pleurotus ostreatus* та *Sacharomyces cerevisiae*), харчова добавка "Мікс-фактор", виявляли схожі з низькомолекулярними компонентами молозива ефекти на показники редокс-системи та фізіологічні показники тварин із фіброзом печінки, що підтверджує гіпотезу і про неспецифічний, горметичний механізм дії

таких різних за природою низькомолекулярних компонентів біологічного походження.

Виявили, що щоденне вживання "Мікс-фактора" з питною водою в малих дозах (0,05-0,06 мл/100 г маси тіла) на пізніх етапах онтогенезу щурів починаючи із 22 та навіть із 31 місячного віку, дещо зміщує криву природної смертності праворуч, а за вживання з 31 місячного віку збільшувало максимальну тривалість життя. Поряд з цим, встановлено, що "Мікс-фактора" покращує здатність старих тварин виконувати фізичні навантаження.

Обґрунтували доцільність використання електропровідності молозива та його окремих фракцій (незбиране, знежирене молозиво, низькомолекулярні компоненти молозива) під час оцінки їхніх інтегративних характеристик, що дозволило запропонувати новий метод контролю при отриманні біологічно активних субстанцій з молозива і інших біологічних об'єктів.

Розробили метод отримання поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, та їх включення до складу казеїнових міцел молозива і показали, що у таких комплексах має місце перебудова білкової частини міцел казеїну. Довели перспективність використання цих комплексів у функціональному харчуванні.

Ключові слова: молозиво, казеїн, низькомолекулярні компоненти молозива, інтоксикація, фіброз печінки, якість та тривалість життя, антиоксиданти, прооксиданти, показники активності імунної системи, кістковий мозок.

ABSTRACT

Ivanov E.G. Development of methods for obtaining various substances from colostrum and study of their biological activity - Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences (specialty 03.00.20 - Biotechnology) - V. N. Karazin Kharkiv National University, 2025.

The dissertation is devoted to the development of technology for the production and standardisation of various biologically active substances from colostrum, and the study of the biological properties of these substances. Namely, the study of the mechanisms of action of low molecular weight colostrum components on the body and the possibility of their use as functional foods that help eliminate the toxic effects of copper ions and improve the ability of animals to perform physical activity; study of the hepatotropic effect of low molecular weight colostrum components on a model of liver fibrosis; the possibility of using the obtained complexes of casein micelles with polyphenolic compounds as functional foods.

Colostrum was always obtained from the same farm - 'Alpha', located in the village of Odnorobivka, Zolochiv district, Kharkiv region of Ukraine, from cows of the Ukrainian Black-and-White breed in the spring and summer, in which no pathologies were recorded, and after the first and second milkings. After receiving colostrum, it was cooled and delivered to the laboratory, where it was cooled to -15 °C and stored for no more than a month. A technology was developed to obtain a lipid fraction, the casein fraction, which was dried and stored at 4°C. The fraction of low molecular weight colostrum components and ultrafiltrate was dried in a rotary evaporator and stored in the same way. Before use, aqueous solutions of the respective colostrum substances were prepared. The food additive 'Mix-factor' was obtained from cell cultures of *Sacharomyces cerevisue* and *Pleurotus ostearatus* according to the technical specifications (www.miks.org/engine.com/engine.ua), which represents low-molecular weight components of exometabolites of these cultures and was used as an analogue of low-molecular weight components of colostrum when testing the

hypothesis of the nonspecific effect of low-molecular weight components from various biological sources. Polyphenolic compounds were isolated from sunflower meal as developed in our laboratory (Bozhkov et al., 2024).

Studies of the biological properties of the obtained colostrum substances were conducted on male Wistar rats, young 3 months and old 20 months of age, and in special experiments to study the 'Mix-factor' very old rats - 22 and 33 months. Animals were kept in standard vivarium conditions in compliance with the general bioethical principles of animal experimentation in accordance with the 'General Principles for Animal Care and Use' approved by the First National Congress on Bioethics [Kyiv, Ukraine, 2001] and in accordance with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' [Strasbourg, France, 1985] and after approval by the Bioethics Committee of V. N. Karazin Kharkiv National University. Cellular level studies were performed on primary cultures of rat bone marrow cells. Microalgae cultures of *Dunaliella viridis* were used to develop bioassay methods for colostrum components. The antibacterial activity was evaluated using standard microbiological methods on cultures of *Staphylococcus aureus* 124 and *Pseudomonas aeruginosa* 18 [Bozhkov A.I. et al.]

Physiological research methods were used in the study: determination of body weight dynamics; body temperature; ability of animals to perform in the tests of swimming with a load and running time in the treadmill; animal behaviour; dynamics of the mass of internal organisms and some of their anatomical features (presence of connective tissue adhesions). Histological changes in liver tissue. Mass spectroscopy was used to analyse the composition of colostrum proteins and its fractions, and confocal microscopy (Olympus FV10i confocal microscope) was used to determine the amount of calcium and ROS in bone marrow cells. The amount of copper ions in the studied samples was analysed using atomic absorption spectrometry with electrothermal atomisation on a KAS-120 type C-115-MI spectrophotometer.

Various biochemical methods were used in the study: determination of the amount of protein, carbohydrates, nucleic acids, lipid hydroperoxides, triglycerides, cholesterol and other indicators, and the activity of a number of antioxidant enzymes.

Statistical analysis of the study results was performed using Student's t-test and ANOVA (for non-parametric data). The difference was considered significant at $p \geq 0.95$ (significance level $P \leq 0.05$).

The high variability of the protein composition of colostrum was shown and a 'selective-integrative' technology was proposed for the production of basic colostrum substances (lipids, casein, low-molecular weight components of colostrum and ultrafiltrate), which allows reducing the natural variability of the composition of colostrum substances, which is important in their practical use. The developed technology allows us to partially ensure the standardisation of the obtained colostrum components

The results of the work expand our knowledge of the mechanisms of action of multicomponent substances on biological systems in different functional states (age-related features, toxicosis, fibrosis), and the example of low-molecular weight colostrum components shows their multifunctional action. It has been established that low-molecular weight colostrum components are capable of performing both specific and nonspecific hormetic effects on biological systems, and this depends on the functional state of the organism during the action of these substances.

The absence of toxic effects of low-molecular weight colostrum components was established, and only at super-high doses (1-5 g/100g of weight) individual intolerance occurs, which manifests itself in impaired digestive function. The study proved that low-molecular weight colostrum components can exhibit the properties of both prooxidants and antioxidants, and this depends on their dose. It is important to emphasise that in low doses (0.01-0.1 g/100 g body weight), low-molecular weight colostrum components can act as antioxidants, and in high doses (1-3 g/100 g) as prooxidants. Such abilities may explain the specificity of their effect on pathological conditions of the body and the absence of their effect on the body of a woman in a prolonged homeostatic state.

It is proved that the mechanism of action of low-molecular weight colostrum components is realised by correcting the characteristics of the redox system and launching a hierarchical system, regulating the function of the liver and bone marrow, and possibly other functional systems of the body. This systemic regulation of metabolism provides a multifunctional effect of low-molecular weight colostrum components. It has been proved that the direction of action of colostrum components depends not only on the dose, but also on the functional characteristics of the biological system at the time of exposure to biologically active colostrum components.

A model of Cu-induced liver fibrosis was developed and it was proved that copper ions after multiple sequential injections into the body at a dose of about 30% of the lethal dose, as well as the well-known model of tetrachloromethane, cause oxidative stress, which triggers the development of fibrosis.

The role of low-molecular weight colostrum components in regulating the qualitative and quantitative characteristics of bone marrow cells in a model of Cu-induced liver fibrosis was proved, which ensures the correction of the functional activity of the cellular part of the immune system in liver fibrosis.

The correlation between the parameters of the redox system, the cellular immune system and such physiological parameters as recovery of body weight growth, body temperature and performance in animals with Cu-induced liver fibrosis was revealed, which occurs in the case of exposure to low molecular weight colostrum components.

It was found that low molecular weight components from other biological sources (*Pleurotus ostreatus* and *Sacharomyces cerevisue*), the food supplement 'Mix-factor', had similar effects to low molecular weight components of colostrum on the redox system and physiological parameters of animals with liver fibrosis, which confirms the hypothesis of a nonspecific, hormonal mechanism of action of such different in nature low molecular weight components of biological origin.

It was found that daily use of 'Mix-factor' with drinking water in small doses (0.05-0.06 ml/100 g of body weight) at the later stages of rat ontogeny, starting from

22 and even 31 months of age, slightly shifts the natural mortality curve to the right, and when used from 31 months of age, it increased the maximum life expectancy. At the same time, it was found that the 'Mix-factor' improves the ability of old animals to perform physical activity.

The expediency of using the electrical conductivity of colostrum and its individual fractions (whole, skimmed colostrum, low-molecular weight colostrum components) in assessing their integrative characteristics was substantiated, which allowed us to propose a new control method for the production of biologically active substances from colostrum and other biological objects.

We developed a method for the preparation of polyphenolic compounds enriched with chlorogenic acid and their incorporation into colostrum casein micelles and showed that such complexes restructure the protein part of casein micelles. The prospects for the use of these complexes in functional foods have been proved.

Key words: colostrum, casein, low-molecular weight colostrum components, intoxication, liver fibrosis, quality and duration of life, antioxidants, prooxidants, indicators of immune system activity, bone marrow.

Розділ у монографії

1. Bozhkov, A. I. ., Ohiienko, S. L. ., **Ivanov, E. G. .**, Bondar, A. Y. ., & Kot, Y. H. . (2021). Determination of Electromagnetic Radiations and Liver Fibrosis Influences the “Lifespan” of Bone Marrow Cells. *Recent Developments in Medicine and Medical Research Vol. 1*, 37–51. <https://doi.org/10.9734/bpi/rdmmr/v1/13311D>

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

2. Bozhkov, A. I., Linkevych, O. S., **Ivanov, E. G.**, Klimova, O. M., & Al Begai, M. A. Y. (2016). Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis. *International Journal of Current Research*, 8(12), 44129-44137. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

3. Bozhkov, A. I., **Ivanov, E. G.**, Al Begai, M. A., Alsardia, M. M., & Kurguzova, N. I. (2017). Low-molecular weight cow colostrum components in functional nutrition. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 6(1), 11-17. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

4. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Lebid, K. M., **Ivanov, E. G.**, Kurguzova, N. I., Gayevoy, S. S., & Al Begai, M. A. Y. (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*, 8(2), 2172-0479. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

5. Bozhkov, A. I., **Ivanov, E. G.**, Kuznetsova, Y. A., Ohiienko, S. L., & Bondar', A. Y. (2017). Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture. *Frontiers in biology*, 12, 271-279. **SCOPUS** (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

6. Bozhkov, A. I., **Ivanov, E. G.**, Kurguzova, N. I., Alsardia, M. M., Akzhigitov, R. A., Baranikova, S. Y., ... & Chuprikova, A. S. (2018). The Toxic Effects of Low Molecular Weight Components of Cow Colostrums: The Short-Term and Long-Term Effects. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 6(4), 84-91. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

7. S. L. Ohienko, A. I. Bozhkov, A. Yu. Bondar, **E. G. Ivanov**, I. A. Ionov (2019). Bone marrow cells obtained from old animals differ from the young animals cells in their ability to divide and in response to the presence of liver fibrosis in primary culture. *Advances in Aging Research*, 8, 14 –27. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

8. Ohienko SL, Bondar AYU, **Ivanov EG**, Bozhkov AI. (2019). Liver fibrosis has a different effect on the “lifespan” of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats. *MOJ Gerontol Ger.* 4(1): 36–40. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

9. Bozhkov, A. I., Ohienko, S. L., Bondar, A. Y., Klimova, E. M., & **Ivanov, E. G.** (2019). Induced Liver Fibrosis Is Accompanied in Young and Old Animals by Age-Dependent Changes in Bone Marrow Cells. *Advances in Gerontology*, 9(3), 289-297. **SCOPUS (Q4)** (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

10. Bozhkov, A. I., Ohienko, S. L., Bondar, A. Y., Klimova, E. M., & **Ivanov, E. G.** (2019). Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells. *Advances in Gerontology*, 32(1-2), 45-54. **SCOPUS (Q4)** (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

11. Bozhkov, A. I., Ohienko, 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. **SCOPUS** (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

12. **Ivanov, I.**, Kozheshkurt, V., Bozhkov, A., Goltvjansky, A., Katrich, V., Sidorov, V., & Gromovoy, T. (2021). Low-molecular components of colostrum as a regulator of the organism redox-system and biological antidote. *EUREKA: Life Sciences*, (2), 56-64. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

13. Kozheshkurt V., **Ivanov I.**, Antonenko Y., Katrich V., Bozhkov A., Gromovoy T. (2021) Devising an express method for estimating the quality of colostrum and its components based on electrical conductivity. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. Vol. 1, N 11 (109). P. 69-77. **SCOPUS (Q3)** (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

14. Bozhkov, A., **Ivanov, I.**, Klimova, E., Kurguzova, N., Bozhkov, A., Goltvyanskiy, A., & Nikitchenko, Y. (2021). “Mix-Factor” is involved in the regulation of the organism's redox systems in the late stages of ontogenesis and affects the lifespan of animals. *Ageing and longevity*, 2(2), 24-36.(Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

15. Novikova, A., **Ivanov, E.**, Kurguzova, N., Akzhigitov, R., & Bozhkov, A. (2021). Colostrum components involved in regulating the number of immunocompetent cells in animals with liver fibrosis. *Norwegian Journal of Development of the International Science*, (70-2), 3-11. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

16. Andrey Bozhkov, Alina Belous, Anatoly Bozhkov, Vladimir Ganin, **Evgeny Ivanov** and Oleg Yurchenko. (2023). 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*. 9: 172 (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

17. 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*, 101338. **SCOPUS (Q2)**. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

18. Bozhkov, A. A., Ganin, V. Y., Akzhyhitov, R. A., **Ivanov, E. G.**, Bilovetska, S. G., Dobrianska, N. I., ... & 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 **SCOPUS (Q 3)**. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

19. Bozhkov, A., Bobkov, V. V., Osolodchenko, T. P., Yurchenko, O. I., Ganin, V. Y., **Ivanov, E. G.**, ... & 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*, Volume 10, Issue 20 e39098 **SCOPUS (Q1)**. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

20. **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. **SCOPUS (Q4)**. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

21. Bozhkov, A., Lebid-Biletska, K., Ivanov, E., Bozhkov, A., & Nikitchenko, Y. (2024). Hepatotoxic doses of copper sulfate induce metabolic memory in the redox system, which has an age-dependent nature. *Ageing and longevity*, 5(3), 113-128. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

22. **Ivanov, E. G.**, Lebid-Biletska, K. M., Bozhkov, A. I., & Nikitchenko, Y. V. (2024). Copper sulfate and carbon tetrachloride induces a uniform response at the level of the redox system and the nature of this response depends on age. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(3), 496-503. **SCOPUS (Q4)**. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

23. Ohiienko S.L., Bondar' A. Yu., **Ivanov E. G.** (2018) Induced liver fibrosis influence on the bone marrow cells culture of rats' different ages. *The development of nature sciences: problems and solutions: The international research and practical conference* (September 12 –18, 2018; Brno, Czech Republic), 405. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

24. Ohiienko S., Bondar A., **Ivanov E.** (2018) Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture. *Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts : XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B.Dybowski*, (April 10 –12, 2018; Lviv, Ukraine), 267-268. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

25. **Ivanov, I.**, & Kozheshkurt, V. (2023). Individual features of the bovine colostrum proteome. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (August 18, 2023; Cambridge, UK), 91-94. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

26. **Ivanov, I.**, Kozheshkurt, V., & Bondar, A. (2023). Low-molecular components of colostrum perform the function of antidote in copper sulphate toxication of the body. *Grail of Science*, (31), 163-167. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

27. **Ivanov, I.**, Bondar, A., & Bozhkov, A. (2024). Age-dependent features of the bone marrow response to toxicogenic liver fibrosis in the experiment. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (March 1, 2024; Paris, France), 126-134. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

28. Goltvjansky, A., **Ivanov, I.** (2024). The "selective integrative" technology of obtaining biologically active components from bovine colostrum. *XI International scientific and practical conference «Innovative Solutions to Modern Scientific Challenges»* (February 21-23, 2024 Zagreb, Croatia), 193-195. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

29. **Ivanov, E.**, Akzhyhitov, R., & Bozhkov, A. (2024). Components from various biological sources reduces the toxic effects of copper sulphate in old animals. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (April 26, 2024; Bologna, Italy), 191-199. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

30. **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. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	24
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	33
1.1 Що таке молозиво і чому його треба вивчати?.....	33
1.2 Роль молозива в еволюції ссавців	36
1.3 Склад та поживна цінність молозива.....	38
1.3.1 Білковий склад молозива	43
1.3.2 Фактори росту і цитокіни молозива	53
1.3.3 Екзосоми та мікро-РНК молозива	55
1.3.4 Вміст цукрів у молозиві.....	56
1.3.5 Ліпідні компоненти молозива	57
1.3.6 Гормони, що містяться в молозиві	58
1.3.7 Вітаміни, які містяться в молозиві	60
1.3.8 Мінеральні компоненти молозива.....	61
1.3.9 Клітини, які містяться в молозиві.....	61
1.4 Про роль молозива у формуванні термогенезу	63
1.5 Відмова від грудного вигодовування та його вплив на онтогенетичні характеристики організму	67
1.6 Використання молозива та його компонентів в медичній практиці	71
1.7 Проблеми та обмеження у використанні молозива та його компонентів....	76
Висновок до розділу 1.....	81
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	83
2.1 Дизайн експериментального дослідження	83
2.2 Отримання та зберігання зразків молозива	84

2.3 Моделювання інтоксикації експериментальних тварин сульфатом міді в експериментальних тварин.....	85
2.4 Виділення та культивування клітин кісткового мозку.....	86
2.4.1. Визначення кількості клітин кісткового мозку та їх морфотипів.....	87
2.5 Фізіологічні методи дослідження.....	88
2.5.1. Визначення динаміки росту, ректальної температури та здатності тварин здійснювати роботу (працездатність).	88
2.5.2 Методика визначення відносної маси органів та міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.....	89
2.5.3 Методика виділення тканин печінки, приготування гістологічних препаратів та підрахунок наявності двоядерних гепатоцитів.....	90
2.6. Конфокальна мікроскопія.....	91
2.6.1 Визначення іонів кальцію у клітинах кісткового мозку	91
2.6.2 Визначення іонів вільних форм кисню у клітинах кісткового мозку (ROS)	92
2.7 Препаративні методи дослідження.....	93
2.7.1 Отримання сироватки крові для дослідження.....	93
2.7.2 Одержання мітохондрій із печінки.....	93
2.7.3 Одержання мікросомальної фракції (ендоплазматичного ретикулуму - ЕПР) клітин печінки.....	93
2.7.4. Одержання цитозольної фракції клітин печінки.....	94
2.8 Аналітичні методи дослідження.....	94
2.8.1 Вимірювання біохімічних показників у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки.....	94
2.8.2 Методика визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), глутаміламінотрансферази (ГГТ), лужної фосфатази	94

	20
2.8.3 Вимірювання вмісту малонового діальдегіду	96
2.8.4 Визначення активності глутаредоксину	96
2.8.5 Визначення глутатіонредуктазної активності (КФ 1.6.4.2)	96
2.8.6 Визначення NADP ⁺ -глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.49).....	97
2.8.8 Визначення NADP ⁺ -малатдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.40)	98
2.8.9 Визначення аконітатгідратазної активність (КФ 4.2.1.3).....	98
2.8.10 Визначення вмісту білку	98
2.9 Мас-спектроскопія білків молозива	98
2.10 Визначення деяких імунологічних показників у експериментальних тварин.....	99
2.10.1. Спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові	99
2.10.2 Метод визначення загальної окисно-відновної активності нейтрофілів у тесті - відновлення нітросинього тетразолію (НСТ)	100
2.10.3 Метод визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові	101
2.10.4 Метод визначення концентрації пептидів молекулярної середньої молекулярної маси	101
2.10.5 Метод визначення гідроперекиси ліпідів (ГПЛ) в сироватці крові	102
2.11 Визначення активності деяких антиоксидантних ферментів	102
2.11.1 Визначення глутатіонпероксидазної активності (КФ 1.11.1.9).....	102
2.11.2 Визначення активності глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2)	103
2.12 Вимірювання електропровідності молозива та компонентів молозива	103
2.13 Визначення антибактеріальної активності іонів міді	105
2.14 Статистичний аналіз даних	107

Висновок до розділу 2:	108
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	109
3.1. Розробка «селективно-інтегративної» технології отримання біологічно-активних компонентів з молозива	109
3.1.1. Обґрунтування способів вирішення проблем нестабільності складу молозива	109
3.1.2. Розробка способу отримання: ліпідної фракції; казеїну; низькомолекулярних компонентів молозива та "ультрафільтрату" із молозива.	114
3.1.3. Методика отримання біологічно активних компонентів із молозива	116
3.1.4. Порівняльне дослідження аналізу «дифференціального» та «інтегративного» способів розділення молозива на фракції	118
Висновок до розділу 3.1	130
3.2. Дослідження фракції низькомолекулярних компонентів молозива як функціональних продуктів харчування.	132
3.2.1. Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на деякі фізіологічні та біохімічні характеристики організму при інтоксикації.....	132
3.2.2. Дослідження низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники функціональної активності кісткового мозку при інтоксикації організму... ..	142
Висновок до розділу 3.2	157
3.3. Дослідження можливих токсичних дій низькомолекулярних компонентів молозива	160
Висновок до розділу 3.3	172
3.4. Розробка експериментальних моделей фіброзу печінки для дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на функції печінки з фіброзом.	174

3.4.1. Обґрунтування необхідності розробки засобів усунення фіброзу печінки	174
3.4.2. Розробка експериментальних моделей Cu-індукованого фіброзу печінки	175
3.4.3. Роль кісткового мозку в розвитку фіброзу печінки у молодих і старих тварин за індукції сірчаноокислою міддю і тетрахлорметаном.....	186
3.4.4 Антибактеріальна активність сірчаноокислої міді по відношенню до <i>Staphylococcus aureus</i> 124 та <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18	203
Висновок до розділу 3.4.....	207
3.5. Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки.....	209
3.5.1. Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники імунної системи.	209
3.5.2. Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники активності печінки у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки та фізіологічні характеристики таких тварин.....	219
3.5.3. Дослідження можливих механізмів дії низькомолекулярних компонентів молозива на моделі фіброзу	223
Висновки до розділу 3.5.....	232
3.6. Дослідження дії "Мікс-фактору" як представник горметинів на показники редокс-системи та тривалість життя тварин в експеримент.....	236
3.6.1. Вплив "Мікс-фактору" на показники редокс-системи експериментальних тварин, які його отримували з 22 місячного віку.....	236
3.6.2. Вплив "Мікс-фактору" на тривалість життя експериментальних тварин, які його отримували з 22 місячного віку	245
Висновок до розділу 3.6.....	250

3.7. Розробка способу контролю якості фракцій молозива на основі визначення електропровідності компонентів молозива як інтегральний показник.....	252
3.7.1. Обґрунтування використання методу визначення електропровідності як інтегрального показника характеристик компонентів молозива	252
3.7.2. Дослідження впливу температури та індивідуальних особливостей продуцентів молозива на електропровідності цільного молозива та його компонентів.....	253
3.7.3. Вплив білкового складу молозива та його компонентів на електропровідність.....	255
3.7.4. Дослідження впливу термінів зберігання на електропровідність компонентів молозива.....	259
3.7.5. Дослідження можливості використання біотесту на основі мікроводорості <i>Dunaliella viridis</i> при оцінці біологічної активності компонентів молозива	261
Висновок до розділу 3.7.....	264
3.8. Дослідження можливостей використання казеїну молозива як "носіїв" біологічно активних субстанцій	266
3.8.1. Обґрунтування актуальності розробки способу отримання комплексу "казеїн-поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою"	266
3.8.2. Розробка способу отримання комплексу "казеїн-поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою"	269
Висновок до розділу 3.8.....	274
ВИСНОВКИ.....	276
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	279

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

HKM – низькомолекулярні компоненти молозива

MFGM – мембранні утворення

ЛПС – ліпополісахариди

TGF- β 2 – трансформуючий фактор росту бета-2

GH – гормон росту

IGF-I – інсуліноподібний фактор росту-I

ІФР – інсуліноподібних факторів росту

IL – інтерлейкіни

EV – візикули

міРНК – мікро-РНК

MFG – кульки молочного жиру

MFGS – епітеліальні клітини молочної залози

MUC – муцини

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини

D3 – холекальциферол

D2 – ергокальциферол

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

ЛПС – ліпополісахариди

LC – Лактобін

АСТ – аспартатамінотрансфераза

АЛТ – аланінамінотрансфераза

cAST – цитоплазма гепатоцитів

mAST – мітохондрії

ГГТ – глутаміламінотрансфераза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

MDH – малатдегідрогеназа

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

ЕДТА – Етилендіамінтетраоцтова кислота

ФІ – фагоцитарний індекс

ФЧ – фагоцитарне число

ГПЛ – гідроперекиси ліпідів

ГП – глутатіонпероксидаза

МДА – малоновий альдегід

ГР – глутатіонредуктаза

НСТ-тест - нітросиній тетразолій

DAMP – молекулярний фрагмент, асоційований з ушкодженнями

ЦІК – циркулюючі імунні комплекси

НАДФН – нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат

МСММ – молекул середньої молекулярної маси

ХК – хлорогенова кислота

ПФ – поліфеноли

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Проблема збереження якості життя та реалізація природного, видового потенціалу тривалості життя є важливою соціальною проблемою. Попри актуальність, інтенсивному розвитку фундаментальних біологічних досліджень, медичних технологій і фармацевтичних розробок ми далекі від її вирішення. Якість і тривалість життя визначаються тонкими дуже складними взаємодіями між великим арсеналом ендогенних та екзогенних факторів, механізми яких залишаються невідомими. Вважаємо, що одним із перспективних підходів у вирішенні такої складної біомедичної проблеми є використання механізмів корекції біологічних процесів природними багатокомпонентними субстанціями. Серед величезної кількості природних сполук, здатних регулювати біологічні процеси, особливу роль посідає молозиво. Сучасні дослідження засвідчили, що молозиво не тільки забезпечує новонародженого поживними речовинами, а й формує та програмує характеристики й особливості проходження всього майбутнього онтогенезу організму. Наші знання про роль молозива у становленні та особливостях фізіологічного розвитку організму обмежені знаннями про його роль у передачі пасивного імунітету та його поживну цінність для новонароджених, а як зазначають автори роботи [1–3], його функції виходять далеко за ці рамки. Розширити наші уявлення про роль молозива у фізіологічних процесах організму та можливостей його практичного застосування сприятиме вирішенню проблеми якості та тривалості життя, та сприятиме розвитку сучасних біотехнологій.

Незважаючи на те, що молозиво називають "рідким золотом", а Hardy у 2000р. заявив, що молозиво є "найважливішою їжею у світі", і багато дослідників вказують на те, що воно володіє величезним потенціалом [4, 5], його використання дуже обмежене через цілу низку причин: 1 - проблем, що виникають під час зберігання та переробки; 2 - відсутності повних знань про його властивості та особливості впливу на розвиток організму, зокрема дорослих і старих людей; 3 -

нестабільності та високої варіабельності складу молозива, що залежить від сполучень великої кількості чинників [6–8], а усунути їх неможливо, що ускладнює процеси стандартизації та сертифікації одержуваних продуктів і субстанцій із молозива.

Мета та завдання дослідження

Метою роботи було: розробка технології одержання та стандартизації різноманітних субстанцій із молозива; дослідження можливості використання отриманих субстанцій у продуктів функціонального харчування; дослідження механізмів гепатотропної дії компонентів молозива на моделі фіброзу печінки; дослідження можливості використання міцел казеїну молозива в якості субстанції для стабілізації та доставки біологічно активних сполук в організм.

Для досягнення мети виконували такі завдання:

1. Обґрунтувати принципи стандартизації при отриманні різних субстанцій з молозива.
2. Розробити спосіб отримання: ліпідної фракції; казеїну; низькомолекулярних компонентів молозива та "ультрафільтрату" з молозива.
3. Дослідити можливість використання фракції низькомолекулярних компонентів молозива як функціональних продуктів харчування.
4. Дослідити дію низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники функціональної активності кісткового мозку за моделью інтоксикації організму.
5. Дослідити можливу наявність токсичності при дії низькомолекулярних компонентів молозива на організм.
6. Дослідити вплив низькомолекулярних компонентів молозива на регуляцію функції печінки на моделі фіброзу.
7. Дослідити дію "Мікс-фактору" на показники редокс-системи та тривалість життя тварин в експерименті.
8. Розробити спосіб контролю субстанцій молозива на основі визначення їх електропровідності.

9. Розробити спосіб отримання комплексу "казеїн-поліфенольні сполуки", збагачений хлорогеновою кислотою.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено нову "селективно-інтегративну" технологію одержання різноманітних субстанцій з молозива: ліпідну; казеїнову; низькомолекулярні компоненти молозива та "ультрафільтрату". Доведено, що ця технологія дає змогу: 1 - отримати 4 субстанції з різними властивостями; 2 - підвищити вихід цільових продуктів; 3 - забезпечити їх часткову стандартизацію.

Доведено можливість використання низькомолекулярних компонентів молозива у якості продукту функціональної їжі, що забезпечує антитоксичну дію у випадку інтоксикації організму, підвищує працездатність експериментальних тварин і поліпшує їх «якість життя».

Встановлено, що механізм антитоксичної дії низькомолекулярних компонентів молозива реалізується шляхом регуляції балансу в редокс-системі організму, і це здійснюється завдяки нормалізації функціональної активності антиоксидантів, та як наслідок зменшенням продуктів вільнорадикальних реакцій.

Виявлено, що зміни у редокс-системі організму, які індукували низькомолекулярні компоненти молозива, супроводжувались і змінами у функції кісткового мозку – зміною швидкості транспорту клітин до кровотоку та таких функціональних характеристик клітин кісткового мозку як швидкість проліферації и час «життя» у системі *in vitro*.

Показано відсутність токсичної дії низькомолекулярних компонентів молозива у широкому діапазоні доз (від 0,01 до 0,5 г/100 г маси) і лише за надвеликих доз (від 1 і до 5 г/100 г), що можуть становити в розрахунку для дорослої людини до 3,5 кг на добу, має місце індивідуальна непереносимість.

Розроблена нова експериментальна модель Cu-індукованого фіброзу печінки, запропоновано механізм стадійного розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки та обґрунтовано можливість його використання при розробці засобів і способів корекції таких функціональних станів.

Вперше на експериментальній моделі фіброзу печінки показано поліфункціональність дії низькомолекулярних компонентів молозива (антифібротична, прооксидантна, антиоксидантна та ін.). Вперше доведено, що дія низькомолекулярних компонентів молозива визначається не тільки дозою, а й функціональним станом метаболізму організму на момент впливу низькомолекулярних компонентів молозива. Показано, що така поліфункціональність пояснюється, з одного боку, неспецифічною-горметичною дією низькомолекулярних компонентів молозива (НКМ), як і інших схожих біологічних субстанцій ("Мікс-фактор"), а з другого, системною корегувальною дією на елементи біологічних систем, що виходять за межі гомеостатичних показників.

Уперше показано, що низькомолекулярні компоненти молозива та низькомолекулярні компоненти з інших біологічних джерел ("Мікс-фактор") володіють схожими біологічними діями, що вказує на те, що вони можуть бути віднесені до груп горметинів, тобто можуть індукувати в організмі ефект гормезису, що пояснює поліфункціональність і неспецифічність дії таких субстанцій.

Запропоновано використовувати метод електропровідності компонентів молозива та культури клітин *Dunaliella viridis* у якості біоідекації, при стандартизації рідких полікомпонентних біологічних субстанцій.

Уперше показано можливість «включення» поліфенольних сполук до складу казеїнових міцел, що супроводжується змінами протеїнової частини таких міцел. Запропоновано використання казеїну молозива як засобу "доставки" та стабілізації поліфенольних сполук в організм.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано метод фракціонування молозива на чотири базові субстанції: ліпіди; казеїн; низькомолекулярні компоненти молозива та "ультрафільтрат", що можуть використовуватися як продукти функціонального харчування та бути основою для подальшого очищення до моносполук, які мають перспективу використання у різних галузях сучасної біотехнології та фармації.

Розроблений метод включення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у міцели казеїну молозива має великі перспективи в розробці продуктів функціонального харчування. Відсутність токсичної дії низькомолекулярних компонентів молозива та відновлення деяких функцій печінки за фіброзу дає змогу розглядати цю субстанцію з молозива як перспективний фармакологічний препарат із гепатотропним ефектом.

Розроблена технологія отримання біологічно активних субстанцій із молозива використовується в НДІ біології для отримання продуктів функціонального харчування. Аспіранти, та студенти кафедри молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна використовують цю технологію при виконанні практичних занять, магістерських кваліфікаційних робіт, та дисертацій.

Отримані результати використовуються під час читання курсу "Фармацевтична біотехнологія", спецкурсів "Об'єкти біотехнології", "Імунобіотехнології" на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на базі Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи інституту за темами: «Виділення, характеристика та оцінка фізико-біохімічної активності низькомолекулярних компонентів молозива» за договором № 26-15; «Дослідження механізмів дії низькомолекулярних компонентів молозива на гемопоез і функцію інтоксикації печінки на моделі фіброзу печінки» за договором № 44-16; «Дослідження дозової залежності дії компонентів молозива на тест-об'єкти та характеристика редокс-системи організму» за договором № 05-18; «Визначення активності антиоксидантних ферментів: глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази на моделі фіброзу печінки» за договором № 26-19 «Розробка системи контролю на різних етапах отримання біологічно активних компонентів з молозива» за договором № 02-21; «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.

Об'єкт дослідження – низькомолекулярні субстанції з молозива та харчової добавки «Мікс-фактор».

Предмет дослідження – біологічні ефекти (антиоксидантний, прооксидантний, гепатотропний, імуномодельючий) низькомолекулярних субстанцій з молозива та харчової добавки «Мікс-фактор».

Методи дослідження – фізіологічні методи (динаміка маси і температури тіла, працездатність), методи клітинної біології та гістології (світлова та камфокальна мікроскопія), біотехнологічні методи (виділення та культивування лейкоцитів та клітин кісткового мозку, фракціонування молозива, ліофілізація та інші), біохімічні (спектрофотометричні методи, активність ферментів, характеристика редокс-системи), аналітичні (мас-спектрометричні МАЛДІ-ТОФ), фізико-хімічні (отримання та характеристика наноструктурних комплексів) та методи статистики.

Особистий внесок автора. Автором особисто проведено пошук та аналіз літератури, розроблено методологію експериментальних досліджень, сформульовано основні положення дисертації, здійснено підготовку рукопису. Експерименти виконані дисертантом особисто або за безпосередньої участі. Співучасть працівників кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна висвітлено у спільних публікаціях і зазначено в подяках.

Апробація результатів дисертації: Основні положення дисертаційної роботи були представлені на міжнародних та вітчезняних наукових конференціях The development of nature sciences: problems and solutions: The international research and practical conference (September 12 –18, 2018; Brno, Czech Republic); *Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts : XIV International Scientific Conference*

for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B.Dybowski, (April 10 –12, 2018; Lviv, Ukraine); Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ», (August 18, 2023; Cambridge, UK); Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ», (March 1, 2024; Paris, France), XI International scientific and practical conference «Innovative Solutions to Modern Scientific Challenges» (February 21-23, 2024 Zagreb, Croatia), Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ», (April 26, 2024; Bologna, Italy).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову роботу та один розділ монографії (у закордонному виданні), що опубліковані в зарубіжних наукових журналах, 10 наукових робіт проіндексовано в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science, 8 тез доповідей на закордонних наукових конференціях. Серед цих робіт: 4 експериментальні статті у журналах, що належать до Q4, 2 експериментальні статті у журналах, що належать до Q3, 1 експериментальна стаття у журналі, який належить до Q2, 1 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 (436 найменувань). Дисертація викладена на 325 сторінках і проілюстрована 63 рисунками та 14 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Що таке молозиво і чому його треба вивчати?

Молозиво - секрет молочної залози, який виробляється самками ссавців протягом 72 годин після пологів [6, 9]. Сучасні дані показують, що пращури плацентарних тварин (ссавці) отримали еволюційну перевагу після крейдяно-палеогенного вимирання, що відбулося приблизно 187 млн. років тому [10]. Перехід до внутрішньоутробного розвитку у тварин, з одного боку, забезпечив "ідеальні" умови для розвитку плоду, а з іншого, виник критичний період в індивідуальному розвитку під час переходу до самостійного життя в досить агресивному навколишньому середовищі. Саме в цей ранній період онтогенезу має місце найвищий відсоток смертності серед ссавців, тобто він є критичним періодом онтогенезу [11, 12]. У зв'язку з цим, у ссавців мати виконує особливу роль у забезпеченні виживання потомства. І хоча в різних видів ссавців сформувалися різні варіанти материнської турботи про потомство, визначальним є забезпечення немовлят молозивом і молоком. Необхідно зазначити, що склад молозива, як і молока, залежить від тривалості вагітності, кількості нащадків під час пологів, особливостей харчування, генетичних характеристик та еволюційних особливостей плаценти. Необхідно відзначити, що кількість споживаного молозива новонародженими відіграє визначальну роль у формуванні біохімічних і фізіологічних характеристик організму, які зберігаються і підтримуються протягом усього онтогенезу. Так, було показано, що необмежене (надлишкове) споживання молозива і молока новонародженими щурятами протягом 24 днів після пологів, супроводжувалося перевагою в масі тіла на 30% порівняно зі стандартним споживанням молозива і молока [13]. Таке перегодовування молозивом і молоком супроводжувалося формуванням специфічних епігенотипів, які зберігалися протягом всього онтогенезу і корелювали зі скороченням тривалості життя [13].

Однак, незалежно від складу молозиво воно не тільки забезпечує новонародженого поживними речовинами, а й формує, а можливо і програмує

характеристики та особливості проходження всього майбутнього онтогенезу. Наші знання про роль молозива в становленні та особливостях фізіологічного розвитку організму обмежені знаннями про його роль у передачі пасивного імунітету та його поживну цінність для новонароджених, а як зазначають автори роботи [1–3] його функції виходять далеко за ці рамки. Розширити наші уявлення про роль молозива у фізіологічних процесах організму і можливостей його практичного застосування і входить в одне із завдань цієї роботи.

Необхідно зазначити, що молозиво це не просто червонувато-жовта, в'язка рідина, а специфічна субстанція з дуже складним і багатокомпонентним високодинамічним складом. До складу молозива входять не тільки велика кількість поживних речовин (білків, ліпідів, вітамінів, амінокислот, пептидів, мікроелементів), та надзвичайно широкий набір біологічних регуляторів (цитокінів, чинників росту, гормонів, імуноглобулінів, вітамінів, мікроелементів), а й відносно велика кількість клітин, до 10^6 клітин на мл (лейкоцитів та еритроцитів) [7, 14, 15]. Нещодавно було показано, що в грудному молоці присутні і стовбурові клітини, які здатні до проліферації та диференціювання в інші типи клітин [16, 17]. Важливо відзначити, що ці компоненти в складі молозива формують специфічні надмолекулярні структури, тобто вони так "упаковані", що зберігають свою структуру доти, доки не опиняться в тих відділах кишечника, де буде забезпечено синергічний ефект їхніх дій у захисних і репаративних процесах організму. Було виявлено, що білки молозива, як і молока, зокрема молекули казеїну, здатні до формування специфічних надмолекулярних комплексів [18, 19] і можуть бути використані як агенти для інкапсулювання різноманітних біологічно активних сполук [19]. Важливу роль у "структуруванні" компонентів молозива відіграють і ліпіди, які формують глобули із середнім діаметром близько 4 мкм. Як відомо, навколо таких ліпідних кульок формуються білкові оболонки, мембранні утворення (MFGM) [20]. Подальші дослідження надмолекулярної організації компонентів молозива становлять великий теоретичний і практичний інтерес, тому що ці знання сприятимуть розумінню процесів самозбирання надмолекулярних комплексів, що має величезне

загальнобіологічне значення. Не менш важливими ці знання є і в розв'язанні цілої низки питань практичної медицини, бо можуть бути корисними під час розроблення способів одержання різноманітних біологічно активних субстанцій із молозива. Корова продукує від 5 до 10 л. молозива за одне доїння, що значно перевищує потреби теляти та могло б бути використане для отримання унікальних продуктів функціонального харчування та медичного призначення. Незважаючи на те, що молозиво називають "рідким золотом" або "імунним молоком", а Hardy у 2000 р. заявив, що молозиво є "найважливішою їжею у світі", і багато дослідників цієї унікальної субстанції вказують на те, що воно володіє величезним потенціалом, його використання сильно обмежене через цілу низку причин.

1 - Проблем, які виникають під час зберігання та переробки.

Так, зокрема, навіть за дотримання жорстких вимог під час доїння має місце контамінація, що потребує додаткового видалення мікроорганізмів. При цьому, з одного боку, високий вміст білка в молозиві ускладнює процес пастеризації [21, 22], а наявність великої кількості протимікробних компонентів, що входять до складу молозива, пригнічують можливий процес подальшої його ферментації [1, 23]. Крім того, висока щільність молозива не дає змоги на пряму розділяти його на окремі компоненти, тобто його технологічна переробка ускладнена.

2 - Відсутність повних знань про його властивості та особливості впливу на розвиток організму, зокрема дорослих і старих людей.

Наявні знання про фізіологічні властивості молозива обмежуються дослідженнями його впливу на новонароджених, що цілком природно. Водночас його вплив на організм, у якого вже сформована імунна система, або є хронічні патології, залишається мало дослідженим, а це могло б допомогти у розв'язанні цілої низки медико-біологічних і геронтологічних проблем.

3 - Нестабільності та високій варіабельності складу молозива, який залежить від сполучень великої кількості чинників [7–9]. Усунути їх неможливо, що ускладнює процеси стандартизації та сертифікації одержуваних продуктів і субстанцій із молозива.

Проблема стандартизації, особливо продуктів медичного призначення, є актуальним і практично важливим завданням не тільки під час переробки молозива, а й усіх продуктів, які отримують методами біотехнології і являють собою суміш або композиції різних сполук, і виділити серед них активний початок, що найчастіше є основою стандартизації, неможливо.

Дослідженню характеристик і властивостей молозива і насамперед молозива великої рогатої худоби присвячено величезну кількість робіт. Разом з тим, широкому колу питань фундаментальної ролі молозива в розвитку та реалізації онтогенетичних процесів приділяється мало уваги. На жаль, залишається не використаним величезний практичний потенціал цього унікального продукту еволюції ссавців. Ми усвідомлюємо, що цією роботою не буде вирішено весь комплекс фундаментальних і практичних завдань, пов'язаних із цією унікальною біологічною субстанцією. Однак, ми сподіваємося, що результати цієї роботи розширять уявлення про еволюційну та фізіологічну роль молозива і привернуть увагу широкого кола фахівців до подальшого дослідження цієї субстанції і розробки нових технологічних підходів, які дозволять використати величезний потенціал, даний нам самою природою, на поліпшення якості життя людини.

1.2 Роль молозива в еволюції ссавців

Ще на початок 20 століття, проводячи порівняльний аналіз тварин, Р. Брум зазначав, що ссавці, які живуть нині, настільки різко відрізняються від усіх інших хребетних, що немає жодної групи, з якою вони здавалися б спорідненими, і жодної групи, яка явно є для них прабатьківською [24].

Молочна залоза розвинулася з потових залоз у так званій кладі синапсид. Потові залози - це шкірні залози, які беруть участь у регуляції температури тіла шляхом випаровування водянистого секрету на поверхні шкіри, тобто наявність у тварин потових залоз - це перший крок до активної регуляції температури тіла на відміну від пасивної, яка забезпечується температурою зовнішнього середовища.

Клад синапсид походить від стовбурових амніот і відокремився від діапсид, від яких і походять сучасні рептилії та птахи. Вважається, що у вимерлих не

ссавцевоподібних видів синапсид, також званих протоскелекоподібними, потові залози були пов'язані з волосяними фолікулами [25]. Немамалієві синапсиди відкладали яйця, які мали тонку, шкірясту оболонку, вразливу до висихання. Тому вважається, що додатковою функцією рідини, що виділяється, було зволоження яєць і виношування потомства.

Сучасні однопровідні також відкладають яйця і мають молочні залози, які розвиваються з апокринових потових залоз, пов'язаних із волосяними фолікулами, і виділяють молоко на поверхню шкіри [26, 27]. Цілком імовірно, що яйцеві зволожувальні залози немамалієвих синапсид є еволюційними попередниками молочних залоз.

Можна погодитися з тим, що кардинальне значення в еволюції ссавців зіграла поява в секреті первинних молочних залоз молекул казеїну [28], а точніше - поява молекул з такими властивостями, якими володіє казеїн. Через те, що молекули казеїну в молоці зв'язують фосфат і кальцій та формують великі надмолекулярні комплекси (міцели), то вживання новонародженими такого продукту, як молоко, не тільки забезпечує їх усіма необхідними амінокислотами та мінеральними компонентами, які сприяють формуванню скелета та ріст зубів, але важливим є і те, що такі міцели відносно повільно перетравлюються у кишковому тракті, а це забезпечує пролонговану дію цих нутрієнтів на метаболізм. Поступовий розвиток лактації у стародавніх синапсид, тобто перетворення пролактальної рідини на поживне молоко, корелювало з еволюційними особливостями ссавців: підвищена швидкість метаболізму, висока аеробна здатність, відносно швидке перетравлення їжі та високі темпи росту [27].

Процес лактації, поряд із забезпеченням новонароджених поживними речовинами й антимікробним та імунним захистом, зіграв вирішальну роль у формуванні інтелекту, тому що тривалий контакт між матір'ю й дитинчам надає нащадкам можливість навчання й передавання досвіду, що в найяскравішій формі спостерігається у "вищих приматів"[29].

Перехід до внутрішньоутробного розвитку і поява лактації це, по-суті, принципово новий етап еволюційного розвитку життя. Існує низка гіпотетичних

припущень про те, що найважливішим селективним чинником походження лактації є мікробне хижацтво [30]. Тоді як у предкових птахів інтенсивне хижацтво з боку ґрунтових бактерій могло бути селективним тиском на користь кальцифікування яєчної шкаралупи [30, 31]. Як вважає В Хайссен, Д.Г. Блекберн, поживна цінність молока затьмарила первісну захисну функцію протолактальних виділень. Разом з тим, антимікробна функція компонентів (лізоциму, лактоферину, лактопероксидази) молока залишається надзвичайно важливою у збереженні та розвитку новонароджених [30, 32–34].

Необхідно зазначити, що еволюція лактації вимагала складної інтеграції багатьох мікроеволюційних змін, які стосувалися різних рівнів організації. У сучасних ссавців лактація являє собою дуже складне явище, яке включає морфологічну, фізіологічну, біохімічну, екологічну та поведінкову адаптації [31]. Адаптивна цінність прото-молочних виділень пов'язана з такими еволюційно важливими проявами як терморегуляція, антимікробний захист, зміни поведінкових і харчових функцій. Встановити причини та механізми виникнення ссавців завдання надзвичайно складне, однак, можна стверджувати, що наслідком грудного вигодовування є формування інтелекту - виникнення людини.

1.3 Склад та поживна цінність молозива

Визначенню складу молозива присвячено величезну кількість наукових публікацій. Однак найбільша кількість досліджень його складу та властивостей присвячена молозиву великої рогатої худоби. Це пояснюється кількома причинами: коров'яче молозиво отримують у промислових масштабах, знання складу та його роль у розвитку новонароджених телят має величезне економічне значення, воно має певну схожість із жіночим молозивом і може бути використане в харчуванні людини. Його окремі компоненти давно використовуються в народній медицині і можуть знайти застосування в сучасних біо- і нанотехнологіях. Незважаючи на величезний інтерес до цього продукту впродовж століть (згадки про його користь і необхідність його застосування згадується в аюрведі), дати повний перелік компонентів, що входять до цієї особливої біологічної субстанції, і сьогодні залишається важким завданням.

Це пояснюється тим, що молозиво одна з найдинамічніших біологічних рідин, склад якої змінюється, навіть в однієї тварини, з кожною наступною хвилиною після пологів, а за 3-5 діб воно майже відповідає зрілому молоку, яке, як відомо, суттєво відрізняється від молозива [7, 8, 14]. Більше того, на його склад впливають не тільки генетичні особливості тварини, а й комплекс надзвичайно різноманітних чинників зовнішнього середовища. Найбільш значущими та дослідженими є: особливості годівлі; вік і кількість пологів; пора року (сезонність) та ін.[35, 36]. Проблема визначення компонентного складу молозива ускладнюється ще й такими фундаментальними біологічними особливостями, як індивідуальний характер відповіді організму на комплексну дію екзогенних чинників середовища.

Пояснимо це на прикладі. Як відомо, до складу молозива входить велика кількість різноманітних білків [8, 37, 38]. Дослідження тільки частини протеому коров'ячого молозива в діапазоні від 5 до 9 Кда, що було отримано у двох корів однієї породи, які перебували в однакових умовах утримання, дуже близьких за віком, в один і той самий період року суттєво відрізнялися між собою (Рис. 1.1). Як видно на малюнку, тільки деякі білкові піки (5164; 5439; 5602; 5788; 5887; 6894; 7729 і 7747) співпадали, при цьому вони кількісно відрізнялися. При цьому, вони відрізнялися за білками в діапазоні з мол. масами від 6222 до 6652 (Рис.1.1).

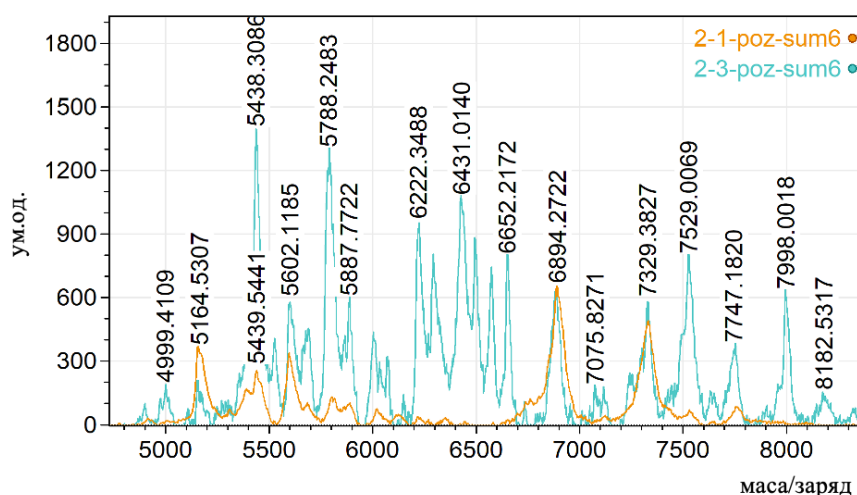


Рис. 1.1. Мас-спектри низькомолекулярних білків молозива, що були отримані в однакових умовах у двох корів породи "Українська чорно-ряба"

близького віку першого доїння без будь-яких патологій у весняний період, показані різними кольорами.

Дослідження електропровідності молозива, яка може слугувати показником кількості заряджених молекул і насамперед іонного складу молозива показало, що вона теж має виражений індивідуальний характер (рис. 1.2).

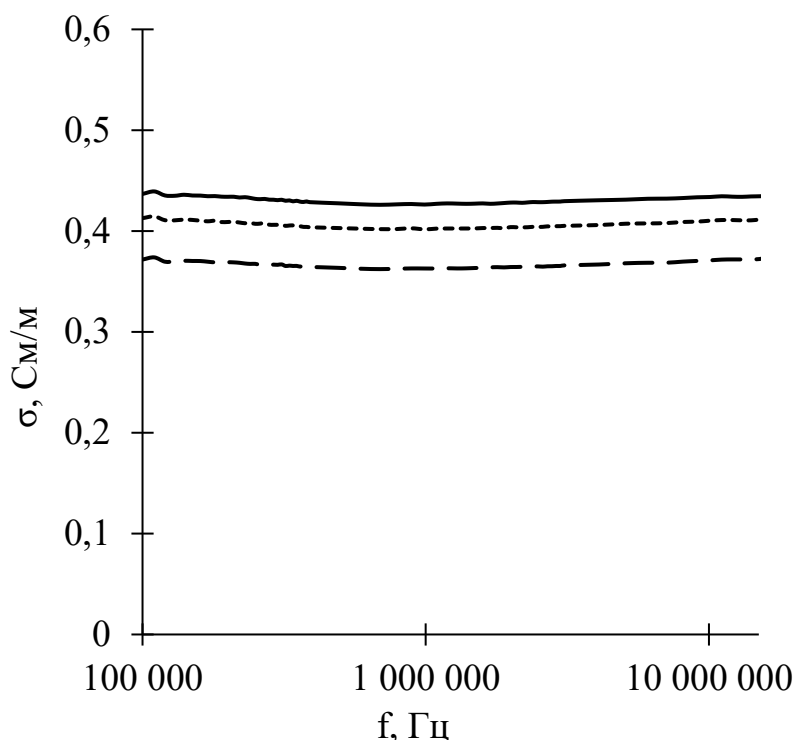


Рис.1.2. Електропровідність σ цільного молозива в діапазоні частот f 100 кГц – 10 МГц, яке отримано від «Аврори» (—), від «Барині» (— —), від «Мухи» (----).

Подібних прикладів можна навести в досить великій кількості, і вони переконливо доводять високу динаміку складу молозива і його виражений індивідуальний характер. Ця особливість компонентного складу молозива є основною, а можливо головною "перешкодою" під час розроблення промислових технологій його перероблення з метою одержання біологічно цінних продуктів, оскільки це ускладнює стандартизацію цільового продукту. Вважаємо, що одним із шляхів практичного вирішення цього важливого завдання, спрямованого на використання величезного потенціалу молозива як сировини для отримання продуктів функціонального харчування та медичних препаратів, є "селективно-

інтегративний" підхід переробки молозива. Суть підходу полягає в тому, що для подальшої переробки відбирають молозиво тільки першого і другого надою, у корів однієї породи та одного і того ж віку, які утримують в однакових умовах годівлі, тобто проводять попередню селекцію. З молозива, отриманих у цих корів, формується єдина партія після об'єднання продукції не менше 10 корів. Кожна партія молозива проходить контроль якості, зокрема й вимірювання електропровідності, і після цього піддається переробці як окрема партія.

З огляду на ці особливості компонентного складу молозива, розглянемо середні дані за його складом, оскільки це має принципово важливе значення як для розуміння його ролі в розвитку новонароджених, так і під час розроблення способів його перероблення та подальшого використання в біотехнологіях, харчовій та медичній галузях.

Увесь різноманітний компонентний склад молозива можна розподілити або класифікувати на три умовні групи сполук: компоненти, що забезпечують функції харчування; компоненти, що беруть участь у становленні та регуляції імунної системи, і різноманітні фактори росту, що беруть участь у регуляції загального метаболізму організму (рис. 1.3).

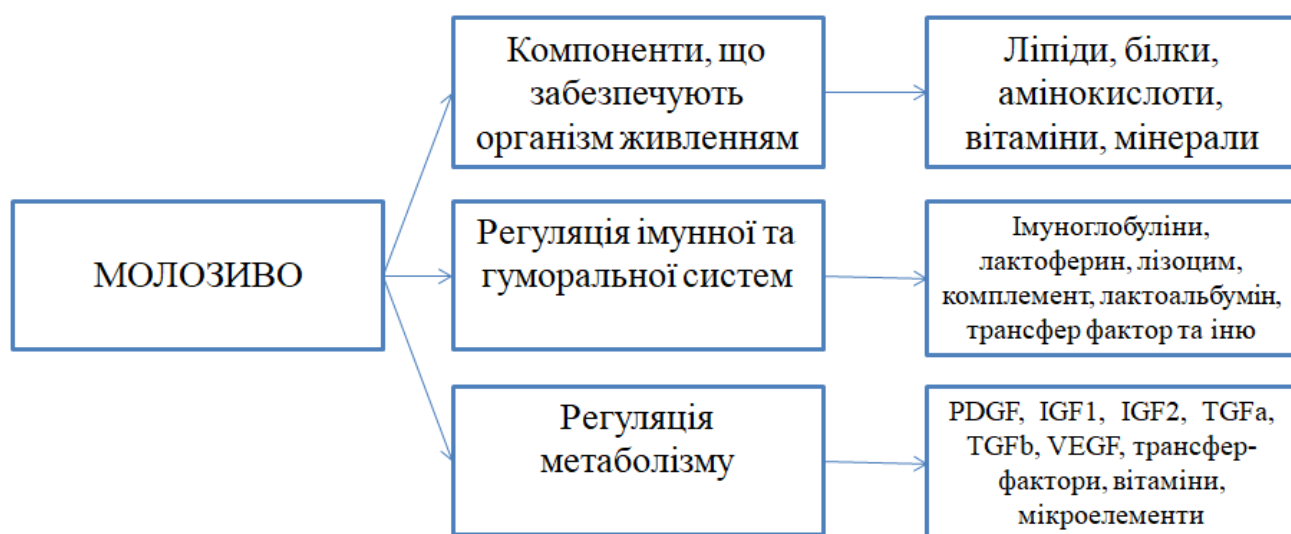


Рис.1.3. Схема, яка демонструє участь молозива в таких фізіологічних процесах, як: харчування, регуляції імунної системи та загального метаболізму, і деяких компонентів молозива, які беруть участь у цих процесах.

Перший прийом молозива новонароджених відіграє істотну роль у харчуванні та становленні всієї метаболічної системи організму. За поживною цінністю молозиво значно перевищує молоко і це пояснюється великою кількістю насамперед білків і ліпідів, що входять до складу молозива. Так, вміст сухих речовин у молозиві першого доїння голштинських корів становить у середньому близько від 24 до 29%, а в молоці - від 12 до 13% [39]. Молозиво містить у чотири рази більше білків і ліпідів порівняно з молоком [39, 40]. Вміст казеїну, який відіграє важливу роль у забезпеченні організму амінокислотами, у молозиві значною мірою (у 2-3 рази) більший, ніж у молоці [41, 42]. У складі молозива присутні: вітамін А, вітамін Е, каротин, рибофлавін, вітамін В12, фолієва кислота, холін, що містяться в підвищених концентраціях у коров'ячому молозиві порівняно з молоком, та широкий набір мікроелементів, які також відіграють суттєву роль у живленні та регуляції активності ферментів [39, 43].

Поживна цінність білків молозива залежить від складу амінокислот і кінетики перетравлювання їх у шлунку та верхньому відділі кишківника [44] і звісно від співвідношення (балансу) біологічно активних сполук, що входять до складу молозива. Казеїнові білки утворюють у шлунку згусток (гель), який сповільнює перетравлювання і транспорт амінокислот у кровообіг. Це створює відчуття ситості і казеїнові білки відносять до групи білків, що повільно перетравлюються. Навпаки, сироваткові білки, що входять до складу молозива, добре розчиняються в шлунку і швидко надходять у тонкий кишечник, де швидко піддаються гідролізу і всмоктуванню. Ці відмінності між кінетикою перетравлення казеїну і сироваткових білків було охарактеризовано як концепцію повільного і швидкого білкового метаболізму [45], і вони мають значення для моторики кишківника і метаболізму під час використання продуктів із молозива і молочних продуктів для організму.

Велику роль у харчуванні новонароджених відіграють ліпідні компоненти молозива, на частку яких припадає від 6,7% при першому надої до 3,9 % після третього надою [46], що значно вище ніж у молоці.

Необхідно зазначити, що склад харчових компонентів та їхній баланс під час перших прийомів їжі відіграють вирішальну роль не тільки в забезпеченні новонародженого "будівельними" компонентами, а й формують епігенетичні та метаболічні характеристики організму. Компоненти молозива добре збалансовані за всіма біологічно активними інгредієнтами, що є вирішальними в становленні метаболізму новонароджених, і ці особливості формують такі гомеостатичні характеристики, які будуть підтримуватися впродовж усього онтогенезу.

1.3.1 Білковий склад молозива

Найбільша доля серед груп сполук, що містяться в молозиві, припадає на білки. Білки молозива надзвичайно різноманітні та мають виражені видові особливості. Усе їхнє різноманіття можна умовно поділити на казеїн і сироваткові білки молозива або молока [18, 41]. Такий поділ ґрунтується на тому, що, з одного боку, казеїну досить багато по відношенню до решти білків, а з іншого боку, він легко і досить повно відокремлюється від інших білків у разі доведення рН до 4,6, тобто за досягнення ізоелектричної точки казеїну [41, 47]. Крім того, казеїн - це особливий і основний білок молока, який має цілу низку унікальних властивостей.

Розглядаючи білковий склад молозива, не можна не зазначити те, що високий вміст білка в молозиві значно ускладнює його промислову переробку і насамперед пастеризацію, яку використовують для знищення супутніх бактерій [8, 21, 22, 48].

1.3.1.1 Деякі особливості казеїну молозива

Казеїн - це специфічна група фосфопротеїнів, які синтезуються в молочній залозі [49, 50]. Казеїн зв'язує кальцій (до 6% за масою припадає на іони кальцію), фосфати та інші іони металів і забезпечує їхню доставку та обмін [19]. Як відомо, це основний білок молока, на його частку припадає від 78 до 85% від усіх білків молока [8, 41, 48, 51]. Вміст казеїну в молозиві першого доїння у 2-3 рази більший, ніж у зрілому молоці [8], проте на його частку в молозиві припадає від 30 до 37% від усіх білків, оскільки в молозиві збільшено кількість інших білків порівняно з молоком [41]. У великої рогатої худоби казеїн представлений чотирма

ізоформами: $\alpha S1$, $\alpha S2$, β і κ , що розрізняються за амінокислотним складом, вмістом фосфору та вуглеводів, але подібні за своїм амфіфільним характером [52, 53]. у молозиві міститься значно більше κ -казеїну відносно інших ізоформ казеїну. Так, співвідношення β -казеїну до κ -казеїну в молозиві 0,61, а в зрілому молоці це співвідношення становить 0,30 [53].

Відомо, що κ -казеїн містить майже в 2 рази більше вуглеводів, ніж інші ізоформи казеїну [41, 49, 53], що припускає відмінності в структурі його простетичної групи та особливості його функціональних характеристик порівняно з іншими формами казеїну. Необхідно зазначити, що κ -казеїн на відміну від β -казеїну не зв'язує кальцій, але він стабілізує казеїнову міцелу. Отже, для формування міцел необхідна присутність усіх форм казеїну, які взаємодіють із кальцієм [28]. Наразі тривають інтенсивні дослідження структурних особливостей ізоформ казеїну, оскільки це може забезпечити отримання специфічних надмолекулярних комплексів та їх використання в медичних цілях.

Гідрофільні та гідрофобні ділянки в білковому ланцюгу казеїну мають блочний розподіл. Казеїнові пептиди несуть на своїй поверхні негативний заряд, що забезпечує їм формування нанокластерів (рис 1.4), тобто вони здатні до самозбирання або формування міцел [19, 54, 55].

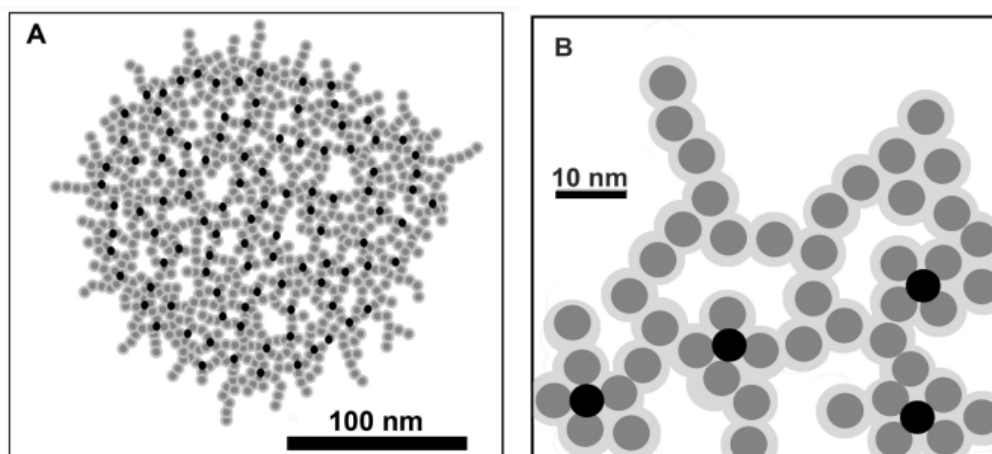


Рис. 1.4. Решітчаста модель міцели казеїну, на якій показано взаємодію молекул казеїну між собою з формуванням довгих ланцюгів та утворення нанокластерів з фосфатом кальцію: А - масштабоване зображення в поперечному перерізі всієї супрамолекули; В - частини периферії супрамолекули. Нанокластери

фосфату кальцію показані діаметром 4,8 нм і на відстані приблизно 18 нм один від одного, а молекули казеїну показані з гідродинамічним діаметром 8 нм [56].

Казеїн відіграє ключову роль у харчуванні, формуванні мікробіома і становленні імунної системи новонароджених. Це пояснюється кількома важливими особливостями його структурної організації. Насамперед його збалансованим амінокислотним складом і вмістом фосфору та кальцію, а це, як уже зазначалося, відіграло визначальну роль в еволюції ссавців [3, 27, 57]. У шлунку казеїн утворює гелеподібну консистенцію, що створює відчуття тривалої ситості та є регулятором апетиту. Він досить довго гідролізується в травній системі і його називають білком, що повільно розщеплюється. У зв'язку з цим, тим, хто вживає казеїн як спортивне або функціональне харчування, рекомендують приймати його на ніч [58]. Важливим є те, що в процесі травлення казеїн гідролізується до макропептидів, які регулюють видовий склад мікробіома шлунка і функціональну активність імунної системи організму [58, 59].

Необхідно зазначити, що макропептид казеїну - це гетерогенна фракція пептидів, що утворюються внаслідок дії травних ферментів, як правило, на κ -казеїн. Ця фракція пептидів має унікальний склад і характеристики. Через те, що ці пептиди виконують важливі та досить різноманітні функції, наразі ведуться розробки методів їхнього визначення та способів їхнього використання як лікарських препаратів [60–62].

Крім того, унікальний амінокислотний склад і функціональні властивості макропептиду припускають, що його можна включати в деякі дієтичні продукти [63]. Так, у низці робіт було показано, що макропептид, який утворюється під дією шлункової протеїнази, може зв'язувати ентеротоксин *Streptococcus*, *Porphyromonas gingivalis* і *Escherichia coli*, тим самим інгібуючи адгезію цих мікроорганізмів [64]. Однак макропептид казеїну може в той же час і сприяти проліферації інших видів бактерій - *Bifidobacterium*, включаючи види *Bifidobacterium bifidum*, *breve*, *infantis* і *lactis* [65]. Повідомлялося, що глікомакропептид із казеїну верблюжого молока може пригнічувати шлунково-кишкові бактеріальні інфекції, такі як *E. coli* та *Salmonella*, за поліпшення

зростання популяцій *Bifidobacterium* [65, 66], що вказує на його позитивний регуляторний ефект на рівні мікробіома. Необхідно відзначити той факт, що позитивно заряджені амінокислоти, які входять до складу пептидів казеїну можуть взаємодіяти з аніонними сполуками деяких бактерій, що призводить до лізису цих клітин [67] .

Можна вважати, що така антибактеріальна активність макропептиду казеїну може розглядатися як альтернатива антибіотикам. Як відомо, антибіотикорезистентність нині стала однією з глобальних проблем охорони здоров'я, продовольчої безпеки та економічного розвитку [42, 68] і розробка нових способів боротьби з патогенними бактеріями є вкрай необхідною.

Високий вміст казеїну в молоці останніми роками зробив його одним із найпопулярніших протеїнів. Ці особливості (здатність формувати міцели), на думку фахівців [54], обіцяють нові та несподівані застосування в науці та техніці, фармацевтичній промисловості та під час отримання продуктів функціонального призначення. Одним із прикладів такого використання є можливість інкапсуляції корисних для здоров'я речовин у казеїнових матрицях [69]. У цьому відношенні казеїн молозива має низку переваг порівняно з казеїном молока не тільки в кількісному, а й у якісному відношенні.

1.3.1.2 Характеристика імуноглобулінів молозива.

Упродовж багатьох років ведуться інтенсивні дослідження складу та ролі імуноглобулінів молозива в становленні імунної системи новонароджених. Як відомо, імуноглобуліни (антитіла), великі глобулярні білки плазми крові, що утворюються у В-лімфоцитах (плазматичних клітинах імунної системи) та виконують такі важливі функції в організмі, як нейтралізація, аглютинація, преципітація антигенів (чужорідних для організму компонентів), поряд із цим вони активують білки системи комплементу. Існують дані, що адаптивні антитіла в еволюційному розвитку з'явилися в хребетних тварин приблизно 500 млн років тому [70–72]. Існує 5 класів імуноглобулінів: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Є припущення, що еволюційно найдавнішими з них є IgM та IgD, деякі види ссавців і птахів у процесі своєї еволюції втратили IgD. Як відомо, основними

імуноглобулінами молозива є IgG, IgA, IgM. Великий інтерес до дослідження імуноглобулінів молозива великої рогатої худоби зумовлений ще й тим, що їхня плацента не є проникною для імуноглобулінів, а відтак новонароджені позбавлені антитіл і надзвичайно вразливі до інфекційних агентів. Однак еволюція "знайшла унікальне рішення" цієї проблеми, і полягає воно в тому, що в дитинчат великої рогатої худоби впродовж перших 12 годин їхнього життя оболонки кишківника є проникними для імуноглобулінів та інших великих молекул [73] і навіть лімфоцитів та інших типів клітин, що містяться в молозиві [74–76]. Споживання антитіл, що містяться в материнському молозиві, забезпечує новонароджених так званим пасивним імунітетом [73].

1.3.1.3 Інші сироваткові білки молозива.

Необхідно зазначити, що поряд з імуноглобулінами, які досить добре досліджені, у молозиві міститься такі біоактивні компоненти з антимікробною активністю, як лактопероксидаза, лактоферин, лізоцим тощо [77–79].

Лактопероксидаза (КФ 1.11.1.7) - пероксидаза, що присутня в молозиві та молоці. Як відомо, пероксидази - клас оксидоредуктаз, що каталізують окиснення різноманітних субстратів і мають високу специфічність щодо перекису водню. Лактопероксидаза молозива корів складається з одного поліпептидного ланцюга, до якого входить 612 амінокислот. Її молекулярна маса близько 78 кДа, ізoeлектрична точка 9,6. До її складу входить до 10% вуглеводів, і вона має 5 потенційних сайтів глікозилювання. На одну молекулу ферменту припадає одна молекула заліза, яке входить до складу гема [80].

У молозиві в середньому міститься близько 30 мг лактопероксидази на літр, що становить близько 0,5 % від усіх сироваткових білків і вона є основним антибактеріальним компонентом молозива та молока [80]. Антибактеріальна дія лактопероксидази досить складна і складається з декількох стадій [80]. Лактопероксидаза токсична по відношенню до Грамм позитивних і негативних бактерій. Показано, що вона виявляла здатність інактивувати віруси поліоміліту, коров'ячої віспи та вірусу імунодефіциту людини [81].

Поряд із лактопероксидазою антибактеріальну активність у молозиві виявляють і лактоферин, і лізоцим [77–79, 82] є відомості про їхню здатність виявляти й антиконцерогенну активність [82, 83].

Лактоферин належить до родини білків-трансферинів і виконує різноманітні функції, зокрема й внутрішньоклітинне перенесення заліза, цинку, міді, а також регулює іонний баланс у крові та в зовнішніх секретах. Лактоферин присутній у великих кількостях у молозиві близько 7 мг/мл і зменшується до 1 мг/мл у зрілому молоці [84]. Показано, що лактоферин міститься практично у всіх екзокринних секретах ссавців, таких як слина, жовч, слюзи і секрет підшлункової залози [85].

Молекула лактоферину складається з одного поліпептидного ланцюга, містить 692 амінокислотних залишки та утворює два гомологічних глобулярних домени, які називаються N- і C-долями (N-доля, залишки 1-333; C-доля, залишки 345-692), кінці яких з'єднані короткою α -спіраллю [86, 87]. Лактоферин, як і лактопероксидазу відносять до лужних білків, його ізоелектрична точка становить 8.7. Цей білок існує у двох формах - залізонасиченій (холо-ЛФ) і залізоненасиченій (апо-ЛФ), їхні третинні структури різні [88].

Лактоферин присутній і в імунокомпетентних клітинах - моноцитах і нейтрофілах та переходить у позаклітинне середовище у вогнищі запалення, тому його відносять до білків гострої фази [85]. Лактоферин блокує ріст бактерій шляхом зниження доступності для них заліза. Антибактеріальний ефект лактоферину посилюється в присутності IgA. Важливим є те, що лактоферин не руйнується в травному тракті, за рахунок того, що його молекула має високий ступінь глікозилювання в кислих значеннях рН [89]. В даний час лактоферин використовується як біологічно активна добавка.

Лактоферин відіграє важливу роль у формуванні системи вродженого імунітету, існують дані про те, що лактоферин опосередковано залучений і в процеси клітинного імунітету. Не менш важлива його роль і в забезпеченні організму антибактеріальною, антивірусною та протигрибковою активностями. Найбільш вивченим є механізм антибактеріальної активності лактоферину.

Антибактеріальні властивості цього білка зумовлені його здатністю зв'язувати залізо і тим самим позбавляти бактеріальну мікрофлору необхідного для її росту та життєдіяльності цього мікроелемента [90]. Бактерицидні властивості лактоферину проявляються і завдяки наявності у нього специфічних лактоферинових рецепторів на клітинній поверхні мікроорганізмів. Показано, що лактоферин зв'язує ліпополісахариди (ЛПС) бактеріальних стінок, а окислена форма заліза, що входить до складу білка, ініціює їхнє перекисне окислення. Це призводить до зміни мембранної проникності та подальшого лізису бактеріальних клітин [90].

Лізоцим - фермент, що належить до класу гідролаз (КФ 3.2.1.17), який забезпечує гідроліз пептидогліканів (муреїну) - специфічного компонента клітинних стінок дріжджів. Він складається з одного поліпептидного ланцюга (14,3 кДа), до якого входять 127-130 амінокислот, а його ізоелектрична точка знаходиться в межах 11,3, він добре розчинний у воді. Це широко поширений у біологічних системах фермент. Лізоцим був виділений А. Флемінгом зі слизової носоглотки 1921 року, проте відкриття ним пеніциліну призвело до втрати інтересу до нього як потенційного антимікробного агента. Пізніше було показано, що лізоцим трапляється в курячих яйцях, слюзовій рідині, у слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту, у молоці та досить у великих концентраціях (близько 400 мг/л) у грудному молоці, що значно більше порівняно з молозивом корів. Цікаво те, що в грудному молоці вміст лізоциму з часом не зменшується, а збільшується. Концентрація лізоциму в молозиві близько 0.37 г/л і вона зменшувалася в перехідному молоці та знову збільшувалася до 0.89 г/л у зрілому молоці [91]. Поряд із біологічними рідинами, лізоцим виявлено в крові, легенях, нирках, селезінці, у плаценті та інших тканинах. Його концентрація в організмі підтримується на постійному рівні завдяки його активному продукуванню імунокомпетентними клітинами та вивільненню його зі зруйнованих клітин [91, 92].

На сьогодні лізоцим належить до одних із добре вивчених ферментів. На відміну від більшості білків, лізоцим легко кристалізується, більше того, його

кристали виявляють хороші заломлюючі властивості. Первинну структуру лізоциму було визначено 1963 року [93], а 1965 року розшифровано його тривимірну структуру.

Дослідження функціональних властивостей лізоциму показало, що він виконує надзвичайно різноманітні й дуже важливі функції в життєзабезпеченні організму. Так, поряд із добре вивченою антибактеріальною активністю він бере участь у формуванні вродженого імунітету, у регуляції імунних і метаболічних процесів [94, 95]. Встановлено, що він ініціює синтез лімфокінів, які беруть участь у диференціюванні та регуляції росту [96]. Є вказівки про те, що він здатний зупиняти пухлинний процес, інактивуючи ізоантигени, шляхом розщеплення полісахаридних ланцюгів мураміну. Нині лізоцим виділяють із курячих яєць, і його активно використовують під час лікування гострих пневмоній у дітей і реанімаційних хворих, у стоматології як безпосередньо ліки за пародонтиту, гострого вогнищового пульпіту, а також під час лікування інфекційно-запальних захворювань слизової оболонки порожнини рота, ясен і гортані: гінгівіту, стоматиту [97, 98]. Цілком очевидно, що медичний потенціал лізоциму далеко не вичерпаний, а його високий вміст у молозиві поряд з іншими біологічно активними сполуками становить великий практичний інтерес.

1.3.1.4 Характеристика протеому низькомолекулярних білків молозива.

Ідентифікація всіх білків молозива (повний протеом), як, до речі, білків сироватки крові та всього організму, завдання досить складне не тільки через велике розмаїття білків, а й через високу мінливість або швидку динаміку білкового складу та унікальність, в тому сенсі, що багато білків можуть бути представлені мінорними компонентами. Разом з тим, завдання це надзвичайно важливе, оскільки білки виконують широкий набір життєво важливих функцій і часто запускають різноманітні метаболічні каскади навіть у малих дозах. Про важливість розв'язання такого завдання свідчить і те, що протеоміка - це один із біологічних напрямів сучасних досліджень, який розвивається найшвидше [99, 100]. У протеомному аналізі використовують два методичні підходи: аналіз на

рівні натуральних білків (підхід "зверху"); або аналіз після ферментативного гідролізу до пептидів (це підхід "знизу") [101].

У першому випадку білки попередньо розділяють на фракції, використовуючи для цього електрофорез або хроматографію, отримані фракції розділяють мас-спектрометрично, що дає змогу аналізувати сотні й навіть тисячі відокремлених білків [102, 103]. У низці робіт було показано високу ефективність використання МАЛЬДІ ТОФ у протеомних дослідженнях [102, 104, 105].

У перших роботах з протеомного аналізу молозива, дослідники використовували двовимірний електрофорез і за допомогою цього методу Yamada et al. 2002 [106] ідентифікували 29 білків характерних для молозива, які були відсутні в молоці. Через 10 років Ніссен і співавтори ідентифікували в коров'ячому молозиві вже понад 400 специфічних білків [107]. Найбільш повний аналіз протеома молозива великої рогатої худоби проведено за допомогою афінної хроматографії, поділу в гелі та нано-ВЕЖХ-МС/МС Алтомаре та ін.[108] і виявлено понад 600 специфічних білків у коров'ячому молозиві [109, 110] та виявлено понад 600 унікальних білків, які були присутні в молозиві в невеликих кількостях. Функції цих білків молозива остаточно не встановлені, а дані, отримані на основі онтології генів, вказують на те, що вони беруть участь у прояві імунних процесів, ферментативних реакціях і в механізмах транспорту різних сполук [109–113].

Також зі співавторами досліджували вплив теплової обробки (30, 60 і 90 хв за температури 60°C) на протеом молозива великої рогатої худоби. Вони ідентифікували 162 білки та виявили, що 62 з них суттєво відрізнялися (більш ніж у 2 рази) після термообробки (60°C) порівняно з молозивом, що не було оброблене такою температурою. Дійшли висновку, що більшість білків молозива, які проявляли чутливість до температури, зокрема лактадгерин, хітиназо-3-подібний білок 1 і компонент комплементу C9, беруть участь в імунних процесах, виконують ферментативні функції та функції транспорту метаболітів, що може вплинути на розвиток новонароджених телят, які отримували пастеризоване, а не натуральне молозиво. Автори цієї роботи вважають, що необхідні подальші

дослідження впливу термічної обробки молозива, тому що цей важливий промисловий процес знезараження може суттєво вплинути на його поживні та регуляторні процеси в новонароджених і споживачів таких продуктів.

Тонкі та цікаві дослідження щодо впливу температурної обробки на протеом молозива провела й інша група дослідників [114]. Вони ідентифікували 328 унікальних білків і показали, що низка білків, зокрема деякі білки системи комплементу, значно зменшилися, знизився вміст інсуліну, IgA, IGF-1b, а також автори цього дослідження так само дійшли висновку, що термообробка молозива може вплинути на розвиток імунної системи новонароджених.

Наявні роботи з дослідження протеома великої рогатої худоби переконливо свідчать: про велике розмаїття мінорних білків молозива; його широку варіабельність, що залежить не тільки від породи, віку й умов утримання, зокрема й годівлі тварин, а й від умов зберігання та переробки молозива. Не менш важливими при використанні молозива для отримання специфічних білкових компонентів є знання про індивідуальні особливості білкового складу молозива. Нам не вдалося, в наукових джерелах, виявити відомості з цього питання. У зв'язку з цим, був проведений спектральний аналіз мінорних білків молозива, яке було отримано у різних корів однієї породи ("Українська чорно-ряба"), одного віку, які утримуються в однакових умовах одного господарства ("Альфа" Золочівського району, Харківської області), після першого доїння. У дослідженні використовували методичний підхід "зверху".

На першому етапі роботи було видалено жири, триразовим послідовним центрифугуванням за 3000 g протягом 15 хв із подальшим осадженням казеїну, додатковим видаленням високомолекулярних білків мембранною фільтрацією. І показано виражений індивідуальний характер вмісту білків молозива в діапазоні молекулярних мас від 4500 до 22 000 КДа [107, 108].

Необхідно зазначити, що в молозиві присутні так звані трансфер-фактори або фактори перенесення - це невеликі білки (близько 4-7 кДа), які "переносять" здатність проявляти клітинно-опосередкований імунітет від імунних донорів до неімунних реципієнтів.

Відомо, що компоненти трансфер-фактору утворюються в організмі на присутність певних патогенів [13, 115] і в цьому сенсі вони є індукцибельними білками. Отже, індивідуальні відмінності за складом низькомолекулярних білків, зокрема й трансфер-фактору, можуть пояснюватися тим, що для кожного організму завжди мають місце "унікальні зустрічі" з різними патогенами, і, як наслідок, завжди матиме місце індивідуальний характер відповіді організму, що проявлятиметься у розходженні спектра індукцибельних білків.

Отже, індивідуальний характер спектрального складу молозива, як, до речі, й інших індивідуальних біологічних характеристик, є природною біологічною реакцією на комплексну дію екзогенних чинників середовища. Передбачити характер біологічної відповіді або особливості інтеграції екзо- та ендогенних чинників неможливо. Можна припустити, що чим більше значущих чинників діє на біологічну систему, тим більш різноманітною може бути біологічна відповідь.

Вважаємо, що під час промислової переробки молозива, зокрема під час одержання низькомолекулярних компонентів, що володіють функціями трансфер-фактору, необхідно використовувати "селективно-інтегративний" підхід переробки молозива.

1.3.2 Фактори росту і цитокіни молозива

Іншими важливими біоактивними компонентами молозива є різноманітні фактори росту, гормони, цитокіни.

Фактори росту в бичачому колостріумі включають трансформуючий фактор росту бета-2 (TGF- β 2), гормон росту (GH) та інсулін, але їхня функція в колостріумі до кінця не вивчена [77]. Колостральний інсуліноподібний фактор росту-I (IGF-I) може бути ключовим регулятором розвитку шлунково-кишкового тракту новонароджених телят, включно зі стимуляцією росту слизової оболонки, ферментів щіткової кайми, синтезу кишкової ДНК, збільшенням розміру ворсинок і підвищенням поглинання глюкози [116–118].

Важливим біоактивним компонентом молозива є інгібітор трипсину, його концентрація в молозиві майже в 100 разів більша, ніж його вміст у молоці, він забезпечує захист IgG та інших білків від протеолітичної деградації в кишківнику

новонародженого теляти, що сприяє збереженню їхніх функціональних характеристик і проникненню в кровотік [42].

Молозиво містить велику кількість інсуліноподібних факторів росту (ІФР) ІФР-1 та ІФР-2. Ці білки термо- і кислотостабільні та здатні витримувати переробку молочних продуктів і не піддаються деградації в шлунково-кишковому тракті. Вони сприяють клітинному росту, диференціації та розвитку і можуть чинити місцевий вплив або всмоктуватися в кровотік, надаючи системний вплив на розвиток молодого організму.

Коров'яче молозиво містить судинні, ендотеліальні та основні фактори росту фібробластів. Тромбоцитарний фактор росту, який також присутній у молозиві, є важливим мітогеном для фібробластів. Показано, що виділений тромбоцитарний фактор росту сприяє загоєнню ран. Трансформуючий фактор росту- β , який присутній у високих концентраціях, чинить протизапальну дію і регулює проліферацію, диференціювання і відновлення в різних тканинах, він також необхідний для індукції регуляторних Т-клітин. Трансформувальний фактор росту- α , є пептидом, що бере участь у підтримці функції та цілісності епітелію [77].

Коров'яче молозиво містить низку імунорегулювальних і запальних цитокінів, таких як інтерлейкіни (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17), фактор некрозу пухлини- α , інтерферон- γ та інші неантимікробні сполуки, що сприяють боротьбі з інфекцією та запаленням за допомогою цитокінів, що сприяють перехресній взаємодії, розпізнаванню патогенів та залученню імунних клітин у вогнище запалення. Поряд із цими регуляторними компонентами специфічні мікроРНК, присутні в молозиві, мають потужний імунорегулювальний потенціал. Вони локалізовані в мікровезикулах, стабільні в умовах деградації в шлунково-кишковому тракті та можуть досягати імунних клітин лімфоїдних тканин, пов'язаних із кишечником [119]. На їхній характеристиці зупинимося докладніше.

Отже, коров'яче молозиво містить широкий арсенал цитокінів, які чинять важливу, системну, регуляторну дію на організм. Подальше вивчення цього унікального природного резервуару регуляторних молекул сприятиме розробці

нових підходів в управлінні функціональними характеристиками організму, зокрема й механізмами регуляції тривалості онтогенезу.

1.3.3 Екзосоми та мікро-РНК молозива

Нині ведуться інтенсивні дослідження екзосом, позаклітинних везикул (EV), мікро-РНК (міРНК). МікроРНК у грудному молоці вперше були профільовані у 2010 році Kosaka et al. [120–122].

Мікро-РНК - це невеликі (18-25 нуклеотидів) некодуючі молекули РНК, які беруть участь у посттранскрипційному регулюванні білків у різних тканинах організму [123, 124].

Ряд авторів вважають, що міРНК у молоці та молозиві виконують щонайменше дві основні функції: по-перше, підтримують функціональність молочної залози, а по-друге, забезпечують комунікацію між матір'ю та потомством [125–127]. Важливо відзначити, що більшість міРНК, виявлених у молозиві людини, корови та свині, беруть участь у реалізації імунологічних механізмів [124, 128]. Поряд із цими функціями міРНК є роботи [124, 128–132], в яких показано, що міРНК молозива можуть відігравати важливу роль і в регуляції росту та розвитку шлунково-кишкового тракту новонароджених.

Великий інтерес у розумінні можливих механізмів дії екзосом становлять роботи на клітинних культурах. Було виявлено, що внесення екзосом у культури макрофагів людини має виражений вплив на метаболізм, міграцію клітин і клітинну відповідь у разі дії на них LPS [133]. Поряд із цим, Baier et al.[134] показали, що обробка *in vitro* культури клітин людини міРНК, виділених із молозива, змінювали експресію генів у культурі клітин людини, що вказує на відсутність видової специфічності їхніх дій. В інших роботах було показано, що екзосоми з коров'ячого молока та молозива можуть поглинатися культурою ентероцитів людини та підтримувати клітинний цикл у цих клітинах [135, 136].

Водночас існує ціла низка невирішених питань щодо механізмів дії екзосом на організм, зокрема не зрозуміло, яка кількість міРНК потрапляє до крові та чи достатньо цієї кількості достатньо для участі в метаболічних процесах[129].

Можливо, що міРНК, виділені з молозива, чинять місцеву дію на функціональні характеристики кишечника.

Незалежно від механізмів функціональної активності екзосом, можна однозначно стверджувати, що їхня кількість у молозиві більша, ніж у молоці, і це є ще однією важливою характерною особливістю молозива як унікальної біологічної субстанції та, за необхідності, його можна розглядати як джерело їхнього одержання та як об'єкт їхнього подальшого глибокого вивчення.

1.3.4 Вміст цукрів у молозиві

Як відомо, основним вуглеводом молока є лактоза - дисахарид, який належить до класу олігосахаридів. Лактоза розщеплюється лактазою (лактазофлоризин гідролазою) на глюкозу і галактозу і поряд з участю в енергетичному обміні організму, лактоза бере участь у регуляції кальцієвого обміну. Лактоза існує у двох ізомерних формах α - і β -, що мають різні фізичні властивості. У молоці переважає α -форма лактози, яка надає молоку солодкуватого присмаку, легко засвоюється організмом, але не проявляє виражених біфідогенних властивостей (не є регулятором мікробіологічних процесів). Енергетична цінність 1 г лактози - 3,8 ккал, а засвоюваність становить 99 %.

Нині активно обговорюється і ведеться пошук вирішення проблеми "непереносимості" лактози, і це особливо актуально для новонароджених, оскільки молоко для них є основним джерелом харчування [137, 138]. Суть проблеми полягає в тому, що в організмі може бути знижена або відсутня активність лактази. Така ферментативна недостатність може бути як вродженою, так і набутою. Виявилося, що це явище є доволі поширеним на планеті та сильно залежить від регіону. Так, у дорослого населення: Швеція, Данія - 3% позбавлені активності лактази, Фінляндія, Швейцарія - 16%, Англія - 20-30%, Франція - 42%, країни Південно-Східної Азії, у деяких африканських народностей - 80-100% [139–141]. У деяких випадках, це пояснюється тим, що в деяких народностей у процесі еволюції було відсутнє молочне скотарство. Неperеносимість лактози не є патологічним станом, проте фахівці відзначають, що це супроводжується розвитком вторинних порушень в організмі, зокрема зміною водно-сольового

обміну та фізичного розвитку [139–141]. На даний час, основний підхід у вирішенні проблеми непереносимості лактози, зводиться для дорослих до відмови від молочних продуктів або до попереднього гідролізу лактози, зокрема й мікроорганізмами. У цьому відношенні важливо зазначити, що вміст лактози в молозиві значно менший, ніж у молоці, і під час переходу до зрілого молока її вміст збільшується.

Крім лактози, у молозиві присутні й інші цукри. Так, Тадао зі співавторами виділили з коров'ячого молозива, через 6 годин після пологів, два нейтральних олігосахариди - галактозиль- β -1,4-N-ацетилглюкозаміну (N-ацетилактозамін, 70,3%) і N-ацетилгалактозамініл- β -1,4-глюкози (3,7%), а за 7 днів після отелення ці олігосахариди в молозиві не виявляли [142].

Дослідження, проведені ще в 1965 р. Куном і Гауе, а Шнайдером і Рафельсоном у 1966 р., показали наявність у молозиві сіалілових олігосахаридів, які були присутні в кількості до 1 г/л, їхня кількість дуже швидко зменшувалась, і вже після 48 годин вони не виявлялися.

Хоча цукри у складі молозива представлені в незначних кількостях, вони можуть забезпечувати захист організму новонароджених від патогенів, діючи як конкурентні інгібітори сайтів зв'язування на епітеліальних поверхнях кишківника новонароджених[43].

1.3.5 Ліпідні компоненти молозива

Як зазначають ціла низка авторів, інтерес до дослідження складу молозива був пов'язаний із визначенням і характеристикою насамперед білкових факторів і насамперед з імуноглобулінами, завдяки яким новонароджені телята набувають так званого пасивного імунітету, що забезпечувало зменшення смертності[143–146]. Однак, поряд із білковими компонентами, вітамінами та мікроелементами в молозиві міститься значна кількість ліпідів (більше ніж у молоці), які відіграють значні та надзвичайно різні функції в розвитку новонароджених. Вважаємо, що подальші дослідження в цьому напрямку приведуть до нових відкриттів. Можна стверджувати, що ліпіди молозива забезпечують організм новонародженого енергією, підтримання температури тіла (термогенез - характерна ознака ссавців),

окиснення жирних кислот, здатні чинити специфічний вплив на гомеостаз і збереження здоров'я [144]. Є дані, що продукти гідролізу тригліцеридів можуть мати антибактеріальну дію [144, 147].

Вміст сирого жиру в молозиві залежить від породи та умов утримання [148], а його кількість у молозиві значно вища, ніж у молоці (3,6%) [39].

У першому грудному молоці людини концентрація жиру в 2-3 рази вища, ніж у зрілому молоці, причому пальмітинова й олеїнова кислоти становлять основні типи жирів молозива [149].

Важливо відзначити, що ліпіди в складі молозива формують так звані кульки молочного жиру (MFG), які складаються з глікопротеїнів і ліпідів [149]. MFG являють собою унікальні колоїдні ансамблі, які можуть мати важливе метаболічне значення і впливати на здоров'я немовлят і на даний час вони активно досліджуються.

Біологічно активні фактори, що містяться в молозиві, зокрема й ліпіди, походять із різних джерел. Деякі з них виробляються епітеліальними клітинами молочної залози, деякі - клітинами молока [150], в той час як інші присутні в сироватці крові матері і транспортуються через епітелій молочної залози. Було показано, що ліпідні бульбашки молозива, які походять з епітеліальних клітин молочної залози (MFGS), містять безліч мембранозв'язаних білків і ліпідів, і такі кульки мають мембранні утворення [125].

Ці мембранні глікопротеїни діють як антибактеріальні та противірусні ліганди, запобігаючи прикріпленню патогенів до слизової оболонки кишечника, тим самим захищаючи немовля від інфекції [125]. Показано, що до складу MFG так само входять і муцини (MUC1 і MUC4). Важливим є те, що MUC1 здатний блокувати вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) і [126] ротавірус, а MUC1 і MUC4 блокують деякі види сальмонел.

1.3.6 Гормони, що містяться в молозиві

Дослідженню вмісту гормонів у молозиві присвячено вкрай мало робіт. Є вказівки про наявність у молозиві інсуліну, кортизолу, тироксину, пролактину та гормону росту [127]. Як відомо, інсулін сприяє засвоєнню вуглеводів і збільшує

транспорт лептину з крові в мозок [151]. Поряд із цим інсулін відіграє важливу роль у функціонуванні нейронів, розгалуженні дендритів і консолідації короткочасної та довготривалої пам'яті в гіпокампі [152]. Показано, що ентеріальний інсулін чинить місцеву дію на дозрівання кишківника [133, 153] та формування мікробіома новонароджених [154].

Як відомо, важливі регуляторні функції в організмі виконує і лептин. Показано, що він сприяє когнітивному розвитку в людини [155], а харчові добавки з лептином забезпечують захист нервової системи в мишей [156]. У недоношених і доношених немовлят чоловічої статі рівень лептину нижчий, ніж у немовлят жіночої статі [157], і обмежені дослідження показали, що рівні лептину можуть бути вищими в доношених дітей, які перебувають на грудному вигодовуванні, порівняно з доношеними дітьми, що отримують штучне вигодовування [158].

Стероїдні гормони мають різноманітні фізіологічні ефекти, але їхня точна роль у ранньому розвитку поки що до кінця не вивчена. Кортизол бере участь у багатьох фізіологічних процесах; він сприяє гліюконезису, протидіє інсуліну і діє як сечогінний засіб [159]. Дослідження показують, що глюкокортикоїди в молозиві можуть впливати на психологічне дозрівання та ріст організму [160]. Прогестерон вважається нейростероїдом, оскільки документально підтверджено його синтез у головному мозку. Прогестерон впливає на ремієлінізацію, відіграє роль у розвитку мозку та поведінки, пригнічує імунні реакції матері на антигени плода і бере участь у диференціюванні Т-клітин [161, 162].

Великий інтерес для розуміння ролі гормонів, що містяться в молозиві та молоці, у розвитку новонароджених викликає робота Река [127], в якій вони дійшли висновку, що грудне вигодовування забезпечує передачу гормональних сигналів між матір'ю та немовлям, і така передача забезпечує формування метаболічних особливостей упродовж подальшого онтогенезу. Результати цієї роботи хоча й опосередковано, проте вказують на надважливу роль впливу материнського молока на формування епігенетичних характеристик нащадків, що проявлялися в особливостях постнатальної адаптації та розвитку. Подальші дослідження вмісту гормонів у молозиві та їхньої ролі в ранньому розвитку

савців, у тому числі й програмуванні майбутнього онтогенезу, є перспективними в розумінні фундаментальних механізмів розвитку.

1.3.7 Вітаміни, які містяться в молозиві

Вітаміни являють собою гетерогенну групу органічних речовин, які присутні в натуральних харчових продуктах, мають дуже високу біологічну активність і потрібні в надзвичайно малих концентраціях для росту і регуляції функціонування організму. Вони мають надходити з їжею, бо в організмі вони або не синтезуються, або їхні кількості недостатні для росту, підтримання та нормального функціонування організму. Родини вітамінів хімічно неоднорідні і зазвичай класифікуються відповідно до їхніх фізичних властивостей, тобто або як жиророзчинні, або як водорозчинні [163, 164]. Досить багатим джерелом вітамінів є молозиво. Більш того, у молозиві вони перебувають у певних вдалих співвідношеннях для організму.

Молозиво великої рогатої худоби містить значно більшу кількість жиророзчинних і водорозчинних вітамінів, ніж молоко. Так, в аналізі молозива зібраного більш ніж на 50 фермах Пенсильванії [8, 163], було показано, що середні концентрації жиророзчинних вітамінів, включно з ретинолом, токоферолом і бета-каротином, становили 4,9, 2,9 і 0,7 мкг/г відповідно. Необхідно зазначити, що вітамін А, як, втім, і інші вітаміни, є мультифункціональною молекулою і виконує різноманітні функції в організмі [163] і в молозиві містяться практично всі форми цього вітаміну (ретинол, ретиналь, ретиноева кислота та ретиноевий ефір) і його передпопередники – каротиноїди [164, 165]. Середні концентрації водорозчинних вітамінів: ніацину, тіаміну, рибофлавіну, вітаміну В12, піридоксалу, піридоксаміну та піридоксину становили 0.34, 0.90, 4.55, 0.60, 0.15, 0.21, і 0,04 мкг/мл відповідно [8]. За результатами інших авторів вітамін Е, який представлений у молозиві у формі токоферолу і токотрієнолу та входив до складу ліпопротеїнів низької щільності, у середньому становив близько 77,1 мг/кг молозива [8]. Як відомо, вітамін D відіграє важливу роль у регуляції рівня кальцію та фосфору в тонкому кишківнику організмі, регулює активність імунної системи та виконує інші функції регуляції. Було виявлено, що в молозиві містяться як

холекальциферол (D3), так і ергокальциферол (D2) у кількості близько 1,2 МЕ/г молозива, а під час переходу в молоко (до 5 дня після отелення) його вміст зменшувався до 0,36 МЕ/г [166]. Вітамін К у молозиві представлений у двох активних формах: філохінон і механохінон [164]. Наявні дані свідчать про те, що молозиво збагачене вітамінами, а їхній баланс може забезпечувати організм новонародженого необхідними регуляторами метаболізму.

1.3.8 Мінеральні компоненти молозива

Відомо, що коров'яче молозиво та зріле молоко є хорошими джерелами кількох мінералів, особливо кальцію та фосфору [166]. Нещодавні дослідження показали, що середні концентрації кількох важливих мінералів у молозиві значно вищі, ніж у зрілому коров'ячому молоці. Кальцій необхідний для підтримки розвитку телят та їхніх здорових кісток і зубів. Фосфор також має вирішальне значення для регуляції швидкості метаболізму та фізіологічних функцій, включно з розвитком скелетної тканини, використанням енергії, синтезом білка і транспортом жирних кислот [167]. Магній присутній у відносно великій кількості разом із цинком і селеном у коров'ячому молозиві [166].

1.3.9 Клітини, які містяться в молозиві

У складі молозива присутня не тільки величезна кількість різноманітних молекул і молекулярних комплексів, а й досить велика кількість клітин, понад 1×10^6 клітин/мл. Насамперед це імунологічно активні материнські лейкоцити, включно з макрофагами, Т- і В-лімфоцитами та нейтрофілами [168, 169]. Було показано, що принаймні частина колостральних лейкоцитів всмоктується через кишковий бар'єр. Liebler-Tenorio і колеги [78] повідомили, що переважний шлях поглинання колостральних лейкоцитів через кишковий бар'єр проходить через фолікуло-асоційований епітелій Пейєрових плям у порожнистій і клубовій кишці. Ребер і колеги [170] припустили, що після потрапляння в неонатальну циркуляцію материнські лейкоцити переміщуються в нелімфоїдні тканини новонароджених і вторинні лімфоїдні тканини, зникаючи з неонатальної циркуляції через 24-36 годин після годування молозивом. Хоча їхня функціональна значущість для телят

не вимірюється регулярно, перші дані свідчать про те, що колостральні лейкоцити посилюють відповідь лімфоцитів на неспецифічні мітогени, збільшують фагоцитоз і здатність вбивати бактерії, а також стимулюють гуморальну імунну відповідь (утворення IgG) у теляти [169, 171–173]. Ймовірно, клітини, які присутні в молозиві, можуть втрачати свою життєздатність у пастеризованому молозиві. На теперішній час роль і функціональне значення колостральних лейкоцитів залишаються областю активних досліджень. Можна припустити, що клітини молозива, беручи участь у міжклітинних контактах організму новонароджених, виконують поки що невідомі "регуляторно-навчальні" функції імунної системи. Подальші дослідження в цьому напрямі мають найважливіше теоретичне значення в біології розвитку ссавців. Показано, що в людському грудному молоці поряд з імунокомпетентними клітинами присутня досить велика кількість і стовбурових клітин [174], і автори цього дослідження вважають, що цю популяцію стовбурових клітин можна використовувати в терапевтичних цілях. У грудному молоці були присутні ембріональні, гемопоетичні, нервові та мезенхімальні стовбурові клітини [174].

Хоча стовбурові клітини в самій молочній залозі присутні в невеликих кількостях, але їхня кількість збільшується, вони активуються під час вагітності та лактації, і, як зазначають автори дослідження [149, 175], начебто вони запрограмовані на проліферацію, диференціювання та апоптоз у потрібний для організму час.

На користь збільшення кількості стовбурових клітин у тканинах молочної залози людини в період лактації, що містять більшу кількість активованих стовбурових клітин, вказують й інші дослідники [176, 177]. Повідомлялося, що людське молоко містить стовбурові клітини, які містять безліч генів, присутніх в ембріональних стовбурових клітинах людини, і вони здатні диференціюватися в клітинні лінії з усіх трьох зародкових листків *in vitro*.

Хоча роль стовбурових клітин молозива в розвитку новонароджених поки не зрозуміла, все ж таки можна припустити, що вони можуть відігравати важливу роль у тканинній організації організму, що розвивається. Про важливу роль

грудного молозива в розвитку організму вказують дані, наведені в різних дослідженнях. Так, смертність немовлят, які перебувають на грудному вигодовуванні, у всіх вікових групах була нижчою навіть у дослідженнях, опублікованих ще в 1922 р. [178]. Згідно з дослідженням 1968 року, проведеним Scrimshaw et al. [179], рівень смертності дітей на штучному вигодовуванні був у сім разів вищим, ніж у дітей на грудному вигодовуванні. Високий позитивний вплив грудного вигодовування на тривалість життя і смертність пояснюється імуномодельюючою дією грудного молока і програмуванням метаболізму компонентами, зокрема й ліпідними молекулами, що містяться в молозиві.

У систематичному огляді, опублікованому 2003 р., Jones et al. [180] передбачили, що винятково грудне вигодовування протягом перших шести місяців може запобігти 13% дитячих смертей серед дітей віком до 5 років. До яких наслідків може призвести відмова від грудного вигодовування ми ще розглянемо, оскільки це вказує на роль молозива в становленні та формуванні характеристик, поряд із генетичними особливостями, організму ссавців.

1.4 Про роль молозива у формуванні термогенезу

Як відомо, одним з найважливіших еволюційних "придбань" ссавців стало виникнення системи терморегуляції (термогенез). Здатність підтримувати температуру тіла на рівні 37°C, незалежно від швидко мінливої температури середовища проживання, забезпечила ссавцям значні переваги в еволюційному розвитку й освоєнні нових місць проживання. Було показано, що термогенез це інтегративна система регуляції загального метаболізму і тривалості онтогенезу [181]. Дослідження неонатального періоду розвитку ссавців показало, що в новонароджених система термогенезу не розвинена порівняно з дорослим організмом, і на її формування, а можливо, і на подальше її функціонування, великий вплив мають ліпідні компоненти молозива [181, 182]. Хоча досліджень механізмів становлення системи терморегуляції в новонароджених вивчено недостатньо порівняно з формуванням імунної системи та потребує подальших досліджень, можна стверджувати, що склад їжі перших годувань відіграє принципово важливу роль у формуванні системи термогенезу.

При розгляді ролі молозива на процеси формування функціональних систем організму, що розвивається, необхідно враховувати і його участь у формуванні харчових "переваг", що може відігравати визначальну роль у становленні індивідуальних метаболічних характеристик. Молозиво чинить стимулюючу дію на тканини кишківника людини, ймовірно, завдяки комбінації декількох факторів росту. Роль люмінальних факторів росту в здоровому кишечнику дорослої людини не встановлена, оскільки рецептори для багатьох трофічних факторів не присутні в люмінальній частині. Проте ці люмінальні ліганди можуть досягати цільових рецепторів на базолатеральних мембранах клітин слизової оболонки в ушкодженному кишечнику, а шкідливі умови в кишечнику можуть призвести до зміни розподілу рецепторів, включно з апікальними мембранами [37, 183].

Подальші дослідження цих аспектів функції молозива значно розширюватимуть наші знання не тільки щодо його ролі в розвитку організму, а й сприятимуть подальшому прогресу в геронтологічних та медичних дослідженнях.

Якщо генетична система формується під час запліднення, то епігенетична та мікробіальна системи організму, як такі, що становлять єдину систему регуляції організму, формуються в процесі внутрішньоутробного та неонатального періодів розвитку. Можна стверджувати, що визначальну роль у формуванні імунологічної, епігенетичної та мікробіальної систем організму відіграє якість і кількість споживаного молозива або інших харчових сумішей під час перших годувань новонароджених.

На користь цього свідчать численні дані. Так було показано, що споживання якісного молозива знижує ризики захворюваності та смертності до відлучення, забезпечує додаткові довгострокові переваги в таких телят, включно зі зниженням смертності в період після відлучення, поліпшенням швидкості приросту й ефективності годівлі, зниженням віку першого отелення, покращенням виробництва молока по першій і другій лактації та зниженням тенденції до вибракування впродовж першої лактації [184–188].

Сучасні дослідження засвідчили, що епігенетичні особливості організму формуються під час внутрішньоутробного розвитку і в період раннього розвитку

і насамперед у неонатальному періоді розвитку, який поділяється на ранній - до 7 днів та пізній з 7 по 28 день після пологів. Необхідно зазначити, що ранній неонатальний період є найскладнішим і найкритичнішим етапом онтогенезу людини. У цей час, особливо в перші 7 днів життя, мають місце найшвидші адаптивні зміни, які спрямовані на адаптацію організму до зовнішніх умов. У цей час починає функціонувати мале коло кровообігу, перелаштовується система травлення, активно формується імунна система і прийом молозива в цей період розвитку відіграє надзвичайно важливу роль на становлення епігенетичних характеристик організму. По суті в цей період формується найважливіша регуляторна епігенетична система організму, що визначає особливості всього онтогенетичного розвитку.

Ссавці - гомеотермічні тварини, і їхній плід розвивається в термічно стабільному середовищі. Однак цей сценарій змінюється при народженні, коли потрібна велика витрата енергії для підтримки основної температури тіла в гіпотермічному середовищі [189]. Становлення системи термогенезу в новонароджених ссавців здійснюється протягом неонатального періоду онтогенезу. Температура тіла немовлят близько 36°C і тому в період до становлення повних функцій термогенезу необхідна батьківська турбота (укутування) для захисту немовляти від гіпотермії [190]. У цей період підтримання температури тіла здійснюється за рахунок жирового (64%) і вуглеводного (28%) метаболізму, і тільки 4% - за рахунок катаболізму білків [191, 192]. Визначальну роль у формуванні системи термогенезу, харчуванні, становленні функцій імунної системи, епігенетичних характеристик і мікробіома організму відіграють ліпідні компоненти молозива.

Як зазначалося, грудне вигодовування і термогенна жирова тканина мають спільну еволюційну історію: обидві ознаки розвивалися під час еволюції гомеотермії; ссавці, які годують, називаються "термоліпіками", що означає "тварини з теплим жиром".

Крім здатності виробляти тепло, термогенна жирова тканина також необхідна для правильного ліпідного обміну і визначає жирову масу у потомства.

Останні досягнення показали, що ліпідний обмін у немовлят регулюється ліпідними сигналами грудного молока, які встановлюють зв'язок між матір'ю і дитиною і контролюють розвиток метаболізму в немовляти.

Основним джерелом енергії для смокчущих ссавців (включно з людиною) є жир, який отримують із багатого на ліпіди грудного молока [191, 193]. Дієтичні ліпіди є потужними сигналами, які контролюють ліпідний обмін, розвиток і функціонування жирової тканини [194–196]. Вони відіграють специфічну роль у фізіології жирової тканини (наприклад, активуючи ліпід-чутливі ядерні рецептори або даючи початок запальним чи прозапальним ліпідним медіаторам) [197–200].

У людини примордії жирової тканини починають формуватися в другій половині вагітності, а материнські кетоніві тіла та глюкоза є основними ліпогенними субстратами для плода [193]. Приблизно 70% глюкози плода перетворюється на жир до народження [201, 202], а примордіальні жирові клітини містять глікоген і нейтральні ліпіди [203–206]. При народженні ці енергетичні запаси становлять 1% і 16% від маси тіла, відповідно [191].

Позаутробне існування характеризується швидким переходом від вуглеводного метаболізму до метаболізму, що ґрунтується переважно на ліпідах, одночасно з посиленням ліполізу та вивільненням гліцерину і вільної жирної кислоти з жирових клітин [191, 193]. Гліцерин перетворюється на глюкозу, вільні жирні кислоти окислюються або переестерифікуються в жировій тканині [207].

Грудне молоко багате на ліпіди, з яких 85-90% поглинаються і метаболізуються в організмі новонародженого [202, 208], а ліпідний профіль плазми крові немовляти, яке перебуває на грудному вигодовуванні, відображає ліпідний склад грудного молока [209] та склад ліпідів материнської жирової тканини і плазми [208, 210]. Важливо відзначити, що, на відміну від дорослих, засвоєння жирів немовлят здійснюється вже в букальній порожнині, завдяки присутності в них лінгвальної ліпази в роті та ліпази грудного молока [211].

Отже, ліпідний обмін організму, що розвивається, "кодується" або формується під прямим впливом материнського організму і зберігається впродовж усього онтогенезу. Грудне вигодовування чинить визначальний

епігенетичний вплив на формування індивідуальних метаболічних особливостей організму, зокрема й підтримання температури тіла, яке забезпечується термогенними жировими клітинами [212], а втрата термогенного жиру пов'язана з ожирінням у дітей [213].

Необхідно зазначити, що ліпіди грудного молока є не тільки метаболічним паливом і визначають особливості метаболізму [214], забезпечують розвиток жирової тканини, а й виконують різноманітні функції передавачів сигналів у клітині. Так, у молозиві міститься карнітин, який необхідний для перенесення жирних кислот у строму мітохондрій для подальшого β -окиснення і синтезу АТФ [215]. Таким чином, карнітин грудного молока підтримує мітохондріальне окиснення жирних кислот в організмі немовляти. Грудне молоко також містить довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), такі як докозагексаєнова та арахідонова кислоти. ПНЖК вбудовуються в мембрани мітохондрій, відіграють складну роль у продукуванні вільних радикалів у мітохондріях і запуску мітохондріального шляху апоптозу, а їхні метаболіти індукують транскрипцію генів мітохондріальних ферментів, включно з компонентами β -окиснення [195, 216].

1.5 Відмова від грудного вигодовування та його вплив на онтогенетичні характеристики організму

Перші годування молозивом або грудним молоком новонароджених є найважливішим етапом формування метаболічних і фізіологічних характеристик організму. Однак сучасні умови життя, розвиток харчових технологій та зокрема індустрії дитячого харчування сприяли навмисному скороченню тривалості грудного вигодовування та натомість широкому використанню різноманітних молочних сумішей.

Індустріалізація, соціальний і культурний впливи є найімовірнішими причинами зниження рівня грудного вигодовування, а в суспільствах з низьким рівнем доходу перевага віддається передчасному відлученню немовлят від грудей [190, 217, 218]. Рівень грудного вигодовування продовжує знижуватися в усьому світі, і наразі 60% немовлят ніколи не годуються грудьми [219]. Наприклад,

пандемія COVID-19 у 2020-2021 роках ще більше знизила рівень грудного вигодовування через побоювання зараження від матері до дитини через грудне молоко [217]. Поряд із цими як об'єктивними, так і суб'єктивними причинами відмови від грудного годування, найважливішою причиною є відсутність глибокого розуміння ролі молозива у формуванні "долі" новонародженого організму. У цьому відношенні важливу роль відіграють терміни годування, склад молозива, на яке впливає особливості харчування матері.

Фахівці Всесвітньої організації охорони здоров'я рекомендують грудне вигодовування новонароджених продовжувати не менше шести місяців [220].

Великий інтерес для розуміння необхідності грудного вигодовування становлять археологічні дані скелетних решток бронзової доби (бл. 2800-1200 рр. до н.е.), римської епохи та Середньовіччя (700 р. до н.е. - 1500 р. н.е.)., які свідчать про те, що винятково грудне вигодовування тривало щонайменше шість місяців, після чого поступово вводили їжу для підготовки до відібрання від грудей, а фактичний вік відібрання від грудей становив від двох до чотирьох років залежно від культури та місцевості проживання [221, 222]. У групах раннього та пізнього неоліту грудне молоко було основним джерелом білка для дітей двох-трьох річного віку; однак існували відмінності у віці завершення відлучення від грудей та його тривалості.

Розвиток сільського господарства скоротив тривалість грудного вигодовування, що вимагало скорочення періоду відновлення матері між вагітностями. Соціальний статус також міг вплинути на рішення про способи годування немовлят [223–225]. Ця інформація була отримана за допомогою ізотопного аналізу $\delta^{15}\text{N}$ скелетних останків, так званої реконструкції віку відлучення за допомогою ізотопного аналізу азоту. Відомо, що трофічний рівень матері й дитини подібні, і в немовлят, які перебувають на грудному вигодовуванні, ступінь включення ^{15}N із грудного молока вищий, ніж у відлучених від грудей дітей, у яких із віком рівень ізотопів ^{15}N [222].

Для порівняння, в даний час, грудне вигодовування обмежується кількома днями або тижнями, і більшість немовлят отримують молочну суміш не більше місяця, а близько 5% немовлят у всьому світі ніколи не годувалися грудьми [226].

Нині важко відповісти на питання адекватності заміни грудного вигодовування на молочні суміші, оскільки провести коректні дослідження їхніх відмінностей на формування метаболічного та імунологічного статусу організму та його взаємозв'язок зі сприйнятливістю до різноманітних патологічних чинників і майбутньою тривалістю життя індивідуума неможливо. Водночас сучасне розуміння ролі епігенетичних механізмів у регуляції формування відповіді організму на негативні фактори середовища та роль молозива в цьому дає змогу припускати, що це може відігравати визначальну роль у формуванні метаболічних і фізіологічних характеристик організму.

Особливий інтерес представляє питання про можливий вплив молозива та/або його окремих компонентів на імунно-метаболічні характеристики дорослого або старого організму.

Парадоксально, але на відміну від інших ссавців, тільки людина споживає грудне молоко інших ссавців у вигляді молочних продуктів у дорослому віці. Це специфічна риса людського харчування, що сягає корінням у неоліт. У післяльодовиковій Європі знайдено археологічні артефакти кераміки для зберігання та переробки молока, найімовірніше, для виробництва сиру [223]. Як відомо, у більшості дорослих людей відсутня здатність перетравлювати лактозу і її споживання може призводити до несприятливих наслідків. Однак сир та інші кисломолочні продукти містять менше лактози, ніж молоко, і тому кисломолочні продукти набули широкого розповсюдження в харчуванні людини, що дає змогу збільшувати споживання білка, кальцію та вітаміну D [223].

На жаль, ми все ще мало знаємо про механізми дії ліпідних медіаторів, одержуваних із грудного молока, що підтримують метаболізм жирів у новонародженого, ми мало знаємо про вплив компонентів молозива на імунно-метаболічний статус дорослого організму, і його дуже мало використовують у розв'язанні актуальних медичних проблем.

Молозиво - один із найбільш незвичних та унікальних "продуктів", який виробляється молочною залозою ссавців за дуже короткий період відтворення ними нових поколінь. Унікальність молозива проявляється в декількох взаємопов'язаних аспектах: у складі, у програмуванні онтогенетичних особливостей метаболізму, у забезпеченні приймальності імунологічних характеристик індивідуума та, нарешті, бере участь у підтримці "еволюційного гомеостазу".

Склад молозива не просто багатий на поживні субстанції та біологічно активні сполуки, це специфічна біологічна тканина, яка характеризується високим динамізмом і таким співвідношенням клітинних і молекулярних компонентів, що чинить системний вплив на організм новонародженого, по суті, індукує та задає "епігенетичний ландшафт" організму на майбутній онтогенез.

Молозиво - продукт еволюційного розвитку тваринного світу, який забезпечив: значне розширення ареалу проживання, як за рахунок оптимального і сталого внутрішньоутробного розвитку, так і за рахунок формування гомоетермності у ссавців, а нова форма материнської турботи про потомство могла стати головним фактором у розвитку інтелекту та, врешті-решт, сучасного прогресу.

Передача від материнського організму до новонародженого широкого спектра біологічно активних сполук, антитіл та імунокомпетентних клітин під час першого прийому молозива забезпечує метаболічну та імунологічну спадкоємність в еволюції, або сприяє збереженню "еволюційного гомеостазу". Вважаємо, що подальші дослідження ролі молозива в онтогенетичних та еволюційних процесах значно розширять наші знання про біологію ссавців.

У молозиві, як унікальній біологічній субстанції, міститься величезний, поки що не повною мірою оцінений, біомедичний потенціал. Це пояснюється цілою низкою причин і насамперед складністю при переробці, труднощами при стандартизації молозива як сировини, існуючою методологією фармації та редукціоністським підходом у біологічних і медичних дослідженнях. Оскільки ця методологія заснована на монотерапевтичному підході, то на практиці найчастіше

молозиво використовують як субстрат для отримання індивідуальних сполук з подальшим дослідженням механізму їхньої дії та потенційного застосування. При цьому не враховується, що дія індивідуальних сполук може сильно відрізнятися від їхньої дії в комбінації з іншим біологічно активними речовинами, що містяться в молозиві та інших продуктах харчування.

У зв'язку з цим, актуальним і важливим з погляду природного потенціалу молозива та інших біотехнологічних субстанцій є використання системного підходу під час оцінювання їхнього біологічного потенціалу в тому розумінні, що необхідно оцінювати не тільки склад молозива, а й функціональні особливості організму, що вживає ці продукти. Вважаємо, що в такому разі виправданим є використання як цільного молозива, його окремих фракцій: знежиреного молозива, ліпідної фракції, фракції низькомолекулярних білків тощо, а також його очищених компонентів: лактоферину, РНК, чинників росту тощо.

1.6 Використання молозива та його компонентів в медичній практиці

Розглядаючи досвід застосування молозива та його компонентів, необхідно зазначити, що існують дві позиції з цього питання. До першої можна віднести твердження про те, що цінність молозива як біологічного препарату в медицині підтверджена клінічними випробуваннями і підкріплена відносно великими базами даних. Друга позиція зводиться до того, що продукція, отримана з молозива, не стандартизована і її біологічна та медична цінність остаточно не доведена.

Прихильники першої позиції найчастіше виходять з величезного практичного досвіду і не враховують сучасні вимоги, які висувуються до медичних препаратів.

Використання молозива в їжу почалося з моменту одомашнення худоби, а в Індії його використовують і в духовних ритуалах [227, 228], підкреслюючи тим самим його унікальність складу та особливий вплив на організм.

Мабуть, найдавніші згадки про використання коров'ячого молозива як лікувального засобу задокументовано в стародавній індійській медицині - [228, 229] в якій є рекомендації промивати очі під час хвороби.

Башкири й татари готували з молозива ритуальну їжу, яку потрібно вживати тільки колективно. Є відомості, що молозиво варили в казані або смажили на пательні з додаванням яєць, і в такому вигляді воно виявляло лікувальні ефекти [5].

У європейських країнах молозиво використовували не тільки як частування, але також і для лікування при різноманітних захворюваннях. Так існують відомості, що до відкриття пеніциліну молозиво досить широко застосовували в боротьбі з бактеріальними інфекціями [5, 227, 228, 230].

Однак, найчастіше з молозива готували різні частування і в цих різноманітних рецептах використовуються національні традиції. Застосування молозива в ті далекі часи не мало широкого розповсюдження, тому що не були розроблені способи його тривалого зберігання та глибокої переробки [228].

Прихильники другої позиції дотримуються жорстких вимог до стандартизації складу молозива або компонентів, одержуваних із молозива, а це досить складне завдання навіть у сучасних умовах. Нині існує невелика кількість прикладів ефективного використання молозива в медичній практиці.

Так, у Європі є продукти медичного призначення, отримані з коров'ячого молозива. Однак, як зазначають деякі фахівці, у випадку більшості з них клінічні показання незрозумілі або не підтверджені клінічними даними, а самі продукти не завжди відповідають стандартам якості, придатним для сучасної доказової медицини [138].

Крім того, в описах препаратів зазвичай не вказується детальна інформація про виробництво, походження та джерело сировини, а також про те, чи відповідають подальші етапи обробки стандартам GMP. У випадку з цими препаратами надання кількісної аналітичної інформації, зокрема, за серологією, є скоріше винятком, ніж правилом, а інформація про те, чи було досліджено

концентрат молозива, чи натуральне молозиво, у публікаціях часто спотворюється [230].

Існує також проблема відсутності інформації про однорідність партій, вироблених у великих масштабах, і це є можливим поясненням того, чому фармакодинамічна інформація доступна лише для деяких препаратів. На думку деяких фахівців, важливо, щоб звіти про властивості концентратів молозива містили інформацію про присутні активні компоненти, включаючи концентрацію IgG або титр антитіл [41, 230].

Наявність двох протилежних поглядів на можливість використання унікальної біологічної субстанції, якою є молозиво сільськогосподарських тварин, у медичній практиці може вказувати на необхідність подальших глибоких досліджень його біологічної дії не тільки на новонароджених, а й на організм дорослих і старих людей. Немає сумнівів, що молозиво та його компоненти виявлятимуть різні ефекти в активно зростаючому організмі новонародженого та на вже сформований організм дорослого або організму, в якого мають місце патологічно змінені функціональних систем [13, 115]. Вважаємо, що відмінність у біологічній відповіді організму визначається не тільки складом молозива або його компонентів, як, втім, і інших препаратів, а й особливостями функціонального стану організму в момент впливів. Разом з тим, результати досліджень дії молозива на новонароджених переносяться і на можливу його дію на організм дорослих і навіть старих людей, що може призводити до суперечливих результатів.

Як уже зазначалося, склад молозива має виражені індивідуальні особливості й залежить від величезної кількості чинників. З метою усунення цих відмінностей доцільно готувати концентрати з молозива, отриманого у великої кількості тварин. Так автори робіт [231, 232], готували концентрат молозива зі 100 корів і показали його здатність нейтралізувати ендотоксини (ліпополісахариди), що утворюються у Грамм-негативних бактерій, і пригнічувати неерогенну ендотоксемію на тваринних моделях.

Наявні дані з клінічних випробувань концентрату молозива показали, що його пероральне застосування знижує надходження ліпополісахаридів з кишківника до організму, і це, мабуть, є основним механізмом, що лежить в основі його терапевтичного ефекту в пацієнтів, які піддаються ризику Грамм-негативного септичного шоку. Випробування були проведені в двох добре контрольованих клінічних дослідженнях за участю загалом 100 хірургічних пацієнтів, і було показано, що молозиво не тільки знизило рівень ЛПС у периферичній крові, а й зменшило такі показники запалення, як вміст IL-6 і CRP. Звичайна добова доза комерційно доступного препарату з молозива - Лактобін® (LC1) - становить 10 - 20 г на день на дорослу людину [233].

За хронічної діареї, пов'язаної із вторинними імунодефіцитами, пацієнти, які приймали LC1, позбувалися розладів упродовж 4 тижнів, але у пацієнтів зі СНІДом реакція може бути менш вираженою. Показано, що концентрат молозива ефективний у немовлят із геморагічною діареєю, спричиненою інфекцією ентерогеморагічною кишковою паличкою. У випадку з LC1, який використовували як комерційний дієтичний харчовий продукт в Німеччині до 1992 року, необхідно зазначити, що його протестували в трьох клінічних дослідженнях фазах 1 і 5 (два дослідження на пацієнтах із вторинними імунодефіцитами) [116, 234].

Необхідно зазначити, що для молозива прояв побічних ефектів, які мають клінічне значення, пов'язані тільки з можливою непереносимістю лактози та чутливістю до молочних білків, оскільки вони також присутні і в багатьох широко використовуваних харчових продуктах.

Компоненти молозива можуть не тільки чинити місцевий вплив, а й брати участь у регуляції імунологічних подій, що призводить до системних ефектів після контакту зі слизовою оболонкою кишечника. Коров'яче молозиво містить численні фактори, пов'язані з набутою і вродженою імунною системою, включно з низкою пептидів і білків із прямою антимікробною дією [143, 235].

Найбільший інтерес, щодо практичного застосування, заслуговує історія отримання та використання трансфер-фактору (фактор перенесення) з молозива.

У 1949 році Lawrence виявив нове явище, яке можна визначити як можливість перенесення від донора до реципієнта стійкості до специфічних антигенів. Так, він показав, що перенесення цілих життєздатних лімфоцитів від донора з позитивною туберкуліною шкірною пробою до реципієнта з негативною пробою, призвело до позитивного результату шкірної проби в реципієнта [236]. Хоча ці дослідження вказували на наявність нового механізму імунологічного захисту, ця робота не викликала інтересу у спеціалістів, тому що на той час лімфоцити не розглядали як імунокомпетентні клітини, і їх вивчали як гематологічний показник. І тільки в 1955 році з'являються перші дані про те, що лімфоцити можуть бути віднесені до клітин імунної системи [237]. Пізніше було показано, що перенесення гіперчутливості до туберкуліну може бути здійснене не тільки життєздатними лейкоцитами, а й екстрактами лейкоцитів. Так було відкрито фактор перенесення або трансфер-фактор. Нині сформувалася думка, що фактори перенесення - це невеликі білки, які "переносять" здатність виражати клітинно-опосередкований імунітет від імунних донорів до неімунних реципієнтів [238].

Нині тривають інтенсивні дослідження компонентів, які здатні забезпечувати передачу сповільненої гіперчутливості (гіперчутливість сповільненого типу належить до IV типу алергії), та розпочато пошук ідентичності матеріалів, які відповідальні за активність трансфер-фактору. Гіперчутливість зумовлена взаємодією антигену (алергену) з макрофагами і Th1-лімфоцитами, що стимулюють клітинний імунітет. Як зазначають автори роботи [239] фундаментальна інформація про трансфер фактор накопичується повільно, оскільки в ньому міститься велика кількість молекул (близько 200 малих білків, з мол. масою від 3 500 до 10 000 Да), а не одна молекула. На думку авторів цієї роботи прогресу в цьому напрямку також перешкоджають ті, хто відмовляється вірити в його клінічну ефективність доти, доки не буде відомий механізм його дії. Необхідно зазначити, що це повною мірою стосується і молозива загалом. Однак, як пишуть ці автори, пеніцилін успішно використовували в разі пневмококової пневмонії протягом 10 років, із приголомшливими клінічними результатами,

тобто задовго до того, як було розкрито механізм його дії, а саме інгібування реплікації клітинних стінок бактерій.

Нині показано, що низькомолекулярні білки, які володіють властивостями трансфер фактору, містяться в різних біологічних середовищах, зокрема й молозиві, як результат формування адаптивного імунітету. Їх отримують із молозива, яєчних жовтків та інших об'єктів. Незважаючи на те, що в цілій низці робіт показано здатність трансфер фактору усувати такі патології, як: 1. Сімейна дисфункція Т-лімфоцитів із тяжкою рецидивуючою інфекцією, 2. Герпесна інфекція, 3. Цитомегаловірусна інфекція, 4. Кандидоз, 5. Паразитарна інфекція (наприклад, пневмоцистна інфекція, криптоспоридіоз тощо), 6. Інфекція, спричинена мікобактеріями туберкульозу, резистентна до антибіотиків, 7. Синдром Бехте, 8. Вегетативна пухирчатка (шкірне захворювання), 9. Синдром Віскотта-Олдріча та ін. [239] його застосування ускладнено, оскільки визначити його точне дозування і фармакокінетику, що входить в обов'язкові вимоги до фармакологічних препаратів, виявилось неможливим. Це пояснюється тим, що дослідники мають справу з багатоконпонентною субстанцією і механізм біологічної дії зумовлений дією не одного типу молекул, а скоріш за все комбінаторикою різних молекул. Ситуація ускладнюється ще й тим, що дослідники використовують різні способи введення трансфер фактору і більше того, можна використовувати різні форми - ліофілізований трансфер фактор та розчинені зразки, які відрізнятимуться за біодоступністю та як наслідок спричинятимуть різні ефекти. Така ситуація веде до поганої відтворюваності експериментальних даних.

Досвід дослідження та обмеження в застосуванні трансфер фактору повною мірою відповідають історії застосування молозива та його компонентів.

1.7 Проблеми та обмеження у використанні молозива та його компонентів

Обмеженість використання молозива та його компонентів може пояснюватися низкою причин та обмежень. Однак, ми вважаємо, що найсуттєвіші з них це погана відтворюваність біологічних ефектів, які спричиняє молозиво, з

одного боку, та надзвичайно широкий спектр біологічних дій молозива, що важко пояснити з позиції сучасної методології і що це викликає сумніви у фахівців.

Такі особливості можуть пояснюватися, з одного боку, тим, що на склад молозива впливають різноманітні фактори та воно має виражений індивідуальний характер і як наслідок має місце погана відтворюваність результатів при порівнянні даних. Більше того, особливості його складу додатково можуть змінюватися в процесі зберігання. Це пов'язано з тим, що, як і раніше, не розв'язано проблему його тривалого зберігання, а спосіб низькотемпературного заморожування або сушіння вимагає спеціального обладнання і стандартної сировини, а різна тривалість зберігання також впливає на його склад. Приготування їжі традиційними способами (тривале температурне оброблення) супроводжується зміною та втратою активності багатьох біологічно активних компонентів молозива. Необхідно зазначити, що молозиво - це специфічна біологічна субстанція, яка динамічно змінюватиметься не тільки в процесі калострогенезу, а й у процесі його зберігання та переробки.

Вважаємо, що різноманіття біологічних ефектів дії молозива та наявна суперечливість в інтерпретації експериментальних даних зумовлена й тим, що ефекти біологічної дії від багатоконпонентних субстанцій, яким є молозиво, залежать не тільки від складу, а й від функціональних станів організму на момент прийому таких багатоконпонентних субстанцій.

Не можна виключати й того, що деякі ефекти дії компонентів молозива на різні системи можуть пояснюватися системною регуляцією їхньої дії на організм, що проявляється в поліфункціональності його дії.

Так, компоненти молозива можуть чинити як пряму дію на функціональні системи організму, зокрема на імунний статус організму та/або мікробіом кишківника, так і опосередковану дію на стійкість до інфекцій, до різноманітних токсикантів або ж стійкість до високих фізичних навантажень тощо. Така особливість біологічної дії компонентів молозива і призводить до настільки різноманітних ефектів його дії. На користь цього свідчать численні спостереження. Так, на думку Вонг та ін. 2014 [240] завдяки наявності в

коров'ячому молозиві імуноактивних компонентів воно, як наслідок, чинить і антимікробну дію, і низку інших добре описаних ефектів. Ці автори вважають, що молозиво, може бути, використане як альтернативний лікарський засіб і це особливо важливо для людей, які належать до груп ризику. У цьому відношенні заслуговує на увагу робота, проведена за участю 160 дітей у віці від 1 до 6 років, які страждають від гострої інфекції верхніх дихальних шляхів або діареєю, яку провели Саад зі співавторами [234]. Вони показали, що якщо такі діти приймали порошок коров'ячого молозива впродовж 4 тижнів, то в них покращувався фізіологічний стан і автори рекомендують вживання молозива в разі інфекцій. Стай зі співавторами [228, 234] вважають, що вживання молозива є особливо актуальним для недоношених дітей, оскільки в них знижена функція травної системи, вони мають низьку бактеріальну колонізацію та у них часто спостерігається дисрегуляція імунної системи. Таке поєднане функціональне порушення додатковий раз вказує на тісний взаємозв'язок між імунною та травною системами. Приймання молозива недоношеними дітьми може позитивно впливати на формування мікробіому кишечника. Поряд із цим ці дані вказують і на те, що дія компонентів молозива залежить від функціонального стану організму в момент його дії.

Поряд зі спостереженнями щодо впливу молозива на імунний статус і функції травної системи, які видаються логічними та цілком очікуваними, є й дещо несподівані результати щодо впливу молозива на відновлення кісткової тканини [241]. Було виявлено, що коров'яче молозиво сприяє збільшенню нижніх кінцівок зі зменшенням резорбції кісток у літніх людей. На думку Ду, прийом молозива може слугувати профілактикою остеопорозу, який є серйозною геронтологічною проблемою, особливо для жінок у постменопаузальний період життя. Ці та ціла низка подібних досліджень переконливо демонструють виражену поліфункціональність біологічної дії молозива та його компонентів. Однак, вони носять дослідницький і радше рекомендаційний характер.

У дослідженні [227] було показано, що молозиво є єдиним природним джерелом двох основних чинників росту, а саме трансформуючих факторів росту

альфа та бета (TGF-A та B) та інсуліноподібних чинників росту 1 та 2 (IGF-1 та IGF-1 та B). Ці фактори росту мають виражені біохімічні характеристики у відновленні м'язів і хрящів. Вони так само сприяють загоєнню ран, тобто стимулюють ріст епітелію з відмінними наслідками, тобто без патологічних проявів [227]. Ці приклади переконливо демонструють системний рівень регуляції функціональних характеристик, що дає змогу пояснити поліфункціональність біологічної дії компонентів молозива.

Вважаємо, що практичне використання молозива або його компонентів можливе тільки після глибоких і всебічних досліджень можливих механізмів дії багатокомпонентних субстанцій, зокрема і молозива в експерименті, тобто проведення доклінічних випробувань на лабораторних тваринах. Такий підхід дасть змогу розширити знання про біологічні властивості багатокомпонентних субстанцій та усунути хибні уявлення щодо властивостей та особливостей дії молозива, як і трансферного чинника, на організм різних вікових груп.

Як вже було відзначено, основні проблеми практичного використання молозива можуть бути зведені до декількох положень: 1) нестабільність і висока варіабельність складу молозива, що залежить від поєднання великої кількості факторів, включаючи умови зберігання та технологічної переробки, що ускладнює процеси стандартизації та сертифікації отримуваних продуктів і субстанцій з молозива; 2) необхідність розробки нових систем стандартизації для багатокомпонентних біологічних або біотехнологічних субстанцій; 3) відсутність єдиної системи зберігання та переробки молозива; 4) недостатність знань про біологічну, зокрема епігенетичну дію багатокомпонентних субстанцій, таких як молозиво тварин, і особливо їх дію в залежності від початкових функціональних характеристик організму.

Важливо відзначити, що детальне ознайомлення з існуючими складом і біологічним впливом молозива дає підстави думати, що у нас сформувалися ряд помилкових уявлень про можливі властивості молозива та його практичне використання. Так, 1) трактування можливого впливу молозива на організм частіше ґрунтується на дії його індивідуальних компонентів, при цьому не

враховується, що ці компоненти в складі молозива можуть не проявляти цих властивостей або ці властивості можуть бути сильно модифіковані, включаючи синергетичні і системні ефекти. Іншими словами, його дія залежить від балансу компонентів. 2) при дослідженні механізмів дії молозива або його компонентів не враховується, що ефекти від його дії визначаються не лише складом і дозою молозива, але і функціональними особливостями (вік, наявність або відсутність патологій) організму. 3) частіше всього дослідники виходять з припущення, що молозиво - це природний продукт, який використовувався в харчуванні дуже давно, і немає потреби досліджувати його можливі побічні дії. 4) до багатокomпонентних субстанцій, яким є молозиво, пред'являють такі ж "вимоги", як і до існуючих однокомпонентних препаратів.

Висновок до розділу 1

Молозиво - це унікальний продукт еволюції ссавців, до складу якого входять не тільки найширший набір біологічно активних сполук, а й різноманітні типи клітин. Сучасні дослідження вказують на те, що молозиво не тільки забезпечує новонароджених пасивним імунітетом і трофічними компонентами, але й виконує епігенетичне "програмування" онтогенетичних характеристик організму. Незважаючи на те, що використання молозива почалося з моменту одомашнення великої рогатої худоби, його потенціал практично не використовується. Це пояснюється двома основними причинами: особливостями фізико-хімічних характеристик молозива та малою вивченістю можливих біологічних дій його компонентів.

Наразі молозиво використовується як харчовий продукт і з нього готують різноманітні ласощі, що мають національні особливості та традиції, проте в процесі приготування дуже сильно змінюються його природні властивості. Сучасні дослідження складу та особливостей впливу молозива та його компонентів як на новонароджених, так і на дорослих, показало, що воно може індукувати надзвичайно різноманітні біологічні ефекти, і це залежить не тільки від його складу, а й особливостей метаболізму біологічного об'єкта. Цим можна пояснити, з одного боку, розмаїття ефектів дії компонентів молозива, зокрема, на імунний статус, мікробіом кишківника, підвищення стійкості до інфекцій, підвищення спроможності організму здійснювати роботу і т. ін., а з іншого боку, суперечливість і неоднозначність одержуваних результатів. Такий стан не дає змоги задовольняти вимоги до розроблення нових фармакологічних препаратів. Застосування традиційних вимог до молозива або його компонентів як до звичайних фармакологічних препаратів не дає змоги вивести на ринок продукти, одержувані на основі молозива. Необхідно розробляти нові вимоги до таких багатокомпонентних біотехнологічних субстанцій як молозиво, дії яких можна пояснити балансом компонентів та їхньою системною взаємодією з метаболічною системою організму, відповідь якої багато в чому залежатиме від функціональних особливостей метаболізму на момент впливу. Це дасть можливість отримувати

продукти функціонального харчування та нові медичні препарати з широким спектром дії. Тому метою наших дослідів є розв'язання деяких із цих важливих питань.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Дизайн експериментального дослідження

Експерименти з оцінки біологічної дії компонентів молозива та інших біологічних субстанцій, з дослідження механізму їхньої дії проводили на статевозрілих молодих самцях (3 міс. віку) і старих самцях (20 міс. віку) щурів лінії *Wistar*. Експериментальні процедури з тваринами планували та проводили з урахуванням можливого впливу циркадних і сезонних ритмів на формування біологічних відповідей. Для цього тварини завжди отримували їжу в один і той самий час доби, їх утримували в стандартних умовах (розплідник НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна) та всі маніпуляції (введення досліджуваних субстанцій, оцінка працездатності, визначення динаміки росту, виведення з експерименту та ін.) здійснювали в один і той самий час доби, як правило, з 8-ї до 10-ї години, окрім спеціальних експериментів. За 24 години до виведення тварин з експерименту їх позбавляли їжі.

Усі дослідження, виконані на тваринах, проводились з урахуванням вимог чинного міжнародного законодавства з біоетики [242]. Протокол кожного етапу дослідження (а після виконання також й звіт) узгоджувався комісією з біоетики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

Тварини мали вільний доступ до води та їжі (повноцінний раціон, розроблений співробітниками віварію). Огляд тварин проводили щодня, заміну підстилки кожні три–чотири дні. Виведення тварин з експерименту здійснювалось шляхом декапітації після наркозу.

Оцінку біотестування компонентів молозива проводили на культурі мікроводоростей *Dunaliella viridis*. Вибір цього об'єкта пояснюється тим, що мікроводорості цього роду, на відміну від інших мікроводоростей, позбавлені клітинної стінки і тестовані субстанції можуть безпосередньо взаємодіяти з клітинами. Крім того, ці клітини є високо рухливими завдяки наявності джгутиків і в разі зміни швидкості та характеру метаболізму легко фіксувати зміни швидкості їхнього руху та/або втрату рухливості. Більше того, у критичних

умовах культивування ці клітини формують специфічні клітинні агрегати, які можуть мати різні характеристики. Морфо-функціональні зміни клітин у культурі фіксуються протягом кількох хвилин. Культура мікроводоростей підтримується на кафедрі протягом 30 років. Тестування компонентів молозива проводили на 18-20 добовій культурі, яка відповідає завершенню фази експоненціального росту. Перед внесенням субстанцій готували суспензії мікроводоростей так, щоб у мл середовища містилося 2 млн. клітин, і контролювали інтенсивність росту культури, кількість нерухомих клітин і наявність клітинних агрегатів. Загальний дизайн експериментальних досліджень включав у себе вісім етапів (Рис. 2.1)

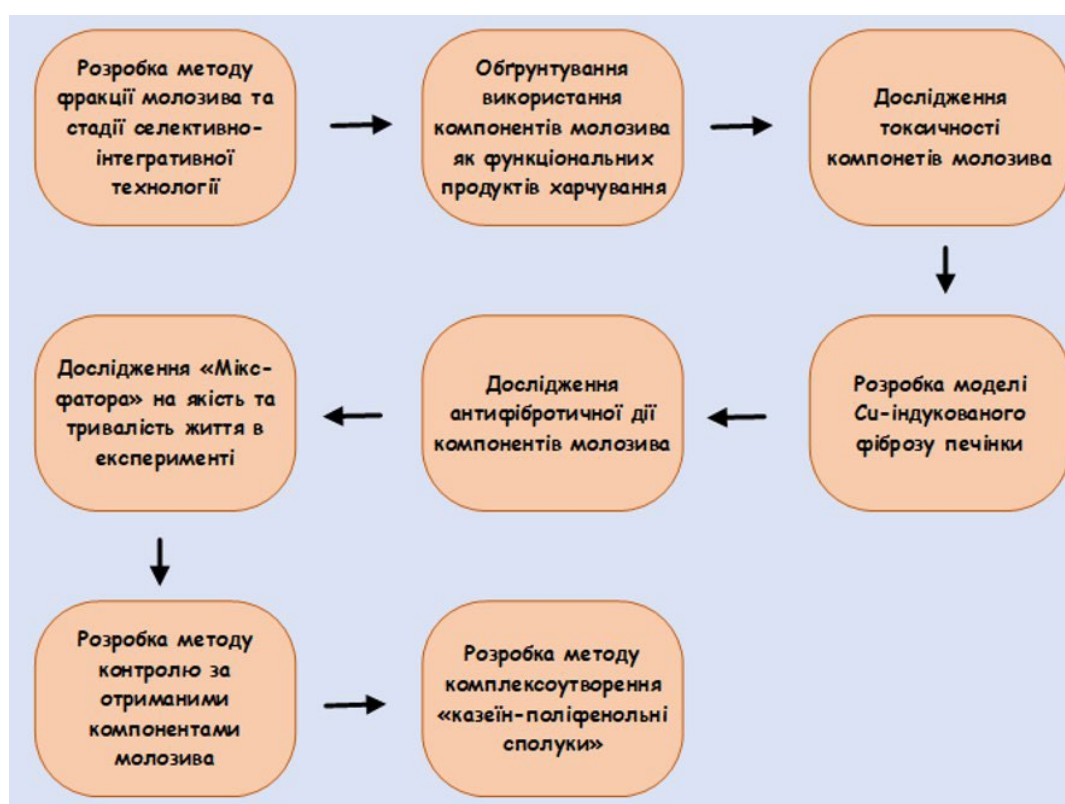


Рис. 2.1 Схема, що демонструє основні етапи дослідження.

2.2 Отримання та зберігання зразків молозива

Молозиво отримували в елітному господарстві "Альфа", що розташоване в Золочівському районі Харківської області, має добре розвинену інфраструктуру, що забезпечує утримання, годівлю, догляд і розмноження високопродуктивного стада корів породи "Українська чорно-ряба". Молозиво збирали у корів тільки цієї породи, одного віку, після першого надою, у яких не було зафіксовано будь-яких

захворювань і тільки у весняно-літній період. Такий підхід дозволив звести до мінімуму вплив цього набору факторів на склад молозива.

Відібране молозиво охолоджували та зберігали за температури -15°C до одного місяця. Під час дослідження молозиво розморожували при кімнатній температурі впродовж ночі та розділяли його на чотири фракції за допомогою диференціального центрифугування ("Препаративна центрифуга - S70D", Німеччина) та мембранною фільтрацією з використанням фільтрів з діаметром пір (80, 60, 45, 22 мкм) і отримували ліпідну фракцію, казеїнову фракцію, постказеїнову фракцію, або фракцію низькомолекулярних білків (НКМ), і "ультрафільтрат". Ліпідні фракції та фракцію казеїну зберігали при температурі -15°C , а НКМ та "ультрафільтрат" висушували в ротаційному випарнику і зберігали в герметично закритих ємностях у холодильнику.

2.3 Моделювання інтоксикації експериментальних тварин сульфатом міді в експериментальних тварин

Як відомо, проникнення в організм різноманітних токсичних речовин супроводжується глибокими порушеннями процесів життєдіяльності, що визначається як інтоксикація. Прояв симптомів інтоксикації залежить не тільки від природи та дози інтоксиканта, а й від функціональних станів організму. У зв'язку з цим, при моделюванні інтоксикації організму використовували такий відомий токсикант, як сірчаноокисла мідь, і тварин двох вікових груп: молодих (3 міс) масою 170-190 г і старих (20 міс) масою 390-410 г. З цією метою їм вводили внутрішньочеревно розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ тричі з інтервалом між введеннями 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла. Тварин було поділено на 4 групи: 1 група - контрольні молоді інтактні тварини; 2 група - контрольні старі інтактні тварини; 3 група - молоді тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді тричі, а через 24 години визначали біохімічні показники; 4 група - старі тварини, яким вводили розчин сірчаноокислої міді тричі, а через 24 години визначали біохімічні показники. Розчин сірчаноокислої міді вводили зранку до годівлі в дозі 1 мг/100 г маси тіла (0,23 мг/1 г печінки), що відповідає LD33 тричі з інтервалом у 48 годин.

При моделюванні інтоксикації печінки дією тетрахлорметану (CCl_4) вводили *per os* 0,1 мл 50% масляного розчину на 100 г маси тіла 1 раз на день протягом 3 днів. Декапітацію тварин і вимірювання показників прооксидантно-антиоксидантного балансу проводили через 24 години після останнього введення тетрахлорметану.

2.4 Виділення та культивування клітин кісткового мозку.

У експериментальних молодих і старих щурів, які перебували під ефірним наркозом, виділяли епіфізи з двох стегнових кісток молодих і старих тварин за методом [243]. Діафізи промивали попередньо охолодженим натрій-фосфатним буфером, який містив 137 мМ хлориду натрію, 2,7 мМ хлориду калію, 10 мМ гідрофосфату натрію та 1,46 мМ монофосфату калію з (рН 7,2-7,4) під тиском за допомогою шприця з голкою великого діаметру до загального об'єму 10 мл з двох діафізів, як рекомендовано в роботах [244–252].

У експериментальних молодих і старих щурів, які перебували під ефірним наркозом, відокремлювали епіфізи з двох стегнових кісток згідно з методикою [243]. Діафізи промивали попередньо охолодженим натрієво-фосфатним буфером, що містив 137 мМ хлориду натрію, 2,7 мМ хлориду калію, 10 мМ гідрофосфату натрію і 1,46 мМ монофосфату калію (рН 7,2-7,4). Для промивання діафізів використовували шприц із голкою великого діаметра, досягаючи загального об'єму 10 мл із двох діафізів, як рекомендовано в роботах [244-252].

Приготування натрієво-фосфатного буфера здійснювали таким чином:

Використовували 8 г NaCl , 0,2 г KCl , 1,42 г Na_2HPO_4 і 0,24 г KH_2PO_4 . Розчиняли солі в 0,5 л дистильованої води, перевіряли рН (7,2-7,4) і доводили кінцевий об'єм до 1 л. Перед використанням отриманий розчин автоклаували протягом 1 години при тиску в 1 атм.

Отриману кісткомозкову суспензію клітин із тканинними фрагментами дезагрегували механічно шляхом ресуспендування. Потім отриману суспензію клітини пропускали через нейлоновий фільтр із діаметром пор 100 мкм (cell dissociation sieve TGK, Sigma). Клітини кісткового мозку осаджували

центрифугуванням протягом 10 хвилин за 1500 g і 4°C. Отриманий осад суспендували в натрієво-фосфатному буфері та знову центрифугували впродовж 10 хвилин за 1500 g і 4°C.

Для видалення еритроцитів від клітин кісткового мозку, клітинну суспензію промивали розчином,, що містить 154 мМ хлориду амонію, 10 мМ бікарбонату натрію, 0,082мМ ЕДТА (ХімЛаборРеактив, Україна) протягом 10 хвилин при кімнатній температурі.

Лізуючий розчин для видалення еритроцитів готували, використовуючи 4,15 г NH_4Cl , 0,5 г KHCO_3 і 15 мг етилендіамінтетраацетату. Суміш солей розчиняли у 20-30 мл автоклавованої дистильованої води, доводили рН до 7,2-7,4 і стерилізували ультрафільтрацією. Доводили загальний об'єм розчину до 0,5 л.

Після лізису еритроцитів кістковомозкову клітинну суспензію двічі відмивали 5 мл охолодженого натрієво-фосфатного буфера. Після чого до отриманої клітинної суспензії додавали по 2 мл охолодженого буфера і відбирали аліквоти об'ємом 50 мкл у пробірки Еппендорфа для підрахунку клітин. Кількість клітин рахували в камері Горяєва.

Для підрахунку клітин до аліквот суспензії клітин додавали 50 мкл розчину барвника 0,4% трипанового синього (Sigma, США), який готували на натрієво-фосфатному буфері (рН 7,1-7,4) і 100 мкл натрієво-фосфатного буфера. Підраховували кількість клітин і розраховували їхню концентрацію в мл маткової суспензії за формулою для камери Горяєва, враховуючи розведення, щоб у кожній чашці Петрі концентрація клітин кісткового мозку була однаковою та становила 2×10^6 клітин/мл, яку використовували для подальшого культивування.

Для визначення кількості клітин кісткового мозку у камері Горяєва використовували наступну формулу:

$$x = a \times 0,01 \times k, \quad (2.1)$$

де, а – кількість клітин у 5-ти маленьких квадратах, розташованих за діагоналлю, 0,01 – коефіцієнт камери Горяєва, k – коефіцієнт розведення.

2.4.1. Визначення кількості клітин кісткового мозку та їх морфотипів

Клітинну суспензію кісткового мозку фіксували метиловим спиртом протягом 5 хвилин, після чого, фіксовані клітини фарбували барвником Романовського-Гімза (у співвідношенні 1:20) протягом 8-10 хвилин. Залишок барвника промивали дистильованою водою і висушували на повітрі, як зазначено в численних роботах [244-252].

Аналіз отриманих цитологічних препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа «Zeiss Primo Star iLED» (Німеччина) при збільшенні $\times 100$. Визначали кількість таких морфологічних типів клітин кісткового мозку як: паличкоядерні нейтрофіли; метамієлоцити; лімфоцити; сегментоватоядерні нейтрофіли; мієлоцити; базофіли; еозинофіли та моноцити. Це робили безпосередньо після отримання клітинної суспензії, а також на 2-у і 4-у добу культивування клітин кісткового мозку.

Підрахунок проводили у випадково обраних полях зору, аналізуючи не менше 500 клітин. Результати виражали у відсотках від загальної кількості клітин, прийнятої за 100 %.

2.5 Фізіологічні методи дослідження

2.5.1. Визначення динаміки росту, ректальної температури та здатності тварин здійснювати роботу (працездатність).

Маса тіла є інтегральним показником функціонального стану організму і в лабораторних тварин вона змінюється протягом доби. З метою коректного визначення цього важливого функціонального показника її визначали щодня завжди в один і той самий час з 8:00 до 9:00 перед годуванням. Ректальну температуру визначали в той самий час (з 8:00 до 9:00) перед прийомом їжі. Вимірювання температури проводили спеціальним термометром MicroTherma 2T HandHeld (Braintree Scientific, INC., USA) [253-257] для дрібних лабораторних тварин.

Працездатність щурів (здатність здійснювати фізичну роботу) оцінювали за допомогою тесту плавання з вантажем у воді температурою 12-14 °C, а також за часом бігу в тредбані до знемоги за швидкості руху стрічки 40 м/хв. Оскільки для щурів такі дії незвичні, то перед початком експерименту визначали максимальний час бігу кожної тварини, приймаючи цей показник за 100% вихідного рівня. Потім тварин піддавали тренуванню з однаковим навантаженням, за якого час бігу становив 10% від вихідного рівня. Таке тренування тривало 5 днів, після чого повторно визначали контрольний максимальний час бігу у відсотках від вихідного рівня [255-257].

2.5.2 Методика визначення відносної маси органів та міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки

Як відомо, розвиток фіброзу або цирозу супроводжується зміною кольору, маси та інших морфологічних показників печінки. Під час розтину оцінювали такі показники, як зовнішній вигляд печінки, зокрема її колір, масу, наявність зрощень між лопатями печінки, а також наявність сполучнотканинних тяжів, що з'єднують печінку з черевною порожниною, кишківником або іншими внутрішніми органами. Ці характеристики використовували для оцінки ступеня спайкової хвороби та фіброзу печінки у тварин.

Фіброз оцінювали за чотирибальною шкалою:

- Стадія 0 (F0) - фіброз відсутній, колір печінки нормальний (світло-коричневий), зрощень між лопастями печінки немає.
- Стадія 1 (F1) - фіброз на початковій стадії, колір печінки коричневий, невеликі збільшення розростань сполучної тканини (білого кольору) на поверхнях лопатей.
- Стадія 2 (F2) - розвинений фіброз, печінка набуває багряно-коричневого кольору, лопаті помірно зрощені сполучною тканиною.
- Стадія 3 (F3) - передциротична стадія, колір темно-коричневий, печінка має зернисту структуру, всі лопаті зрощені сполучною тканиною, краї органа округлі й ущільнені.

– Стадія 4 (F4) - цироз, печінка втрачає чітку структуру і форму, колір темний.

Ступінь спайкової хвороби визначали за п'ятибальною шкалою:

- Стадія 0 - відсутність спайок.
- Стадія 1 (1-3 бали) - поверхня печінки покривається сполучнотканинним утворенням, набуваючи білуватого відтінку.
- Стадія 2 (4-5 балів) - сполучнотканинні утворення поширюються між органами, підвищуючи щільність з'єднання.

Масу печінки, селезінки, нирок зважували на аналітичних вагах одразу після декапітації тварин та вилучення її з порожнини тіла. Надалі ця маса враховувалася при розрахунках відносної маси печінки, та інших органів. Після того, як відбирався зразок печінки для подальших гістологічних досліджень, залишки печінки зважували повторно для того, щоб розраховувати співвідношення сухого залишку сполучної тканини в печінці до маси печінки з якого його було отримано.

2.5.3 Методика виділення тканин печінки, приготування гістологічних препаратів та підрахунок наявності двоядерних гепатоцитів

При проведенні досліджень морфологічних характеристик печінки висікали невеликі фрагменти печінки та переносили їх у 10% розчині формаліну. Обробку зразків здійснювали за методикою, описаною в роботі [258]. Після 24-48 годин фіксації шматочків печінки в 10% формаліні проводили їх зневоднення з використанням етанолу зі зростаючою концентрацією (від 70% до 96%), витримуючи кожен етап по 12 годин. Після завершення цього етапу зразки переносили в ксилол на 1-3 години, а потім у рідкий парафін за 57°C на 2-3 години. Для отримання напівтонких зрізів (2-4 мкм завтовшки, 1-2 см²) використовували мікротом. Отримані напівтонкі зрізи забарвлювали в розчин гематоксиліном-еозином. Характеристику морфологічної структури печінки проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss з камерою SIGETA M3CVOS 14000 при збільшенні $\times 200$.

Гістологічні зрізи печінки аналізували методом сліпого експерименту, тобто без додавання інформації про походження зразків і без зміни виконавця. Отримані біоптати мали довжину щонайменше 15 мм і містили достатню кількість порталних трактів, що давало змогу проводити коректну оцінку гістологічних змін і встановлення діагнозу [259].

Гістологічні особливості тканини печінки аналізували за схемою, яка була описана Brunt et al. [260]. Ступінь запалення визначали за 4-бальною шкалою [261]: 0 ступінь - запалення відсутнє або незначне, 1 ступінь - легке запалення, 2 ступінь - помірне запалення, 3 ступінь - важке запалення. Кількість двоядерних гепатоцитів у гепатоцитах (присутність яких вказує на наявність проліферуючих гепатоцитів) підраховували на тих самих гістологічних препаратах, що використовували для морфологічного аналізу печінки, за допомогою мікроскопа Carl Zeiss з камерою SIGETA M3CVOS 14000 при збільшенні $\times 400$. Для отримання достовірних результатів підраховували по 100 клітин у трьох полях зору для кожного з трьох гістологічних препаратів печінки однієї тварини кожної дослідної групи.

2.6. Конфокальна мікроскопія

2.6.1 Визначення іонів кальцію у клітинах кісткового мозку

Для визначення внутрішньоклітинного вмісту кальцію використовували специфічний флуорисцентний зонд Fluo-3, який має високу чутливість до іонів кальцію. Для цього до суспензії клітин, яка завжди дорівнювала 2 млн клітин/мл, додавали по 10 мкг/мл Fluo-3, що був розчинений у 3,03 mM фосфатному буфері, який містить 2,89 mM CaCl_2 (ThermoFisher Scientific, USA). Отриману суспензію клітин із барвником витримували протягом 15 хвилин за 24°C , як зазначено в роботі [262]. Інтенсивність флуоресценції, що вказує на кількість кальцію в клітинах, вимірювали за допомогою конфокального мікроскопа LSM 510 META Carl Zeiss (Німеччина) за збільшення $\times 100$, а вміст кальцію виражали у відносних одиницях, як прийнято в таких дослідках [246].

2.6.2 Визначення іонів вільних форм кисню у клітинах кісткового мозку (ROS)

Важливим показником активності редокс-системи клітин є вільні форми кисню. Отримання даних його кількості в клітинах кісткового мозку є важливим показником функціональних властивостей цих клітин. Тому, визначали кількість ROS у клітинах кісткового мозку. Для цього до 50 мкл суспензії клітин ($6 \times 10^6/\text{мл}$), що отримували у дослідних тварин, додавали по 5 мкл робочого розчину для визначення вільних форм кисню, дотримуючись рекомендацій виробника набору Cellular ROS Assay Kit-Red (ab186027) [263].

Після ретельного змішування за допомогою піпетування суспензію клітин. Після цього суспензію клітин витримували в темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин. Для візуалізації ROS 30 мкл суспензії наносили в лунку скляного слайда (ThermoScientific™ PTFE, 10632391) і накривали покривним склом товщиною 0,13 мм (Fisherbrand, 12-542A). Після фіксації слайда на робочому столі мікроскопа проводили візуалізацію за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Olympus FV10i-LIV (Olympus, Японія). Детекцію флуоресценції проводили в блакитному каналі для DAPI ($\lambda_{\text{Ex}} = 405 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{Em}} = 453 \text{ нм}$), зеленому каналі для Fluo-3 ($\lambda_{\text{Ex}} = 506 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{Em}} = 527 \text{ нм}$) і червоному каналі для визначення ROS ($\lambda_{\text{Ex}} = 520 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{Em}} = 605 \text{ нм}$). Чутливість детекторів та інтенсивність лазерів залишалися однаковими для всіх зразків. Величина конфокальної діафрагми становила 2,0.

При отриманні зображення використовували об'єктив $\times 60$ із застосуванням водної імерсії. Проводили зйомку серії горизонтальних оптичних зрізів через весь об'єм клітин із кроком 0,5 мкм. Зображення зберігали у форматі OIF як інтегральне зображення з поєднанням усіх оптичних зрізів, а також як тривимірну реконструкцію окремих клітин. Для визначення відносної інтенсивності флуоресценції в кожній клітині з урахуванням фону використовували програмне забезпечення Olympus FV4.1. Деконволюцію зображень і тривимірну реконструкцію об'єкта здійснювали за допомогою програми Olympus CellSense Dimension Desktop [263].

2.7 Препаративні методи дослідження

2.7.1 Отримання сироватки крові для дослідження

Експериментальних тварин наркотизували за допомогою ефіру. При декапітації кров збирали в сухі стерильні центрифужні пробірки. Отримані зразки крові витримували при температурі 20°C протягом 30 хвилин. Після цього зразки крові центрифугували при 1500g протягом 15 хвилин. Сироватку крові, що вийшла, відбирали в чисті сухі пробірки для подальшого аналізу [255, 256, 264].

2.7.2 Одержання мітохондрій із печінки

При виділенні мітохондрій використали класичний метод диференціального центрифугування. На першому етапі проводили перфузію печінки холодним (4°C) 0,15 М розчином хлористого натрію через ворітну вену. При цьому видалили клітини крові та одночасно охолоджували тканину. Після цього печінку продавлювали через прес і до отриманого гомогенату додавали 100 мМ тріс-НCl буфер, рН 7,4, що містив 250 ммоль сахарози, 5 ммоль KCl і 1 ммоль MgSO₄. Подальше руйнування тканини забезпечували гомогенізації у гомогенізаторі Потера протягом 1 хвилини при 8000 об/хв, а потім фільтрували через нейлонову тканину. Отриманий гомогенат центрифугували при 10000 g протягом 30 хвилин. При виділенні мітохондрій дотримувалися співвідношення ваги тканини до об'єму середовища, що становило 1:7 m/v. Середовище виділення містило 0,3 М сахарози, 1 мМ трилон Б, 10 мМ тріс-НCl, рН 7,4. Мітохондрії, які перебували в осаді, додатково очищали дворазовим промиванням у середовищі без трилону Б. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за класичним методом Лоурі та становила від 60 до 80 мг/мл суспензії [255–257, 264].

2.7.3 Одержання мікросомальної фракції (ендоплазматичного ретикулуму - ЕПР) клітин печінки

Постмітохондріальну фракцію клітин, яка збагачена мембранами ендоплазматичного ретикулуму клітин печінки, отримували центрифугуванням при 90 000 g протягом 60 хвилин при температурі 4°C. Надосадову рідину, яка є водорозчинною фракцією клітин – цитозоль, переносили у чисті пробірки. Осад,

який містив фракцію ЕПР, суспендували в 10 мМ тріс-НCl буфері, що містив 0,25 М сахарози, 5 мМ KCl і 1 мМ MgSO₄, і використовували для подальшого аналізу [256, 257, 264].

2.7.4. Одержання цитозольної фракції клітин печінки

Цитозольну фракцію печінки отримували використанням методу диференціального центрифугування. Після послідовного осадження клітинних ядер, мітохондрій, лізосом та мембран ендоплазматичного ретикулуму отримували фракцію цитозоля після центрифугування при 90 000 g протягом 60 хвилин. Усі маніпуляції проводили за температури не вище 4°C [255].

2.8 Аналітичні методи дослідження

2.8.1 Вимірювання біохімічних показників у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки

Активність клітин печінки визначали за активністю печінкових ферментів у сироватці крові, а саме: активність аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), глутамілтрансферази (ГТ), вмістом альбуміну, холестерину в сироватці, використовуючи біохімічних аналізаторах «Beckman Coulter AU480» і StatFax (Німеччина).

2.8.2 Методика визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), глутаміламінотрансферази (ГГТ), лужної фосфатази

Як відомо, такі ферменти як аспартатамінотрансферази (АСТ) та аланінамінотрансферази (АЛТ) синтезуються у печінці. Зростання активності цих ферментів у сироватці крові вказує на порушення структури гепатоцитів. аспартатамінотрансферазі (АСТ) та аланінамінотрансферазі (АЛТ) [266]. АЛТ є більш специфічним для пошкодження печінки, оскільки вона присутня лише в цитоплазмі гепатоцитів, тоді як АСТ міститься і в цитоплазмі, і в мітохондріях гепатоцитів, при цьому переважна частина її активності припадає на мітохондрії (mАСТ) [267].

У роботі визначення активності АЛТ, АСТ, ГГТ та лужної фосфатази проводили за допомогою наборів реагентів (Global scientific, USA), що дозволяють виміряти ці ферменти на біохімічному аналізаторі STAT-FAX 1908 (США). Вимірювання проводили при температурі 37°C, з інкубацією протягом 60 секунд. Контроль якості перевіряли при кожному окремому експерименті, для цього використовували контрольну сироватку, що додається до набору реагентів (Global scientific, USA) з відомими нормальними (рівень 1) та підвищеними (рівень 2) рівнями АЛТ, АСТ, ГГТ та лужної фосфатази. Результати виражали в умовних одиницях.

Метод визначення активності АСТ заснований на її здатності каталізувати перенесення аміногрупи від L-аспартату до α -кетоглутарату, що супроводжується утворенням оксалацетату та L-глутамату [268]. Оксалацетат далі піддається відновленню, при цьому відбувається окислення NADH до NAD, і зниження поглинання при 340 нм пропорційно активності АСТ.

Активність АЛТ (КФ 2.6.1.2) визначали шляхом каталізу перенесення аміногрупи від L-аланіну до α -кетоглутарату, що призводить до утворення пірувату та L-глутамату. Зниження поглинання при 340 нм також пропорційно активності АЛТ.

Активність лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1) визначали за методом гідролізу п-нітрофенілфосфату до п-нітрофенолу та неорганічного фосфату. Зниження поглинання в спектрі 405 нм пропорційно активності лужної фосфатази.

Для оцінки активності γ -глутаміламінотрансферази (ГГТ) використовували метод, який базується на її здатності переносити глутамінову групу від L- γ -глутамілкарбокси-4-нітроаніліду до гліцилгліцину з утворенням 5-аміно-2-нітробензоату. Зміна поглинання при 405 нм прямо пропорційна активності ГГТ [271].

Концентрацію холестерину визначали в сироватці крові ензиматичним колориметричним методом [272]. Холестерин визначається після ензиматичного гідролізу і окислення. Індикатор квіноментин формується з перекису водню і 4-амінофеназону в присутності фенолу і пероксидази. Забарвлення продуктів

реакції проводили з використанням набору реактивів виробництва фірми «HUMAN». Концентрацію холестерину в зразках визначали за величиною оптичної щільності на біохімічному аналізаторі Beckman Coulter AU480 (Німеччина) при довжині хвилі 492 нм [256].

2.8.3 Вимірювання вмісту малонового діальдегіду

Вимірювання концентрації малонового діальдегіду (МДА) у мітохондріях печінки і інших фракцій біоматеріалу проводили за методом Ohkawa H. et al. [273], а у сироватці крові – за методом Asakawa T. et al. [274]. Спектр поглинання забарвленого продукту (МДА) реєстрували на спектрофотометраї, вимірюючи різницю в екстинкціях при 535 нм та 520 нм. Вміст малонового діальдегіду обчислювали в еквівалентних одиницях МДА, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.8.4 Визначення активності глутаредоксину

Активність глутаредоксину визначали у фракцій мітохондріях клітин печінки щурів з використанням спектрофотметричного методу Raghavachari N. [276] з незначними змінами які провів Gallogly N. [277]. Для цього використовували реакційний розчин 50 мМ К-фосфатному буфері (pH 8,0), що містив 0,5 мМ GSH, 0,2 мМ НАДФН, 0,4 од/мл глутатіонредуктази дріжджів, 1,25 мМ цистину, 0,2% тритону X-100. Температура реакційного середовища становила 37 °C. реакція тривала на протязі 30 хвилин. Активність виражали в нмоль НАДФН/хв на 1 мг білка, з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.8.5 Визначення глутатіонредуктазної активності (КФ 1.6.4.2)

Важливим показником антиоксидантної системи мітохондрій та постмітохондріальної фракції печінки є активність глутатіонредуктази. У зв'язку з цим визначали її активність у цих фракціях використовуючи спектрофотметричний метод запропонований I. Carlberg et al., який ґрунтується на вимірюючи зменшення рівня НАДФН [278] у середовищі. Як середовище

інкубації використовували середовище в якій містилося 50 мМ калій-фосфатного буфера, pH 7,4, 1 мМ EDTA, 0,16 мМ НАДФН, 1 мМ GSSG та 0,2% тритону X-100. Інкубацію проводили за температури 37 °C протягом 30 хв. Активність фермента виражали в нмоль НАДФН/хв на 1 мг білка, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.8.6 Визначення NADP⁺-глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.49)

У мітохондріях та постмітохондріальній фракції печінки експериментальних тварин визначали активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ). Для вирішення цього завдання використовували зручний і швидкий метод спектрофотометричного визначення, який заснований на визначенні швидкості відновлення NADP⁺ за методом розробленим Zaheer N. [279]. Як реакційне середовище використовували 120 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, що містив 10 мМ MgCl₂, 2 мМ глюкозо-6-фосфату, 0,9 мМ NADP⁺, 0,2% тритону X-100. Зразки інкубували за температури 37°C. протягом 30 хв. Активність ферменту виражали як прийнято в нмоль NADPH/хв·мг білка..

2.8.7 Визначення NADP⁺-ізоцитратдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.42)

Як відомо ізоцитратдегідрогеназна (ІЦДГ) забезпечує реакцію перетворення ізолімонної кислоти на α-кетоглутарову та є третьою реакцією циклу трикарбонових кислот. Вважають, що саме ця реакція лімітує швидкість проходження всього циклу. У роботі визначали активність цього ферменту в МХ і ПМХ фракціях печінки використовуючи спектрофотометричний метод визначення швидкості відновлення NADP⁺ за методом, який був запропонований Bauman H. [280]. У якості реакційної суміші використовували 34 мМ трис-HCl буфері, pH 7,4, який містив 0,34 мМ EDTA, 1,5 мМ MnCl₂, 0,1 мМ NADP⁺, 1,5 мМ ізоцитрату, 0,2 % тритону X-100. Температура інкубації становила 37 °C. Активність ферменту виражали в нмоль NADPH/хв·мг білка.

2.8.8 Визначення NADP⁺-малатдегідрогеназної активності (КФ 1.1.1.40)

Малатдегідрогеназа бере участь у реакціях гліколізу, каталізуючи перетворення лактату на піруват, при цьому утворюється NADH. Активність цього ферменту служить діагностичним тестом при визначенні низки патологічних станів. У роботі використали спектрофотометричний метод визначення цього ферменту у мітохондріях та постмітохондріальній фракції печінки за швидкістю відновлення NADP⁺ за методом розробленим Усатенко М. С. [281]. Для цього використовували реакційний розчин, що містить 68 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містить 0,85 мМ MnCl₂, 2 мМ малату, 0,4 мМ NADP⁺, 0,2 мМ тритону Х-100. Температура реакції становила 37 °С. Час реакції 30 хв. Активність ферменту виражали в нмоль NADPH/хв·мг білка.

2.8.9 Визначення аконітатгідратазної активності (КФ 4.2.1.3)

Аконітатгідратаза каталізує ізомеризацію цитрату в ізоцитрат через утворення проміжної сполуки цис-аконітату в циклі Крепса. Було виявлено, що активність цього ферменту залежить від наявності активних форм кисню та вимірювання активності аконітази використовується як показник окисного стресу. У зв'язку з цим у цій роботі визначали аконітатгідратазну активність у мітохондріях використовуючи спектрофотометричний метод запропонований Gardner J. et al. [282]. Для здійснення реакції використовували середовище що містило 50 мМ Трісс-НСІ-буфер (рН 8.0), 10 мМ MnCl₂, 10 мМ ізоцитрату. Мітохондрії інкубували протягом 6 хв з перемішуванням у термостатуючій комірці при температурі 37 °С. Активність виражали в нмоль аконітату на мг білка.

2.8.10 Визначення вмісту білку

Вміст білка в усіх дослідних зразках визначали за класичним методом Лоурі [283] у модифікації Міллера [284].

2.9 Мас-спектроскопія білків молозива

Виділені за допомогою гель-хроматографії ЛПС далі досліджували методом MALDI-TOF. Зразки концентрували за допомогою роторного випаровувача і доводили до однакової концентрації білка в зразку 1,5 мг/мл. Мас-спектрометричні дослідження проводили на мас-спектрометрі Autoflex II LRF 20 Bruker Daltonics, обладнаному імпульсним азотним лазером (1 ¼ 337 нм, довжина імпульсу 3 нс). Змішані з матрицею зразки наносили на стандартну сталеву мішень і висушували при кімнатній температурі. Кожен мас-спектр представлений сумою 490 індивідуальних спектрів. Дослідження проводили в лінійному режимі роботи приладу з детектуванням позитивних і негативних іонів. Матрицю для мас-спектрометричного аналізу готували за стандартними методиками: 12 мг синапінової к-ти - C₁₀H₁₁O₃COOH (Fluka) розчиняли в 1 мл суміші вода-ізопропанольний спирт у співвідношенні 1:1 (v/v) з додаванням 0,1% (TFA). Аналіз отриманих результатів проводили з використанням відкритого програмного забезпечення ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net>), mMass (<http://www.mmass.org>) та OpenMS (<https://www.openms.de>).

2.10 Визначення деяких імунологічних показників у експериментальних тварин.

2.10.1. Спосіб визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові

Зразки крові, змішували з гепарином та поміщали в пробірки по 0,2 мл. и додавали по 70 мкл 0,05 % суспензії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, та інкубували їх 40 хв (при 37 °C). Після закінчення інкубації з інкубаційної суміші готували мазки, висушували їх при 37°C, фіксували в метиловому спирті, фарбували за Романівським-Гімзою і після висушування їх мікроскопували під імерсією (зб. ×1000) [285].

Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали за такими показниками: фагоцитарний індекс (ФІ) – % фагоцитуючих нейтрофілів на 100 поліморфно-ядерних лейкоцитів; фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість клітин дріжджів, поглинутих одним нейтрофілом.

Метод заснований на здатності поліморфно-ядерних лейкоцитів зв'язувати, поглинати та перетравлювати мікробну тест-культуру (*Saccharomyces cerevisiae*). Щоб оцінити фагоцитарну активність гранулоцитарних нейтрофілів, змішували в рівних кількостях 400 мкл гепаринізованої цільної крові експериментальних щурів і суспензію клітин *Saccharomyces cerevisiae* та інкубували за 37 °C впродовж 30 і 120 хв. Готували мазки клітин, зафіксували їх у 96% етанолі та фарбували за Романовським протягом 20 хв. За допомогою мікроскопа (Primo Star Care Zeiss Surhou Co. Ltd.) за збільшення x900, підраховували 200 клітин і визначали серед них кількість лейкоцитів, що поглинули тест-культуру, і висловлювали їх у відсотках від загальної кількості клітин, а також приймали їх за фагоцитарний індекс (ФІ). Середню кількість клітин дріжджів, яку було поглинуто однією клітиною, що фагоцитує, приймали за фагоцитарне число (ФЧ) і висловлювали в умовних одиницях. Для визначення інтенсивності фагоцитозу або перетравної здатності фагоцитів визначали ФІ через 30 хв. до ФІ через 120 хвилин як описано у роботі [286].

2.10.2 Метод визначення загальної окисно-відновної активності нейтрофілів у тесті - відновлення нітросинього тетразолію (НСТ)

Метод заснований на здатності нітросинього тетрозолію відновлюватися до диформазану, у вигляді нерозчинних гранул синього кольору, під дією супероксидного аніону, що утворюється в реакції НАДФН-оксидази. У нейтрофілах має місце індукція окислювальних реакцій як механізм стимуляції фагоцитозу та знищення захоплених клітин бактерій. Отже, за визначенням кількості гранул диформазану у клітинах, що фагоцитують, можна судити про інтенсивність окисних процесів у лейкоцитах.

Матеріалом для дослідження слугувала цільна кров експериментальних тварин.

Для оцінки ферментативної активності гранулоцитів змішували 50 мкл гепаринізованої цільної крові з рівним об'ємом нітросинього тетразолію у двох стерильних центрифужних пробірках, потім в одну пробірку вносили 50 мкл.

0,15М фосфатного буфера з рН 7,2 і визначали кількість гранул диформагану в 200 клітинах. Цю кількість приймали за спонтанний або вихідний рівень фагоцитарної активності в НСТ-тесті. Для визначення потенційного резерву нейтрофілів фагоцитарну активність посилювали (індукували) за допомогою зимозану. Для цього в наступну пробірку додавали 50 мл. 0,5% суспензії опсонізованого зимозану замість фосфатного буфера та інкубували 30 хвилин за 37°C, потім зразки центрифугували 10 хвилин за 1000 g, надосадову рідину видаляли, осад повторно промивали. Клітини фіксували 96% етанолом і фарбували 0,1% нейтральним червоним протягом 40 хв. Аналізували щонайменше 100 клітин під мікроскопом (Primo Star Care ZeissSurhou Co. Ltd.) при збільшенні $\times 900$. Підраховували кількість клітин із диформаганом [287].

2.10.3 Метод визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові

Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які представляють собою асоціацію між антигеном, антитілами і комплементом, оцінювали спектрофотометрично (СФ-46) після інкубації зразків сироватки в боратному буфері і поліетиленгліколі (ПЕГ) 6 000 при кімнатній температурі. В дві пробірки вносили по 100 мкл сироватки крові і додавали по 200 мкл боратного буферу.

В першу пробірку (контрольну) додавали 2,7 мл, а в другу пробірку вносили 2,7 мл розчину 4,2% ПЕГ 6000. Інкубували 1 годину за кімнатної температури. Після інкубації визначали оптичну густину зразків спектрофотометрично за довжини хвилі $\lambda = 450$ нм проти боратного буферу. Вміст ЦІК висловлювали в умовних одиницях [288].

2.10.4 Метод визначення концентрації пептидів молекулярної середньої молекулярної маси

Для визначення пептидів середньої молекулярної маси до 300 мкл сироватки крові додавали по 150 мкл 10% трихлороцтової кислоти. Білки з мол. масою понад 10 кДа осаджували протягом 30 хв за 3000 g. У надосадовій рідині визначали оптичну щільність спектрофотометром при $\lambda = 254$ нм проти

дистильованої води. Вміст пептидів середньої молекулярної маси виражали в умовних одиницях [289].

2.10.5 Метод визначення гідроперекиси ліпідів (ГПЛ) в сироватці крові

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) є визнаним показником продуктів вільно-радикальних реакцій в організмі. Для оцінки ступеня прояву окислювального стресу на рівні організму визначали їх вміст у сироватці крові. З цією метою використовували запропонований метод Asakawa [274]. Не менш важливим показником вільно радикальних процесів є кількість гідроперекисів ліпідів у мітохондріях та фракціях мікросом печінки. При визначенні цих компонентів клітин використовували метод Ohkawa [273]. Спектр поглинання забарвленого продукту гідроперекисів реєстрували на дволучевому спектрофотометрі Specord UV VIS (Німеччина). У процесі визначення вимірювали різницю екстинкції при довжині хвилі 535 нм та 520 нм [290]. Вміст ГПЛ виражали в еквівалентних кількостях малонового діальдегіду (МДА), використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [253, 255, 257, 264].

2.11 Визначення активності деяких антиоксидантних ферментів

2.11.1 Визначення глутатіонпероксидазної активності (КФ 1.11.1.9)

Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали у сироватці крові та еритроцитах, а також у мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки спектрофотометрично при тривалості ввілі 340 нм за методом Paglia D. et al. [275]. У роботі використовували 50 мМ калій-натрієвий-фосфатний буфер (рН 7,4), який містив 1 мМ EDTA, 0,2 мМ НАДФН, 1 одиницю глутатіонредуктази дріжджів, 1 мМ GSH, 0,2% тритон X-100, 0,4 мМ перекису водню та 3 мМ азиду Na для інгібування каталази. Ферментативну реакцію проводили при температурі 37 °C протягом 30 хв. Активність ГП виражали в нмоль НАДФН/хв на 1 мг білка або на 1 мл сироватки, з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [256, 257, 264].

2.11.2 Визначення активності глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2)

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) визначали в мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки за допомогою спектрофотометра Specord UV VIS (Німеччина) за методикою Carlberg & Mannervik (1975). В аналізі відстежували зниження концентрації NADPH у середовищі, що містило 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,4), 1 мМ ЕДТА, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ GSSG та 0,2% Triton X-100 при 37°C.

Активність ферменту виражали як нмоль НАДФН, спожитого за хвилину на мг білка, з молярним коефіцієнтом екстинкції $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.12 Вимірювання електропровідності молозива та компонентів молозива

Електропровідність молозива та его компонентів вимірювали за допомогою векторного аналізатора «Rohde & Schwarz» ZNB 40 та тефлонової вимірювальної комірки ємністю 400 мкл (рис. 2.2).

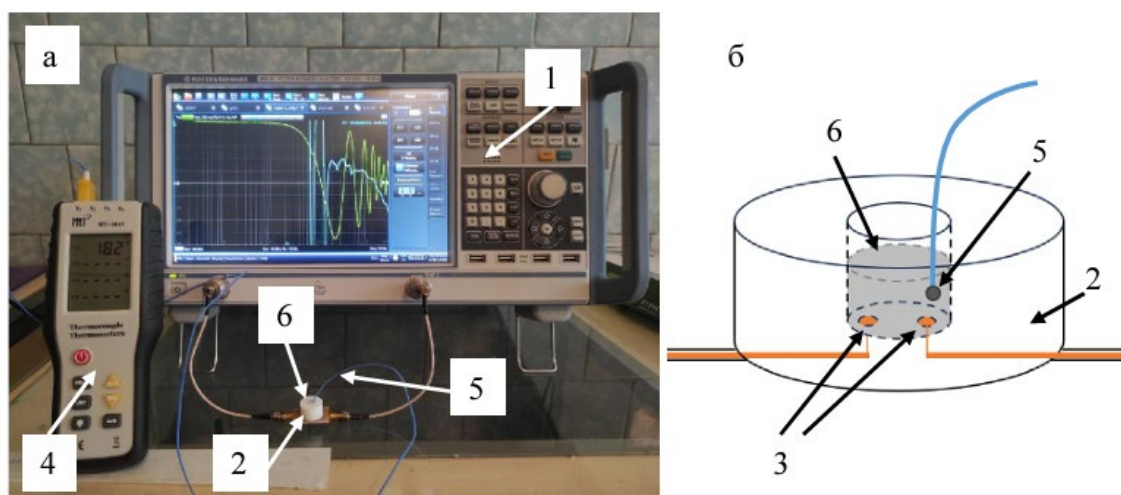


Рис. 2.2. Фотографія експериментальної установки для вимірювання електропровідності (а) та схематична будова вимірювальної комірки (б). 1 – векторний аналізатор, 2 – тефлонова вимірювальна комірка, 3 – електроди вимірювальної комірки, 4 – термометр, 5 – термопара, 6 – досліджуваний зразок.

«Rohde & Schwarz» ZNB 40 використовувався в наступному режимі: скануючий електромагнітний сигнал в діапазоні частот 100 кГц – 10 МГц

пропускається через тефлонову комірку, під'єднану до портів векторного аналізатора, і вимірюються коефіцієнти пропускання сигналу S_{21} . За 63 коефіцієнтами пропускання програмне забезпечення векторного аналізатора дозволяє автоматично розраховувати дійсну $\text{Re}(Z \leq -S_{21})$ та уявну $\text{Im}(Z \leq -S_{21})$ частини імпедансу Z вимірювальної комірки. Електропровідність є зворотною величиною активного опору, який розраховували за дійсною та уявною частинами імпедансу за формулою, виведеною для еквівалентної електричної схеми вимірювальної комірки [292].

$$R = \text{Re}(Z < -S_{21}) + \frac{\text{Im}(Z < -S_{21})^2}{\text{Re}(Z < -S_{21})}. \quad (2.2)$$

Електропровідність досліджуваного зразка є характеристикою матеріалу цього зразка, а також залежить від його геометричних параметрів, а у випадку рідин – геометричними параметрами комірки. Щоб виключити вплив геометричних параметрів, вимірювали питому електропровідність σ досліджуваного зразка:

$$\sigma = k \cdot \frac{1}{R} = \frac{k}{\text{Re}(Z < -S_{21}) + \frac{\text{Im}(Z < -S_{21})^2}{\text{Re}(Z < -S_{21})}}. \quad (2.3)$$

Коефіцієнт $k = 400 \text{ м}^{-1}$ враховує геометричні параметри вимірювальної комірки, підлягає одноразовому визначенню для спроектованої циліндричної комірки (Рис. 2.2, б) з використанням калібрувальних розчинів з відомою питомою електропровідністю та залишається незмінним в ході експерименту. Розрахунок значень електропровідності σ на кожній частоті в досліджуваному діапазоні проводився за формулою (2.3) із масиву значень $\text{Re}(Z \leq -S_{21})$ та $\text{Im}(Z \leq -S_{21})$ за допомогою програми MS Excel.

Електропровідність речовин, включаючи біологічні зразки, залежить від температури [293]. Це може бути обумовлено впливом температури на різні процеси, які визначають механізми електропровідності: утворення іонів та їх рухливість, формування та розпад надмолекулярних комплексів, що містять некомпенсований електричний заряд, і інші фактори. Оскільки метою дослідження не було вивчення залежності електрофізичних властивостей зразків

від температури, для усунення її можливого впливу вимірювання проводили при фіксованій температурі. Температуру зразків вимірювали за допомогою цифрового контактного термометра Hti HT-9815 з датчиком температури на термопарі типу К (хромель-алюмель) (Рис.2.2, а). Перед вимірюванням електропровідності температура зразків доводилася до кімнатної (приблизно 21 °С) і в межах одного експерименту підтримувалася з точністю до 0,2 °С. Температуру вимірювали безпосередньо перед вимірюванням електропровідності, але не одночасно, оскільки термопара, яка була в контакті з вмістом вимірювальної комірки, могла впливати на електропровідність цього зразка.

2.13 Визначення антибактеріальної активності іонів міді

При визначенні антибактеріальної активності досліджуваних субстанцій, зокрема й іонів міді, можна використовувати як метод дисків, так і метод колодязів. Оскільки при цих методах спостерігається різниця у швидкості дифузії антибактеріального матеріалу, у роботі застосовували обидва методи визначення антибактеріальної дії міді.

Як бактеріальні тест-культури використовували штами *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18. Ці штами мікроорганізмів були надані співробітниками Інституту мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова.

З метою приготування мікробної суспензії для досліджень використовували прилад Densi-La-Meter (виробництво PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Процес приготування суспензії проводили згідно з інструкцією, що додається до приладу, а також з інформаційним листом № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій» (м. Київ). Перед визначенням антибактеріальної активності міді проводили синхронізації штамів, для чого клітини витримували 24 години при температурі 4 °С. Наносили на 1 мл поживного середовища 10^7 клітин, що відповідало стандарту McFarland. В роботі використовували 18-24 годинну культуру мікроорганізмів. Мікроорганізми

вирощували на агаризованому середовищі Мюллера-Хінтона (виробництво - Індія, «Himedia Laboratories Pvt. Ltd India»).

При визначенні антибактеріальної активності міді використовували метод з двошаровим живильним середовищем. Культуральне середовище розливали в чашки Петрі діаметром 100 мм і висотою 15 мм. Нижній шар складався з так званого "голодного" середовища, що містить агар-агар, воду, та солі. На поверхні середовища встановлювали шість металевих циліндрів діаметром 8 мм і висотою 10 мм, після чого заливали верхній шар, що складався з поживного агаризованого середовища, розплавленого і охолодженого до температури $(40,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Верхній шар добре перемішували до утворення однорідної маси. Після застигання середовища, стерильним пінцетом видаляли циліндри, і в утворені лунки додавали досліджувані зразки в об'ємі 0,3 мл. Чашки Петри підсушували 30-40 хвилин за кімнатної температури в стерильних умовах, після чого зразки переносили в термостат и культивували протягом 18-24 години. Після завершення інкубації чашки Петри фотографували, і вимірювали діаметри зон інгібування росту мікроорганізмів, виражаючи як прийнято у міліметрах.

При оцінці антибактеріальної активності використані наступні критерії:

Відсутність зон затримки росту бактеріальних культур навколо лунки, а також зони затримки лише до 10 мм вказує на нечутливість мікроорганізму до препарату; зона затримки росту досягали діаметром 10-15 мм вказує на невелику чутливість мікроорганізму; зона затримки росту діаметром 15 - 25 мм вказує на середню чутливість мікроорганізму до випробовуваних субстанцій, і на решті якщо зона затримки росту досягала діаметру за 25 мм - це вказує на високу чутливість мікроорганізмів до випробуваної концентрації речовини.

При використанні методу дисків, на поверхню Чашок Петрі з агаром, засіяну відповідним мікроорганізмом, накладали диски діаметром 3 мм, попередньо змочені розчином випробовуваного зразка. Після культивування оцінювали зони затримку росту мікроорганізмів. Під час оцінювання антибактеріальної активності досліджуваних екстрактів та їхніх модифікацій застосовували такі критерії:

Відсутність зон затримки росту бактеріальних культур навколо паперового диску, а також зони затримки до 10 мм вказує на нечутливість мікроорганізму до внесеного в лунку препарату або концентрації антимікробної речовини; зони затримки росту діаметром 5-8 мм свідчить про невелику чутливість мікроорганізму до випробуваної концентрації антибіотичної речовини; зони затримки росту діаметром 9-14 мм вказує на середню чутливість мікроорганізму до випробовуваних субстанцій; зони затримки росту, діаметр яких є більшою за 15 мм вказує на високу чутливість мікроорганізмів до випробуваної концентрації речовини.

2.14 Статистичний аналіз даних

Отримані дані були аналізовані статистично за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA та непараметричного критерію Манна-Уїтні при ненормальному розподілі при невеликій (менше 30) кількості тварин в експериментальній групі. Використовувалося програмне забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Визначали середні значення та стандартні помилки вимірюваних величин. Значущі відмінності між контрольною та експериментальною групами були визнані при $P \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою [294, 295].

Висновок до розділу 2:

Охарактеризовано дизайн проведеного експериментального дослідження, включаючи опис моделей та етапів.

У розділі представлено застосовані схеми дослідження (Рис. 2.1), а також детальний опис цитогенетичних, мікроскопічних, біохімічних та статистичних методів дослідження, що використані у дисертаційній роботі для оцінки впливу компонентів молозива на біологічні системи (Рис. 2.3).

Методи дослідження



Рис. 2.3. Узагальнена схема основних методів дослідження.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Розробка «селективно-інтегративної» технології отримання біологічно-активних компонентів з молозива

3.1.1. Обґрунтування способів вирішення проблем нестабільності складу молозива

Як відомо, варіабельність і нестабільність складу одержуваних продуктів тваринного, рослинного або біотехнологічного походження, з одного боку, є природною властивістю біологічних систем, а з іншого - перешкодою в процесі отримання стандартних продуктів, у тому разі якщо ми використовуємо вже наявні способи контролю.

При аналізі біологічних основ варіабельності складу молозива та інших біотехнологічних продуктів і різноманіття індукованих біологічних ефектів необхідно виходити з того, що всі біологічні системи є відкритими системами, тобто вони безперервно перебудовують свій метаболізм відповідно до умов зовнішнього середовища, що постійно змінюються, і цю їхню фундаментальну властивість ми визначаємо як явище адаптації. Отже, здатність організму "відповідати вимогам" зовнішнього середовища, параметри якого надзвичайно варіабельні, є однією з базових властивостей живих систем, а це означає, що їхні метаболіти не можуть бути стабільними. Разом з тим, варіабельність біологічної продукції, зокрема й молозива, змінюється по-різному залежно від характеристик та особливостей зміни чинників середовища та індивідуальними особливостями відповіді на ці чинники середовища, через унікальність генетичної системи кожного організму. У цьому відношенні все різноманіття чинників зовнішнього середовища, які індукують будь-яку адаптивну відповідь організму, можуть бути кваліфіковані за природою свого походження на глобальні та локальні, а за характером адаптивної відповіді організму на рівні метаболізму - на чотири категорії (рис. 3.1): 1 - адаптивно незначущі (функціонально варіабельні), 2 - адаптивно значущі (такі, що формують епігенетичну та метаболічну пам'ять, 3 - хронічні і 4 - летальні (рис. 3.1).

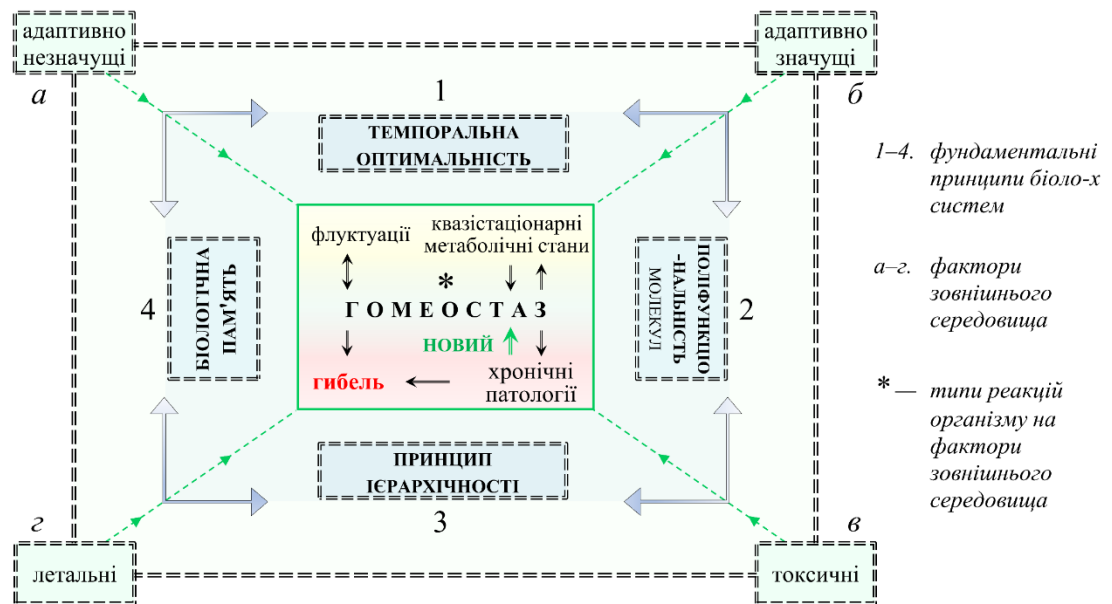


Рис. 3.1. Схема, що демонструє участь чотирьох базових принципів структурно-функціональної організації біосистем у формуванні єдиної системної відповіді на рівні гомеостазу на відгук на дію різноманітних факторів зовнішнього середовища; Все різноманіття екзогенних факторів, згідно з їх здатністю індукції різноманітних відповідей в організмі, може бути представлено у вигляді чотирьох умовних категорій: адаптивно не значущі (а), адаптивно значущі (б), токсикогенні (с) та летальні (д) (пунктирні зв'язки між цими категоріями факторів відображають широкий спектр можливих варіацій між ними); Сигнали екзогенних факторів трансформуються (показано зеленими пунктирними стрілками) на рівні структурно-функціональної організації біосистеми чотирма базовими принципами: темпоральною оптимальністю (1), багатфункціональністю біомолекул (2), ієрархічністю організації (3) та метаболічною пам'яттю (4), які функціонують як єдина система (показано кутовими стрілками) і забезпечують формування адаптивних відповідних реакцій на рівні гомеостатичної системи організму (позначено *) у вигляді чотирьох основних метаболічних проявів: флуктуації (короточасні відхилення від гомеостатичного рівня), квазі-стаціонарні метаболічні стани (формування нових гомеостатичних рівнів незначно відмінних від вихідних показників), хронічні патології, які можуть призводити до одужання-формування нових гомеостатичних характеристик, або до їх повної деградації систем гомеостазу — смерті).

Наші знання про особливості впливу глобальних факторів зовнішнього середовища, до яких відносяться зміни сонячної активності, комплексу астрофізичних факторів, магнітного поля Землі та інших, а також їх поєднань (комбінаторики) на структурно-функціональні характеристики біологічних систем, досліджені дуже фрагментарно. Це пояснюється кількома причинами: вони поки не піддаються повному аналізу, їх зміни не передбачувані, можливості дослідження їх впливу на біологічні системи дуже складні і не розроблені методи їх аналізу, а так як пояснити механізми їх дії з позицій сучасної біологічної парадигми дуже складно або неможливо, то вони практично не досліджуються.

Наприклад, результати досліджень отримання біологічно активних сполук, зокрема каротиноїдів у *Dunaliella viridis*. Відомо, що мікроводорості роду *Dunaliella* здатні за певних умов накопичувати у своїх клітинах достатньо велику кількість каротиноїдів, що є результатом адаптивної відповіді до існування в екстремальних умовах (висока солоність, підвищена температура та інше). При спробі розробити біотехнологію отримання каротиноїдів в культурі мікроводоростей ми стикалися з проблемою високого рівня варіабельності вмісту каротиноїдів та інших метаболітів (білків, ліпідів та нуклеїнових кислот), навіть при спробах жорсткої стандартизації умов культивування цих мікроводоростей. Так, виявилось, що культивування цих мікроводоростей за круглодобового освітлення, постійній температурі протягом року на одному і тому ж поживному середовищі, в одних і тих же культуральних сосудах у періодичному режимі культивування з пересадкою кожні 21 день росту, що проводив один і той же дослідник, протягом одного року, показали виражену та досить велику варіабельність у вмісті білків (рис. 3.2) та інших метаболітів. Встановили, що така варіабельність показників залежить від сонячної активності (рис. 3.2).

Поряд із глобальними факторами довкілля на функціональну активність біологічних систем, і зокрема, на кількісний та якісний склад молозива, суттєву роль відіграють і такі локальні чинники, тобто зовнішні чинники, що змінюються по-різному в різних плідників, як умови утримання, режим та особливості годівлі

тварин, мікробіологічне тло, особливості догляду, зокрема, ветеринарні втручання, та ін. [15].

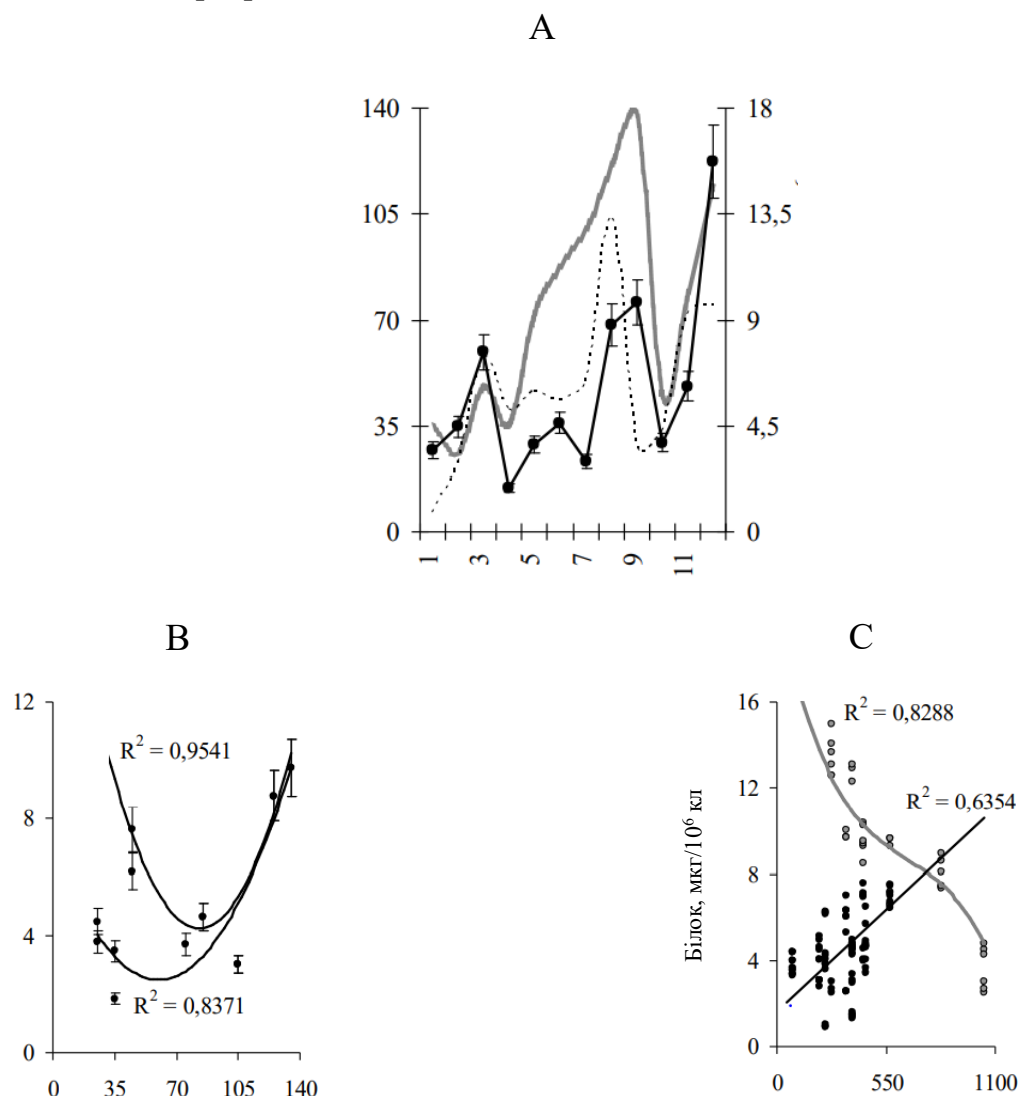


Рис. 3.2 А - накладення на річну динаміку кількості білка в клітинах *Dunaliella viridis* у різні місяці протягом року за культивування в «ідеальних» умовах та флуктуації числа Вольфа і площі сонячних плям S, Hemis, x10⁻⁶; В - кореляційна залежність між кількістю білка в клітинах у 21-денній культурі *Dunaliella viridis* у різні місяці року за культивування в «ідеальних» умовах культивування та флуктуації числа Вольфа і площі сонячних плям S, Hemis, x10⁻⁶ (С).

На варіабельність складу молозива величезний вплив мають індивідуальні генетичні, епігенетичні та онтогенетичні характеристики тварин. Як відомо,

еволюційний перехід до статевого розмноження забезпечив і можливості формування нескінченного розмаїття генетичних систем.

Важливо відзначити, що генетичне різноманіття біологічних систем збільшується і за рахунок епігенетичних механізмів "маркування" генома. Експериментально показано, що склад молозива залежить від віку тварини або кількості отелень, тобто і від онтогенетичних характеристик організму [15, 296].

Необхідно зазначити, що нині в біологічних дослідженнях використовується редукціоністська методологія, яка заснована на поділі складних систем на окремі елементи і подальше дослідження кожного з елементів, які складають єдину систему. З цією метою, експериментатором "формуються ідеальні умови", які спрямовані на усунення комплексного впливу чинників, що діють на біологічну систему, або спроба стандартизації умов функціонування організму, що, з одного боку, значно спрощує трактування одержуваних результатів, а з іншого - не враховує реальних умов біологічного розмаїття. Цілком зрозуміло, що такий редукціоністський підхід виправданий і досить ефективний при дослідженні таких складних, відкритих біологічних систем.

Водночас за такого методологічного підходу не враховується те, що організм і навколишнє середовище - це єдина, глобальна функціональна система, а особливості молекулярних характеристик організму, зокрема й молозива, є результатом взаємодії ендогенних і екзогенних чинників, тобто організм і середовище - це єдина система, що саморегулюється. Отже, при отриманні біотехнологічних продуктів необхідно використовувати не редукціоністську, а холістичну методологію, або, іншими словами, виходити не з одноманітності, а з різноманіття, або молекулярної унікальності біологічних індивідумів і одержуваних у них продуктів. На користь цього переконливо свідчать дані з дослідження складу молозива.

3.1.2. Розробка способу отримання: ліпідної фракції; казеїну; низькомолекулярних компонентів молозива та "ультрафільтрату" із молозива

Через те, що до складу молозива входять надзвичайно різноманітні сполуки, а відмінності в їх співвідношеннях у молозиві різних тварин різні, то це призводить до ще більшої різноманітності одержуваних біологічних ефектів від застосування незбираного молозива. Вважаємо, що поділ молозива на окремі фракції (базові компоненти), збагачені різними сполуками, може дати змогу: дещо зменшити варіабельність складу на відміну від незбираного молозива; одержувати не один, а кілька різноманітних за дією продуктів і дещо спростити способи стандартизації.

Як уже зазначалося молозиво є в'язкою маслянистою рідиною, в якій присутні у відносно великій кількості клітини різних типів, велика кількість ліпідів та високий вміст білків, що й надає йому таких фізико-хімічних властивостей. Розділити компоненти молозива на окремі фракції, зокрема й методом центрифугування, досить складне завдання.

Оскільки на склад молозива, як і інших біотехнологічних субстанцій, впливають широкий набір екзогенних і ендогенних чинників, то процес стандартизації може складатися з низки етапів. Для часткового усунення варіабельності складу на першому етапі необхідно провести добір (селекцію) зразків молозива за основними характеристиками, що впливають на склад молозива (рис. 3.3.).



Рис. 3.3. Схема, що демонструє принцип селективного відбору молозива, за якого відбирається молозиво у продуцентів однієї породи, близького віку, у

тварин без патологій, що утримуються в однакових умовах одного господарства, в один і той самий сезон, і лише після першого удою вони об'єднуються у єдину серію для подальшого перероблення.

На другому етапі, зразки молозива, які пройшли "селекцію" об'єднуються ("інтегруються") в одну серію. Їхня кількість має бути не менше 10, однак, чим більша їхня кількість, тим менша очікувана варіабельність. Надалі отримані субстанції документуються як представники єдиної серії готової продукції (рис. 3.3).

На наступному етапі, зразки єдиної серії піддаються поділу на окремі базові субстанції (рис. 3.4.).

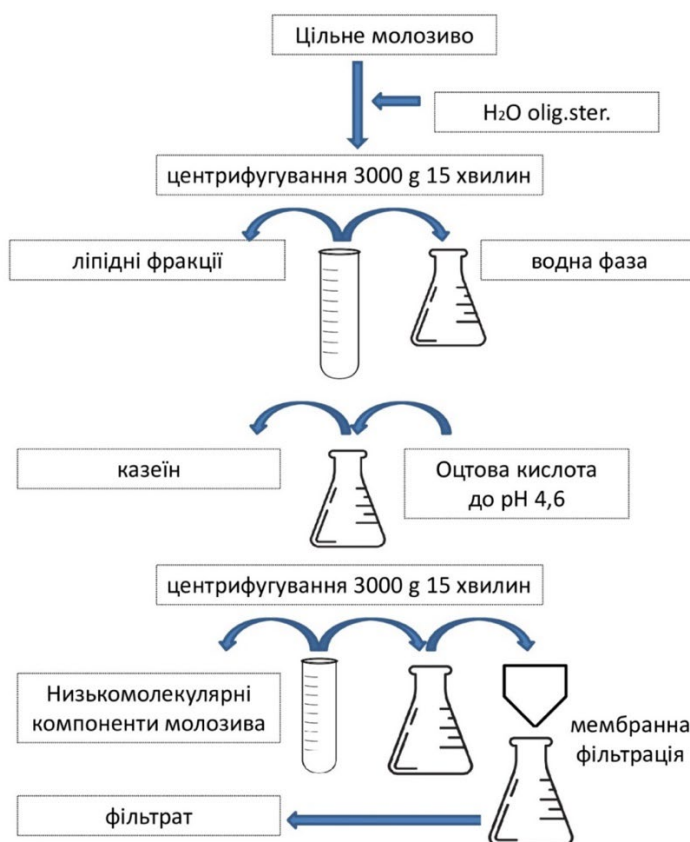


Рис. 3.4. Схема, що демонструє основні етапи розділення молозива методом центрифугування на основні базових компоненти молозива: ліпідну фракцію; казеїн; низькомолекулярні компоненти молозива та "ультрафільтрат".

Ми вважаємо, що поділ молозива на окремі, базові субстанції, може дозволити додатково зменшити варіабельність складу порівняно зі складом цільного молозива. За базові субстанції приймаємо субстанції, збагачені ліпідами, специфічними білками або групами білків подібних за молекулярними масами або властивостями, або іншими типами сполук (факторами росту, екзосомами та ін.).

Оптимальним способом розділення молозива на базові субстанції є поєднання методів центрифугування та мембранної фільтрації (ультрафільтрації). Регулюючи відцентрове прискорення та в'язкість молозива, можна розділити молозиво на такі базові фракції: ліпіди, казеїн, пост-казеїнову або фракцію відносно низькомолекулярних білків (НKM), яка може бути піддана подальшій процедурі поділу послідовною ультрафільтрацією з використанням фільтрів із різним діаметром пір (80, 60, 45, 22 мкм) та отримувати білкові компоненти з різними молекулярними масами (рис 3.4).

Такий підхід фракціонування молозива на базові субстанції може дати змогу; зменшити варіабельність за складом одержуваних компонентів: мати не один, а кілька продуктів, що розрізнятимуться за біологічною дією; базові субстанції можуть бути основою для подальшого фракціонування та одержання моноскладів.

3.1.3. Методика отримання біологічно активних компонентів із молозива

На етапі збирання або селекції, молозиво збирали у корів одного віку однієї породи ("Українська чорно-ряба") в одному фермерському господарстві "Альфа", що знаходиться в с. Одноробівка Золочівського району Харківської області України, у весняно-літній період, у яких не зафіксовано патологій і після першого надою. Воно являє собою в'язку, маслянисту рідину, в якій присутні клітини різних типів, велика кількість ліпідів і високий вміст білків, невелика кількість цукрів і залишкова кількість РНК, що й надає йому таких особливих фізико-хімічних властивостей. Відібрані зразки, які були отримані після першого надою, у корів одного віку, однієї породи, в одному господарстві та в один сезон, зберігали за температури -15 °C не більше 30 днів.

На другому етапі – «інтегративному», молозиво розморожували за повільного відтавання при кімнатній температурі, після чого всі зразки об'єднували в одну партію та піддавали центрифугуванню за 3000 g протягом 15 хв, після чого охолоджували їх до 6⁰С. За такого режиму центрифугування ліпідні компоненти флотували та формували щільний жировий шар на поверхні водної фази, який легко відділявся від рідкої фази. Клітини, які містилися в молозиві, переходили в осад. Для повноти відділення ліпідів центрифугування зразків повторювали за тих самих умов (рис. 3.4). Визначали вихід ліпідів за сирою масою в розрахунку на літр молозива.

Рідку, знежирену фракцію молозива переносили в чисту стерильну ємність, а осад клітин видаляли. Загальну кількість ліпідів визначали на аналітичних вагах. На наступному етапі, після знежирення, проводили відділення фракції казеїну. Для цього ємність зі знежиреним молозивом нагрівали до 32⁰С, додавали оцтову кислоту за постійного перемішування до досягнення рН-4,6, тобто до ізоелектричної точки для казеїну (рис.3.4.), далі доводили температуру зразків до 45 ⁰С, осад, казеїн осаджували центрифугуванням за 3 000 g протягом 15 хв. Визначали вихід казеїну за сирою речовиною в розрахунку на літр молозива. Отриманий казеїн залежно від способів його подальшого використання може бути ліофілізованим або збереженим у вологому стані за - 15 ⁰С до використання.

Постказеїнову фракцію – низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ), може бути використано як цільовий продукт. З цією метою її піддавали сушінню на ротаційному випаровувачі за температури 37 ⁰С та зберігали сухі зразки за температури 4-6 ⁰С до використання (рис.3.4.). Її також можна використати для одержання пептидів і низькомолекулярних компонентів молозива методом ультрафільтрації - ("ультрафільтрат"). Для цього, до сушіння рідку фракцію НКМ піддавали послідовній фільтрації через мембранні фільтри з діаметром пор 85→60→45→22 мкм, що дає змогу отримувати компоненти з різними молекулярними масами (рис.3.4.). Отриману фракцію низькомолекулярних компонентів молозива - "ультрафільтрат", піддавали сушінню за тих самих умов, що й постказеїнову фракцію.

Визначали вихід НКМ і "ультрафільтрату" за сухим залишком на літр молозива.

В експериментах із визначення впливу вихідної концентрації білка в розчині на ступінь осадження або додаткового осадження білка (співосадження) використовували розчин рослинних білків, що були отримані із соняшникового шроту сольовою екстракцією, як описано в роботі [297]. До розчину рослинних білків додатково вносили розчин білків, який було отримано з молозива – НКМ, до кінцевої концентрації 5,5 г/л. Для формування білкових агрегатів отримані розчини білків автоклаували протягом 30 хвилин за 1,5 атм. Агрегати білків збирали центрифугуванням за 3000 g упродовж 15 хвилин, висушували до постійної маси та визначали кількість білків, що осаджуються до та після внесення у вихідний розчин додаткових білків молозива.

Кількісне визначення білка і РНК в отриманих зразках здійснювали як описано в наших роботах раніше [13, 298], кількість вуглеводів [297, 299]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі UV-2600 (Shimadzu).

Для вивчення складу білків отриманих фракцій, готували проби так, щоб в 1 мл містилося по 2 мг білка кожної фракції. Мас-спектрометричні дослідження проводили на приладі Autoflex II LRF 20 "Bruker Daltonics" (Німеччина), оснащеному імпульсним азотним лазером ($\lambda=337$ нм, тривалість імпульсу - 3 нс). Зразки білків після змішування з матрицею, приготовленою за стандартною методикою: 12 мг синаптичної кислоти (Fluka) розчиняють в 1 мл суміші вода-ізопропаноловий спирт (1:2 за об'ємом) із додаванням 0,1 % трифтороцтової кислоти наносили на сталеву мішень і сушили за кімнатної температури. Аналіз проводили за лінійного режиму роботи приладу з детектуванням позитивних і негативних іонів. Результати аналізували з використанням відкритого програмного забезпечення ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net>) mMass (<http://mmass.org>).

3.1.4. Порівняльне дослідження аналізу «дифференціального» та «інтегративного» способів розділення молозива на фракції

Результати щодо фракціонування молозива подано в таблиці 3.1. Показано, що з 1 літра незбираного молозива першого надою, отриманого у весняний період у корів породи "Українська чорно-ряба", у середньому можна отримувати близько $147,1 \pm 27,9$ г ліпідів за сирою масою. Таку саму кількість казеїну можна отримати після видалення ліпідів із молозива, у вигляді щільного білого осаду ($140 \pm 9,9$ г за сирою масою, або 30-33 г сухій масі).

На фракцію НКМ, яка виходила після видалення казеїну, припадало теж $30 \pm 3,6$ г за сухою речовиною.

Таблиця 3.1

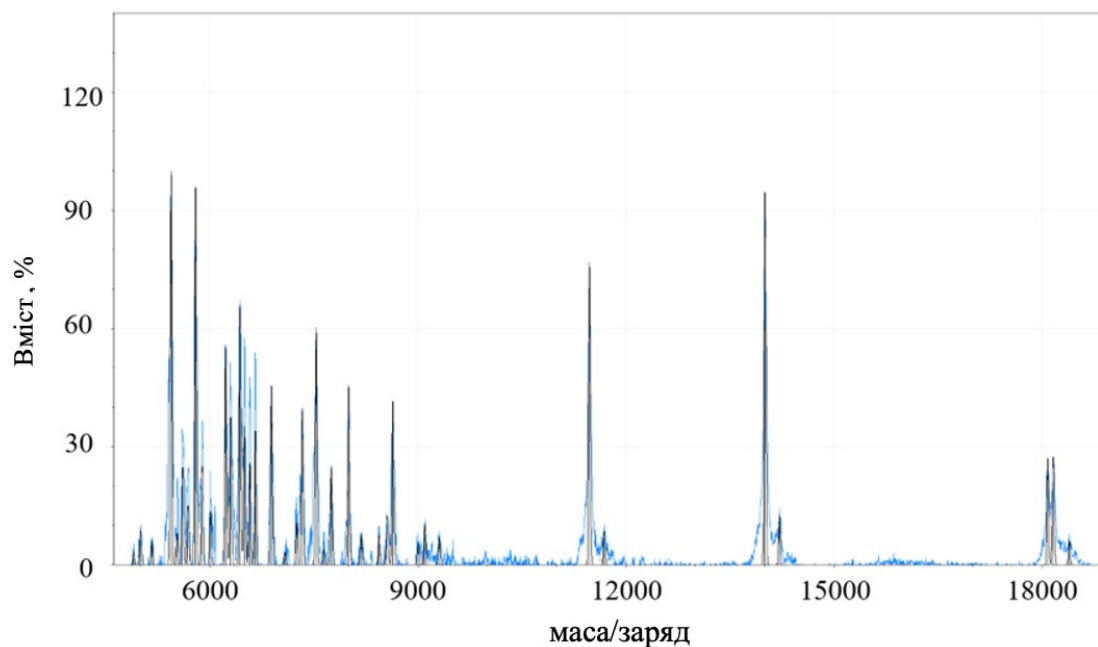
Вихід ліпідів, казеїну, НКМ, та "ультрафільтрату" (це речовини, які проходять через мембранний фільтр із діаметром пор $0,22$ мкм) з одного літра молозива.

Ліпіди, г сирої маси	Казеїн, г сирої маси	Пост-казеїн, г/за сухою речовиною	"Ультрафільтрат" НКМ, г за сухою речовиною
$147,1 \pm 27,9$	$140,0 \pm 9,9$	$30,0 \pm 3,6$	$19,1 \pm 3,1$

Примітка. Наведено середні дані, отримані з 6 зразків молозива від корів однієї породи в один сезон і після першого доїння, а також їхні стандартні помилки.

У цю фракцію входила досить велика кількість різноманітних білків із молекулярними масами від 5 і до 18 кДа (рис. 3.5 А). З 1 літра молозива можна отримати відносно велику кількість білків з молекулярною масою від 5 до 9,5 кДа ("ультрафільтрат"), до складу якого входять різноманітні фактори росту, амінокислоти та короткі пептиди (рис. 3.5 Б). Необхідно зазначити, що склад білків як у випадку НКМ, так і у випадку "ультрафільтрату", отриманих у різних корів, мав суттєві (індивідуальні) відмінності (рис. 3.5).

А



Б

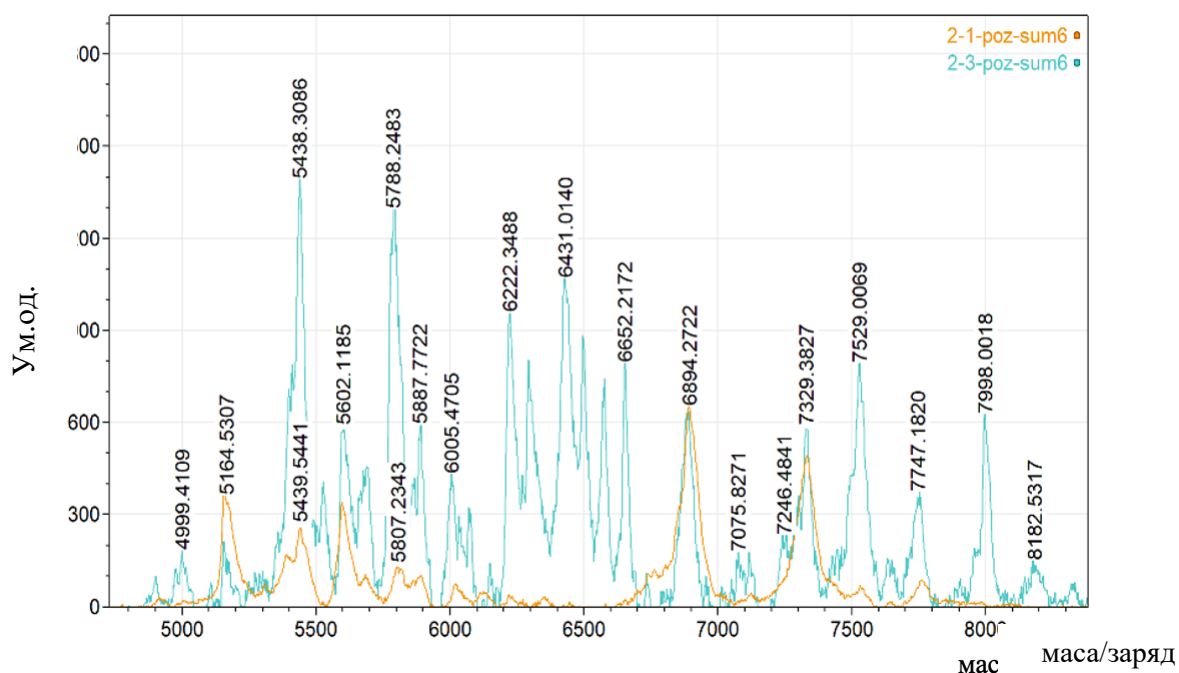


Рис. 3.5. Склад білків фракції НКМ (А) та "ультрафільтрату" (Б), за поділу методом мас-спектроскопії, отриманих від двох різних корів після першого надою однієї породи з схожими характеристиками, вони показані різними кольорами.

Отже, з молозива можна отримувати щонайменше чотири різні фракції речовин у відносно великих кількостях.

Однак поділ молозива на компоненти не дає змоги повною мірою усунути індивідуальну варіабельність складу одержуваних продуктів. Необхідно звернути увагу на те, що стандартні помилки, які відображають варіабельність показників, були різними для різних фракцій (табл. 3.1), найбільша варіабельність між зразками проявлялася для ліпідної фракції. Так, із 6 зразків молозива найменша кількість ліпідів становила 49 г/л., а найбільша - 225 г/л., тобто за кількістю ліпідів різні зразки молозива різнилися між собою в 4,5 рази (рис. 3.6).

При цьому, відмінності за вмістом казеїну в 6 досліджуваних зразках молозива були незначні і не перевищували 30% між різними зразками. Відмінності між зразками для НКМ і "ультрафільтрату" проявлялися ще меншою мірою, ніж для казеїну (рис. 3.6).

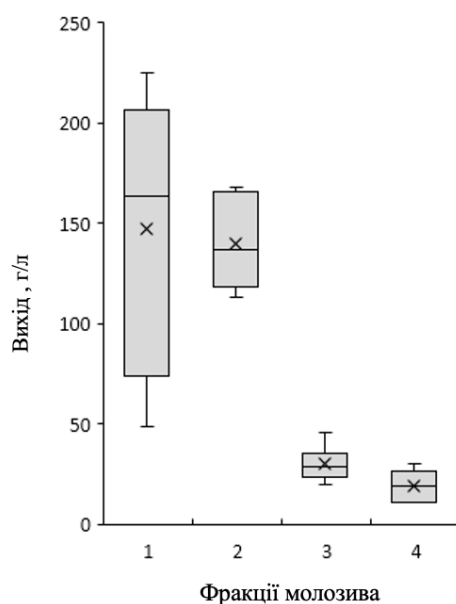


Рис. 3.6. Варіабельність вмісту різних фракцій компонентів молозива (ліпідів - 1, казеїну - 2 в г/л за сирою речовиною, НКМ - 3, та "ультрафільтрату" - 4 г/л за сухою речовиною), що були отримані з молозива першого надою від 6 корів породи " Українська чорно-ряба " у весняний період.

Отже, фракції, які отримували з різних зразків молозива, відрізнялися між собою за кількісною варіабельністю компонентів. Найбільша варіабельність виявлялася за кількістю ліпідів у зразках молозива. Це може пояснюватися кількома причинами. По-перше, ліпідний метаболізм регулюється унікальними

особливостями "взаємодій" генетичних, трофічних та екзогенних чинників, що призводитиме до вираженої індивідуальної варіабельності вмісту ліпідів у молозиві. По - друге, виділення жиру з розчинів під час центрифугування та/або сепарування з високим вмістом білків, як у випадку молозива, не дають змоги забезпечити їхнє ефективне (повне) розділення. Разом з тим, фракціонування молозива на базові компоненти дає змогу частково зменшити варіабельність принаймні для кількісних характеристик під час одержання НКМ та "ультрафільтрату".

Поряд із фракціонуванням молозива, що може бути визначено як "диференційний" спосіб отримання компонентів, ще одним способом у зменшенні варіабельності складу компонентів молозива може бути об'єднання молозива, отриманого від різних корів до його подальшого фракціонування, або умовно "інтегративний" спосіб отримання базових фракцій молозива. Ідея "інтегративного" підходу ґрунтується на тому, що ефективність розділення компонентів у центробіжному полі залежить не тільки від розміру молекул і їхньої густини, а й від концентрації компонентів, які розділяються, у вихідному розчині. Так, у розведених розчинах для досягнення термодинамічної рівноваги потрібне значно більше прискорення та/або часу центрифугування. У разі збільшення концентрації речовини, особливо в багатоконпонентних водних системах, яким є молозиво, швидкість досягнення рівноваги в системі буде досягатися швидше, що означає підвищення ефективності розділення.

На наступному етапі роботи, було здійснено розділення молозива на ті самі чотири базові субстанції після попереднього об'єднання зразків молозива. При цьому виходили з того, що в технології отримання різних субстанцій можна використовувати два підходи. У першому випадку різні зразки молозива поділяють на компоненти, а після цього об'єднують отримані фракції в одну серію, тобто "диференційний підхід". У другому випадку, різні зразки молозива об'єднують до фракціонування, тобто "інтегративний підхід".

Наведемо приклад ефективності "інтегративного" підходу при отриманні та стандартизації компонентів молозива порівняно з "диференціальним підходом".

Так, якщо з трьох різних зразків молозива можна отримати відповідно: 49,3; 82,2 і 167 г/л, а після об'єднання цих трьох зразків - 298,5 г за сировою речовиною (табл. 3.2) Якщо ж усі три зразки об'єднати до виділення ліпідів, то з тих самих трьох літрів молозива можна одержати 505,2 г ліпідів, або в 1,7 разів більше у випадку "інтегративного підходу" порівняно з "диференціальним" підходом.

Таблиця 3.2

Вихід ліпідів, казеїна, НКМ и "ультрафільтрата" з різних зразків молозива, при використанні «диференціального» та «інтегрального» підходів фракціонування молозива.

Компоненти молозива	Варіанти зразків			Вихід при «диференціаль ному» підході	Вихід при «інтегратив ному» підході
	1	2	3		
ліпіди	82,2	167,0	49,3	298,5	505,2
казеїн	168,1	113,0	165,0	446,1	492,0
НКМ	28,1	20,0	32,3	80,4	90,0
Ультра фільтрат	25,4	18,0	25,0	68,4	75,0

Якщо порівняти вихід казеїну, НКМ фракції з різних зразків молозива за "інтегративного" підходу з "диференціальним" підходом, то можна відмітити, що він був більшим на 10 та 12 % відповідно у разі використання "інтегративного підходу" (табл. 3.2).

Кількість "ультрафільтрату" за інтегрального підходу розділення теж була дещо більшою, на 6,6 г, або на 8,8%, порівняно з диференціальним методом (табл. 3.2).

Отже, при розділенні молозива на ліпідну, казеїнову та НКМ фракції методом центрифугування на основі "інтегративного" підходу, можна отримувати більший кількісний вихід порівняно з "диференціальним" підходом, і різниця між цими підходами залежить від відмінностей між вихідними зразками молозива. Чим більші відмінності між зразками компонентів, що виділяються (приклад - ліпідна фракція), тим вищий вихід цільового продукту за "інтегративного" підходу порівняно з "диференціальним" підходом.

Раніше було проведено серію експериментів щодо впливу НКМ на функціональні характеристики печінки з фіброзом і на культурі клітин кісткового мозку. Показано, що низькомолекулярні компоненти молозива можуть усувати деякі патологічні стани у таких тварин [13, 115]. У зв'язку з цим представляло інтерес визначити склад НКМ. Виявлено, що до складу НКМ входить близько 14,0 мг/мл білків, що становило 30% від загальної кількості білка цільного молозива. До складу фракції НКМ поряд із білками, які становили основну кількість, була присутня відносно невелика кількість вуглеводів (до 1,7 мг/мл). Необхідно зазначити, що у складі НКМ виявили і слідові кількості РНК - 1,8 мкг/мл (табл. 3.3), що є важливим критерієм при використанні цих компонентів як продуктів функціонального харчування.

Таблиця 3.3

Вміст загальних білків молозива при використанні "інтегративного" підходу та склад НКМ фракції.

Загальний білок, мг/мл	Склад компонентів НКМ		
	білок, мг/л	вуглеводи, мг/л	РНК, мкг/мл
46,2 ± 5,0	14,1 ± 1,8	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,8

Примітка. Наведено середні значення та їхні стандартні помилки з трьох незалежних експериментів.

Отже, склад НКМ представлений білками з різними молекулярними масами, від 5 і до 20 кДа, невеликою кількістю вуглеводів (що становили близько 12% від білків) та слідовими кількостями РНК. Такий неоднорідний склад НКМ може забезпечувати його поліфункціональність дії, яка була показана раніше [13, 300].

Менший вихід компонентів, що входять до складу "ультрафільтрату", вказує на принципові відмінності в методах розділення в гравітаційному полі та мембранною фільтрацією.

З метою додаткової експериментальної перевірки ефекту впливу концентрації білка на збільшення виходу кількості білка, що осаджується, що можна назвати методом співосадження, було проведено серію експериментів з осаження рослинних білків із додатковим внесенням у розчин НКМ. Для цього

рослинні білки осаджували шляхом термоагрегації за надлишкового тиску. Було виявлено, що при екстракції 200 г соняшникового шроту хлористим натрієм можна отримати від 6,6 до 7,3 г білка (за сухою речовиною), який формував білкові агрегати після термоагрегації, цей білок можна назвати ендегенним білком (табл. 3.4).

Таблиця 3. 4

Вплив додатково внесеного екзогенного білка молозива на загальну кількість білка, що осаджується, у варіантах із різним вмістом розчиненого ендегенного білка за використання методу термоагрегації.

Варіанти експерименту	Кількість ендегенного білку, г/л	Кількість екзогенного білку, г/л	Теоретично очікуваний вихід білку, г/л	Кількість експериментально отриманого білку, г/л
1	6,6± 0,8	5,5± 0,1	12,1	13,1± 0,5
2	7,3± 0,9	5,5± 0,2	12,8	16,7± 0,8

Примітка. Наведено середні значення з трьох експериментів та їхні стандартні помилки.

У тому разі, якщо в такий самий розчин ендегенних білків до термоагрегації вносили додатково по 5,5 г екзогенного білка молозива фракції НКМ, а після цього проводили осадження білка термоагрегацією, то загальний вихід білка був вірогідно більшим за суму цих білків (табл. 3.4).

Необхідно зазначити, що кількість соосаджуваного білка ("додаткове" осадження) після внесення екзогенного білка залежить від вихідної концентрації ендегенного білка в розчині. Так, якщо у вихідному розчині містилося 6,6 г білка за сухим залишком і до нього вносили додатково 5,5 г, то вихід загального (сумарного) білка становив не 12,1 г, як можна було очікувати, а 13,1 г за сухим залишком або на 8,3% більше простої суми (табл. 3.4). У тому разі, якщо у вихідному розчині містилося 7,3 г ендегенного білка і до цього розчину додатково вносили 5,5 г білка молозива, то вихід сумарної кількості білка був не 12,8 г, як можна було очікувати, а 16,7 г, або на 30% більшим за просту суму білків (табл. 3.4).

Отже, додаткове внесення білка молозива до розчину рослинних білків дає змогу збільшити кількість білків, що осаджуються, методом термоагрегації, а ефективність співосадження залежить від вихідної концентрації білка в розчині. При збільшенні концентрації білка у вихідному розчині збільшується соосадження білка. За такого підходу можна "збагатити" рослинні білки білками тваринного походження, що важливо під час отримання повноцінних за білковим складом композитів.

Отримані результати свідчать про те, що додаткове внесення білка до розчину сприяє формуванню додаткових білкових агрегатів, до складу яких входять і малі молекули білків, які в разі низьких концентрацій залишаються в розчині, тобто не переходять в осад. Ефекти співосадження білків мають місце як у полі центробіжного прискорення, так і під час осадження термоагрегацією.

Як відомо, отримання фармакологічних препаратів, вітамінів, білків, нуклеїнових кислот та інших біологічно активних субстанцій ґрунтується на їх екстракції, подальшому очищенні, характеристиці та консервації. Нині розроблено цілий арсенал методів розділення й очищення різноманітних сполук та їхніх комплексів із багатокomпонентних біотехнологічних субстанцій. Найширше застосування знаходять різноманітні методи хроматографії, центрифугування та мембранної фільтрації, а також їх поєднання [301].

Методи центрифугування знаходять найширше застосування тому, що вони: прості у виконанні, легко реалізуються, досить ефективні й дають змогу переробляти відносно великі кількості зразків. Це пояснюється тим, що цей спосіб дає змогу легко регулювати відцентрове прискорення в дуже широких межах, а швидкість осадження компонентів, що перебувають у розчині, залежить від геометричної форми частинок, їхньої густини, в'язкості розчину та прискорення сили тяжіння і може бути виражена узагальненою формулою Стокса:

$$v = \lambda \cdot \delta\rho \cdot g \cdot \omega^{2/3} \cdot \mu^{-1}, \quad (3.1)$$

де: $\delta\rho = \rho_a - \rho_{fs}$ – густина осаджених частинок і густина рідкої фази, μ – в'язкість водної фази, ω – об'єм частинок, λ – коефіцієнт форми, g – прискорення сили тяжіння.

Завдяки впливу широкого набору чинників на швидкість осадження частинок (молекул) у відцентровому полі ми маємо простий і ефективний спосіб розділення багатокомпонентних розчинів на різні фракції.

Важливо зазначити, що швидкість осадження частинок, зокрема й білків, які перебувають у розчинах, залежить від їхніх початкових концентрацій і здатності осаджуваних частинок формувати неспецифічні агрегати в суспензії та, як наслідок, збільшувати розміри частинок, що утворюються. Відомо, що білки здатні формувати як специфічні, так і не специфічні агрегати [302, 303]. Необхідно зазначити, що процес агрегації білків, який забезпечується за рахунок формування великої кількості водневих, електростатичних, гідрофобних взаємодій і Ван-дер-Вальсових сил, залежить від великої кількості різноманітних чинників і відіграє ключову роль у структурно-функціональній організації клітини. Нині розглядається питання про так звану нативну (внутрішньоклітинну) агрегацію білків [304]. Нативна агрегація білків є динамічним процесом і може розглядатися як перехід від "розгорнутого" до агрегованого стану і назад у розгорнутий стан. Перші дані про наявність нативних розгорнутих ділянок білків у клітині були отримані в 1978 р. [305].

Процес нативної агрегації білків може визначатися неоднорідністю структурної організації клітини, але ці механізми поки що тільки починають досліджуватися. Виявилося, що в еукаріотичній клітині від 35 до 51% білків перебувають у нативно-розгорнутому стані (протяжність розгорнутих ділянок може становити близько 50 амінокислотних залишків) [306].

У процесі виділення і переведення білків у розчин, більша частина білків переходить у розгорнутий стан, а це збільшує ймовірність неспецифічної агрегації білків. Цілком очевидно, що неспецифічна агрегація призводить до формування необоротних станів на відміну від специфічної агрегації, яка має місце в клітині.

Як відомо, великі агрегати в гравітаційному полі осідають з більшою швидкістю, ніж дрібні агрегати [307]. Оскільки до складу багатокомпонентних сумішей, зокрема й молозива, входять білки з різними характеристиками та молекулярними масами (рис. 3.7), то у центробіжному полі вони

переміщатимуться силовими полями з різними швидкостями. Великі білкові молекули, "стикаючись" у процесі руху з дрібними молекулами, формуватимуть неспецифічні агрегати й "укрупнюватимуться" в процесі осадження (рис. 3.7).

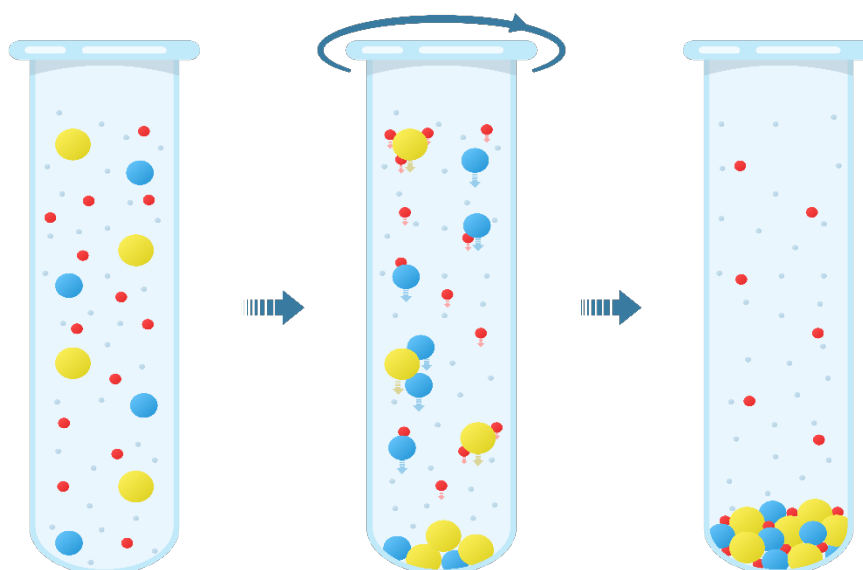


Рис. 3.7. Схема, яка демонструє процес формування білкових агрегатів між "великими" і "малими" молекулами у центробіжному полі (співосадження) за рахунок їхнього "захоплення" великими молекулами, завдяки різним швидкостям руху великих і малих молекул у відцентровому полі.

Процеси агрегації в розчині визначаються об'ємом молекул, молекулярною масою, їхньою концентрацією, температурою, в'язкістю та відцентровим прискоренням. Отже, чим більше великих молекул у заданому об'ємі, тим ефективніше вони формуватимуть агрегати, до складу яких входитимуть і відносно малі молекули, що забезпечить перехід в осад додаткових (малих) молекул, що не осідають у розбавлених розчинах, тобто співосадження.

Невелике збільшення кількості молекул, що входять до складу фільтрату (близько 8 %), можна пояснити тим, що за використання "інтегративного" методу поділу білкових молекул, залишкова концентрація молекул у розчині перед мембранною фільтрацією за рахунок ефективнішого їхнього осадження центрифугуванням, є меншою, ніж у разі "диференціального" методу, а це супроводжується меншим механічним утриманням низькомолекулярних сполук

на фільтрах, що також буде супроводжуватися збільшенням виходу білків, здатних проходити крізь фільтр.

Отже, селективно-інтегративний підхід при отриманні базових компонентів молозива дає змогу зменшити природну варіабельність за складом і збільшити кількісний вихід одержуваних субстанцій.

Висновок до розділу 3.1

У розділі проведено аналіз екзогенних та ендогенних причин, що лежать в основі біологічної варіабельності компонентів молозива та інших продуктів біотехнологічного походження. Обґрунтовано "селективно-інтегративну" технологію зменшення біологічної варіабельності молозива. Експериментально показано переваги "інтегративної" технології отримання цільових продуктів порівняно з "диференціальним" способом отримання білкових субстанцій з молозива. Показано залежність кількісного осадження методом центрифугування від концентрації білка в розчині та запропоновано спосіб співосадження, що дає змогу збільшити вихід білку в цільовому продукті під час фракціонування компонентів молозива. "Селективно-інтегративна" технологія дозволяє отримувати: ліпіди; казеїн; низькомолекулярні компоненти молозива та "ультрафільтрат", які можуть використовуватися в продуктах функціонального харчування та/або як субстанції для отримання фармацевтичних препаратів.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. **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. **SCOPUS (Q4)**. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. Goltvjansky, A., **Ivanov, I.** (2024). The "selective integrative" technology of obtaining biologically active components from bovine colostrum. *XI International scientific and practical conference «Innovative Solutions to Modern Scientific Challenges» (February 21-23, 2024 Zagreb, Croatia)*, 193-195. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису).

3. **Є. Г. Іванов** Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв : навчальний посібник / Є. Г. Іванов. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2024. – 100 с.

3.2. Дослідження фракції низькомолекулярних компонентів молозива як функціональних продуктів харчування.

3.2.1. Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на деякі фізіологічні та біохімічні характеристики організму при інтоксикації

Одним із пріоритетних напрямів біомедичних наук є розробка концепції функціонального харчування[13, 245, 296] Як зазначено у роботі [308], їжу можна вважати функціональною, якщо вона забезпечує сприятливий вплив на одну або кілька цільових функцій організму, крім забезпечення організму необхідними поживними речовинами. Отже, їжу можна розглядати як функціональне харчування, якщо вона забезпечує успішне підтримання здоров'я або знижує ризик виникнення патологічних станів. Традиційні продукти харчування можна перевести в категорію функціонального харчування, змінивши (збільшивши або зменшивши) компонентів, що входять до її складу, або включаючи до її складу додаткові компоненти, а також змінюючи біодоступність компонентів їжі. Поряд із цим, на прояви біологічних ефектів продуктів функціонального харчування впливатимуть і відсутність у їхньому складі потенційно токсичних сполук (консервантів, антибіотиків тощо), особливості дієти (доза, поєднання з іншими продуктами, інтервал і тривалість прийому) та, звісно, особливості функціонального стану організму (відсутність або наявність патологій та ін.). Цілком очевидно, що тільки на основі знань фундаментальних механізмів дії компонентів їжі на організм можна розробити єдину концепцію функціонального харчування. Необхідно зазначити, що дослідження особливостей впливу різноманітних продуктів харчування на організм пов'язане з методичними труднощами і насамперед з тим, що ми стикаємося з одночасним впливом не одного, а великої кількості різноманітних сполук, або точніше комбінації багатьох речовин. Цілком, очевидно, що досліджувати механізми дії поліфункціональних субстанцій надзвичайно складно і для цього необхідно розробляти нові методичні підходи.

Компоненти коров'ячого молозива можна розглядати як основу для розробки продуктів функціонального харчування, і це пояснюється надзвичайно

широким спектром речовин, що входять до складу молозива. Водночас необхідно зазначити, що під час використання незбираного молозива як харчового продукту, може мати місце і низка обмежень. По - перше, молозиво містить низку високомолекулярних білків, що мають алергічні властивості. По - друге, до складу молозива входять компоненти, які швидко розпадаються у звичайних умовах зберігання. По-третє, високий вміст біологічно активних сполук у продукті також може спричиняти небажані ефекти дії на метаболічні процеси в організмі. Вважаємо, що видалення високомолекулярних, потенційно алергенних сполук і отримання окремих фракцій із молозива може дозволити обійти ці обмеження. Виходячи з цього, з цільного молозива отриманого у Фермерському господарстві "Альфа", що розташоване в с. Одноробівка, Золочівського району Харківської області України, після першого та другого доїння в корів породи "Українська чорно-ряба" видаляли ліпідні компоненти та казеїн, а отриману фракцію, що була названа НКМ, піддавали ліофільному сушінню за температури 35°C та досліджували її дію на модельних тваринах (щури лінії *Wistar*).

Для оцінки можливості використовувати НКМ як продукт функціонального харчування використовували модель Су-індукованого токсикозу [13]. Як відомо, токсикоз - хворобливий стан, що зумовлений дією на організм надзвичайно різноманітних речовин як ендогенного (токсикоз вагітних), так і екзогенного (мікроорганізми, токсичні сполуки грибів або інших продуктів, хімічні сполуки та ін.) походження. Наслідки токсикозів можуть бути різними, проте в усіх випадках має місце порушення гомеостатичних характеристик і, як правило, це проявляється в порушенні функцій травної системи (проявляється у втраті маси тіла та зміні температури), детоксикаційних функцій (зміни функціональної активності печінки та нирок), перебудова нейро-імунної та гормональної систем.

Необхідно зазначити, що токсичні явища відбуваються значно частіше, ніж вони фіксуються, тому що вони можуть не проявлятися в гострій формі, однак, вони чинять значущі зміни на рівні метаболізму, і це може призводити до формування схильності до розвитку тих чи інших хронічних патологій. У зв'язку з цим їх купірування або усунення на початкових стадіях формування має

надзвичайно важливе значення і це завдання може бути вирішене продуктами функціонального харчування.

Виявили, що за Cu-індукованого токсикозу спостерігали гальмування швидкості росту і навіть зменшення маси тіла порівняно з контрольними тваринами на 4-6% (рис. 3.8 А), що підтверджує наявність токсикозу у тварин, яким вводили сірчаноокислу мідь.

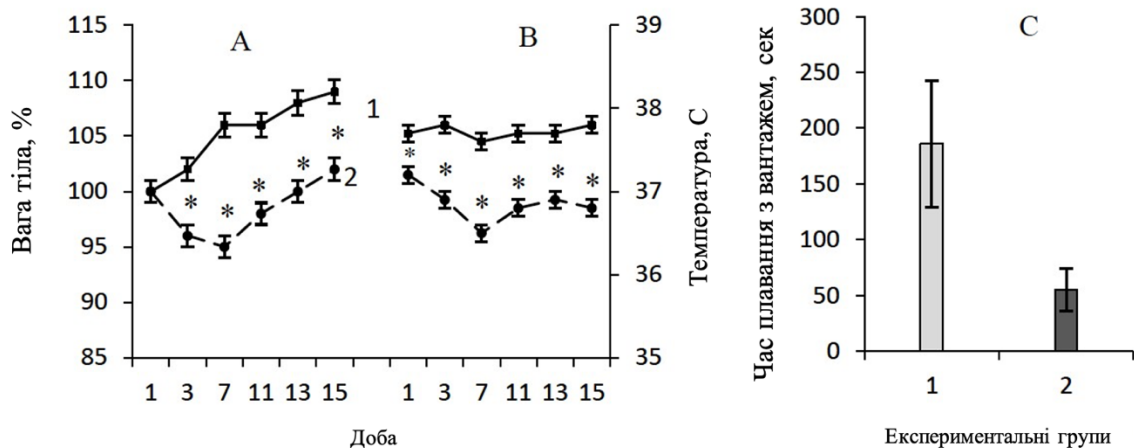


Рис. 3.8. Зміна маси тіла (А), ректальної температури тіла (В) і час плавання (С) в інтактній (контрольній) групі (1) і в групі тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю (2). Сірчаноокислу мідь вводили тричі в дозі 1 мг/100г маси з інтервалом 48 годин між введеннями. * - позначено варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Поряд із пригніченням росту маси тіла у тварин із Cu-індукованим токсикозом спостерігалось і зниження температури тіла (рис. 3.8 В). Так, якщо температура тіла інтактних тварин відповідала 37,6-37,8°C, то у тварин із токсикозом вона зменшувалася на 0,8-1,0 °C (рис. 3.8 В). Як правило, токсикоз супроводжується підвищенням температури тіла, таке відносно короткочасне зниження температури тіла може свідчити про виражене пригнічення метаболізму таких тварин, що пов'язано і зі зниженням або зупинкою росту маси тіла таких тварин.

Зниження температури тіла, пригнічення швидкості росту тварин із токсикозом супроводжувалося і втратою такими тваринами здатності виконувати фізичні навантаження (тест плавання з вантажем) (рис. 3.8 С).

Отже, токсикоз, спричинений іонами міді, супроводжувався вираженими фізіологічними змінами, що характерно і для інших способів інтоксикації організму. Ці ефекти можуть пояснюватися пригніченням і функції печінки як основного органу детоксикації токсичних сполук і регуляції загального метаболізму організму.

Виявили, що активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, які використовують як маркери цитолізу гепатоцитів, не відрізнялися від контрольних значень (рис. 3.9). Ці результати можуть свідчити про те, що іони міді за такої схеми введення не спричиняли масового руйнування гепатоцитів.

Кількість холестерину та креатиніну незначною мірою зменшувалася порівняно з контрольними тваринами, а вміст триацилгліцеридів та альбуміну не відрізнялися від контролю (рис.3.9).

Водночас активність гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) у тварин із токсикозом була збільшена на 263% порівняно з контролем (рис. 3.9). Визначення активності ГГТ у сироватці крові набуло великого значення в діагностиці захворювань печінки, а збільшення активності ГГТ у сироватці - чутливий показник і при захворюваннях гепатобіліарної системи (біохімічний маркер гемостазу).

Вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові таких тварин був збільшився на 37% (рис. 3.9). Таке збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій в організмі за інтоксикації, можливо, зумовлене інгібуванням антиоксидантних систем і, зокрема, антиоксидантних ферментів. Виявилося, що активність одного з ключових антиоксидантних ферментів - глутатіонпероксидази була достовірно знижена порівняно з контролем (рис. 3.9).

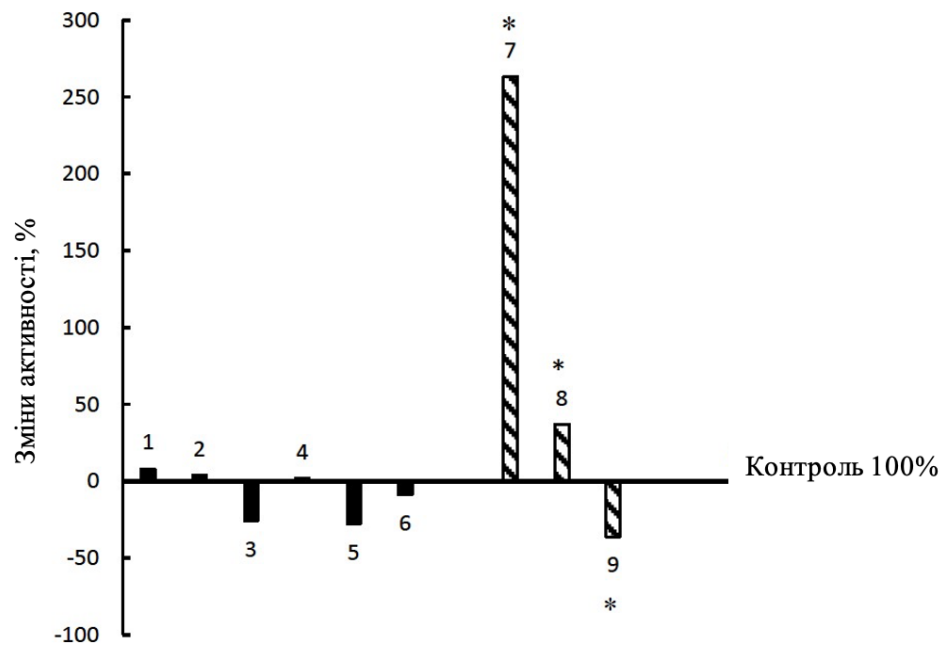


Рис. 3.9. Активність АЛТ (1), АСТ (2), вміст холестерину (3), триацилгліцериду (4), креатиніну (5), альбуміну (6), активність ГГТ (7), вміст гідропероксиду ліпідів (8) та активність глутатіонпіроксидрази (9) в сироватках крові тварин із Cu-індукованим токсикозом по відношенню до контрольного рівня, що прийнятий у всіх випадках за 100 %. * - позначено варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, Cu-індукований токсикоз супроводжувався проявом таких інтегральних фізіологічних характеристик організму, як зміна маси тіла, температури та втрата працездатності. Ці прояви зумовлені метаболічними перебудовами метаболізму і, зокрема, зміщенням рівноваги в системі "прооксиданти-антиоксиданти" в бік прооксидантів (прояв окисного стресу) та невеликими змінами функціональної активності печінки. Необхідно зазначити, що подібні зміни на рівні функціональних характеристик печінки відбуваються під впливом широкого спектра чинників: алкоголю, наркотичних засобів, харчових токсинів, лікарських препаратів, і в цьому сенсі Cu-індукований токсикоз може розглядатися як типова модель відповідної реакції організму на чужорідні сполуки.

У наступній серії експериментів визначали можливий вплив різних доз НКМ на можливе усунення прояву інтоксикації у тварин із Cu-індукованим токсикозом. Виявили, що якщо на тлі інтоксикації тварини одержували НКМ *per os* у дозі 0,01 мг/100г маси, то втрата маси тіла наставала пізніше, а після припинення дії токсиканту спостерігався інтенсивний ріст тварин і наприкінці експерименту (13-15 доба) ці тварини не відрізнялися від контрольної групи за цим показником та значно перевершували тварин із токсикозом (рис. 3.10 А). Температури тіла у тварин, які отримували НКМ у дозі 0,01 мг/100г, залишалися в межах природної флуктуації, незважаючи на інтоксикацію сірчаною кислотою міддю (рис. 3.10 В).

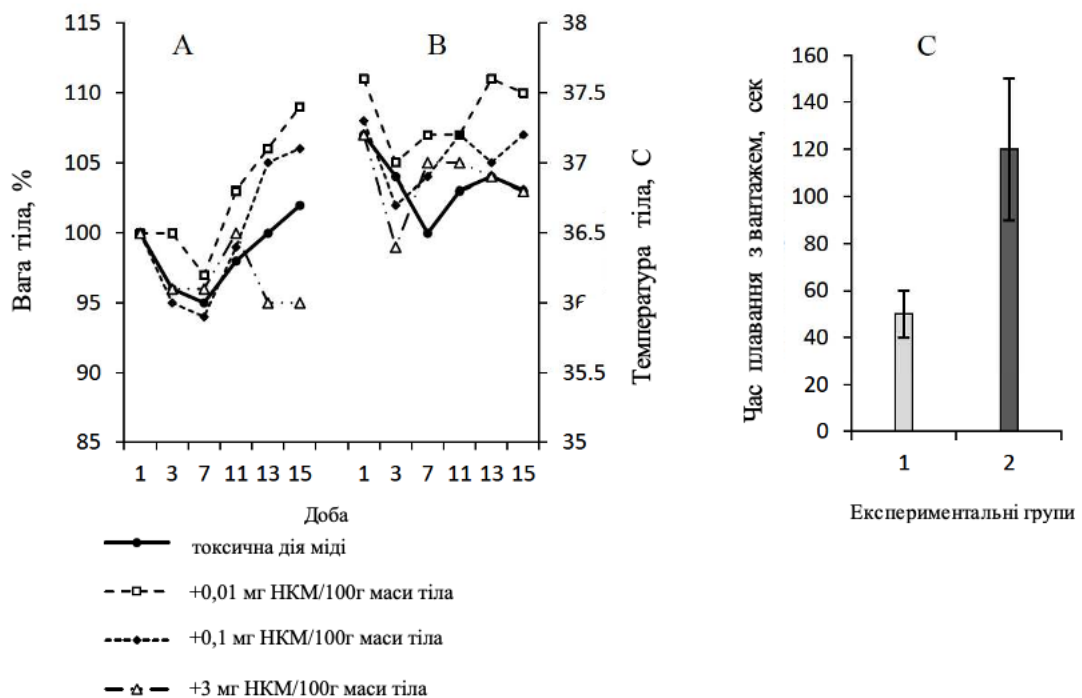


Рис. 3.10. Маса тіла (А), ректальна температура (В) і час плавання з вантажем (С) тварин із Cu-індукованим токсикозом (1), тварин, що отримували НКМ *per os* після початку інтоксикації в дозі 0,01 мг/100 г маси (2), у дозі 0,1 (3) і дозі 3 мг/100 г (3). * -зазначено відмінності між контрольним і дослідними варіантами, для яких $P \leq 0,05$

Отже, НКМ навіть у відносно малій дозі - 0,01 мг/100 г маси, якщо його ввели на початкових етапах інтоксикації, сприяв усуненню або швидкому

відновленню таких інтегральних показників, як температура тіла та ріст маси тіла, в експериментальних тварин із токсикозом.

Збільшення дози НКМ до 0,1 мг/100г супроводжувалося менш вираженим ефектом у підтримці температури та маси тіла, порівняно з малою дозою (рис. 3.10 А, В). Подальше збільшення дози до 3 мг/100г призводило навпаки до збільшення швидкості втрати маси тіла (рис. 3.10 А). Необхідно відзначити, що після завершення процесу інтоксикації у тварин на 7 день від початку експерименту спостерігалось відновлення росту, а в тому разі, якщо тварини на тлі інтоксикації отримували більшу дозу - 3 мг/100г НКМ, їхня маса тіла залишалася незмінною впродовж 15 днів експерименту (рис. 3.10).

Отримані результати вказують на те, що НКМ може виконувати функцію антидоту під час інтоксикації організму сірчаною кислотою та його ефективність залежить від дози, оптимальною є доза - 0,01 мг/100 г, а більші дози близько 3 мг/100 г можуть мати негативний ефект.

На користь цього висновку свідчать і результати щодо відновлення в експериментальних тварин здатності здійснювати роботу в тесті плавання з вантажем (рис. 3.10 С).

Відомо, що між зміною маси тіла, температурою, спрямованістю і швидкістю метаболізму існує прямий взаємозв'язок. Є експериментальні дані про те, що однією з "первинних" реакцій організму на дію негативних чинників середовища, які призводять до значущих відхилень від гомеостатичних характеристик, є зміни в редокс-системі організму [309]. Як було показано в цьому дослідженні, інтоксикація організму супроводжувалася зсувом рівноваги редокс-системи в бік прооксидантів, і це може бути регуляторним сигналом для перебудови всієї метаболічної системи, що й проявлялося у зміні інтегральних фізіологічних параметрів організму. Якщо це припущення має місце, то можна очікувати, що доза НКМ у 0,01 мг/100 г може забезпечити підтримання показників редокс-системи на рівні контрольних значень, і такий механізм може бути основою усунення негативних наслідків такого токсиканту як сірчана кислота мідь.

Для перевірки цієї гіпотези визначали показники прооксидантної системи (вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові) та антиоксидантної системи (активність глутатіонпероксидази в сироватці крові) у досліджуваних груп тварин.

Виявили, що вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові тварин на тлі інтоксикації збільшувався на 40-45 % порівняно з контрольними тваринами, а активність глутатіонпероксидази навпаки зменшувалася на 45-48 % (рис. 3.11).

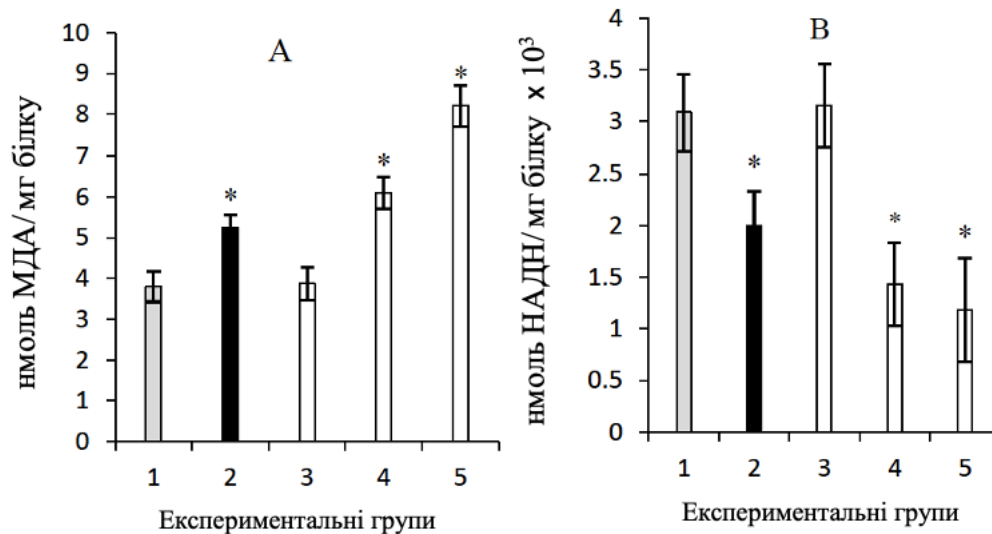


Рис. 3.11. Кількість гідроперекисів ліпідів (А) та активність глутатіонпіроксидази (В) у сироватці крові контрольній групі тварин (1), у тварин після інтоксикації сірчаною кислотою міддю (2), а також після триразового введення тваринам НКМ на тлі інтоксикації сірчаною кислотою міддю у дозі 0,1 мг/100 г (3), у дозі 0,5 мг/100 г (4) та 2,0 мг/100 г (5). У кожній експериментальній групі було по 5 тварин. відмічені відмінності між групами достовірні для яких $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Отже, інтоксикація організму сірчаною кислотою міддю супроводжувалася проявом окисного стресу на рівні організму і це проявлялося в інгібуванні активності одного з центральних ферментів антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази) і як наслідок збільшенням гідроперекисів ліпідів. Ці зміни показників редокс-системи корелювали зі зниженням температури тіла і втратою маси тіла.

У тому разі, якщо експериментальні тварини після інтоксикації щоденно впродовж 3 днів отримували НКМ *per os* у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла, то кількість гідроперекисів ліпідів не відрізнялася від їхньої кількості в інтактного контролю (рис. 3.11 А). Активність глутатіонпероксидази також відповідала контрольним значенням (рис. 3.11 В).

Якщо доза НКМ була збільшена в 5 разів і відповідала 0,5 мг/100 г маси тіла, то показники редокс-системи не змінювалися в порівнянні з тваринами, які отримували сірчанокислу мідь (рис. 3.11). При цьому зберігався взаємозв'язок між збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів і зниженням активності глутатіонпероксидази (рис. 3.11). Збільшення дози НКМ до 2,0 мг/100 г тіла, що призводило до збільшення токсичності, супроводжувалося збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів у сироватці крові на 56 % порівняно з тваринами із Су-індукованим токсикозом та на 215 % порівняно з інтактним контролем, що відбувалось на тлі вираженого зниження активності глутатіонпероксидази (рис. 3.11). Необхідно зазначити, що кількість холестерину, триацилгліцеридів, креатинін та альбумін у сироватці крові після введення тваринам з інтоксикацією різних доз НКМ залишилися незмінними, порівняно з тваринами, що були після інтоксикації.

Отже, в усуненні токсичного ефекту низькомолекулярними компонентами молозива бере участь одна з "еволюційно давніх" регуляторних систем - редокс-система організму, і це здійснюється завдяки нормалізації функціональної активності антиоксидантної системи, та як наслідок зменшення продуктів вільнорадикальних реакцій. Антитоксична дія НКМ залежить як мінімум від дози.

Додаткові дослідження дозової залежності НКМ на показники редокс-системи показали, що введення компонентів молозива в малих дозах (0,01-0,05 г/100 г маси тіла) приводило до зниження вмісту гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) у сироватці крові на 24-45 % порівняно з вихідним рівнем (рис. 3.12). Збільшення дози НКМ до 0,1 г/100 г маси тіла не впливало на кількість ГПЛ (рис.3.12). Додаткове збільшення дози НКМ у 10 разів, що відповідало 1 г/100 г,

супроводжувалося збільшенням кількості ГПЛ у сироватці тварин на 115 % від вихідного, контрольного рівня (рис. 3.12). У тому випадку, якщо експериментальні тварини отримували більшу дозу в 3 г/100 г, що супроводжувалося інгібуванням росту маси тіла та зниженням температури тіла в таких тварин, то вміст ГПЛ був збільшений у 2 рази порівняно з вихідним рівнем (рис. 3.12), що свідчить про прояв окислювального стресу.

Отримані результати переконливо свідчать, що великі дози НКМ (1-3г/100г, що відповідає 700-2000 г на дорослу людину) призводять до збільшення продуктів вільнорадикальних реакція. Отримані нами результати вказують на те, що це пов'язано з інгібуванням антиоксидантних систем в організмі.

Активність глутатіонпероксидази (ГП) у сироватці крові, що є одним із ключових ферментів антиоксидантного захисту організму, не змінювалася порівняно з початковим рівнем після введення експериментальним тваринам малих доз НКМ (0,01-0,05 мг/100 г), за дози 0,1 мг/100 г її активність збільшувалась порівняно з вихідним рівнем (рис. 3.12). Якщо тварини отримували більшу дозу НКМ (1 мг/100 г), то активність ГП у сироватці крові була знижена на 55-65% від вихідної, а при подальшому збільшенні дози НКМ до 3 мг/100 г вона залишалась на такому ж низькому рівні (рис.3.12).

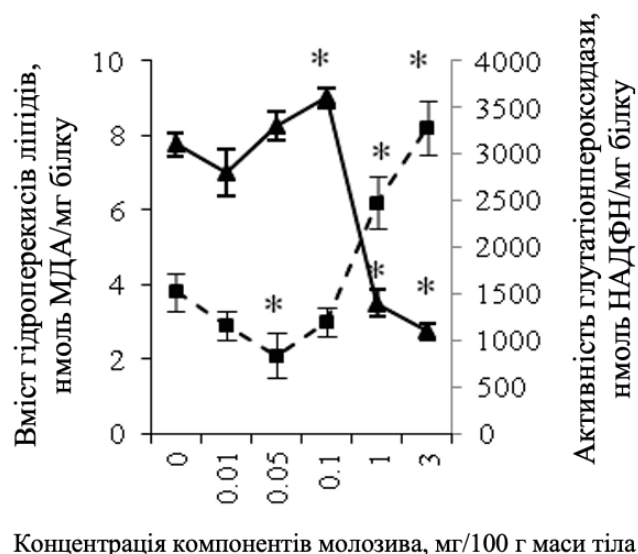


Рис. 3.12. Вміст гідроперексидів ліпідів (---) та активність глутатіонпероксидази (—) у сироватці крові тварин, контрольної групи (0), та експериментальних груп тварин, через 24 години після приймання компонентів

молозива в різних дозах (0,01, 0,05, 0,1, 1,0 і 3,0 мг/100 г). Наведено середні значення з 5 експериментів і стандартні помилки, відмінності між варіантами аналізували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні.

* позначено варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Отже, у малих дозах до 0,1 мг/100г маси тіла НКМ проявляє антиоксидантні властивості, тоді як у разі збільшення дози до 1 і більше г/100 г проявляє прооксидантні властивості.

Як відомо, редокс-система є найзагальнішою, еволюційною, найдавнішою, у тому сенсі, що вона виконує системні регуляторні функції у всіх відомих організмів. Зміна її параметрів чинитиме системний регуляторний вплив на всі або більшу частину функціональних систем організму. У цьому відношенні великий інтерес представляє вплив компонентів молозива на функції клітин кісткового мозку, як продуцента імунокомпетентних клітин, еритроцитів і тромбоцитів. На наступному етапі роботи визначали вплив різних доз НКМ на деякі показники функціональної активності кісткового мозку на тлі інтоксикації організму.

3.2.2. Дослідження низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники функціональної активності кісткового мозку при інтоксикації організму

Дослідження можливих механізмів дії молозива на організм показали, що компоненти молозива мають виражену поліфункціональну дію [310]. Можна припустити, що такий широкий спектр дії молозива на різні системи організму пояснюється тим, що компоненти молозива модулюють окисно-відновлювальну систему організму, яка є основним або базовим рівнем регуляції функцій біологічних систем [82, 274].

Змінюючи співвідношення в системі прооксиданти-антиоксиданти компонентами молозива, забезпечують системну регуляцію всіх функціональних систем організму, тобто має місце ієрархічна система регуляції обміну речовин. Саме цим може пояснюватися давно встановлений факт наявності кореляцій між окислювальним стресом і практично всіма відомими патологіями [311].

Особливий інтерес у цьому відношенні представляє дія компонентів молозива на функції кісткового мозку шляхом змін показників редокс-системи організму. Не можна виключати і прямої дії різноманітних факторів росту, що містяться в молозиві, на функціональні особливості кісткового мозку. Оскільки кістковий мозок продукує імунокомпетентні клітини, клітини крові (еритроцити та тромбоцити) та в ньому локалізовано пул стовбурових клітин, що здатні до спрямованої міграції та забезпечують клітинний рівень регуляції в організмі [312], то знання впливу молозива на функціональні характеристики кісткового мозку є важливим етапом у дослідженні поліфункціональності біологічно активних субстанцій.

При розгляді системного рівня регуляції компонентами молозива, що проявляється як поліфункціональність, необхідно враховувати їхній вплив на мікробіом кишківника та функціональні характеристики травної системи в цілому.

На першому етапі дослідження визначали вплив різних доз НКМ на клітинність - загальну кількість клітин у кістковому мозку. Установили, що одноразове введення НКМ у дозах від 0,01 до 3 мг/100 г маси не впливало на загальну кількість клітин у кістковому мозку за добу після введення (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Кількість в кістковому мозку (2×10^6 клітин/мл) у інтактних тварин та через 24 години після введення *per os* НКМ в різних дозах (мг/100г маси тіла)

Дози НКМ	Кількість клітин
0,0 (контроль)	14,3 $\pm$ 2,3
0,01	12,3 $\pm$ 1,7
0,1	20,3 $\pm$ 4,7
1,0	17,5 $\pm$ 1,5
3,0	14,5 $\pm$ 1,7

Оскільки зміна кількості клітин у кістковому мозку залежить від співвідношення між швидкістю утворення клітин і швидкістю їхнього транспорту в кровотік, то можна вважати, що кількісні характеристики кісткового мозку

зберігаються на тлі введення НКМ. Водночас не можна виключати того, що на тлі дії компонентів молозива не відбуваються якісні зміни в клітинах кісткового мозку.

Як відомо, всі типи клітин крові утворюються в кістковому мозку з мезенхімальних стовбурових клітин і в кістковому мозку вони перебувають на різних стадіях диференціювання, тому, оскільки ідентифікувати всі ці типи клітин є досить складним завданням, то в наступній серії експериментів визначали співвідношення між морфологічно ідентифікованими типами клітин та типом клітин, які не ідентифікують, тобто тими, які важко однозначно віднести до відомих типів клітин. До морфологічно ідентифікованих типів клітин ми віднесли: паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли, мієлоцити, метамієлоцити, лімфоцити, еозинофіли, базофіли, моноцити, до неідентифікованих типів віднесли мезенхімальні стовбурові клітини, клітини на різних стадіях диференціювання.

Виявилося, що загальна кількість ідентифікованих морфологічних типів (морфотипів) клітин в інтактних тварин становила 50-60% (рис. 3.13).



Рис.3.13. Загальна кількість морфологічно ідентифікованих типів клітин (паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, метамієлоцити, мієлоцити, лімфоцити, базофіли, нейтрофіли, еозинофіли, моноцити) у кістковому мозку контрольної групи тварин (на осі позначена як 0) та у тварин за 24 години після однократного введення їм *per os* НКМ у різних дозах та відповідно

морфологічно неідентифіковані типи клітини в кістковому мозку. Наведено середні значення з 5 незалежних експериментів.

Введення експериментальним тваринам компонентів молозива *per os* у дозах 0,01 і 0,1 мг/100 г маси тіла не вплинуло на загальну кількість морфологічно ідентифікованих типів клітин у кістковому мозку (рис. 3.13). Однак після введення НКМ у більших дозах -1-3 мг/100 г, у кістковому мозку були присутні лише 7-11% морфологічно ідентифікованих типи клітин, а близько 90% клітин морфологічно не ідентифікувалися (рис. 3.13).

Визначення співвідношень між ідентифікованими типами клітин у кістковому мозку інтактних контрольних тварин показало, що найчисельнішими клітинами були паличкоядерні нейтрофіли - близько 16% від суми загальної кількості клітин кісткового мозку, на метамієлоцити припадало близько 10%, на лімфоцити - 7%, на еозинофіли - близько 3%, базофіли - 0,6%, на мієлоцити - близько 10%, на базофіли - близько 3%, на базофіли - 0,6%, на лімфоцити - близько 3%, на мієлоцити - близько 3%, на базофіли - близько 3%, на мієлоцити - близько 10%, на базофіли - 0,6%, на базофіли - близько 3% (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Кількість ідентифікованих морфологічних типів клітин, у відсотках від загальної кількості клітин у кістковому мозку, що прийняті за 100%, у кістковому мозку контрольної групи тварин і у тварин через 24 години після прийому компонентів молозива *per os* у дозах 0,01, 0,1, 1,0 і 5,0 мг/100 г маси тіла: паличкоядерних нейтрофілів (ПН), метамієлоцитів (МТ), лімфоцитів (Л), сегментовано-ядерних нейтрофілів (СН), мієлоцитів базофілів (МБ), еозинофілів (Е), базофілів (Б) і моноцитів (М).

Експериментальні групи	Типи клітин, %							
	ПН	МТ	Л	СН	МБ	Е	Б	М
контроль	16.3	10.8	7	8.8	4.3	3.5	0.6	0.5
0,01	14.3	9.7	6.7	8.0	3.7	2.3	0.4	0.5
0,1	13.3	7.8	7.7	8.0	3.3	6.3	0.4	0.3
1.0	0	0	0	0	0	4.0	0	0
5.0	0	0	0	0	0	7.3	0	0

Як відомо, паличкаядерні - це остаточно не диференційовані клітини, тобто не зріла форма нейтрофілів, на відміну від сегментоядерних нейтрофілів, які є остаточно диференційованими, тобто зрілою формою нейтрофілів. Нейтрофіли - найбільш численна група лейкоцитів у крові, на їхню частку припадає понад 40% усіх лейкоцитів. У кістковому мозку інтактних контрольних щурів виявляли понад 25% від усіх типів клітин кісткового мозку або 48% від морфологічно ідентифікованих типів клітин кісткового мозку. Нейтрофіли виконують функції вродженого імунітету і здатні здійснювати фагоцитоз як продуктів розпаду тканин, так і мікроорганізмів. Вони здатні до активного руху (хемотаксису) за градієнтом різноманітних прозапальних молекул у вогнище запалення і проникати через стінки кровоносних судин. У кровотоці перебуває невелика кількість нейтрофілів, оскільки вони досить швидко проникають у різні тканини, де виконують функції фагоцитів. Тривалість життя неактивованих нейтрофілів у кровотоці становить від 5 до 135 годин [313].

У тому випадку, якщо тваринам вводили НКМ у дозі 0,01 мг/100г, то співвідношення між різними типами ідентифікованих клітин залишалося практично незмінним. Однак за дози 0,1 мг/100 г спостерігали невелике зменшення кількості паличкаядерних нейтрофілів (на 20%), метамієлоцитів (28%) і збільшення еозинофілів (80%) (табл. 6). Такі зміни у співвідношеннях диференційованих клітин у кістковому мозку на тлі введення НКМ можуть пояснюватися тим, що відбувалося як збільшення швидкості транспорту в кровообіг, так і зміна у швидкості утворення різних типів клітин у кістковому мозку. Відомо, що в кровотоці виявляється від 1 до 5% паличкаядерних (незрілих) нейтрофілів. Можна припускати, що в екстремальних умовах процес транспорту незрілих клітин може ускорюватись.

Після введення експериментальним тваринам великих доз НКМ - 1-3мг/100г маси, у кістковому мозку були присутні тільки морфологічно не диференційовані клітини та еозинофіли. За дози 3 мг/100 г спостерігали збільшення еозинофілів у кістковому мозку на 108 % порівняно з контролем (табл.3. 6).

Еозинофіли - належать до лейкоцитів і мають досить великі розміри (від 18 до 20 мкм у діаметрі). Після переходу з кісткового мозку в кров вони досить швидко переміщуються до тканин, де можуть функціонувати відносно довго до 10-12 діб. Серед різноманітних функцій найбільш вивчена і, ймовірно, основна для еозинофілів - руйнування багатоклітинних паразитів (гельмінтів тощо) завдяки цитотоксичності низки білків, що формують специфічні гранули в клітинах еозинофілів. Поряд з цим, такі білки як MBP, ECP і EPO виявляють токсичність щодо клітин самого організму. Зокрема, MBP може викликати дегрануляцію базофілів і опасистих клітин, а MCP здатний пригнічувати проліферацію Т-клітин та ін. [314].

Збільшення кількості еозинофілів у крові або еозинофелія є патологічним станом.

Отримані результати свідчать про те, що за великих доз НКМ (1 мг/100 г і більше) у кістковому мозку значно знижується кількість диференційованих клітин і він збагачується незрілими формами клітин, при цьому має місце збільшення кількості еозинофілів. Можна припустити, що в разі зміщення рівноваги в сироватці крові в бік прооксидантів може відбуватися активний викид диференційованих і остаточно не диференційованих клітин у кровообіг і гальмування та/або зміна спрямованості диференціювання клітин (збільшення швидкості утворення еозинофілів і зменшення утворення інших типів клітин). Не можна виключати й того, що на тлі дії високих доз компонентів молозива можуть утворюватися імунокомпетентні клітини з функціонально зміненими властивостями.

Це може пояснюватися тим, що клітинні ніші в кістковому мозку являють собою функціональні компартменти, які регулюють поведінку гемопоетичних стовбурових клітин [315]. На характеристики клітинних ніш впливають оксигенація, характер інервації та особливості редокс-системи, співвідношення між різноманітними факторами росту та низка інших чинників. Великі дози НКМ, які зміщують рівновагу в бік прооксидантів, можуть впливати на характеристики

клітинних ніш кісткового мозку, що може впливати на клітинні взаємодії в ніші, змінюючи спрямованість диференціювання (виробництво різних типів клітин).

Цікаві дослідження, які були проведені Грассіджером зі співавторами [316], показали, що фенотипічно однотипні клітини, виділені з різних ділянок (різних ніш) кісткового мозку, володіють різним біологічним потенціалом і можуть проявляти дещо різні функціональні властивості. Це вказує на те, що близькі або однотипні в морфологічному відношенні клітини можуть проявляти різні функціональні характеристики. Можна припустити, що клітини, які утворюються в умовах високих доз НКМ, можуть мати і різний біологічний потенціал. З метою перевірки цього важливого положення в наступній серії експериментів визначали здатність клітин кісткового мозку, отриманих у експериментальних тварин, яким вводили різні дози НКМ проліферувати в культурі клітин.

Так як, клітини, які були отримані у різних тварин (контрольні та дослідні) культивувалися в однакових умовах (сліду DMEM з 10% телячою сироваткою) та у всіх випадках початкова концентрація клітин була однаковою та становила 2 млн/мл, то відмінності у швидкості проліферації цих клітин можуть дозволити стверджувати, що клітини, які були отримані у різних тварин, розрізняються за функціональними характеристиками.

Було виявлено, що клітини кісткового мозку, отримані в контрольній групі тварин, активно росли в системі *in vitro*, що відповідає наявним даним. Так, через добу кількість клітин у системі *in vitro* збільшувалася більш ніж у 2 рази від початкової кількості, надалі швидкість росту лінійно збільшувалася і на третю добу культура досягала стаціонарного рівня (рис. 3.14). При досягненні стаціонарної фази росту кількість клітин у культурі була збільшена втричі порівняно з початковою концентрацією клітин (рис.3.14).

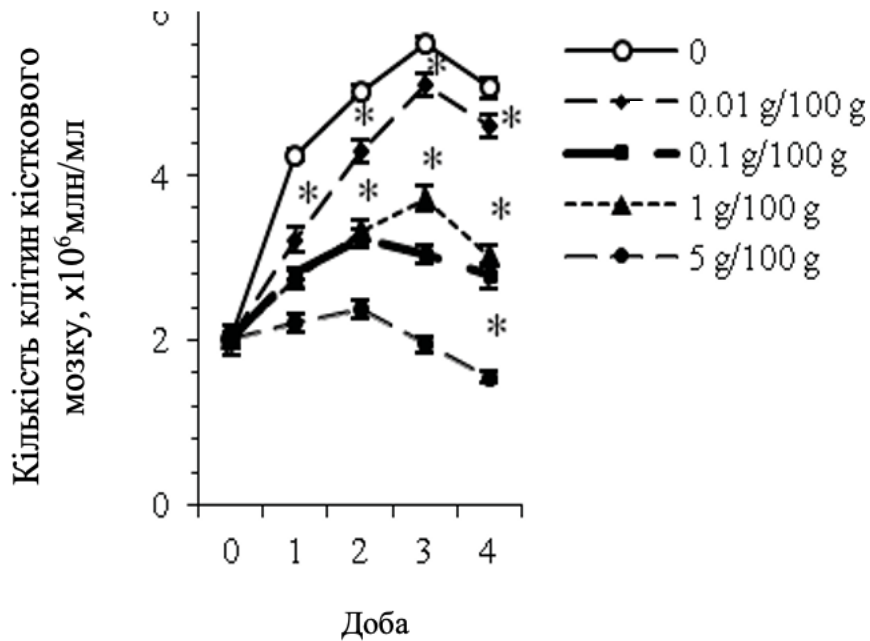


Рис. 3.14. Кількість клітин кісткового мозку в первинній культурі з 1 до 4 доби культивування на середовищі DMEM з 10 % телячою сироваткою. Клітини для культивування отримували у тварин контрольної групи та чотирьох експериментальних груп тварин, які отримували за 24 години до виділення клітин різні дози НКМ: 0,01; 0,1; 1 і 5 мг/100 г маси тіла. Представлено середні значення і стандартні помилки з трьох незалежних експериментів. Відмінності між зразками аналізували з використанням непараметричного U-критерію Манна - Уїтні. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контрольним варіантом.

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку виділяли у тварин, яким вводили НКМ навіть у найменшій дозі - 0,01 мг/100 г маси тіла, то динаміка росту клітинної культури не відрізнялася за характером від контролю, водночас кількість клітин достовірно була меншою (на 25-10%) порівняно з такою клітинною культурою, отриманою в контрольних тварин (рис. 3.14). Отже, швидкість проліферації клітин навіть на тлі низьких концентрацій НКМ була дещо знижена порівняно з контролем, при цьому співвідношення між різними типами клітин залишалося таким самим, як і в контролі (табл. 3.6).

Збільшення дози НКМ до 0,1 мг/100г, яку отримували тварини, призводило до значного гальмування швидкості росту клітинних культур кісткового мозку, і такий самий ефект справляла доза - 1 мг/100г (рис.3.14).

При введенні тваринам дози в 3 мг/100г клітинна культура не зростала, а після 2 діб кількість клітин у культурі зменшувалася, тобто мало місце скорочення "часу життя" клітин кісткового мозку в системі *in vitro* (рис. 3.14).

Отже, введення експериментальним тваринам НКМ *per os* чинить різний вплив на клітинний склад кісткового мозку, а клітини кісткового мозку розрізняються за здатністю до проліферації в культурі. Між зміною проліферативної активності клітин і дозою введеного тваринам НКМ немає прямої залежності.

Отримані результати дають змогу зробити висновок, що клітини, які утворюються в кістковому мозку на тлі дії компонентів молозива, відрізняються від клітин контрольних тварин за своїми функціональними характеристиками навіть у межах одних і тих самих морфотипів.

Відомо, що імунокомпетентні клітини мають відносно коротку "тривалість життя". Поряд із проліферативною активністю "тривалість життя" клітин у культурі є важливою функціональною характеристикою. У наступній серії експериментів визначали "тривалість життя" еозинофілів кісткового мозку в системі *in vitro*.

Було виявлено, що якщо еозинофіли було отримано у тварин контрольної групи, то через 48 годин культивування в середовищі ДМЕМ із 10% телячої сироватки їхня кількість зменшилася на 27% від початкової кількості, а через 96 годин культивування в середовищі були наявні тільки 5% клітин (рис. 3.15).

Отже, кількість еозинофілів, отриманих у контрольних тварин і переведених у культуру, відносно повільно зменшувалася протягом 48 годин, а надалі їхня кількість різко скоротилася, і їхня "тривалість життя" становила не більше ніж 96-100 годин у системі *in vitro*.

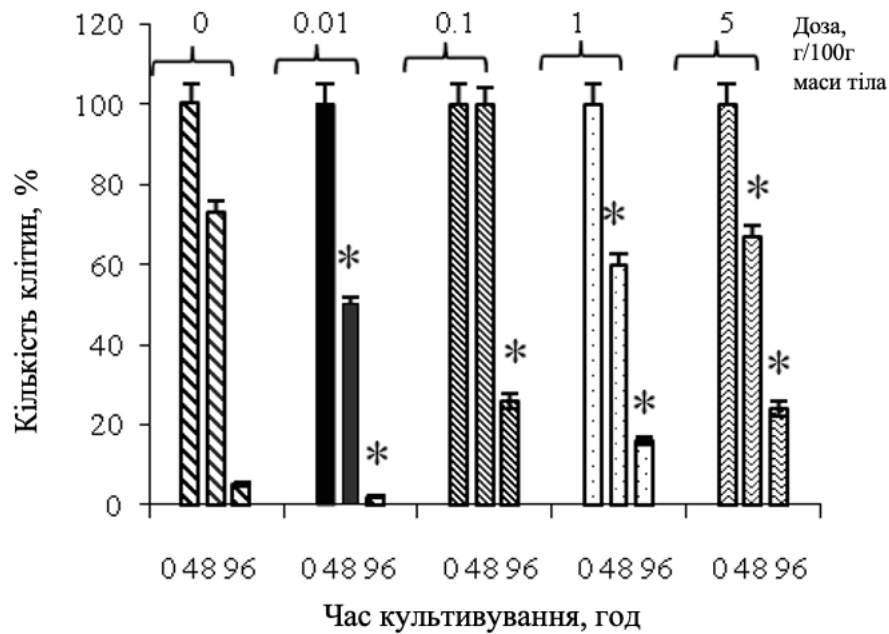


Рис. 3.15. Кількість еозинофілів ($x \pm SE$) у відсотках від вихідної кількості клітин у культурі *in vitro* та їхня кількість за 48 і 96 годин культивування за стандартних умов на середовищі ДМЕМ із 10 % телячою сироваткою в разі їхнього одержання від інтактних (контрольних) тварин, що відмічено як 0-доза, та після введення експериментальним тваринам різних доз НКМ молозива (0,01, 0,1, 1,0 та 5,0 г/100 г маси тіла). Наведено середні значення з 5 незалежних експериментів. Відмінності між зразками визначали з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. * - варіанти, для яких $p \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

І в тому випадку, якщо еозинофіли були виділені у тварин, які отримували компоненти молозива в малій дозі 0,01 г/100 г маси тіла, то їхня кількість зменшувалась майже так само, як і кількість еозинофілів контрольних тварин, з тією невеликою різницею, що їхня кількість у культурі зменшувалась лінійно в часі, і до 96-ї години в культурі було присутнім не більш як 2% від початкової кількості (рис. 3.15).

Водночас, якщо компоненти молозива вводили в дозі, збільшеній у 10 разів (0,1 г/100г), то тривалість їхнього життя в культурі перевершувала таку еозинофілів контрольних тварин і тварин, які отримали малу дозу НКМ (рис. 3.15). Це проявлялося в тому, що їхня кількість залишалася незмінною порівняно

з вихідною кількістю через 48 годин культивування, а через 96 годин у культурі були присутніми 25-30% від вихідної, а не 5% як для контролю (рис. 3.15).

Збільшення дози НКМ до 1,0 і 5,0 г/100 г маси тіла супроводжувалося зменшенням кількості еозинофілів за 48 годин культивування дещо швидше порівняно з контрольними тваринами, проте надалі швидкість зменшення кількості клітин у середовищі була меншою, ніж для культури контрольних тварин, і за 96 годин у культурі були присутні приблизно 20% клітин (рис. 3.15).

Отже, введення експериментальним тваринам різних доз НКМ супроводжувалося зміною характеристик еозинофілів, що проявлялися у зміні "часу життя" в системі *in vitro* і характер цих змін залежав від дози НКМ. Використаний експериментальний підхід не дає змоги отримати детальні зміни властивостей еозинофілів, проте він дає змогу судити про інтегральні властивості досліджуваних клітин і може бути корисним у порівняльних дослідженнях.

Зупиняючись на обговоренні отриманих результатів, доцільно зазначити, що загальна інтоксикація організму відома як такий хворобливий стан, що зумовлюється пролонгованою дією екзогенних та ендогенних токсичних сполук різноманітної природи [317]. Найчастішими причинами токсикозу можуть бути неякісні продукти, лікарські препарати, хімічні речовини і, зокрема, іони важких металів [318]. Відомо, що хіміотерапія завжди супроводжується вираженою інтоксикацією організм [319]. Виходячи з цього, розробка продуктів функціонального харчування і, зокрема, продуктів на основі молозива є надзвичайно актуальним завданням.

Важливо зазначити, що поряд з екзогенним токсикозом має місце й ендогенний токсикоз. Він може виникнути внаслідок погіршення клітинних і тканинних структур унаслідок опіків, радіаційного ураження, травм, вірусних і бактеріальних інфекцій [320] та різноманітних аутоімунних патологій [321]. Екзогенні токсичні фактори завжди індукують вторинні ендотоксичні продукти. Вважаємо, що формування ендотоксичних сполук має надзвичайно широке розповсюдження і в тому випадку, коли це не призводить до вираженого токсикозу, воно може проходити непоміченим, оскільки не завжди

супроводжується явними змінами на фізіологічному рівні. Водночас індукція цитотоксичних сполук завжди має "регуляторні" ефекти на метаболічному рівні і може супроводжуватися формуванням схильності до прояву різноманітних патологічних станів. Яскравим прикладом переходу функціонально незначущих змін у загрозові стани є формування постковідних станів, як за COVID-19. У дослідженнях нашої лабораторії було показано, що через 2 і більше місяців пацієнти, які перехворіли на COVID-19, і в яких не виявляли яскравих проявів патологій, в їхній сироватці крові були присутні компоненти, що володіють цитотоксичністю, так звані DAMPs. Наявність DAMPs призводила до формування специфічних імунopatологічних закономірностей, для яких було характерно: підвищений вміст С-реактивного білка, збільшення компонентів системи комплементу C3 та C4 і цитокінів (ФНП- α , IL-6, IL-10, IL-18). Поряд із цим в організмі таких пацієнтів мало місце утворення широкого спектра аутоантитіл, спостерігалася низька ефективність ендцитозу за кисень-незалежного фагоцитозу; їхня фагоцитарна активність сягала функціональної межі, і на цьому тлі мало місце активування пасток нейтрофілів, що, своєю чергою, сприяло подальшій індукції вже "вторинних" DAMPs, тобто в організмі починали продукуватися ендотоксичні сполуки. Така самопідтримувана активація "знищення клітин" забезпечувала довгострокове збереження постковідних симптомів і найнеприємніше полягає в тому, що в таких пацієнтів виникають порушення функцій різноманітних систем організму [320].

Необхідно зазначити, що утворення ендогенних цитотоксичних сполук в організмі за токсикозів, зокрема й за вірусних та інших типів інфекцій, виконують двояку роль. З одного боку, на початкових етапах їхнього утворення, коли їхні концентрації не є великими, вони беруть участь в активації систем адаптації організму, і насамперед активацію імунної системи. Однак, при досягненні відносно великих концентрацій, що зумовлено "включенням" додаткових джерел їхнього утворення (деградацією частини імунотетентних клітин як природних наслідків імунної системи, що активно функціонує, має місце формування хронічних патологій або загрозово-небезпечних станів).

Якщо розглядати темпоральні характеристики розвитку токсикозів, то їх можна умовно розбити на два етапи або стадії. Первинний або ранній токсикоз, який може бути відносно легко усунутий зміною дієти або продуктами функціонального харчування, та вторинний або гострий токсикоз, що може призвести до формування хронічних патологій чи загрожуючих станів і навіть смерті (рис. 6).

За Cu-індукованого токсикозу іони міді накопичуються в різних органах і насамперед у печінці. Більшість іонів міді локалізуються у фракції мідь-зв'язуючих білків цитозоля (металотіонеїнах) клітин печінки, мітохондріях і мембранах ендоплазматичних ретикулів гепатоцитів [322]. Було показано, що три послідовних введення сірчаноокислої міді експериментальним тваринам супроводжувалося руйнуванням невеликої частини гепатоцитів, збільшенням капсули Гліссона та, як наслідок, індукція синтезу сполучної тканини печінки [13]. Ці результати свідчать про те, що іони міді, потрапляючи в організм, будучи екзогенними токсикантами, індукують утворення й ендогенних токсичних сполук. У відповідь на первинний токсикоз, що проявляється втратою працездатності, слабкістю, метеоризмом, діареєю та зміною температури тіла, можуть мати місце два варіанти розвитку метаболічних подій. У разі тривалої дії іонів міді, бутет мати місце формування токсичного гепатиту, фіброзу та цирозу печінки. У разі усунення подальшої дії екзогенних чинників і приймання антидотів і, зокрема, НКМ може бути відновлений гомеостатичний рівень метаболізму.

Отже, НКМ може бути використано як продукт функціонального харчування при токсикозах різної етіології.

На користь цього можуть свідчити наявні дані щодо впливу молозива та його компонентів на працездатність у спортсменів. Інтенсивні фізичні навантаження збільшують енергетичний обмін в організмі, а це супроводжується збільшенням функціональної активності мітохондрій і, як наслідок, збільшенням продукції не тільки АТФ, а й продуктів вільнорадикальних реакцій. Під час інтенсивних тренувань може мати місце виснаження антиоксидантного резерву та прояв окислювального й термічного стресу [323].

Вживання молозива під час інтенсивних тренувань призводило до поліпшення спортивних результатів і швидшого відновлення [324]. Такий результат може бути пов'язаний з тим, що компоненти молозива підвищують резерв антиоксидантних систем, які здатні забезпечувати захист скелетних м'язів від окисних ушкоджень, що утворюються в результаті інтенсивних фізичних вправ [323]. Результати, отримані в нашій роботі щодо впливу НКМ на працездатність експериментальних тварин на тлі токсикозу, добре узгоджуються з даними інших авторів.

Як зазначали автори іншої роботи, поряд з активацією енергетичного обміну, інтенсивні фізичні тренування часто супроводжуються і порушенням функцій шлунково-кишкового тракту, що призводить до дисбактеріозу, а отже - до збільшення токсинів в організмі, що, на думку Девісона, сприяє імунодепресії в спортсменів [325]. З огляду на те, що молозиво впливає на мікрофлору кишківника, можна вважати, що вживання молозива чи його компонентів за дисбактеріозів може усунути й такі стани токсикозу. На користь цього можуть свідчити й результати роботи [326], в якій було показано, що вживання спортсменами харчових добавок із молозивом знижувало частоту порушення функцій шлунково-кишкового тракту. Автори іншого дослідження дійшли висновку, що такий ефект від дії молозива зумовлений зниженням проникності для токсичних речовин кишечнику та нормалізацією його мікрофлори [327]. Участь молозива в регуляції функціональних характеристик шлунково-кишкового тракту була показана і в роботі [328], автори якої виявили збільшення ворсинок у поросят після вживання молозива та зниження тяжкості випадків некротизуючого ентероколіту.

Необхідно зазначити, що підвищена кишкова проникність має місце і в разі діабету першого типу, тиреоїдиту Хашимото, аутоімунного гепатиту та аутоімунного ураження сполучної тканини [329], і використання молозива або його компонентів в усуненні цих патологічних станів може бути досить ефективним.

Поряд із відновленням працездатності, функцій шлунково-кишкового тракту та участю компонентів молозива в регуляції мікробіому, результати цієї роботи показали, що такі компоненти молозива як НКМ індукують системну відповідь організму в разі токсикозу, або іншими словами мають місце зміни цілої низки систем організму та передусім редокс-системи, яка є базовою системою регуляції в живих системах незалежно від рівня організації. Надзвичайно важливим у цьому відношенні є те, що НКМ може виступати як прооксидантом, так і антиоксидантом і це залежить як від дози НКМ, так і від особливостей функціонального стану організму в момент його дії. Корекція системи "про-антиоксиданти" супроводжується зміною у функціональній активності кісткового мозку, що проявляється не тільки в кількісних, а й у якісних характеристиках імунокомпетентних клітин.

Наявні дані та результати цієї роботи дають змогу стверджувати, що молозиво, зокрема й такі його компоненти як НКМ, можуть бути рекомендовані як основа продуктів функціонального харчування. Разом з тим, для коректного та ефективного використання НКМ як продуктів функціонального харчування або фармакологічних препаратів необхідні знання про потенційну токсичність або нешкідливість цих компонентів.

Висновок до розділу 3.2

Встановили, що Cu-індукований токсикоз супроводжувався зміною таких інтегральних фізіологічних характеристик організму, як зміна маси тіла, температури та втрата працездатності. Ці прояви зумовлені перебудовами метаболізму і, зокрема, зміщенням рівноваги в системі "прооксиданти-антиоксиданти" в бік прооксидантів (прояв окисного стресу) та невеликими змінами функціональної активності печінки. Необхідно зазначити, що подібні зміни на рівні функціональних характеристик печінки відбуваються під впливом широкого спектра чинників: алкоголю, наркотичних засобів, харчових токсинів, лікарських препаратів, і в цьому сенсі Cu-індукований токсикоз може розглядатися як типова модель відповідної реакції організму на чужорідні сполуки.

Показали, що прийом НМК навіть у відносно малій дозі - 0,01 г/100 г маси, якщо його приймали на початкових етапах інтоксикації організму, сприяв усуненню або швидкому відновленню таких інтегральних показників, як температура тіла та ріст маси тіла, у експериментальних тварин із токсиком.

Отримані результати вказують на те, що НМК може виконувати функцію антидоту під час інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю та його ефективність залежить від дози; оптимальною є доза - 0,01 г/100 г, а більші дози (близько від 1 г/100 г і більші) можуть мати негативний ефект.

Встановили, що в усуненні токсичного ефекту низькомолекулярними компонентами молозива бере участь одна з "еволюційно давніх" регуляторних систем - редокс-система організму, і це здійснюється завдяки нормалізації функціональної активності антиоксидантної системи, та як наслідок зменшення продуктів вільнорадикальних реакцій.

Виявили, що зміни у редокс-системі організму, які індукували НМК супроводжувались й змінами у функції кісткового мозку. Клітини, які утворюються в кістковому мозку на тлі дії компонентів молозива, відрізняються від клітин контрольних тварин за своїми функціональними характеристиками (здатність до проліферації, та тривалість «життя» *in vivo*).

У разі прийому великих доз НКМ (1г/100г і більше) у кістковому мозку значно знижується кількість диференційованих клітин і він збагачується незрілими формами клітин, при цьому має місце збільшення кількості еозинофілів. Можна припустити, що в разі зміщення рівноваги в сироватці крові в бік прооксидантів може відбуватися активний викид диференційованих і остаточно не диференційованих клітин у кровообіг і гальмування та/або зміна спрямованості диференціювання клітин (збільшення швидкості утворення еозинофілів і зменшення утворення інших типів клітин) у кістковому мозку. Не можна виключати й того, що на тлі дії високих доз компонентів молозива можуть утворюватися імунокомпетентні клітини з функціонально зміненими властивостями втрата до проліферації у культурі, та зміна «тривалості життя» таких клітин.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Lebid, K. M., **Ivanov, E. G.**, Kurguzova, N. I., Gayevoy, S. S., & Al Begai, M. A. Y. (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*, 8(2), 2172-0479. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. Bozhkov, A. I., **Ivanov, E. G.**, Kuznetsova, Y. A., Ohienko, S. L., & Bondar', A. Y. (2017). Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture. *Frontiers in biology*, 12, 271-279. **SCOPUS** (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
3. Ohienko S.L., Bondar' A. Yu., **Ivanov E. G.** (2018) Induced liver fibrosis influence on the bone marrow cells culture of rats' different ages. *The development of nature sciences: problems and solutions: The international research and practical conference* (September 12 –18, 2018; Brno, Czech

- Republic), 405. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)
4. Ohiienko S., Bondar A., **Ivanov E.** (2018) Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture. *Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts : XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B.Dybowski*, (April 10 –12, 2018; Lviv, Ukraine), 267-268. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)
 5. S. L. Ohiienko, A. I. Bozhkov, A. Yu. Bondar, **E. G. Ivanov**, I. A. Ionov (2019). Bone marrow cells obtained from old animals differ from the young animals cells in their ability to divide and in response to the presence of liver fibrosis in primary culture. *Advances in Aging Research*, 8, 14 –27. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
 6. Ohiienko SL, Bondar AY, **Ivanov EG**, Bozhkov AI. (2019). Liver fibrosis has a different effect on the “lifespan” of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats. *MOJ Gerontol Ger.* 4(1): 36–40. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
 7. **Ivanov, I.**, Kozheshkurt, V., & Bondar, A. (2023). Low-molecular components of colostrum perform the function of antidote in copper sulphate toxication of the body. *Grail of Science*, (31), 163-167. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

3.3. Дослідження можливих токсичних дій низькомолекулярних компонентів молозива

Базовим критерієм до продуктів харчування, зокрема й продуктів функціонального харчування, є відсутність токсичності або потенційної безпеки. Існує думка, що продукти природного походження, зокрема й молозиво, не можуть бути токсичними. Разом з тим, цілком очевидно, що будь-які біологічно активні сполуки, які беруть участь у метаболізмі організму можуть проявляти різні ефекти залежно від дози. Як було показано, НКМ може проявляти як прооксидантні, так і антиоксидантні властивості, і це залежить від дози (рис. 3.12). Попри наявні думки про потенційну нешкідливість молозива та його компонентів, необхідні дослідження різних доз від мінімальної до максимально можливої на нешкідливість для організму.

Як справедливо зазначають автори роботи [330], молозиво, отримане безпосередньо від корів, протягом багатьох років безпечно вживається в їжу. Однак, отримання нових продуктів із молозива потребують оцінки безпеки та проведення токсикологічних досліджень. Такі дослідження необхідні ще й тому, що вони дають змогу правильно визначити дозу споживання нових продуктів.

Автори іншого дослідження наголошують на тому, що незважаючи на тривале використання продуктів, які отримані з коров'ячого молозива та загалом є безпечними, всебічної та систематичної оцінки безпечності таких продуктів протягом тривалого періоду часу, не проводились [331]. Ці дослідники провели одне з перших досліджень безпеки та токсичності молозива з використанням стандартизованого аналізу токсичності для тварин, рекомендованого ОЕСР. Як зазначено в роботі, особливе занепокоєння викликає вплив гормонів і факторів росту на маленьких дітей і немовлят, особливо коли молозиво необхідно вживати на регулярній основі протягом тривалого часу. Це дослідження було спрямоване на вивчення безпеки тривалого споживання молозива новозеландської великої рогатої худоби, що харчується травою, з використанням моделі тварини з однокамерним шлунком - щура. Керівні принципи ОЕСР та USFDA щодо оцінки безпечності та токсичності нових харчових інгредієнтів рекомендують

використовувати модель на гризунах, а лабораторні щури є загальноприйнятою та перевіреною моделлю для людей, використовуваною в численних харчових та біомедичних дослідженнях (OECD, 1995, USFDA, 2006).

У нашій роботі, як об'єкт дослідження безпечності компонентів молозива – НКМ, було обрано щурів лінії *Wistar*, тримісячного віку. У цей період онтогенезу тварини ще активно продовжують рости. Необхідно зазначити, що дослідження зв'язку між дозою та біологічними ефектами має не тільки важливе практичне значення, а й може бути корисним для розуміння механізмів біологічної дії досліджуваних природних субстанцій.

Як малу дозу НКМ було обрано дози 0,01 г/100 г маси тіла, дозу, збільшену в 10 разів (0,1 г/100 г маси), збільшену в 100 разів (1 г/100 г маси) і максимально можливу дозу - 5 г/100 г маси. Оскільки НКМ тварини отримували внутрішньо-шлунково, ввести їм більший об'єм фізично неможливо, тому ця доза була визначена як максимально можлива або супердоза. Для наочності, якщо уявити ці дози для людини, то прийом дози НКМ в 5г/100г, відповідає одноразовому прийому дорослою людиною 3,5 кг за умови середньої маси в 70 кг. Оскільки багато показників оцінювалися візуально, то в кожній експериментальній групі містилося від 10 до 20 тварин.

Виявили, що одноразове введення НКМ експериментальним тваринам *per os* у малій дозі (0.01 г/100г) супроводжувалося невеликим зниженням рухової активності. Однак через 1-5 годин вона відновлювалася, і вони не відрізнялися від групи контрольних тварин (рис. 3.16 А). Збільшення дози НКМ у 10 разів (0,1 г/100 г) викликало таку саму відповідь, як і мала доза, з тією лише різницею, що в них дещо повільніше відбувалося відновлення рухливості (рис. 3.16 А).

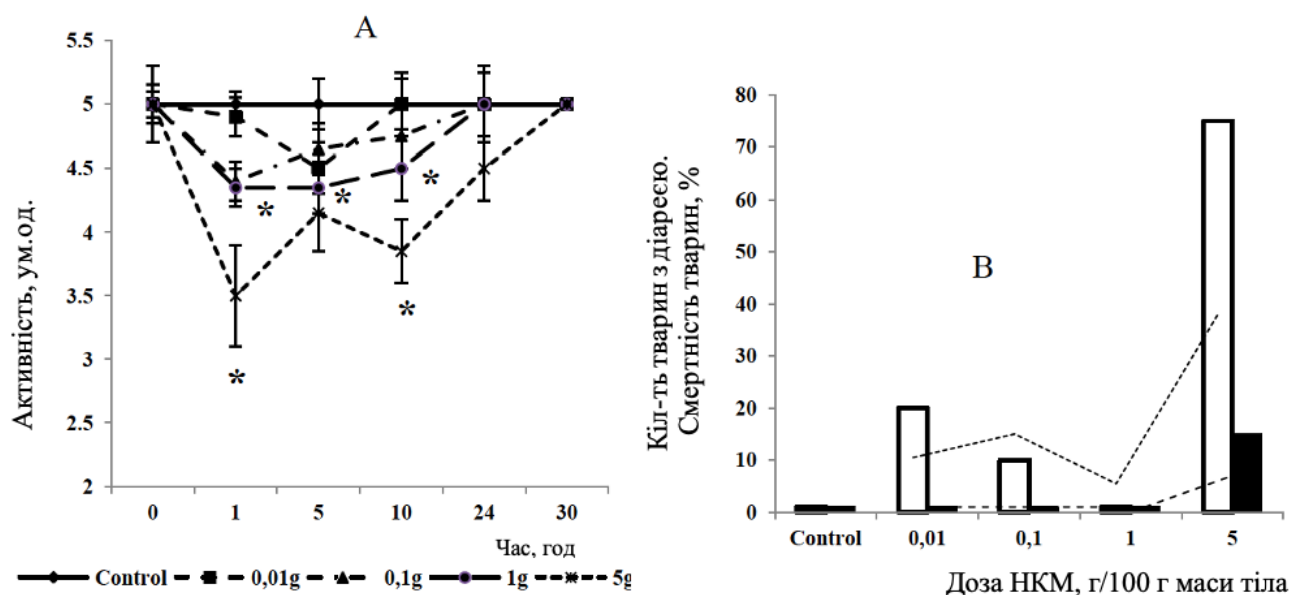


Рис. 3.16. Рухова активність піддослідних тварин контрольної групи, що оцінювалася в балах, від 1 до 5, та рухова активність тварин, яким вводили НКМ *per os* одноразово в дозах: 0,01 г/100 г; 0,1 г/100 г; 1 г/100 г та 5 г/100 г, яку контролювали впродовж 1 - 30 годин після початку експерименту (А). Кількість тварин у відсотках, у яких було виявлено діарею (□) та було зареєстровано смерть (■) через 10 годин після початку експерименту (В). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для кожної з експериментальних груп, у кожній з яких було по 20 тварин. *- варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Якщо тварини отримували велику дозу НКМ (1 мг/100 г), то в більшій частині тварин спостерігали зниження фазової активності порівняно з малими дозами, однак найвираженіші зміни цього показника відбувалися в групі тварин, які отримували надвелику дозу НКМ (5 г/100 г) (рис. 3.16 А). Відновлення рухливості до нормальних значень відбувалося тільки через 30 годин після початку експерименту (рис. 3.16 А). Втрата рухливості може пояснюватися відносно повільним звільненням шлунку від компонентів молозива через великий об'єм НКМ.

Отже, після введення НКМ *per os* мало місце тимчасове зниження рухової активності тварин і між дозою та активністю тварин була відсутня пряма дозова залежність.

З зазначено раніше, молозиво та його компоненти впливають на мікрофлору кишечника та функціональну активність травного тракту. Діарея є показником порушення функцій кишечника, яке може бути спричинене різними причинами: інфікуванням, харчовим отруєнням, алергійними реакціями, непереносимістю деяких видів харчових продуктів, зокрема молочних та ін. Внутрішньошлункове введення тваринам НКМ у дозі 0,01 г/100г маси супроводжувалося появою діареї у 20 % експериментальних тварин (рис. 3.16 В). Збільшення дози НКМ у 10 разів супроводжувалося, навпаки, зменшенням кількості тварин із проявом діареї до 10%, при великій дозі - 1 г/100г діарея була відсутня (рис. 3.16 В). Однак, за супервеликої дози НКМ - 5 г/100 г діарея проявлялася майже у 80% тварин (рис. 3.16 В). Необхідно зазначити, що при дозах до 1 г/100 г функція травного тракту відновлювалася через 24-48 годин.

Отже, внутрішньошлункове введення НКМ викликало появу у частини тварин діареї. Між проявом діареї та дозою субстанції, що вводиться, існувала зворотна залежність у діапазоні доз від 0,01 і до 1 г/100 г, а за надвеликої дози -5 г/100 г - вона виникала майже у всіх тварин (до 80%).

Незважаючи на зміни у функціональній активності травного тракту, всі тварини швидко та без видимих наслідків приходили до нормального стану, і гострої токсичності для доз від 0,01 до 1 г/100г не спостерігалось (рис. 3.16 В). Водночас за дози НКМ у 5 г/100 г понад 10-15% експериментальних тварин гинуло протягом 10 годин. Решта тварин відновлювалися і загинули в цій групі не спостерігали.

Отже, у разі супервеликих доз НКМ може мати місце порушення функцій травлення, зневоднення, а також, можливо, інтоксикація і навіть настання смерті у невеликої частини експериментальних тварин.

Важливим, інтегральним показником функціонального стану організму є зміна маси тіла.

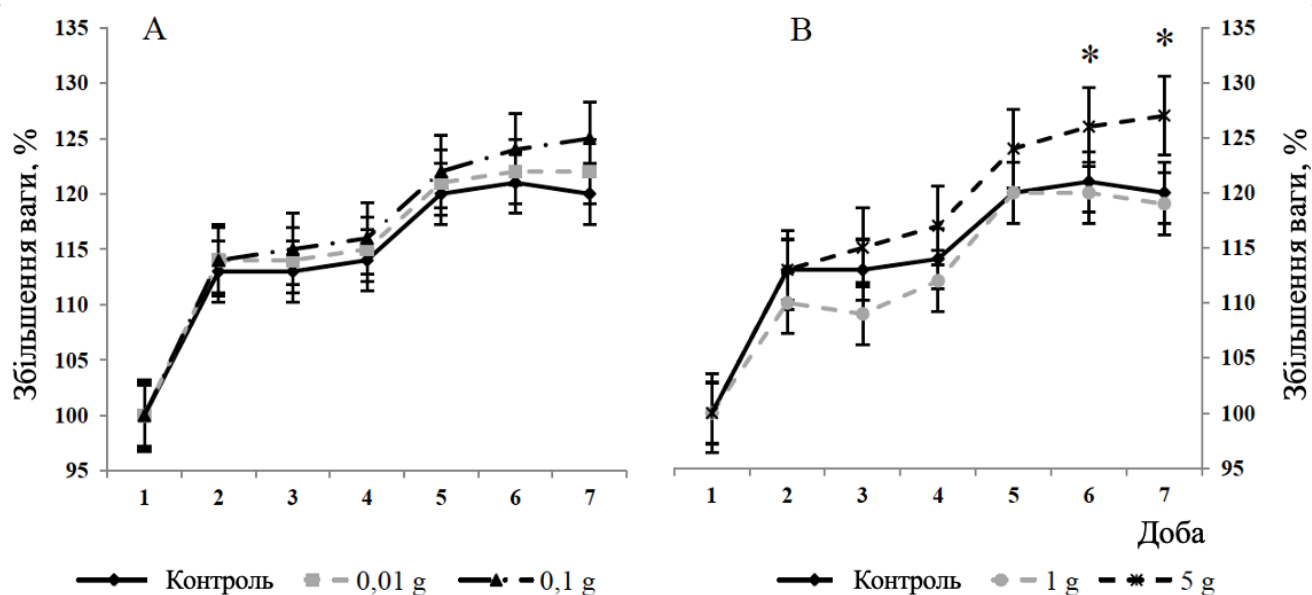


Рис. 3.17. Зміни маси тіла експериментальних тварин, показано у відсотках від початкової, яку прийнято за 100%. Для експериментальних груп: контрольна, отримували воду дистильовану в дозі 0,5 мл протягом 7 днів; дослідна, тварини отримували НКМ у дозі 0,01 г на 100 г щоденно протягом 7 днів; тварини отримували НКМ у дозі 0,1 г на 100 г щоденно протягом 7 днів (А); і контроль отримували дистильовану воду в дозі 0,5 мл протягом 7 днів; дослідні тварини отримували НКМ у дозі 1 г на 100 г одноразово, тварини отримували НКМ у дозі 5 г на 1 прийом (В). У кожній експериментальній групі було по 10 тварин, наведено середні значення та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Динаміка зростання маси тіла в контрольній групі тварин мала не лінійний характер (рис. 3.17). Такий характер росту тварин може пояснюватися впливом стресу (процедура зважування, введення води для контролю або водного розчину НКМ, вимірювання температури тіла тощо) та особливостями утримання тварин. Необхідно зазначити, що така не лінійна динаміка росту була характерна і для всіх дослідних груп (рис. 3.17), що дає змогу проводити порівняння між досліджуваними експериментальними групами.

За 7 днів експерименту маса тіла контрольних тварин збільшувалася на 18-20% від вихідної (рис. 3.17). Якщо тварини щодня одержували НКМ у дозі 0,01г/100 г маси, то маса їхнього тіла збільшувалася так само, як і в контролі, зі

збереженням динаміки росту, як у контролі (рис. 3.17). Збільшення дози НКМ до 0,1 г/100 г маси супроводжувалося незначним збільшенням маси тіла таких тварин на 7 день експерименту (рис. 3.17).

Оскільки введення настільки великих за об'ємом доз, як 1 і 5 г/100 г маси щодня неможливе, а в частини тварин проявлялася діарея, то ці великі дози вводили одноразово, а спостереження за динамікою росту вели протягом 7 днів. Виявили, що доза в 1 г/100 г не впливала на динаміку і швидкість росту, а доза в 5 г/100 г призводила до невеликого прискорення росту маси тіла на 6-7 дні після одноразового введення. Як, показано в результатах, представлених на рис. 3.15 В, до 7 діб у таких тварин було збільшено масу тіла на 27% від початкової, у той час як у групі контрольних тварин вона збільшувалася не більше ніж на 20% (рис. 3.17 В).

Необхідно відзначити, що після введення експериментальним тваринам надвеликих доз НКМ (5 г/100 г) невелика частина тварин гинула (рис. 3.16 В), а ті тварини, які переносили такі дози, в них мало місце збільшення маси тіла, тобто НКМ виконувала трофологічні функції.

Отримані результати дають змогу зробити висновок, що НКМ навіть у супервеликих дозах, які не можуть бути реалізовані у повсякденному житті, не виявляють гострої токсичності, проте має місце індивідуальні реакції щодо переносимості компонентів молозива, що підтверджує наявні дані.

Визначення віддалених наслідків впливу НКМ на масу тіла засвідчило, що за 30 днів після початку експерименту маса тіла тварин у контрольній групі збільшилася на 33% від початкової, а за 60 днів - на 53% (табл.3. 7).

Через 30 днів після останнього введення тваринам НКМ їхня маса тіла достовірно не відрізнялася від контрольної групи тварин незалежно від дози НКМ (табл. 3.7). Водночас маса тіла тварин через 60 днів після прийому НКМ у дозі 5 г/100 г перевершувала масу тіла всіх груп тварин і контрольну на 18 -20% (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Зміна маси тіла у відсотках від вихідної, яку прийнято за 100%, у тварин контрольної групи та експериментальних груп через 30 і 60 днів після прийому різних доз НКМ. Дози НКМ в 0,01 і 0.1 г/100г маси тварини отримували щодня протягом 7 днів, а дози в 1 і 5 г/100 г одноразово. Наведено середні значення, отримані для 10 тварин кожної групи та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Час після введення НКМ, дні	Дози НКМ в г/100 г маси тіла				
	Контроль (0)	0.01	0.1	1	5
30	133.8 $\pm$ 6.9	129.7 $\pm$ 4.9	156.9 $\pm$ 6.9	120.5 $\pm$ 4.7	135.7 $\pm$ 3.9
60	153.4 $\pm$ 10.6	149.9 $\pm$ 8.3	154.3 $\pm$ 8.0	141.7 $\pm$ 10.0	180.6* $\pm$ 15.6

Отже, прийом НКМ у широкому діапазоні доз не призводив до зміни динаміки росту маси тіла навіть у віддалений період, через 30 і 60 днів. Водночас, у разі приймання дуже великих доз, мала місце невелика перевага у швидкості росту тварин у віддалений період (60 днів) порівняно з контролем. Пояснення такого ефекту потребує спеціальних досліджень. Можна припустити, що в разі прийому таких великих доз НКМ в організмі деяких тварин (деякі тварини гинули на тлі діареї) формуються епігенетичні зміни, що можуть проявитися надалі під час формування певних метаболічних характеристик, пов'язаних із ростом.

Як відомо, зміна відносної маси життєво-важливих органів, зокрема печінки, селезінки та нирок, є важливим показником їхньої функціональної активності, зокрема, й за розвитку патологій. Так, зміни відносної маси внутрішніх органів може відбуватися внаслідок гіпертрофії (внаслідок проліферації клітин або поліплоїдизації) або за рахунок апоптичних процесів у цих органах.

Якщо тварини отримували внутрішньошлунково НКМ у дозі 0,01 г/100 г маси щоденно протягом 7 днів, то через 30 днів відносна маса печінки достовірно не відрізнялася від контролю (табл.3. 8). У тому разі, якщо доза була збільшена до 0,1 г/100 г, то відносна маса печінки була зменшена порівняно з контролем на 27%

(табл.3.8). При збільшенні дози НКМ до 1 г/100 г і навіть після одноразового прийому мало місце зменшення відносної маси печінки на 33% порівняно з контролем (табл. 3.8). Супервелика доза НКМ (5 г/100 г) чинила такий самий ефект на відносну масу печінки через 30 днів після прийому (табл.3. 8). Однак ці невеликі зміни відносної маси печінки повністю нівелювалися, тобто вона не відрізнялася від контролю через 60 днів після прийому НКМ (табл.3. 8).

Отже, прийом НКМ супроводжувався зменшенням відносної маси печінки через 30 днів після прийому, яка повністю відновлювалася через 60 днів.

Таблиця 3.8

Зміни відносної маси печінки, селезінки та нирок через 30 і 60 днів після приймання НКМ per os щоденно протягом 7 днів у доз 0,01 і 0,1 г/100 г маси та одноразового приймання НКМ у дозах 1 і 5 г/100 г маси. Наведено середні значення для 5 тварин у кожній із груп та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Дози НКМ г/100 г маси тіла	Печінка		Селезінка		Нирки	
	30 днів	60 днів	30 днів	60 днів	30 днів	60 днів
Контроль	4.92± 0.28	4.92± 0.28	0.72± 0.05	0.72± 0.05	0.82± 0.10	0.82± 0.10
0.01	4.20± 0.09	4.86± 0.34	0.35*± 0.01	0.41*± 0.01	0.74± 0.02	0.72± 0.03
0.1	3.61*± 0.11	4.66± 0.19	0.36*± 0.02	0.32*± 0.03	0.75± 0.04	0.65*± 0.03
1	3.32*± 0.06	4.51± 0.13	0.45*± 0.03	0.44*± 0.04	0.76± 0.03	0.67*± 0.03
5	3.78*± 0.11	4.51± 0.23	0.45*± 0.05	0.41*± 0.01	0.76± 0.03	0.67*± 0.05

Прийом НКМ супроводжувався ще більш вираженими змінами відносної маси селезінки. Так, у разі вживання навіть маленької дози НКМ (0,01 г/100г) через 30 днів відносна маса селезінки була зменшена на 52% порівняно з контролем (табл. 3.8). Доза НКМ у 0,1 г/100г спричиняла такий самий ефект, а більші дози навіть менш виражене зменшення відносної маси селезінки (на 48%) порівняно з контролем (табл.3.8). Відносне зменшення маси селезінки після вживання НКМ зберігалось і через 60 днів після вживання компонентів молозива (табл.3.8). Незначне зменшення відносної маси нирок проявлялося тільки у

віддалений період спостережень (через 60 днів і тільки після приймання НКМ у дозах 0,1; 1 і 5 г/100 г маси (табл. 3.8).

Отже, вживання НКМ у малій дозі (0,01 г/100 г маси) протягом 7 днів щодня не впливало на зміну відносної маси печінки та нирок навіть через 30 і 60 днів після вживання, водночас відносна маса селезінки зменшувалася й залишалася меншою на 52 і 44% через 30 і 60 днів відповідно, порівняно з контролем. У разі збільшення дози НКМ до 0.1 г/100г маси відбувалося зменшення відносної маси печінки через 30 днів після прийому і відновлення до вихідної через 60 днів. За такої дози спостерігали зменшення відносної маси селезінки, яка залишалася зменшеною за 30 і 60 днів, і зменшення відносної маси нирок, що проявлялося тільки через 60 днів. Якщо розташувати досліджені органи за ступенем зменшення відносної маси в послідовний ряд за ступенем змін, то отримаємо: селезінка > печінка > нирки. При цьому швидше за всіх відновлювалася відносна маса печінки, а зміна відносної маси нирок наставала тільки у віддалений період після введення НКМ (через 60 днів).

Як відомо, одним із показників негативної дії фармакологічних препаратів або біологічно активних субстанцій є наявність пірогенності. Визначення температури тіла щурів, які отримували НКМ одноразово в різних дозах, не впливало на температуру тіла тварин (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Ректальна температура тіла у тварин різних експериментальних груп з 1-ї по 5-ту добу після одноразового введення НКМ у різних дозах. Наведено середні значення для 5 тварин у кожній із груп та їхні стандартні помилки.

Дози НКМ, г/100 г маси	Динаміка зміни температури тіла (в °C)				
	1	2	3	4	5
Контроль	36.24 ± 0.15	36.42 ± 0.66	36.44 ± 0.55	36.57 ± 0.47	36.71 ± 0.24
0.01	37.00 ± 0.39	36.7 ± 0.42	37.03 ± 0.57	37.12 ± 0.63	37.24 ± 0.51
0.1	36.95 ± 0.63	37.33 ± 0.56	37.46 ± 0.54	37.59 ± 0.55	37.55 ± 0.45
1.0	36.79 ± 0.50	36.33 ± 0.52	36.63 ± 0.63	36.74 ± 0.15	36.61 ± 0.74
5.0	36.86 ± 0.40	36.59 ± 0.77	36.82 ± 0.64	36.48 ± 0.32	36.65 ± 0.81

Отже, введення тваринам навіть супервеликих доз НКМ, які спричиняли діарею в більшій частині тварин, не впливало на температуру їхнього тіла. В обговоренні отриманих результатів необхідно зазначити кілька загальних положень. Після введення НКМ *per os* у великих або дуже великих дозах (1 і 5 г/100 г) мала місце тимчасова втрата активності в таких тварин, відмова на деякий час від приймання їжі, що пов'язано з наповненням шлунку і появою діареї. Загибель частини тварин за супервеликих доз НКМ є наслідком ймовірного зневоднення організму, порушенням перистальтики та можливо мікробіому кишківника, а не прямої токсичної дії НКМ. Як відомо, діарея - це симптомокомплекс, зумовлений різними інфекційними та неінфекційними агентами [332]. Діарею відносять до клінічних проявів пов'язаних із порушенням всмоктування води та електролітів у кишківнику, розладами кишкової рухомості та порушенням мікробіому [333]. Небезпека діареї полягає в тому, що вона може призводити до зневоднення організму, мальабсорбції та загибелі організму. Відомо, що у деяких людей вживання молока супроводжується індукцією та посиленням діареї [334]. Наявні дані щодо впливу молочних продуктів на функції травної системи та результати теперішньої роботи вказують на необхідність врахування індивідуальних особливостей реакції організму на такі продукти, в тому числі і компоненти молозива, і правильний підбір дози.

Ще одним важливим аспектом отриманих результатів є наявність не прямої залежності між дозою НКМ і фізіологічними проявами відповіді організму. Така складна дозова залежність може пояснюватися кількома положеннями: 1 - багатоконпонентність НКМ; при введенні тваринам різних доз змінюватиметься відносний вміст частини компонентів. Тобто при збільшенні дози деякі компоненти, що присутні в малих кількостях, досягають таких концентрацій, за яких досягається "поріг" чутливості, і вони можуть індукувати біологічні відповіді; 2 - причини і наслідки діареї можуть бути різними залежно від дози. Найбільш вираженими змінами у відповідь на багаторазовий вплив доз 0,01 і 0,1 г/100 г маси та одноразовий вплив великих і дуже великих доз, що на

практиці не можуть бути реалізовані, проявлялися у зменшенні відносних мас селезінки, печінки та нирок.

Однак при цьому експериментальні тварини не втрачали і навіть дещо перевершували контроль у наборі маси тіла, у них зберігалася температура тіла, рухливості та інших фізіологічних показників. Ефект тимчасового зменшення відносної маси селезінки, печінки та нирок після дії НКМ може пояснюватися тимчасовим зневодненням організму. У 2019 р. група авторів провела дослідження новоотриманого ультрафільтрованого продукту з молозива, що може слугувати аналогом НКМ, на безпеку та можливу токсичність [330]. Для оцінки безпечності "ультрафільтрату" коров'ячого молозива відповідно до міжнародно визнаних стандартів було досліджено його генотоксичний потенціал, наявність хромосомних аберацій та мікроядерний тест на ссавцях у системі *in vivo*. У цих трьох тестах автори не спостерігали прояву мутагенності або генотоксичної активності. При пероральному прийомі "ультрафільтрату" на щурах *Wistar* у дозах 0, 1050, 2100 та 4200 мг/кг маси тіла/добу, що вводили 90 днів, не спостерігалось смертності або побічних ефектів. Автори роботи дійшли висновку, що найвища доза за якої не спостерігається побічних ефектів (NOAEL), є доза - 4200 мг/кг ваги тіла на день, або 0,4 г/100 г маси.

Ще одна група дослідників провела оцінку токсичної дії нативного коров'ячого молозива [331]. З цією метою автори включали в раціон щурів 3% і 10% добавку молозива на 90 днів.

Через 90 днів не було виявлено жодних відмінностей між тваринами, які одержували молозиво, і контрольною групою за масою тіла, споживанням їжі, клінічними ознаками, гематологічними показниками та більшістю параметрів крові, включно з вуглеводним обміном, функцією печінки та функцією нирок. Єдиним статистично значущим ефектом було зниження концентрації холестерину в сироватці крові в щурів, які отримували 10% молозива ($P \leq 0,025$), та збільшення концентрації тригліцеридів у сироватці на 33% у щурів, які отримували 3% молозива ($P \leq 0,05$). Крім того, гістологічне дослідження більшості органів і тканин підтвердило відсутність видимих відмінностей між тваринами, які отримували

молозиво, порівняно з контрольною групою. На підставі цих результатів можна зробити висновок, що в молодих щурів, які зростають, не спостерігалось токсикологічних і гістопатологічних відхилень, спричинених молозивом за умови використання добавок у кількості 3% і 10% від об'єму споживаної їжі.

Хоча умови проведення експериментів та дози і склад компонентів у цих роботах і нашому дослідженні були дещо різними, проте результати добре узгоджуються і дають змогу стверджувати, що НКМ не має токсичності, а його прийом в надвеликих дозах (5 кг для дорослої людини) спостерігали індивідуальну непереносимість. Оптимальними дозами для НКМ є 0,01- 0,1г/100г маси тіла.

Висновок до розділу 3.3

Внутрішньошлункове введення НКМ у діапазоні доз від 0,01 і до 1 г/100 г супроводжувалось проявом тимчасової діареї, а за надвеликої дози -5 г/100 г - вона виникала майже у 80% тварин, що викликало до загибелі деяких тварин, але у тварин, які переносили такі великі дози НКМ мало місце збільшення маси тіла, в порівнянні з контролем, у віддалений період, тобто НКМ виконувала трофічні функції у цих тварин.

Вживання НКМ у малій дозі протягом 7 днів щодня не впливало на зміну відносної маси печінки та нирок навіть через 30 і 60 днів після вживання, водночас відносна маса селезінки зменшувалася й залишалася меншою навіть через 30 і 60 днів відповідно, порівняно з контролем, що може вказувати на імунотропну дію НКМ. НКМ не викликає зміну температури тіла піддослідних тварин. Отримані результати узгоджуються з наявними даними в літературі і вказують на те, що отримана фракція НКМ не токсична, але за більших доз проявляються індивідуальні особливості відповіді організму (не переносимість) на її дію. Оптимальними дозами для НКМ є широкий діапазон доз від 0,01 і до 1 г/100 г маси тіла.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. Bozhkov, A. I., **Ivanov, E. G.**, Kurguzova, N. I., Alsardia, M. M., Akzhigitov, R. A., Baranikova, S. Y., ... & Chuprikova, A. S. (2018). The Toxic Effects of Low Molecular Weight Components of Cow Colostrums: The Short-Term and Long-Term Effects. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 6(4), 84-91. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. **Ivanov, E.**, Akzhigitov, R., & Bozhkov, A. (2024). Components from various biological sources reduces the toxic effects of copper sulphate in old animals. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (April 26, 2024; Bologna, Italy), 191-199. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

3. **Ivanov, I., Bondar, A., & Bozhkov, A.** (2024). Age-dependent features of the bone marrow response to toxicogenic liver fibrosis in the experiment. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (March 1, 2024; Paris, France), 126-134. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

3.4. Розробка експериментальних моделей фіброзу печінки для дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на функції печінки з фіброзом

3.4.1. Обґрунтування необхідності розробки засобів усунення фіброзу печінки

Як відомо, процес формування патологій печінки проходить низку стадій: гепатит, фіброз і цироз, який є термінальною стадією - загрозливим і незворотнім патологічним станом [335–337]. За наявними даними, у США цироз печінки посідає 4 місце за смертністю серед осіб, старших за 40 років [338]. Незважаючи на актуальність, інтенсивне дослідження механізмів формування фіброзу печінки та наявність великого арсеналу лікарських засобів, поки що не вдалося розробити єдиного ефективного протоколу лікування цієї патології [339].

Як відомо, зміни функції печінки відбуваються під впливом різноманітних факторів як фізичної, так і біологічної природи [340-342]. У процесі еволюції у печінці сформувалися різні способи адаптації до цих впливів, які запускаються розвитком запальних реакцій [343, 344]. Так, збереження функціональної активності печінки може забезпечуватись через поліплоїдизацію гепатоцитів, їх гіпертрофію, а може мати місце та активація проліферації клітин печінки [345–348].

Проблема полягає в тому, що після дії негативних факторів та розвитком запальних реакцій у печінці можуть формуватися різні стратегії подальшої адаптивної відповіді, яка може призвести до усунення негативних наслідків, розвитку хронічних патологій або навіть до смерті. Важливо відзначити, що на ранніх етапах розвитку патологій печінки відсутні болючі відчуття та звернення пацієнтів до лікаря має місце тільки після настання фінальної стадії (цирозу), коли лікування мало ефективно [349].

Враховуючи ці особливості, необхідні проводити дослідження механізмів формування стратегій адаптації печінки до різноманітних токсикогенних факторів, що дозволить проводити не лише ранню діагностику, а й профілактику таких патологій.

Нині активно розробляють способи лікування фіброзу печінки, оскільки за наявними даними ця стадія розвитку фіброзу може бути оборотною [350, 351]. Для цього використовують широкий арсенал лікувальних заходів, які включають: усунення причинних чинників; використання лікувальних препаратів, що мають антицитотоксичну активність, гепатопротекторну дію, антифібротичну активність, антиоксидантні властивості; застосовують інгібітори ренін-ангіотензивної системи та ін [352, 353]. Однак, ефективних способів лікування фіброзу поки що не розроблено [339].

Вважаємо, що під час лікування патології печінки та насамперед фіброзу мають враховуватися такі фундаментальні положення особливостей функціонування біологічних систем як: (1) темпоральні особливості розвитку запального процесу, тобто функціональний стан печінки на момент медикаментозного впливу, та (2) природні спроможності печінки до регенерації, а для цього доцільно використовувати не ксенобіотики, а природні біологічно активні субстанції, що є природними й "тонкими" регуляторами метаболічних процесів, а саме - вітаміни та інші природні сполуки. Вважаємо, що перспективним у цьому відношенні є і використання такого природного продукту та його компонентів як молозиво.

Дослідження механізмів фіброзу печінки та пошук способів його усунення може бути здійснено тільки на експериментальних моделях. Разом з тим, не завжди вдається легко і коректно переносити результати, отримані на лабораторних тваринах, у клініку. З огляду на це, необхідно приділяти особливу увагу розробці та використанню лабораторних моделей.

3.4.2. Розробка експериментальних моделей Cu-індукованого фіброзу печінки

У розділі 3.2.1. було дано характеристику прояву Cu-індукованого токсикозу, який може призводити до різних наслідків: 1 - до незначних функціональних змін, що можуть бути оборотними; 2 - адаптивно значущих, відносно стійких епігенетичних та метаболічних змін, тобто формування метаболічної пам'яті; 3 - стійких хронічних змін, які можуть бути визначені як

відомі хронічні патології (у якості прикладу - фібрози); 4 - призводити до летальних наслідків (рис. 6). Формування таких варіантів відповіді організму на екзогенні впливи залежать від великої кількості чинників, які можуть бути класифіковані як поєднана (інтегративна) дія екзогенних чинників (час дії, доза, послідовність впливів та ін.) та ендогенних характеристик (функціонального стану організму в момент впливів) [337].

Як відомо, одним із первинних відгуків біологічної системи на значущі екзогенні впливи є зміни в редокс-системі організму, або зміна балансу в прооксидантно-антиоксидантній системі в бік прооксидантів або окиснювачів [354].

Аналіз наявних даних показав, що найчастіше як індуктор фіброзу використовується тетрахлорметан [355, 356]. Разом з тим, це досить високо токсична сполука, яка призводить до розвитку цирозу печінки. Нами було показано, що трикратне послідовне внутрішньочеревне введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 годин між введеннями також супроводжується активним формуванням міжклітинної сполучної тканини.

Як уже було зазначено, однією з первинних реакцій печінки на дії токсичних сполук є зміни в редокс-системі. У зв'язку з цим було проведено порівняльне дослідження дії тетрахлорметану та сірчаноокислої міді на деякі показники прооксидантної та антиоксидантної системи в мітохондріях печінки та сироватці крові експериментальних тварин.

Виявили, що після трикратного введення тваринам тетрахлорметану вміст малонового альдегіду (МДА) в мітохондріях печінки був збільшений на 35% порівняно з інтактними молодими (3 міс.) тваринами (рис. 3.18 А). Оскільки цей показник може мати вікзалежний характер, було визначено і його кількість у мітохондріях печінки старих тварин (20 міс.). Виявилось, що у старих тварин його кількість була на 130% більшою від їхнього контрольного (вихідного) рівня (рис. 3.18 А). Необхідно зазначити, що вихідний рівень вмісту продуктів гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки у старих тварин був меншим порівняно з вихідним

рівнем молодих тварин на 39% (рис. 3.18 А), а після введення їм тетрахлорметану вміст МДА в мітохондріях печінки був однаковим у молодих і старих щурів (рис. 3.18 А).

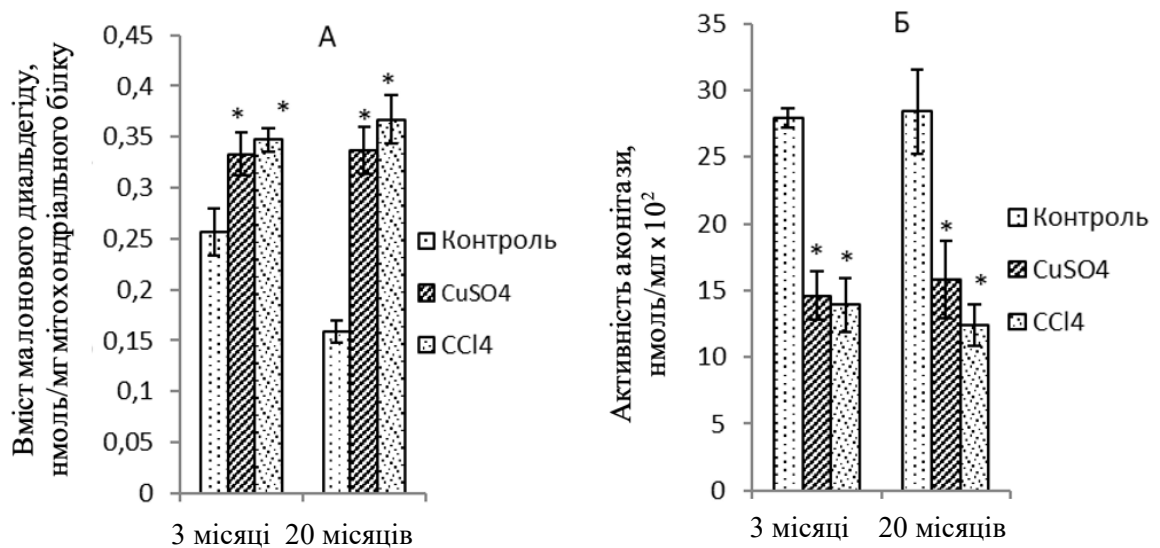


Рис. 3.18. Вміст малонового діальдегіду в мітохондріях печінки (А) та активність аконітази в мітохондріях печінки (Б) у молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) тварин у трьох експериментальних групах: контрольній; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси з інтервалом 48 годин між введеннями; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили тетрахлорметан з інтервалом у 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мл 50 % масляного розчину. Наведено середні значення з 8 експериментів та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких значення $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

У тому випадку, якщо тваринам ввели сірчаноокислу мідь так само тричі, то вміст МДА в мітохондріях печінки був збільшений у молодих на 30 %, а в старих на 111 % порівняно з відповідним віковим контролем, тобто збільшення кількості МДА в мітохондріях після введення цих цитотоксичних сполук було схожими (рис. 3.18 А).

Відносно нещодавно було встановлено, що ще одним важливим і досить інформативним показником окисного стресу є активність аконітази, або аконітатгідратаза - фермент (КФ 4.2.1.3), із сімейства гідратаз (клас ліази), що

каталізує реакцію ізомеризації цитрату в ізоцитрат за допомогою утворення цис-аконітату в циклі Кребса [357], інгібується на тлі стресу.

Визначення активності аконітази в мітохондріях печінки молодих тварин після введення їм тетрахлорметану та сірчаноокислої міді призводило до зниження активності цього ферменту на 50 та 48 % порівняно з контролем відповідно (рис. 3.18 В). Зниження активності аконітази мітохондрій у старих тварин становило у випадку тетрахлорметану 57%, а у випадку сірчаноокислої міді - 45%, тобто однаковою мірою (рис. 3.18 В).

Хоча мітохондрії роблять істотний внесок у формування рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти на рівні організму, це не єдине "джерело" продуктів вільнорадикальних реакцій в організмі. З огляду на це необхідне вимірювання вмісту гідроперекисів і в сироватці крові. Було виявлено, що вміст МДА в сироватці крові в молодих тварин, які одержували тетрахлорметан і сірчаноокислу мідь, був збільшений на 100 і 107% відповідно (рис. 3.19). Вміст МДА в сироватці крові старих щурів був збільшений на 141 і 107% відповідно для тетрахлорметану і сірчаноокислої міді (рис. 3.19).

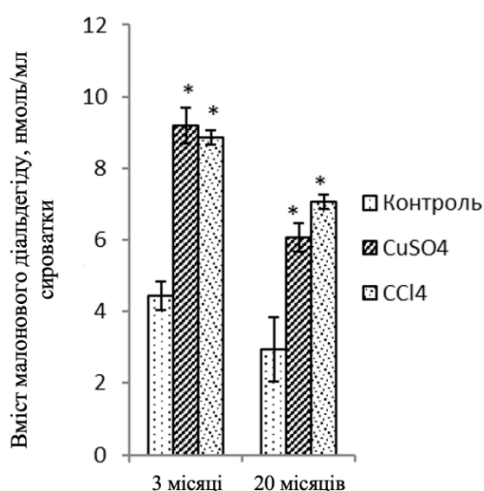


Рис. 3.19. Вміст малонового діальдегіду в сироватці крові в молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) тварин у трьох експериментальних групах: контрольної; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси з інтервалом 48 годин між введеннями; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили тетрахлорметан з інтервалом у 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мл 50

% масляного розчину. Наведено середні значення з 8 експериментів та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких значення $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, трикратне послідовне введення експериментальним тваринам тетрахлорметану, що супроводжувалося розвитком фіброзу печінки, призводило до збільшення вмісту МДА в мітохондріях печінки та інгібування активності аконітази, а також до значного збільшення кількості МДА в сироватці крові, що вказує на прояв окиснювального стресу в таких тварин. Такий самий окислювальний стрес індукувало і трикратне послідовне введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді. Необхідно зазначити, що активність аконітази може слугувати показником окисного стресу.

Строго кажучи, збільшення продуктів вільно радикальних реакцій ще не свідчить про формування окисного стресу. У цьому відношенні важлива зміна співвідношень між показниками прооксидантної та антиоксидантної систем. Відомо, що важливим показником антиоксидантної системи організму і клітин є активність різних ізоформ глутатіонпероксидази (ГП). Було виявлено, що її активність у мітохондріях печінки після отримання молодими тваринами тетрахлорметану була знижена на 23% порівняно з контролем, а у старих тварин - на 25% (рис. 3.20 А). У тому разі, якщо тварини отримували сірчаноокислу мідь, то активність ГП у мітохондріях печінки була зниженою порівняно з вихідним рівнем у молодих і старих тварин на 20 і 22% відповідно (рис. 3.20 А).

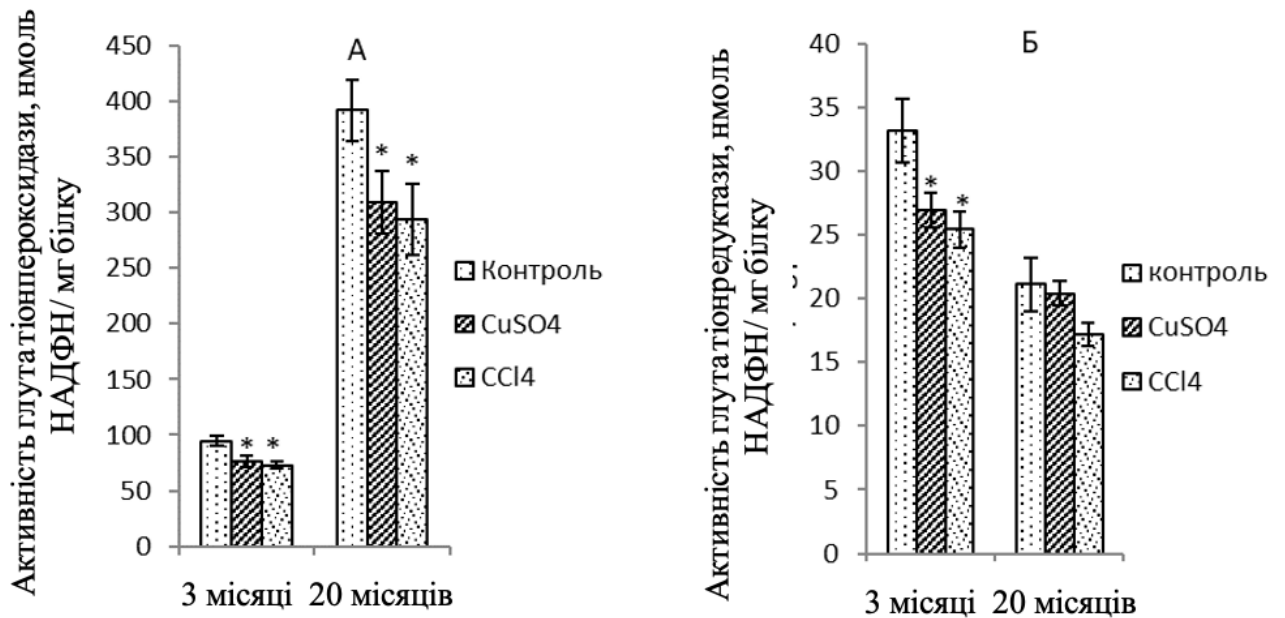


Рис. 3.20. Активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки (А) та активність глутатіонредуктази в мітохондріях печінки (Б) у молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) тварин у трьох експериментальних групах: контрольній; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси з інтервалом 48 годин між введеннями; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили тетрахлорметан з інтервалом у 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мл 50% масляного розчину. Наведено середні значення з 8 експериментів та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких значення $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Глутатіонредуктаза (ГР) є ще одним із ферментів глутатіонового циклу, який забезпечує антиоксидантний захист організму. Її активність у мітохондріях печінки молодих і старих тварин після введення тетрахлорметану так само була знижена на 20% порівняно з їхніми початковими рівнями (рис. 3.20 В). Введення тваринам сірчаноокислої міді супроводжувалося падінням активності ГР також на 20%, як і у випадку з тетрахлорметаном, але тільки у молодих тварин, тоді як у старих тварин її активність залишалася на рівні контролю (рис. 3.20 В).

Раніше було показано, що серед антиоксидантних ферментів активність глутатіонпероксидази найбільшою мірою піддається зміні під час дії різноманітних стрес-факторів [354]

Це може пояснюватися тим, що ГП - це сімейство ферментів (у людини виявлено 8 ізоформ), які забезпечують відновлення гідроперекисів ліпідів до відповідних спиртів та відновлення пероксиду водню до води, а як відомо, ліпіди піддаються окисненню найбільшою мірою серед інших біополімерів. Нині ідентифіковано кілька генів, які кодують різні форми глутатіонпероксидази і для них характерна різна тканинна та клітинна локалізації. У плазмі крові присутня здебільшого ГП 3, а в мітохондріях локалізована ГП 4 [358].

Визначення активності ГП у сироватці крові засвідчило, що вона так само була знижена після введення тетрахлормету на 24% у молодих і на 27% у старих тварин і практично такою самою мірою після введення сірчаноокислої міді в молодих і старих тварин - 22 і 23%, відповідно (рис. 3.21).

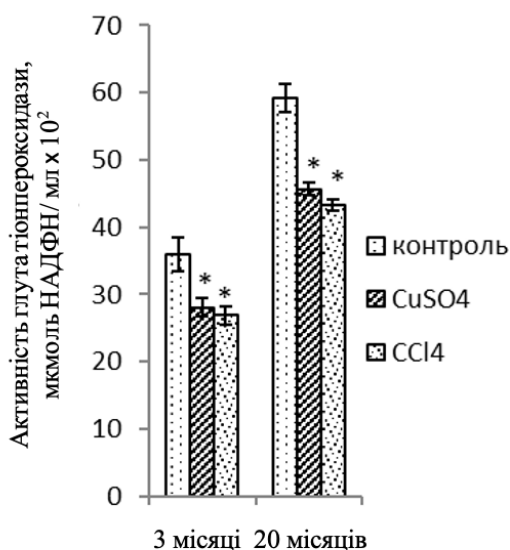


Рис. 3.21. Активність глутатіонпероксидази в сироватці крові в молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) тварин у трьох експериментальних групах: контрольній; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси з інтервалом 48 годин між введеннями; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили тетрахлорметан з інтервалом у 48 годин між введеннями в дозі 0,1 мл 50% масляного розчину. Наведено середні значення з 8 експериментів та їхні стандартні помилки. * - варіанти, для яких значення $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, можна дійти висновку: 1 - трикратні послідовні введення експериментальним тваринам тетрахлорметану в дозі, що індукує розвиток

фіброзу печінки, та трикратне введення тваринам сірчаноокислої міді в дозі 1 мг/100 г маси, індують зсув рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти в бік прооксидантів практично так само, як і тетраклорметан; 2 - прояв окисного стресу на тлі дії цих гепатотропних токсичних сполук проявлявся схожим чином у тварин різного віку та 3 - індукція та ймовірний розвиток фіброзу печінки здійснюється на тлі окисного стресу, як і більша частина відомих патологій.

Незважаючи на використання широкого набору біохімічних показників як маркерів фіброзу печінки, як і раніше, найнадійнішим із них залишаються гістологічні критерії. З метою підтвердження впливу багаторазових послідовних введеннь сірчаноокислої міді на розвиток фіброзу печінки було визначено розвиток позаклітинного сполучно-тканинного матриксу. Виявили, що через 6 діб після першого введення сірчаноокислої міді навколо печінки формувалася капсула зі сполучної тканини, що призводило до "зрощення" всієї лопатей печінки щура в єдину морфоструктуру (рис. 3.22 Б). На гістологічному рівні спостерігали виражене та значне збільшення капсули Гліссона, яка була інкорпорована імунокомпетентними клітинами.

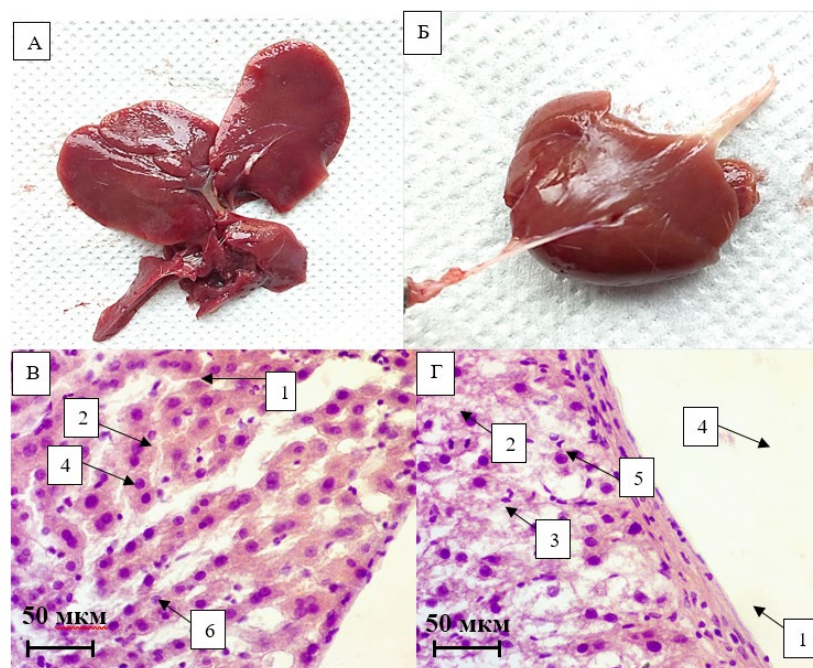


Рис. 3.22. Вигляд печінки контрольної групи тварин (А) і печінки після триразового послідовного внутрішньочеревного введення сульфатом міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 годин між введеннями (Б); гістологічний

препарат печінки інтактних (контрольних) щурів (В) і печінки після введення сульфатом міді (Г) : Формування з'єднувальної тканини навколо печінки, зміна форми лопастей печінки та їх зрощування з'єднувальною тканиною після інтоксикації сірчаноокислою міддю (В), вид печінки контрольної групи тварин (Г): 1 — капсула Гліссона, 2 — клітини Іто, 3 — лімфоцити, 4 — ендотеліоцити, 5 — простір Діссе, 6 — аутоліз гепатоцитів, (фарбування гематоксилін-еозін, microscope Carl Zeiss, camera SIGETA M3CVOS 14000, magnification 200).

Як відомо, іони міді виконують чималу кількість функцій в організмі та передусім регуляції ферментативної активності, а нестача цього елемента призводить до проявів різноманітних порушень розвитку та формування патологій [359]. Водночас надходження надлишку, а точніше порушення еволюційно сформованого балансу цього, як і інших мікроелементів, залежно від ступеня відхилення від природного балансу для біологічного виду індукує різні варіанти адаптивних відповідей, від зворотніх функціональних змін до хронічних патологій і летальності. Дослідження механізмів адаптації та особливо хронічних патологій, зокрема й фіброзів печінки, важливе не тільки для розуміння таких фундаментальних біологічних явищ, як адаптаціогенез і незворотність біологічних процесів, а й як модель для розроблення підходів можливого регулювання цими процесами. У цьому контексті розробка та використання моделі Cu-індукованого фіброзу є перспективною при вирішенні таких задач.

Багаторічні дослідження механізмів токсичності надмірної кількості іонів міді в організмі показали, що через кілька годин (час прояву залежить від дози) має місце внутрішньосудинний гемоліз еритроцитів. Така гемолітична анемія може розвиватися внаслідок як прямої дії іонів міді на мембрани, так і за рахунок пригнічення активності ферментів, зокрема й антиоксидантних (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, що було показано і в наших дослідженнях). Поряд із цим іони міді можуть окислювати гемове залізо з утворенням метгемоглобіну, що супроводжується гіпоксією [360].

Ще однією мішенню для іонів міді є печінка, а точніше дисфункція мітохондрій у печінці, що супроводжується проявом окисного стресу, що було

показано і в цьому дослідженні. Поряд зі збільшенням продукції вільних радикалів іони міді інгібували активність антиоксидантних ферментів (рис. 3.20; 3.21). Ще одним патогенетичним фактором іонів міді є некроз гепатоцитів (рис. 3.22, Г). Водночас необхідно зазначити, що некротичні порушення клітин печінки не настільки виражені, як у випадку інших цитотоксичних факторів, зокрема тетрахлорметану. Поряд із незначним некрозом клітин, надлишок іонів міді сприяє прояву синдрому синусоїдальної обструкції, що подібний до синдрому Бадда-Кіарі, з тією лише різницею, що кровотік заблокований лише в дуже дрібних кровоносних судинах печінки, а не у великих кровоносних судинах у печінці або поза печінкою. Блокування відтоку крові з печінки та застій, породжують ішемічні ушкодження, переповнення печінки кров'ю та збільшення в розмірах і масі (рис. 3.23А). При цьому мало місце і невелике збільшення маси селезінки (рис. 3.23 Б).

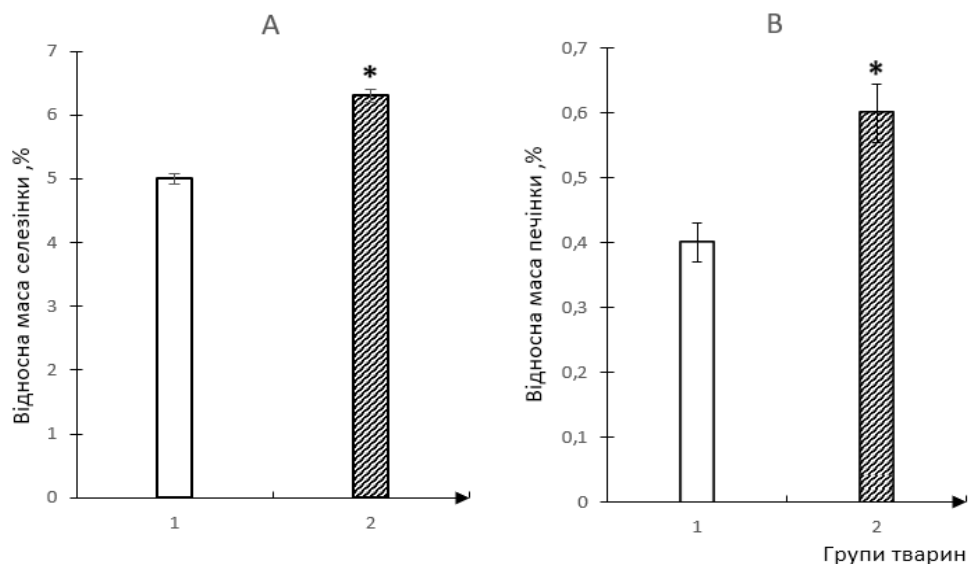


Рис. 3.23 Відносна маса печінки (А) та селезінки (В) у групі контрольних тварин (1) та групі, що отримувала сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси тіла тричі з інтервалами між введеннями у 48 годин (2). Представлено середні значення з 5-ти тварин у групі. * відмічені відмінності між групами для яких $P \leq 0,05$

У низці випадків у деяких тварин ми спостерігали появу асцити, який проявлявся в накопиченні рідини в черевній порожнині, що пояснюється портальною гіпертензією.

Продукти гемолізу еритроцитів сприяють пошкодженню канальцевого епітелію нирок, що також може призводити до ниркової недостатності. При формуванні ниркової недостатності спостерігається затримка екскреції цитотоксичних компонентів, що утворюються після цитолізу, зокрема й накопичення іонів міді. Було показано, що через 45 хвилин після введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в дозі 2,5 мг/100 г маси тіла вміст міді в нирках значно може перевищувати її вміст у печінці та селезінці, які є основними мішенями для іонів міді (рис. 3.24)

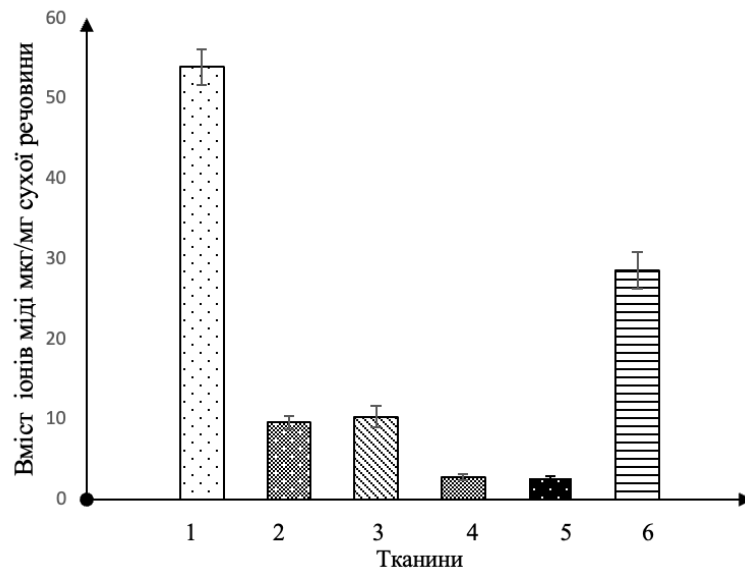


Рис. 3.24. Вміст іонів міді в п'яти типах тканин (1), а саме в печінці (2), селезінці (3), серці (4), головному мозку (5) і нирках (6), за 45 хвилин після одноразового введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді в дозі 2,5 мг/100 г маси тіла. Наведено середні значення з трьох незалежних експериментів та їхні стандартні помилки.

Можна припускати, що затримка іонів міді в нирках є додатковою прямою токсикогенною дією міді на функціональну активність нирок.

Пряма дія іонів міді на еритроцити та інші типи клітин крові, передусім лейкоцити, може супроводжуватися формуванням адаптивної відповіді, що буде

спрямована на збереження клітинно-гомеостатичного рівня, тобто компенсаторних ("відповідних") реакцій організму. У цьому відношенні найбільший інтерес представляє відповідна реакція кісткового мозку на такі впливи, як основного органу кровотворення та імуногенезу.

3.4.3. Роль кісткового мозку в розвитку фіброзу печінки у молодих і старих тварин за індукції сірчаноокислою міддю і тетрахлорметаном

Усі типи клітин у кістковому мозку можуть бути представлені як остаточно диференційовані, тобто морфологічно ідентифіковані: мієлоцити, метамієлоцити, паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли, лімфоцити, базофіли та моноцити, та морфологічно неідентифіковані типи клітин, до яких відносяться стовбурові клітини та комітовані (остаточно не диференційовані) клітини. У кістковому мозку молодих контрольних тварин на частку морфологічно ідентифікованих типів клітин припадало близько 60%, а 40% становили неідентифіковані, тобто незрілі типи клітин (рис. 3.25). У той же час, у старих контрольних тварин це співвідношення становило 80% ідентифікованих і тільки 20% неідентифікованих (попередники) клітин (рис.3.25).

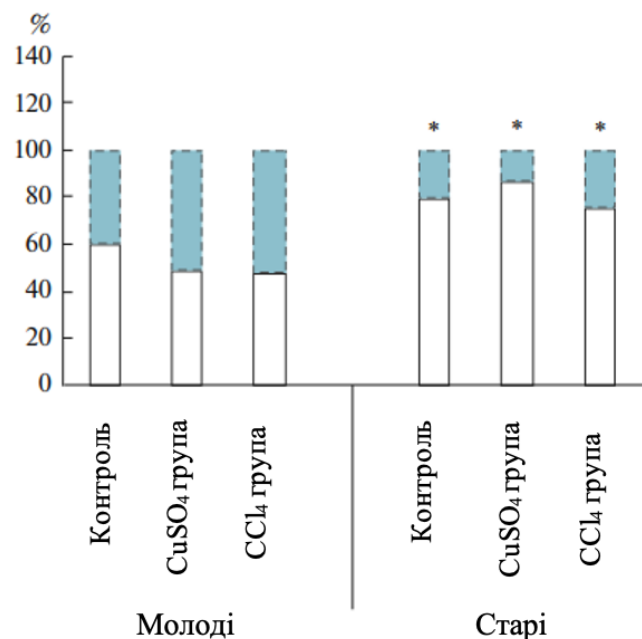


Рис 3.25. Кількість морфологічно ідентифікованих клітин (□) і кількість неідентифікованих клітин (■) у відсотках від загальної кількості клітин кісткового мозку, отриманих у молодих та старих тварин відповідно у групі

контрольних, у групі, що та сірчанокислу мідь, та отримували тетрахлорметан. Наведено середні значення, отримані у 8 тварин кожної групи, та їхні стандартні помилки. *- варіанти, для яких $P \leq 0,05$ старих тварин порівняно з молодими, за критерієм Манна-Уїтні.

Ці результати можуть вказувати на те, що диференційовані (зрілі) клітини, а це насамперед імунокомпетентні клітини, у старих тварин довше "затримуються" у кістковому мозку, або повільніше транспортуються до кровотоку, порівняно з молодими, або ж у кістковому мозку старих тварин зменшений пул клітин попередників. Звісно, це припущення потребує подальших досліджень цього важливого питання, однак цей показник може бути корисним під час оцінки функціональних характеристик кісткового мозку при моделюванні фіброзу печінки.

Виявили, що співвідношення між ідентифікованими та не ідентифікованими морфотипами клітин кісткового мозку молодих і старих тварин змінювалися по-різному залежно від індуктора фіброзу (сірчанокиислої міді або тетрахлорметану). Так, на тлі розвитку фіброзу печінки кількість морфологічно ідентифікованих типів клітин у кістковому мозку у молодих тварин зменшувалася за умови збільшення кількості неідентифікованих клітин незалежно від типу індуктора (рис. 3.25). У той же час, у старих тварин, навпаки, кількість морфологічно ідентифікованих типів клітин у кістковому мозку зменшувалася після введення їм сірчанокиислої міді та залишалася на рівні контролю за умови CCl_4 -індукованого фіброзу (рис.3.26).

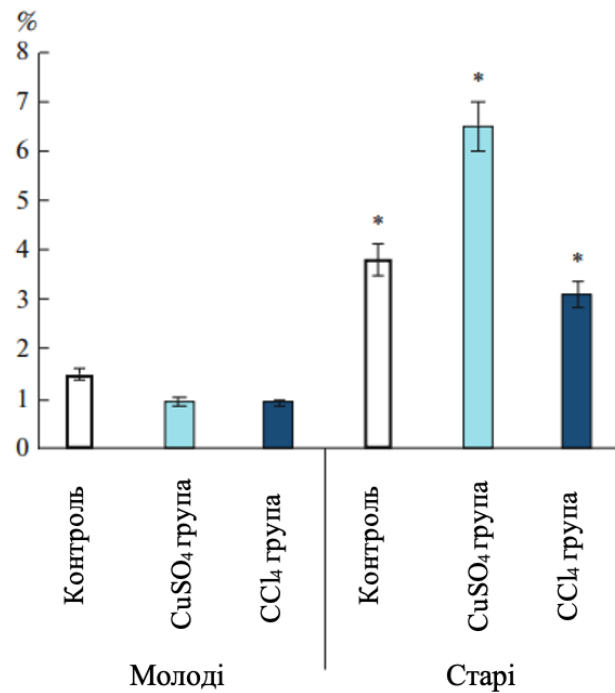


Рис. 3.26. Співвідношення у відсотках ідентифікованих до неідентифікованих типів клітин у кістковому мозку у молодих і старих тварин відповідно для контрольної групи, групи із Cu-індукованим фіброзом печінки та групи із CCL₄-індукованим фіброзом. Представлено середні значення та їхні стандартні помилки, отримані у 8 тварин у кожній із груп. * - відмінності між молодими і старими тваринами, для яких $P \leq 0,05$, ** - відмінності між контрольними і дослідними групами, для яких $P \leq 0,05$, за критерієм Манна-Уїтні.

Ці результати дають змогу зробити висновок, що кістковий мозок молодих і старих контрольних тварин різниться за вмістом різних типів клітин. Якщо у молодих тварин було індуковано фіброз печінки різними токсикогенними сполуками, то співвідношення між ідентифікованими та не ідентифікованими типами клітин у кістковому мозку не змінювалося порівняно з їхнім вихідним рівнем. Водночас індукція фіброзу печінки різними токсикогенними сполуками у старих тварин призводила до різних змін у співвідношеннях типів клітин кісткового мозку. Ці вікзалежні відмінності можуть відображати як зміни у швидкості транспорту клітин кісткового мозку до кровотоку, так і відмінності у швидкості проліферації та спрямованості диференціювання клітин у кістковому мозку молодих і старих тварин.

Під час визначення кількості паличкоядерних нейтрофілів, метамієлоцитів, лімфоцитів, сегментоядерних нейтрофілів, мієлоцитів, еозинофілів, базофілів і моноцитів виявили, що в кістковому мозку контрольної групи старих тварин містилося на 160% більше лімфоцитів порівняно з контрольною групою молодих тварин, а сегментоядерних нейтрофілів - на 35% менше відповідно (рис. 3.27 а). Відмінності між молодими і старими тваринами контрольних груп за рештою типів клітин, що ідентифікуються, були незначними (рис. 3.27 а).

Як видно з даних, представлених на рис. 3.27 б, обидві гепатотоксичні сполуки спричиняли різні зміни в кількості імунокомпетентних клітин у кістковому мозку, і ці кількісні зміни були різними для молодих та старих тварин із Cu-індукованим та із CCl_4 -індукованим фіброзом. Так, наприклад, у старих тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки кількість базофілів у кістковому мозку зменшувалася порівняно з їхнім контрольним рівнем, а в молодих в цей час, їхня кількість, навпаки, збільшувалася порівняно з їхнім віковим контролем (рис. 3.27 б). При цьому необхідно зазначити, що кількісні зміни порівняно з вихідними (контрольними) значеннями були більшою мірою виражені для тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки порівняно з CCl_4 -індукованим фіброзом, як для молодих, так і для старих тварин (рис. 3.27 б, с).

Наявні численні дані та результати, отримані в цій роботі, дають змогу стверджувати, що кістковий мозок бере активну участь у формуванні адаптивної відповіді на фібротичні зміни в печінці. З огляду на те, що іони міді не накопичуються в кістковому мозку, можна припускати, що зміни у функціональній активності кісткового мозку на тлі Cu-індукованого фіброзу зумовлені не прямою дією цих токсичних сполук, а зміною характеристик клітинних ніш у кістковому мозку експериментальних тварин. Зміна характеристик редокс-системи, утворення різноманітних DAMP, що відбуваються у тварин із фіброзом, розрізняються за своїми характеристиками для різних індукторів, формують в організмі молодих і старих тварин специфічні низькомолекулярні патерни, які системно регулюють формування адаптивної відповіді організму у відповідь на дії гепатотоксичних сполук.

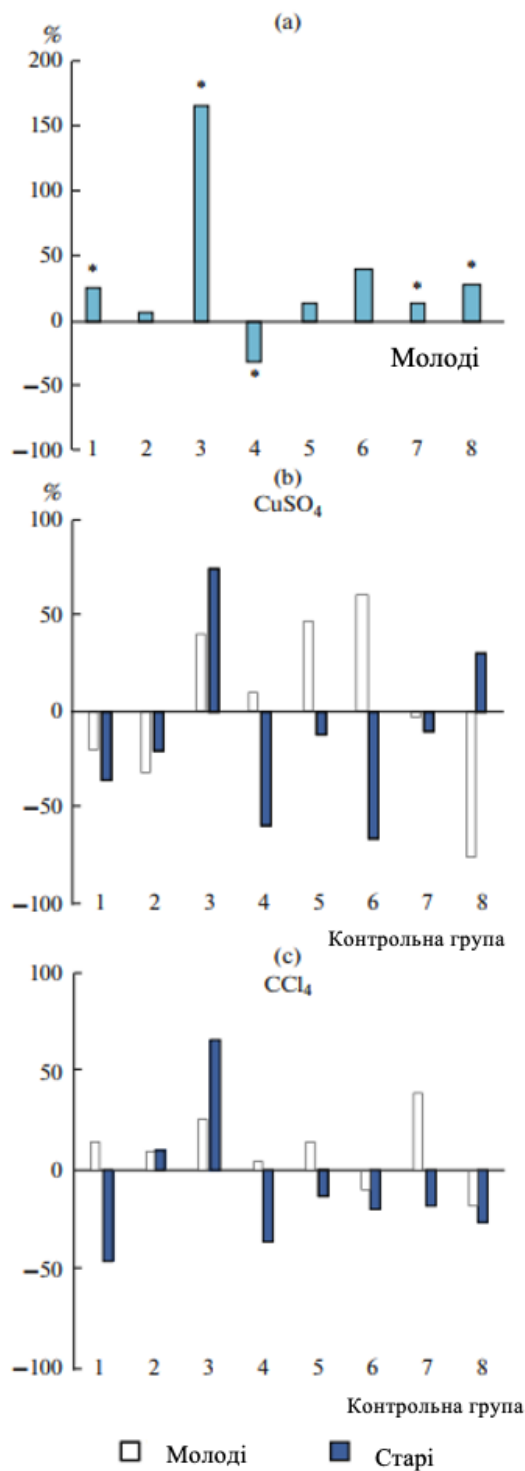


Рис. 3.27. Відмінності в кількості паличкоядерних нейтрофілів (1), метамієлоцитів (2), лімфоцитів (3), сегментоядерних нейтрофілів (4), мієлоцитів (5), еозинофілів (6), базофілів (7) і моноцитів (8) у старих тварин у відсотках порівняно з молодими, які прийняті за нульовий рівень (а) та зміни кількості цих типів клітин у молодих (□) та старих тварин (■) тварин у відсотках на тлі розвитку Cu-індукованого фіброзу (b) та відповідно на тлі CCl₄-індукованого фіброзу (c) порівняно з їхніми контрольними значеннями, які прийняті за нульовий рівень. Представлено середні значення та їхні стандартні помилки, у кожному з варіантів було використано по 8 тварин. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ старих порівняно з молодими, за критерієм Манна-Уїтні.

Поряд із кількісними змінами типів клітин у кістковому мозку в молодих і старих тварин, а також тварин із фіброзом печінки, що були індуковані різними гепатотоксичними сполуками, можуть супроводжуватися і функціональними змінами імунокомпетентних клітин, що утворюються в цих тварин в екстремальних умовах. Відомо, що одні й ті самі морфологічні типи клітин можуть виконувати різні функції залежно від мікрооточення і "контексту", в

якому вони перебувають у даний момент. Про це побічно свідчать і результати цього дослідження. З метою експериментальної перевірки цього, у наступній серії експериментів, визначали здатність імунокомпетентних клітин кісткового мозку, що були отримані в контрольних тварин, тварин із Cu-індукованим і CCl_4 -індукованим фіброзом різного віку, до проліферації в системі *in vitro*. При цьому виходили з того, що проліферативна активність є одним із найважливіших показників функціональної активності клітин. Особливий інтерес у цьому відношенні становлять імунокомпетентні клітини, оскільки вони мають відносно коротку тривалість життя.

Під час визначення проліферативної активності готували суспензію клітин кісткового мозку так, щоб початкова концентрація клітин у всіх досліджуваних варіантах була однаковою та завжди становила 2 млн клітин на мл, а також, щоб клітини перебували на однаковому поживному середовищі та культивувалися в однакових умовах одночасно. Виявили, що за першу добу культивування кількість клітин кісткового мозку (ККМ), отримані в контрольних молодих тварин, збільшувалась на 60 % від початкової кількості, водночас за тих самих умов кількість ККМ, отримані в старих тварин, збільшувалась на 112 % (рис. 3.28 а). Надалі кількість клітин у культурі, отримані у молодих і старих тварин, збільшувалася однаковою мірою, і до третьої доби вони досягали стаціонарного рівня в первинній культурі (рис. 3.28а). Перевага ККМ у швидкості проліферації отриманих у старих контрольних тварин може пояснюватися збільшеною порівняно з молодими тваринами кількістю лімфоцитів (Рис. 3.28 а), які мають вищу швидкість проліферації порівняно з іншими типами клітин кісткового мозку.

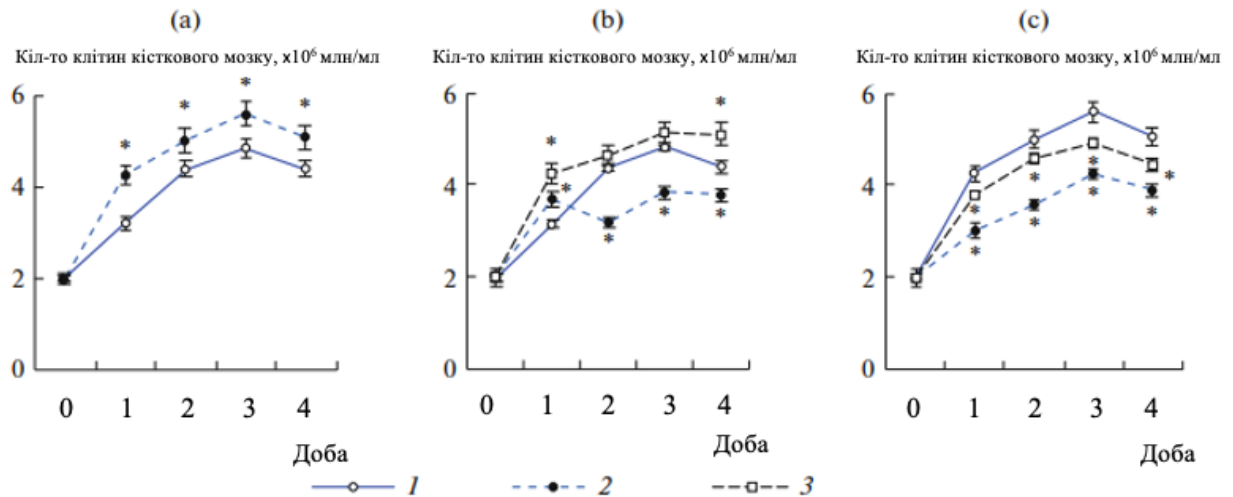


Рис.3.28. а- кількість клітин з 1 по 4 добу культивування на середовищі DMEM які були отримані у молодих (—) і старих (----) тварин: б- кількість клітин з 1 по 4 добу культивування на середовищі DMEM які були отримані у контрольних молодих тварин (1) у молодих із Cu-індукованим фіброзом (2) та CCl_4 -індукованим фіброзом (3): с- кількості клітин з 1 по 4 добу культивування на середовищі DMEM які були отримані у контрольних старих тварин (1) у старих із Cu-індукованим фіброзом (2) у старих із CCl_4 -індукованим фіброзом (3). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для 8 тварин у кожній експериментальній групі. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним віковим контролем, за критерієм Манна-Уїтні.

Не можна виключати й того, що характеристика ніш, у яких відбувається диференціювання клітин кісткового мозку у старих тварин, відрізняється від таких у молодих тварин, у результаті чого клітини кісткового мозку, що утворюються, можуть мати незначні структурно-функціональні відмінності у тварин різного віку. До таких вікзалежних особливостей клітин кісткового мозку можна зарахувати і відмінності в іонному складі клітин, що впливає на швидкість поділу клітин. У цьому відношенні найбільший інтерес представляє вміст іонів кальцію. Як відомо, кальцій виконує надзвичайно різноманітні функції в клітині й організмі загалом, зокрема є вторинним месенджером і бере участь у регуляції проліферації клітин. Можна вважати, що "вибір" функції поліфункціональних молекул, до яких належить і кальцій, може визначатися характеристикою

мікрооточення самої молекули. Є роботи, в яких показано, що збільшення внутрішньоклітинного вмісту кальцію призводить до активації проліферації клітин [361]. Вміст іонів кальцію визначали в клітинах кісткового мозку, отриманих у молодих і старих тварин за ступенем флуоресценції специфічного для цього іона флуоресцентного зонда Fluo-3. (рис. 3.29).

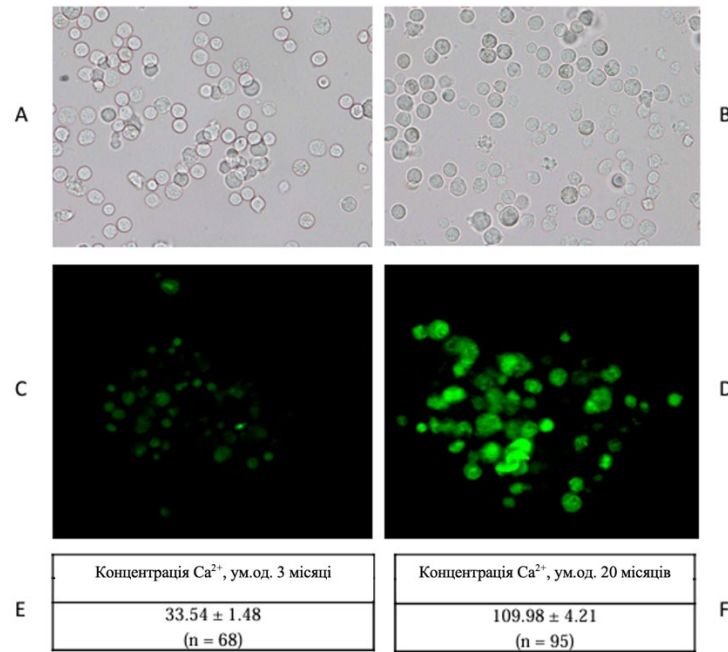


Рис. 3.29. Популяція клітин кісткового мозку молодих (A) і старих (B) тварин, світлова мікроскопія Carl Zeiss Primo Stari LED (Німеччина). Флуоресценція зонда Fluo-3 індикатор кальцію в клітинах молодих (C) і старих (D) тварин, конфокальна лазерна скануюча мікроскопія LSM 510 META Carl Zeiss (Німеччина) та інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях в клітинах кісткового мозку, отриманих від молодих (E) і старих (F) тварин, збільшення $\times 100$.

Виявилося, що кількість кальцію в клітинах кісткового мозку, отриманих від молодих тварин, була в 3 рази меншою, ніж у клітинах старих тварин (рис. 3.29).

Отримані результати дають змогу вважати, що вища проліферативна активність ККМ у культурі клітин, отриманих із кісткового мозку старих тварин, може бути пов'язана як із більшою кількістю в них лімфоцитів, так і зі зміненим складом компонентів клітин порівняно з молодими тваринами принаймні за вмістом кальцію. Необхідно зазначити, що визначення проліферативної

активності клітин у культурі відображає їхні потенційні можливості до розмноження і з цих даних не випливає, що в організмі клітини кісткового мозку старих тварин реалізують цей потенціал.

Аналізуючи особливості проліферації клітин кісткового мозку в культурі, необхідно зазначити, що якщо ККМ було виділено в молодих тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки, то протягом першої доби культивування їхня кількість збільшувалась навіть дещо швидше від контрольного рівня, проте на 2-гу добу їхня кількість зменшувалась та не змінювалася в часі, при цьому їхня кількість була значно меншою порівняно з контролем у цей час (рис. 3.28 b). Якщо ККМ були отримані в молодих тварин із CCl₄-індукованим фіброзом печінки, то їхня кількість збільшувалася навіть швидше ніж у контролем (рис. 3.28 b).

Отже, клітини кісткового мозку, що утворюються на тлі різних індукторів фіброзу, різняться за своїми проліферативними властивостями, а можливо й за іншими функціональними особливостями.

Інші проліферативні характеристики ККМ були отримані для клітин, виділених у старих тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки та CCl₄-індукованим фіброзом печінки (рис. 3.28 c). Так, динаміка збільшення кількості клітин у процесі культивування була однаковою для всіх досліджуваних варіантів. При цьому швидкість проліферації була найвищою в контролі, незначно нижчою для ККМ із CCl₄-індукованим фіброзом печінки та значно нижчою за контроль і CCl₄-індукований фіброз печінки, якщо ККМ отримували в старих тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки (рис. 3.28 c).

Незважаючи на те, що кількість лейкоцитів у кістковому мозку старих тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки та CCl₄-індукованим фіброзом печінки залишалася підвищеною однаковою мірою, проліферативна активність клітин, отриманих у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки, була вірогідно нижчою від клітини тварин із CCl₄-індукованим фіброзом печінки. Отримані дані дають змогу вважати, що зміна мікрооточення для клітин кісткового мозку, у цьому разі після введення тваринам сірчаної кислоти міді та тетрахлорметану, супроводжувалась не лише зміною кількості різних типів клітин у кістковому

мозку, а й у цих типів клітин формувались різні функціональні характеристики, принаймні за проліферативною активністю в культурі клітин.

Отже, проліферативна активність клітин кісткового мозку у тварин із Cu-індукованим фіброзом була значно нижчою за проліферативну активність тварин із CCl₄-індукованим фіброзом печінки, і більш того, клітини кісткового мозку по-різному змінювали свій проліферативний потенціал у відповідь на дії різних індукторів у молодих і старих тварин. Особливості розвитку фіброзу печінки залежать не тільки від характеристик індуктора цього патологічного процесу, а й від віку тварин, який може "модифікувати" відповідь на дії потогенетичних чинників, і в цьому процесі важливу роль відіграє кістковий мозок, як центральний орган імуногенезу. Подальші дослідження ролі кісткового мозку з урахуванням його вікових особливостей у процесах розвитку фіброзу печінки дають змогу розробити системний підхід до діагностики та лікування захворювань печінки.

Отримані дані дають змогу припускати, що зміна мікрооточення для клітин кісткового мозку, в даному випадку після введення тваринам сірчаноокислої міді та тетрахлорметану, супроводжувалась не лише зміною кількості різних типів клітин у кістковому мозку, а й у цих типів клітин формувались різні функціональні характеристики, принаймні, щодо здібностей розмножуватись у культурі. На наступному етапі роботи визначали здатність імунокомпетентних клітин до фагоцитозу.

Виявили, що фагоцитарний індекс (характеризує здатність фагоцитуючих клітин поглинати інфекційні частинки) у старих контрольних тварин був на 28% вищим за показник молодих тварин, тобто їх поглинаюча здатність була вищою, ніж у молодих. Фагоцитарне число було на 23% вище у старих тварин порівняно з молодими (табл.3. 10).

Таблиця 3.10

Показники активності фагоцитозу та нейтрофілів у НСТ-тесті у молодих і старих контрольних тварин та тварин цих двох вікових груп після індукції в них CCl_4 -індукованого фіброзу печінки.

Вік тварин	Група	фагоцитарний індекс	Фагоцитарне число	Активність нейтрофілів	
				спонтанні	зимозан- індуковані
3х-місячні (молоді)	Контроль, $n = 8$	32.1 ± 0.8	2.1 ± 0.2	44.1 ± 1.9	58.0 ± 2.1
	CCl_4 - індукований фіброз, $n = 8$	$25.8 \pm 1.8^*$	$1.8 \pm 0.1^*$	48.0 ± 3.1	$44.2 \pm 2.4^*$
20ти- місячні (старі)	Контроль, $n = 8$	41.1 ± 1.7	2.6 ± 0.1	40.2 ± 2	47.8 ± 2.4
	CCl_4 - індукований фіброз, $n = 8$	$26.5 \pm 2.0^*$	$1.9 \pm 0.12^*$	$64.6 \pm 4.1^*$	$31.5 \pm 2.4^*$

При $P \leq 0,05$, порівняно зі старими тваринами за критерієм Манна-Уїтні

У старих тварин після індукції фіброзу тетрахлорметаном спостерігалось зниження фагоцитарного індексу на 36% порівняно з контролем, а в молодих тільки на 20%, і, як наслідок, вони були однаковими за фіброзу (табл. 3.10).

Як було показано, багаторазові послідовні введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді та тетрахлорметану зміщують рівновагу в редокс-системі в бік окисників, тобто здатні індукувати так званий окиснювальний стрес. Найчастіше окислювальний стрес розглядають як індуктор патологічних процесів [362]. Однак, процес генерації активних форм кисню в нейтрофілах, так званий респіраторний вибух, "використовується" клітинами імунної системи для інактивації бактеріальних клітин і є однією з ефективних ланок фагоцитозу [363]

Для оцінки респіраторного вибуху якій забезпечує неспецифічний імунітет [364] нейтрофілів *in vitro* використовується реакція відновлення ними нітросинього тетразолію (НСТ-тест). НСТ-тест може проводитися як при стимуляції нейтрофілів зимозаном у системі *in vitro* (індукований НСТ-тест), так і без додаткової стимуляції цього процесу (спонтанний НСТ-тест). Під час реакції НСТ-тесту відбувається відновлення нітросинього тетразолію до нерозчинного

диформагану, що відкладається в нейтрофілах у вигляді темно-синіх гранул, які легко визначити шляхом мікроскопування отриманих зразків.

Виявили, що швидкість ферментативної активності, що забезпечують відновлення нітросинього тетразолію в нейтрофілах без додаткової стимуляції в НСТ-тесті була однаковою для нейтрофілів молодих і старих контрольних тварин (табл. 3.10). Під час визначення можливості додаткової стимуляції фагоцитозу нейтрофілів було показано, що зимозан стимулював швидкість відновлення тетразолію в молодих щурів на 31% порівняно з вихідним (спонтанним) рівнем (табл. 3.10), а в старих він залишався на рівні контролю (табл. 3.10).

Тобто нейтрофіли, отримані від старих інтактних тварин, виявляли таку саму фагоцитарну активність, як і інтактні контрольні щури. Однак нейтрофіли молодих тварин мали, умовно кажучи 30% потенціал, тоді як нейтрофіли старих тварин не мали цього потенціалу додаткової стимуляції.

У тому разі, якщо нейтрофіли були отримані в молодих тварин із CCl_4 -ін. фібр. печінки, то їхня спонтанна активність (без додаткової стимуляції) достовірно не відрізнялася від їхнього контрольного варіанту (табл. 3.10). При цьому зимозан не стимулював активність нейтрофілів, тобто у них був відсутній резерв активності (табл. 3.10).

Несподіваною і дуже цікавою виявилася відповідь нейтрофілів, отриманих у старих тварин із CCl_4 -індукованим фіброзом печінки. Спонтанний рівень нейтрофілів перевищував їхню активність порівняно з контролем на 60 %, а після внесення зимозану як стимулятора активність не стимулювалася порівняно зі спонтанним рівнем, а навіть була у 2 рази нижчою за спонтанний рівень старих (табл. 3.10).

Отже, нейтрофіли старих тварин із CCl_4 -індукованим фіброзом печінки були навіть активнішими за нейтрофіли молодих після стимуляції зимозаном, однак у них повністю був відсутній функціональний резерв.

Зупиняючись на загальному підсумку функціональних характеристик імунокомпетентних клітин молодих і старих тварин та впливу на них фіброзу печінки, можна відзначити наступне: 1 - на тлі розвитку фіброзу відбулося

змінення якісних і кількісних характеристик клітин кісткового мозку, 2 - на якісні і кількісні характеристики клітин кісткового мозку впливає вік тварин, 3 - зміни клітин кісткового мозку ймовірно обумовлені непрямою дією гепатотоксичних сполук, а індуковані опосередковано, через зміни показників редокс-системи, появою різних цитотоксичних сполук - DAMP на тлі розвитку цієї патології і перебудовою інших регуляторних систем, які функціонують як єдина регуляторна система організму, 4 - ці особливості необхідно враховувати при розробці систем відновлення функціональних особливостей печінки.

Розглядаючи механізм Cu-індукованого фіброзу печінки, слід зазначити, що після трьох послідовних ін'єкцій сульфату міді експериментальним тваринам, іони міді виявлялися у сироватці крові, вони накопичувалися в печінці та селезінці у відносно великих кількостях, а наявність їх у великій кількості в нирках свідчить, з одного боку, про те, що вони швидко виводяться з організму при великих дозах, а з іншого, про порушення функцій нирок і як наслідок додаткової інтоксикації організму на тлі фіброзу печінки, тобто має місце системні зміни в організмі.

На молекулярному рівні іони міді інгібували активність ферментів циклу Кребса (аконітаза — зниження в 2 рази), антиоксидантні ферменти (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутаредоксин — на 40–50%), в мітохондріях печінки, і це супроводжувалося збільшенням кількості продуктів вільнорадикальних реакцій, як у печінці, так і в організмі в цілому, про що свідчить їх значне збільшення в сироватці крові.

Паралельно іони міді проявляли помірне цитотоксичне дію на клітини печінки [365]. У кінцевому підсумку це може проявлятися в ініціюванні некрозу і/або апоптозу гепатоцитів. Морфологічні порушення гепатоцитів виявляються на гістологічних препаратах. Характерною особливістю для Cu-індукованого фіброзу печінки є значне збільшення товщини капсули Гліссона, в яку були інкорпоровані імунокомпетентні клітини, що певним чином підтверджує важливу роль клітин кісткового мозку в розвитку і/або усуненні фіброзу печінки.

Відомо, що печінка виконує широкий спектр функцій, а зміни в її структурно-функціональному стані призводять до порушення роботи більшості

систем організму. Так, печінка бере участь в видаленні CD^{8+} -Т-кліток шляхом антиген-опосередкованої гибелі клітин [365, 366], гальмування функції детоксикації, яке відбувається на тлі високих концентрацій іонів міді, особливо в разі тривалого або хронічного її впливу [311], може супроводжуватися збільшенням кількості аутоантитіл, що може призводити до "вторинного" ефекту інгібування функції печінки.

Ключовим фактором фіброгенезу печінки є трансформуючий фактор росту (TGF- β 1) [367, 368]. Продукти вільнорадикальних реакцій, цитокіни та продукти деградації гепатоцитів (DAMP) індукують синтез TGF- β 1 у зірчастих клітинах, забезпечуючи їх перехід в активовані зірчасті клітини і трансформацію їх в фібробластоподібні клітини, які активно синтезують колаген та інші елементи сполучної тканини. Отримані результати про інтенсивне утворення сполучної тканини навколо печінкових лопаток на тлі Cu-індукованого фіброзу печінки (рис. 3.22), можуть побічно свідчити про активацію зірчастих клітин печінки після багаторазових послідовних введень сульфату міді тваринам. Більше того, не можна виключити того, що на тлі Cu-індукованого фіброзу печінки відбувається і посилення продукції сполучної тканини гепатоцитами та іншими типами клітин [369]. Збільшення продукції сполучної тканини, як і інших біологічних процесів, має двозначне значення. З одного боку, це відповідна реакція на наявність вогнеборцевого процесу, яка спрямована на усунення відхилень, що виникли від встановленого гомеостатичного рівня, і це може бути реалізовано збільшенням процесів регенерації тканини або гепетрофії клітин [337]. З іншого боку, надмірний ріст сполучної тканини призведе до формування шрамів з подальшим формуванням спайкової хвороби, зменшенням кількості гепатоцитів та переходом фіброзу в цироз. Отже, індукція сполучної тканини є необхідною, як адекватна відповідь на вогнеборцевий процес та потенційно фактор регенерації пошкодженої тканини, проте цей процес повинен бути вчасно зупинений, тобто має бути збережений баланс між синтезом і розпадом, так само як і баланс між прооксидантами та антиоксидантами. У підтримці цього тонкого балансу беруть участь зірчасті клітини. Показано, що після "ушкодження" загрози подальшого

руйнування гепатоцитів та "вироблення" достатньої кількості сполучної тканини, яка може збігатися з збільшенням жирових включень у зірчастих клітинах, зменшенням в них ретиноїдів та інших метаболітів, зірчасті клітини починають виробляти металопротеїнази [370]. Матриксні металопротеази — це сімейство позаклітинних цинкзалежних ендопептидаз, здатних руйнувати всі типи білків позаклітинного матриксу [371]. На сьогодні виділено приблизно 30 ферментів цієї родини. Було показано, що вони беруть участь в ремоделюванні тканин, ангіогенезі, проліферації, міграції та диференціюванні клітин, апоптозі та інгібуванні росту пухлини [370, 372].

Отже, процес індукції фіброзу можна поділити на кілька умовних етапів: на першому етапі в організмі накопичуються токсичні сполуки (DAMP), переважно в печінці, вони розподіляються по різних компартментах клітин і тканин (рис. 3.30, I). На наступному етапі формується специфічний метаболічний паттерн з медіаторів запалення, продуктів клітинного розпаду та продуктів вільнорадикальних реакцій, що призводить до зсуву рівноваги в бік прооксидантів (рис. 3.30, II). Далі ці продукти активують зірчасті клітини та фіброгенез як термінову реакцію, спрямовану на усунення розпаду печінки. На цій стадії проліферація гепатоцитів незначна, і в подальшому на цьому етапі формується сполучнотканинна матриця (рис. 3.29, III). І, нарешті, на четвертому етапі може відбуватися активація матриксних металопротеїназ і формування певних співвідношень між синтезом і розпадом сполучної тканини, що впливає на подальший вибір стратегії розвитку подій (рис. 3.30, IV).

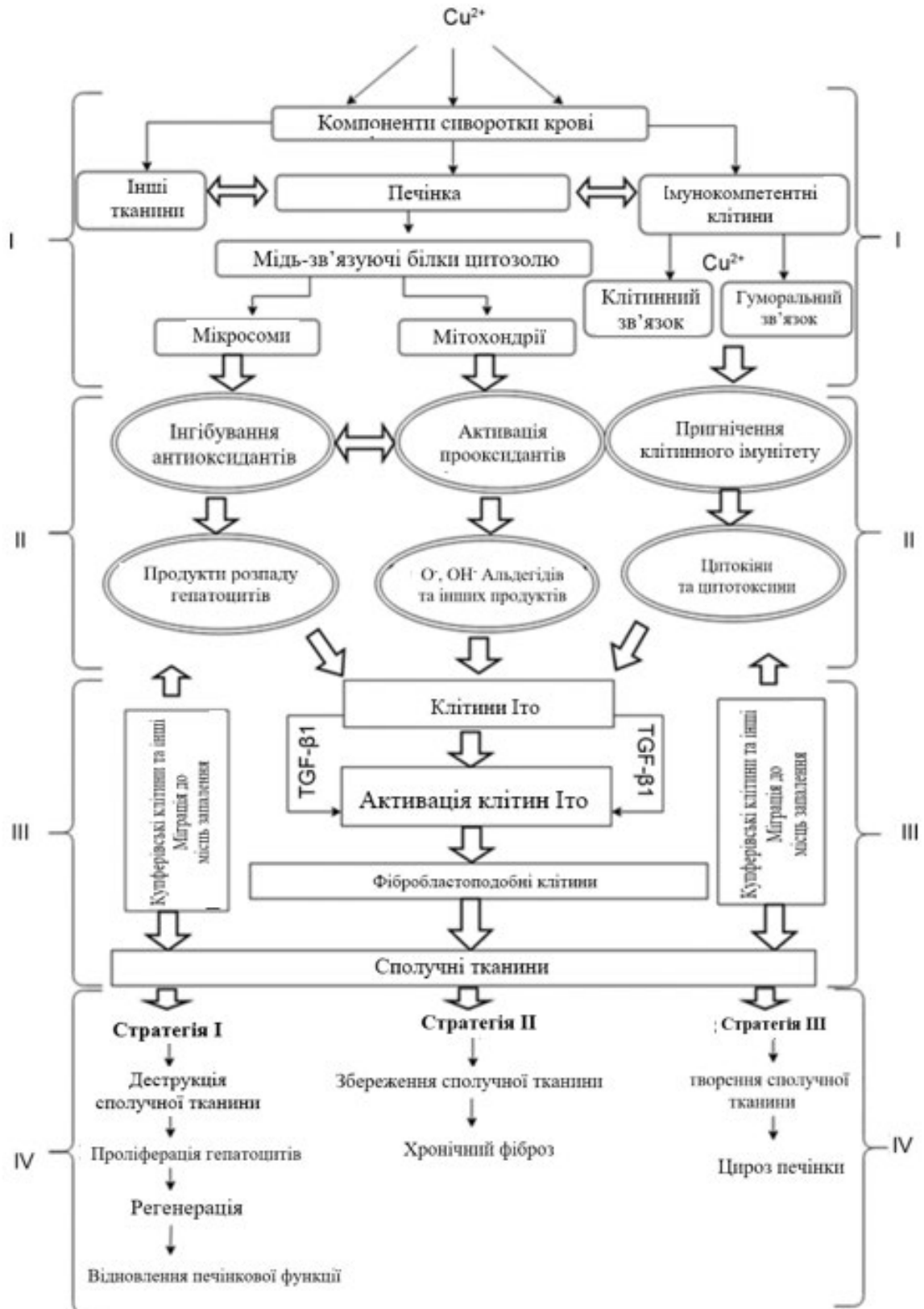


Рис. 3.30. Схема, що демонструє ієрархію формування Cu-індукованого фіброзу печінки.

Метаболічна ситуація, що утворилася на тлі тривалої дії іонів міді може призвести до розвитку кількох стратегій адаптації.

Стратегія I — посилення проліферації гепатоцитів, руйнування сполучної тканини шляхом активації металопротеїназ, тобто справжня регенерація печінки з подальшим відновленням її гомеостатичних показників до значень, близьких до початкових характеристик (рис. 30).

Стратегія II — підтримання балансу між синтезом і розпадом компонентів сполучної тканини на новому сформованому рівні, що супроводжується повільним заміщенням пошкоджених гепатоцитів сполучною тканиною; на фізіологічному рівні це проявляється як хронічний фіброз (рис. 3.20).

Стратегія III — з невідомих нам причин триває процес деградації гепатоцитів, можливо за рахунок «авторегуляції DAMP», яке ми спостерігали у випадку розвитку постковідного синдрому [320], що супроводжується заміщенням клітин печінки сполучною тканиною. На фізіологічному рівні такі зміни проявляються як цироз печінки (рис. 3.30).

Варто відзначити, що всі молекулярні та клітинні процеси, що відбуваються в печінці в цей час, мають адаптивний характер у тому сенсі, що організм «вибирає» одну з трьох можливих стратегій, оптимальних для даного моменту часу, тобто використовує принцип «ТОП» [337]. Доказом адаптивної, а не патогенетичної функції описаних змін є проявлення у цих тварин вираженого гормезисного ефекту на летальні дози мідного купоросу [372]. Однак, оскільки ці зміни є необоротними і в кінцевому підсумку призводять до смерті, ми характеризуємо їх як патологічні, тобто загрозливі для життя.

Якщо це так, то чому адаптивні реакції, які мають бути спрямовані на виживання в екстремальних умовах, призводять до розвитку патологій і збільшують імовірність настання смерті?

Ми вважаємо, що вибір стратегії подальшої адаптації відбувається в момент досягнення такого метаболічного стану системи, коли вона має високий (найвищий) рівень "неоднорідності" або гетерогенності елементів, що входять до цієї системи. На цей тимчасовий момент метаболічна система перебуває в

найбільшому відхиленні від свого гомеостатичного рівня. Для такого метаболічного рівня характерні дві фундаментальні особливості: стрибкоподібний перехід до встановлення нового метаболічного паттерну з новими відношеннями складових її елементів; на цей тимчасовий період система надзвичайно чутлива до ендо- та екзофакторів, тобто у цей момент можна отримати максимально можливу відповідь системи навіть на незначні зовнішні фактори (лікарські препарати, продукти харчування, фізичні зміни параметрів системи), або іншими словами, адаптивна відповідь на зовнішні впливи буде залежати від функціонального стану системи в момент впливу, і це визначається ступенем віддалення від гомеостатичного рівноваги.

Отже, Cu-індукований фіброз печінки, як модель багатоетапного процесу розвитку адаптивних реакцій організму на екстремальні фактори середовища, може бути використана в розв'язанні таких фундаментальних проблем, як: механізми формування стратегій адаптації; проблеми принципової необоротності метаболічних стратегій і таке практичне завдання як можливості використання компонентів молока в профілактиці та лікуванні фіброзів печінки та розвитку продуктів функціонального харчування."

Необхідно зазначити, що така комплексна дія іонів міді на біологічні системи не є специфічною, тобто вони здатні впливати не лише на формування фіброзу, а проявляти й антибактеріальну активність [362]. Як відомо, формування резистентності до дії великої кількості антибіотиків призвели до необхідності пошуку альтернатив антибіотиків. У зв'язку з цим, дослідження антибактеріальної активності міді є надзвичайно актуальним завданням. На наступному етапі роботи було досліджено антибактеріальну активність іонів міді, міді в хелатній формі та міді у вигляді тонких (1-3 мкм) плівок, тому що мідь може перебувати в різних структурних станах.

3.4.4 Антибактеріальна активність сірчанокислої міді по відношенню до *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18

Відкриття пеніциліну А. Флемінгом у 1928 р. і промислове виробництво антибіотиків, яке розпочалося в 40-х роках 20 століття і триває дотепер, мало три

величезні наслідки. Стимулювало розвиток біотехнології, призвело до формування нової ери в медицині, а за 60-70 років активного застосування найширшого спектра антибіотиків, до нової глобальної проблеми - антибіотикорезистентності у більшості госпітальних інфекційних мікроорганізмів. Широке застосування антибіотиків у медичній та у ветеринарній практиці призвело до того, що антибіотики стали новим фактором еволюції для мікроорганізмів, які в підсумку сформували резистентність до широкого спектра антибіотиків [373]. Пошук і розробка нових антибактеріальних засобів стала одним з найактуальніших завдань сучасної біотехнології та медицини [374–376].

Відомо, що багато іонів металів мають антибактеріальну активність [377–379], а розвиток сучасних нанотехнологій і отримання наночастинок відновили інтерес до механізму їхньої дії на клітини бактерій [380–382]. Особливий інтерес у цьому відношенні становлять іони міді.

На те існує кілька причин: іони міді виявляють добре виражені антибактеріальні ефекти, при цьому вони значно дешевші та доступніші за іони срібла, що володіють подібною дією; мідь є есенціальним мікроелементом і, як правило, досить швидко елімінується з організму. Вона може перебувати в різних станах - металізованому, хелатованому з білками та іншими лігандами, формувати наночастинки або бути в іонній формі. Можна вважати, що різні стани міді можуть мати різну біологічну, зокрема й антибактеріальну активність. Дослідження впливу міді, нанесеної на тканину, міді в хелатній та іонній формах на ріст *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 дасть змогу розширити сфери її застосування як антибактеріального засобу і сприятимуть розумінню механізму її дії на біологічні системи. Можна припустити, що час біологічної дії (короткостроковий або пролонгований), так само може залежати від стану міді. Очікується, що в разі пролонгованої дії міді можна забезпечувати більш тривалу та вибіркову дію на бактерії та організм. У зв'язку з цим визначали антибактеріальну дію міді нанесеної на тканину, іонів міді та міді в хелатній формі на інтенсивність росту двох видів розповсюджених госпітальних бактеріальних інфекцій: *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 у системі *in vitro*

після одноразового первинного контакту з цими розповсюдженими госпітальними інфекціями.

Знання антибактеріальної активності міді, що перебуває в різних формах, може значно розширити сфери її застосування використання як антибактеріального агента та забезпечувати організм необхідним пролонгованим надходженням цього есенціального елемента в організм.

Тестування антибактеріальної активності іонів міді проводили на двох поширених інфекційних госпітальних видах бактерій.

Виявили, що при тестуванні стійкості *Staphylococcus aureus* 124 до дії іонів міді (водний розчин сірчаноокислої міді) методом паперових дисків за концентрації 0,25 і 0,5 г/л не чинили впливу на ріст цього штаму, а при збільшенні концентрації сірчаноокислої міді до 1 г/л мало місце незначне пригнічення росту, в той час як при 7 г/л зона затримки росту становила від 16 до 20 мм, що можна кваліфікувати як відносно високу чутливість *Staphylococcus aureus* 124. Подальше збільшення концентрації сірчаноокислої міді не впливало на пригнічення швидкості росту *Staphylococcus aureus* 124, тобто мало місце вихід кривої антибактеріальної активності на плато (Рис. 3.31 А, 1).

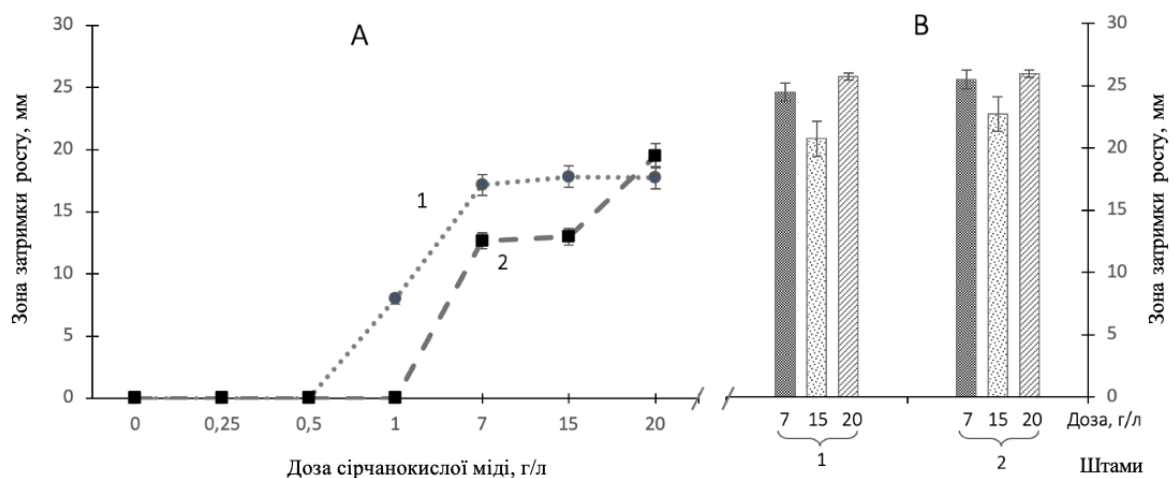


Рис.3.31. Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) при нанесенні CuSO_4 на паперові диски в різних дозах після культивування впродовж 24 годин при температурі 37°C (А) та в разі нанесення сірчаноокислої міді в дозах 7, 15 та 20 г/л у колодязі гелю - для *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) (В). Наведено середні значення та

їхні стандартні помилки з трьох незалежних експериментів. (* - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ для *Staphylococcus aureus* 124 порівняно з *Pseudomonas aeruginosa* 18).

Іони міді виявляли різну антибактеріальну активність щодо *Pseudomonas aeruginosa* 18 та з *Staphylococcus aureus* 124 (Рис. 3.30 А), у разі тестування на паперових дисках. У той же час при високих концентраціях сірчанокислої міді в 7-20 г/л зона затримки росту для *Pseudomonas aeruginosa* 18 стала практично не відрізнялася від такої для *Staphylococcus aureus* 124 (Рис. 3.31 А).

Оскільки дія іонів міді, як і інших антибактеріальних засобів, залежить не тільки від кінцевої концентрації діючої речовини, а й від швидкості проникнення чи дифузії через субстрат, проводили порівняльну оцінку дії міді при тестуванні «дифузійним» методом або методом «колодязів». Виявлено, що за високих концентрацій сірчанокислої міді антибактеріальна активність була такою самою, як і у разі випробування міді у тонкому шарі нанесеною на тканину. При оцінці антибактеріальної дії методом колодязів отримали подібні ефекти як і для антибіотика, мерепенема. В цьому випадку не виявили особливих відмінностей між стійкістю двох різних штамів бактерій (рис. 3.31).

Отже, іони міді мають здатність пригнічувати ріст *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18. Ефективність затримки росту залежить від концентрації, і ця залежність має насичувальний характер. *Pseudomonas aeruginosa* 18 мав меншу чутливість порівняно зі *Staphylococcus aureus* 124 за відносно малих концентрацій, а за досягнення високих концентрацій (7-20 г/л) ефективність гальмування росту іонами міді була однакова для обох штамів.

Висновок до розділу 3.4.

В експерименті показано, що багаторазове послідовне введення тваринам сірчаноокислої міді в дозі, що становить 33% від летальної, індукує зсув рівноваги в редокс-системі організму в бік прооксидантів, що реалізується на тлі інгібування активності антиоксидантних ферментів організму. Такі самі ефекти, на рівні редокс-системи, спричиняв такий відомий гепатотропний токсин як тетрахлорметан. Доведено, що на тлі утвореного окисного стресу, який може бути індукований різними факторами, в організмі формується системна адаптивна відповідь, у якій беруть участь щонайменше печінка та кістковий мозок, а на біохімічному, клітинному та фізіологічному рівнях це класифікується як фіброз печінки. У результаті гепатотоксичних сполук в організмі можуть формуватися кілька стратегій відповіді організму, як: відновлення змінених функціональних характеристик; хронічний фіброз печінки з можливим переходом у цироз і летальний наслідок.

Показано, що незважаючи на спільність дії сірчаноокислої міді та тетрахлорметану на рівні редокс-системи, яка є еволюційно давньою та базовою системою регуляції в організмі, ці зміни реалізуються по різному на інших ієрархічних рівнях організму. У роботі це показано на якісних і кількісних змінах імунокомпетентних клітин, що утворюються в кістковому мозку. На характер адаптивної відповіді, на тлі дії сірчаноокислої міді та тетрахлорметану, впливає і вік тварин, що необхідно враховувати при способах корекції та лікування таких станів. Запропоновано механізм стадійного розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки та обґрунтовано можливість його використання при розробці засобів і способів корекції таких функціональних станів.

Показано, що іони міді здатні до прояву прояву антибактероїдної дії щодо *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 за відносно високих концентрацій (7 г/л і більше).

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. Bozhkov, A. I. ., Ohienko, S. L. ., **Ivanov, E. G. .**, Bondar, A. Y. ., & Kot, Y. H. (2021). Determination of Electromagnetic Radiations and Liver Fibrosis Influences the “Lifespan” of Bone Marrow Cells. *Recent Developments in Medicine and Medical Research Vol. 1*, 37–51. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці розділу у монографії до друку).
2. Bozhkov, A., Bobkov, V. V., Osolodchenko, T. P., Yurchenko, O. I., Ganin, V. Y., **Ivanov, E. G.**, ... & 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*, Volume 10, Issue 20 e39098 **SCOPUS (Q1)**. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
3. Bozhkov, A., Lebid-Biletska, K., **Ivanov, E.**, Bozhkov, A., & Nikitchenko, Y. (2024). Hepatotoxic doses of copper sulfate induce metabolic memory in the redox system, which has an age-dependent nature. *Ageing and longevity*, 5(3), 113-128. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
4. **Ivanov, E. G.**, Lebid-Biletska, K. M., Bozhkov, A. I., & Nikitchenko, Y. V. (2024). Copper sulfate and carbon tetrachloride induces a uniform response at the level of the redox system and the nature of this response depends on age. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(3), 496-503. **SCOPUS (Q4)**. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

3.5. Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на моделі Си-індукованого фіброзу печінки.

3.5.1. Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники імунної системи.

Як відомо, імунна система є однією з регуляторних систем організму [383], яка забезпечує загальну регуляцію гомеостазу та сприяє усуненню патологій, що виникають, або, інакше кажучи, впливає на вибір стратегій адаптацій в екстремальних умовах. Як було показано в нашому дослідженні та роботах інших авторів кістковий мозок бере участь у розвитку фіброзу печінки, що дедалі частіше діагностується в усіх країнах [300, 384]. Цей факт пояснюється змінами в дієті, використанням великої кількості медичних препаратів, алкоголю, підвищеним вмістом токсичних сполук у навколишньому середовищі, зокрема й іонів важких металів, серед яких мідь посідає лідерські позиції як за кількістю, так і за токсичністю [385]. У зв'язку з цим використання розробленої нами експериментальної моделі Си-індукованого фіброзу печінки є актуальним завданням біології та медицини і, зокрема, ролі імунної системи в цих процесах.

Відомо, що до складу молозива входять і так звані "високомолекулярні білки", які можуть індукувати алергенні реакції. З огляду на це було отримано низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ) та досліджено їхній вплив на фагоцитарну активність, вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), вміст пептидів середньої молекулярної маси, вміст гідроперекисів ліпідів, активність глутатіонпероксидази в сироватці крові і деякі фізіологічні показники в тварин із Си-індукованим фіброзом печінки. Дослідження проводили на статевозрілих (3-4 міс.) самцях щурів лінії *Wistar*, яких було розбито на 3 експериментальні групи (рис. 3.32).

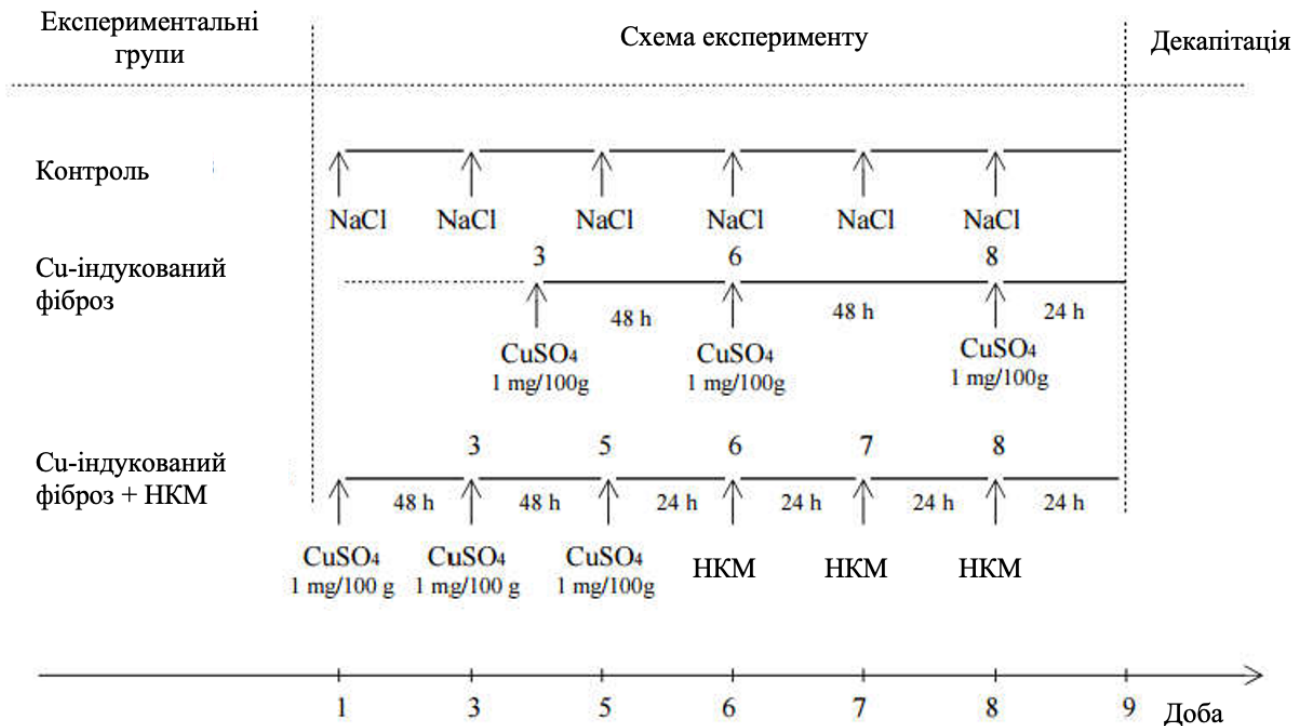


Рис. 3.32. На схемі показано послідовне триразове введення сульфат міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла тварини з інтервалом 48 годин між введеннями з метою індукції фіброзу печінки (варіант 2), а також триразове введення НКМ у різних дозах (0,1; 0,05; 0,01 г/100 г маси) з інтервалом між введеннями 24 години після індукції Си-індукованого фіброзу печінки (варіант 3) та контрольну групу (варіант 1), що отримувала фіз. розчин в той же час, коли дослідні групи отримували сірчаноокислу мідь або НКМ.

Виявили, що кількість нейтрофілів, які поглинали клітини бактерій, у системі *in vitro* (фагоцитарний індекс - ФІ), була зниженою на 22% у групі тварин із Си-індукованим фіброзом печінки порівняно з контрольною (інтактною) групою (рис. 3.33 А). При цьому, у тварин із фіброзом, кількість поглинутих бактерій одним фагоцитом (фагоцитарне число – ФЧ) та індекс завершеності фагоцитозу залишалися на рівні контрольних показників (рис. 3.33 С, D).

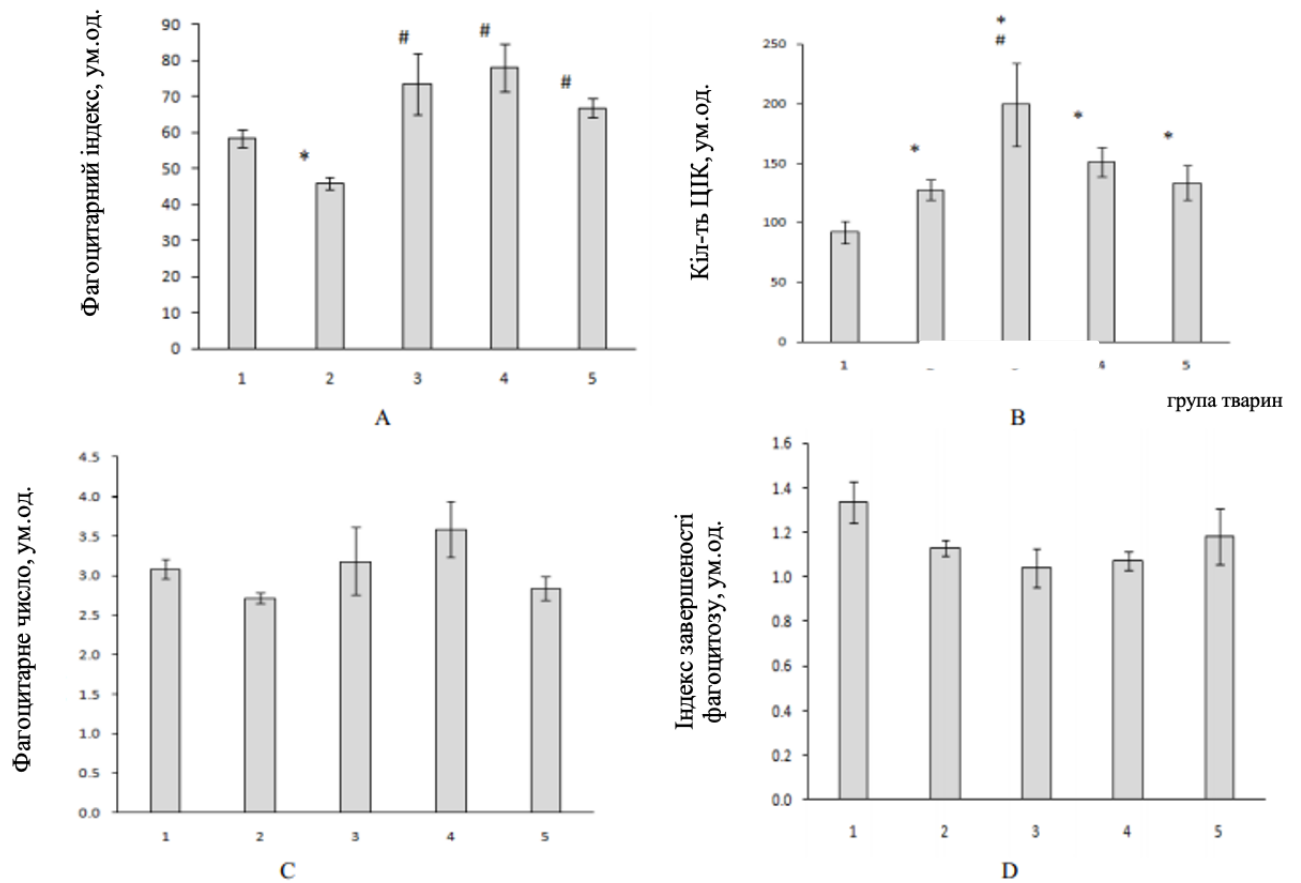


Рис. 3.33. Фагоцитарний індекс (А), вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові (В), фагоцитарне число (С), індекс завершеності фагоцитозу (Д) у контрольних тварин (1), у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки (2), у тварин із фіброзом, яким вводили НКМ тричі в дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварини (3), а також НКМ у дозі 0,05 г/100 г (4) і в дозі 0,01 г/100 г маси (5). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки. * - значення для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою, # - значення для яких $P \leq 0,05$ порівняно з фіброзом.

У тварин із Си-індукованим фіброзом печінки було значно (38%) підвищено вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові порівняно з інтактною групою тварин (рис. 3.33 В).

Отже, на початкових етапах розвитку фіброзу печінки мало місце незначне зменшення активності фагоцитозу і виразне збільшення кількості утворюваних імунних комплексів (антитіло-антиген). Ці результати можуть вказувати на те, що

при розвитку Си-індукованого фіброзу печінки посилюються аутоімунні процеси в результаті деградації компонентів клітин.

У випадку, якщо тваринам з Си-індукованим фіброзом печінки вводили низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ) 3 рази з інтервалами між введеннями 24 години в дозі 0,1 г/100 г маси тварини, то фагоцитарний індекс у таких тварин збільшився на 40% порівняно з групою тварин з фіброзом і на 25% порівняно з інтактним контролем (рис. 3.33 А).

Зменшення дози НКМ до 0,05 г/100 г маси не впливало на індукцію фагоцитозу і лише при дозі 0,01 г/100 г маси незначно зменшувався, проте залишався підвищеним порівняно з групою тварин з фіброзом печінки (рис.3.31 А). При цьому фагоцитарне число і індекс завершеності фагоцитозу зберігалися без змін порівняно з фіброзом печінки (рис. 3.33 С, D).

Якщо тваринам з Си-індукованим фіброзом печінки вводили *per os* НКМ в дозі 0,1 г/100 г, то кількість ЦІК збільшувалась на 55% порівняно з тваринами з фіброзом (рис. 3.32 В). У випадку, коли дози НКМ були знижені до 0,05 і 0,01 г/100 г маси тіла тварини, вміст ЦІК у сироватці крові також знижувався і не відрізнявся від такого у тварин з фіброзом, але залишався вище, ніж у групі інтактного контролю (рис. 3.33 В). Таким чином, НКМ стимулював фагоцитарний індекс і підвищував вміст ЦІК у сироватці крові.

ЦІК - високомолекулярний білковий комплекс, що утворюється в результаті імунної реакції "антиген-антитіло". Збільшення кількості ЦІК у циркулюючій крові відображає патогенетичні механізми деяких аутоімунних захворювань і може призводити до дисфункцій декількох органів. Важливо зауважити, що короткочасна антигенемія не спричиняє розвитку патології.

Збільшення кількості ЦІК у тварин з фіброзом печінки, які отримували НКМ, можна трактувати, з одного боку, як прояв імуногенності компонентів молозива та, можливо, як збільшення швидкості утворення імунних комплексів на тлі розвитку фіброзу, що може вказувати на відновлення (ремоделювання) функціональної активності печінки, тобто мати адаптивний характер. Збільшення кількості утворених ЦІК на тлі розвитку фіброзу печінки відображає активацію

системи комплементу, що свідчить про перебудову функціональних характеристик імунної системи.

Відомо, що нейтрофіли фагоцитують ушкоджені клітини власного організму, виділяють антибактеріальні речовини та полегшують регенерацію ушкоджених тканин [386].

При оцінці фагоцитуючої здатності нейтрофілів руйнувати утворюючихся в організмі імунних комплексів використовується тест з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест). НСТ-тест дозволяє оцінити стан НАДФН-оксидазну активність нейтрофілів. Під час НСТ-тесту визначається спонтанний (початковий, не активований) рівень активності НАДФН та (потенційно можливий) рівень активності НАДФН, який активується після введення зімозану в систему тестування [387].

Виявилося, що у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки спонтанний рівень активності НАДФН у нейтрофілах був на 57% вищим за контрольний рівень (рис. 3.34 варіанти 1,2).

У тому разі, якщо проводили активацію нейтрофілів зімозаном, то це супроводжувалося збільшенням оксидазної активності у 2,8 раза порівняно з вихідним значенням, тобто зі спонтанним рівнем, у тварин інтактної контрольної групи (рис. 3.34 варіант 1). Отже, нейтрофіли контрольних тварин мали досить високий "потенціал" ферментативної активності, який може бути використаний у разі збільшення інфекційних агентів або після збільшення аутоімунних реакцій.

Водночас додаткова активація нейтрофілів зімозаном, отриманих у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки, супроводжувалася активацією оксидазної системи тільки у 2,2 раза порівняно з її вихідним рівнем, тобто меншою мірою порівняно з інтактним контролем (рис. 3.34, варіанти 1,2).

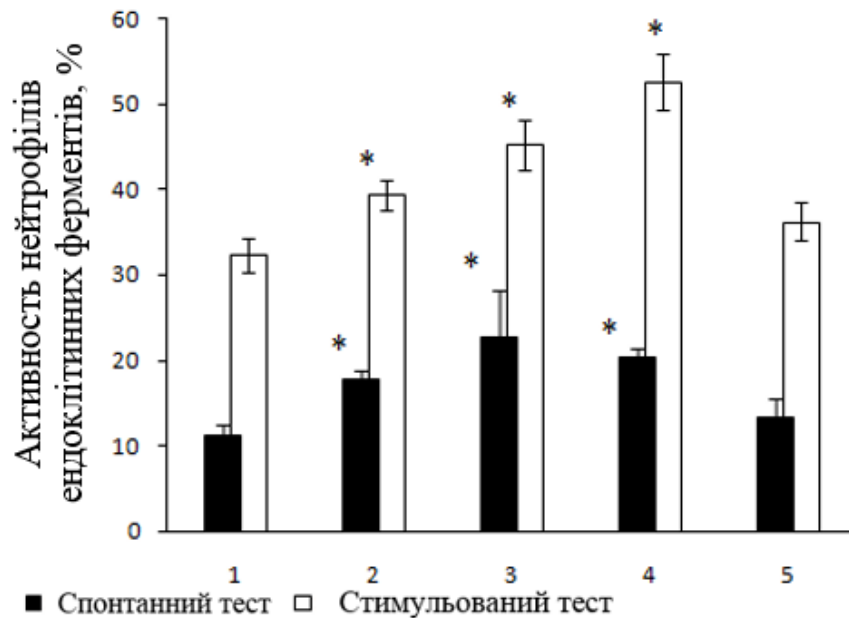


Рис. 3.34. Спонтанний та стимульований зимозаном рівень оксидазної активності нейтрофілів у контрольних тварин (1), у тварин з Cu-індукованим фіброзом (2), у тварин з фіброзом, які отримували НКМ *per os*, тричі (щоденно) у дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварин (3), те саме у дозі 0,05 г/100 (4), та у дозі 0,01 (5). Наведено середні значення для 5 тварин та їх стандартні помилки. * - $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що на ранніх стадіях розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки відбувається активація нейтрофілів, які успішно руйнують антигенні комплекси. Однак, при цьому резерв або "потенціал" нейтрофілів у тварин з фіброзом був меншим на 64% порівняно з таким в інтактного контролю.

У тому випадку, якщо тваринам з Cu-індукованим фіброзом печінки вводили НКМ в дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварини, то їх спонтанний (початковий) рівень активності нейтрофілів при оцінці в НСТ-тесті був вище на 28% порівняно з тваринами з фіброзом. Це свідчить про те, що НКМ в дозі 0,1 г/100 г маси збільшує фагоцитарну активність нейтрофілів у тварин з фіброзом печінки. При цьому резерв активності нейтрофілів залишався таким же високим, про що свідчить результат щодо ефективності стимуляції зимозаном.

Зменшення дози НКМ до 0,05 г/100 г не впливало на спонтанний рівень нейтрофільного фагоцитозу, при цьому стимульований зімозаном рівень залишався достатньо високим і перевищував такий у інтактного контролю та тварин з фіброзом.

При дозі НКМ у 0,01 г/100 г маси тіла, показник як спонтанного, так і стимульованого фагоцитозу нейтрофілів не відрізнявся від контрольного варіанту.

Отже, НКМ може збільшувати як спонтанний, так і стимульований рівні фагоцитарної активності нейтрофілів у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки. Ефект збільшення фагоцитарної активності нейтрофілів залежить від дози НКМ, найбільший ефект спостерігався при дозі 0,1 г/100 г маси тіла.

Відомо, що одним з важливих і критичних факторів патогенезу фіброзу печінки, а також інших патологічних станів, є ендогенна інтоксикація організму. Вважається, що ендогенна інтоксикація організму пов'язана з накопиченням метаболітів від нормального та аномального обміну речовин в біологічних рідинах організму. Можна виділити три основні фактори, які призводять до ендогенної інтоксикації - мікробіологічна, біохімічна і імунологічна. Можна припустити, що Си-індукований фіброз печінки пов'язаний перш за все з біохімічними і імунологічними механізмами інтоксикації.

Багато досліджень показали, що стан ендогенної інтоксикації виникає при різних захворюваннях і як і оксидативний стрес не має специфічних симптомів. Ступінь розвитку ендогенної інтоксикації може вказувати на стадію розвитку того чи іншого патологічного процесу. Одним з найбільш простих і інформативних методів оцінки токсичності внутрішнього середовища організму є визначення вмісту молекул середньої молекулярної маси (не більше 5000 Д), а точніше ступінь їх збільшення порівняно з їх початковим або контрольним рівнем.

Визначення вмісту молекул середньої молекулярної маси (МСММ) у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки показало, що вони залишалися на рівні контрольних тварин. Отже, на ранніх стадіях розвитку Си-індукований фіброз не

призводив до значущої біохімічної індукції утворення токсичних сполук (табл.3.11).

Таблиця 3. 11

Вміст (відносні одиниці) молекул середньої молекулярної маси в сироватці крові контрольної групи тварин, групи із Cu-індукованим фіброзом печінки та груп із фіброзом, яким додатково ввели НКМ у різних дозах. Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для 5 тварин у кожній групі. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контрольним варіантом.

Експериментальні групи тварин					
Показник	Контроль	Cu-індукований фіброз	Cu- ин. фиб.+ НКМ 0,1 г/100 г маси тіла тварини	Cu-ин.фиб.+ НКМ 0,05 г/100 г маси тіла тварини	Cu- ин.фиб.+ НКМ 0,01 г/100 г маси тіла тварини
Серед. знач.	$0,320 \pm 0,02$	$0,331 \pm 0,01$	$0,410 \pm 0,03^*$	$0,490 \pm 0,09^*$	$0,350 \pm 0,07$

У випадку, коли експериментальним тваринам з Cu-індукованим фіброзом печінки вводили НКМ в дозі 0,1 і 0,05 г/100 г маси тіла, це супроводжувалося невеликим збільшенням МСММ на 24 і 48% відповідно порівняно з фіброзом і інтактним контролем, тоді як в дозі НКМ у 0,01 г/100 г маси тіла тварини це не впливало на цей показник.

Збільшення вмісту МСММ в сироватці крові є не лише неспецифічним показником токсичності, але й може вказувати на виконання ними різноманітних регуляторних функцій в організмі. Вплив НКМ на функції МСММ потребує подальших досліджень.

Зупиняючись на обговоренні отриманих результатів, необхідно відзначити, що нейтрофіли— найбільша популяція клітин в організмі здатних до фагоцитозу. Нейтрофіли відіграють важливу роль у "нагляді" за гомеостазом організму і є елементом так званої першої лінії оборони від інфекційних агентів і аутоімунних комплексів. Відомо, що нейтрофіли використовують два основних механізми реалізації захисного ефекту: утворення фагосом та "кисневий вибух". "Кисневий

вибух" забезпечує нейтралізацію інфекційних агентів, дестабілізує мембрани фагоцитарних клітин, сприяє видаленню пошкоджених клітинних структур.

Спонтанний рівень активності нейтрофілів у тварин, які отримували НКМ на тлі фіброзу, ще більше збільшувався порівняно з фіброзом. Це може вказувати на те, що низькомолекулярні компоненти молозива значно збільшували ферментативну активність нейтрофілів і це може сприяти зменшенню кількості утворюваних "аномальних" надмолекулярних комплексів. Відомо, що присутність іонів міді у великих кількостях в організмі, яке має місце в разі Си-індукованого фіброзу, супроводжується інактивацією ряду ферментів і денатурацією білків. Образовані білки з "розгорнутою" структурою сприяють додатковим міжмолекулярним взаємодіям. Такі неспецифічні, нефункціональні надмолекулярні комплекси можуть залишатися "непоміченими" елементами імунного захисту і призводити до аномальних змін в організмі. Не можна виключати того, що НКМ як білкові молекули можуть входити в неспецифічні білкові комплекси і забезпечувати їх розпізнавання і як наслідок активувати нейтрофіли. Вміст ЦІК і фагоцитарний індекс були збільшені у тварин (рис. 3.35).

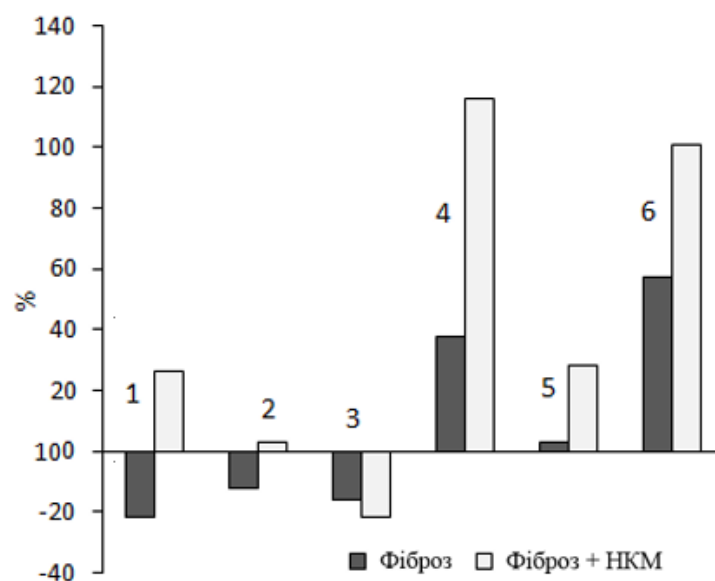


Рис. 3.35. Зміна деяких імунологічних показників (1 - фагоцитарний індекс; 2 - фагоцитарне число; 3 - індекс завершення фагоцитозу; 4 - кількість циркулюючих імунних комплексів; 5 - кількість пептидів середньої молекулярної маси; 6 - спонтанний рівень активності у НСТ-тесті у тварин з Си-індукованим

фіброзом і в тварин з Cu-індукованим фіброзом, яким додатково вводили НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварин, порівняно з контролем, що був прийнятий за 100%.

Для нейтрофілів характерна надзвичайно висока інтенсивність окисно-відновних процеси, і це явище отримало назву "метаболічний", "кисневий" або окислювальний "вибух" [388]. Дослідження цього явища показало, що в біологічних системах одні й ті самі процеси можуть виконувати різні, а часом протилежно спрямовані функції. У тому сенсі, що надмірні окислювальні процеси можуть призводити зрештою до загибелі та/або до захисту і виживання.

Так, збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів у мітохондріях печінки та в організмі загалом, що відбувалося за Cu-індукованого фіброзу, може призводити до розвитку цирозу та смерті, а може забезпечити прояви адаптивних реакцій та виживання. Водночас, надмірне збільшення вільнорадикальних продуктів локально в нейтрофілах може забезпечити виживання організму в екстремальних умовах. Спрямованість дій тих чи інших процесів залежатиме від рівня прояву, просторової локалізації та "контексту", тобто особливостей просторового оточення на даний момент часу.

Встановлено, що основним ферментом, який утворює вільні радикали під час окислювального вибуху в нейтрофілах є НАДФН-оксидаза. Цей фермент локалізований у фаголізосомах і в разі його індукції він здатний ефективно окислювати інфекційні агенти.

Визначення НАДФН-оксидазної активності в НСТ-тесті показало, що активність цього ферменту збільшується у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки (рис. 3.33).

Слід зазначити, що у випадку Cu-індукованого фіброзу печінки мало місце і збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій не лише в мітохондріях, а й в організмі загалом, що відбувалося за рахунок інгібування антиоксидантних ферментів іонами міді, зокрема глутатіонпероксидази, та внаслідок кисневого вибуху в нейтрофілах. Цим можна пояснити і той факт, що у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки в гепатоцитах і в сироватці крові підвищувався

вміст гідроперекису, відповідно, на 30-40% і 90-100% відповідно. Поряд з окислювальним ушкодженням клітин зареєстровано й активацію аутоімунного процесу, про що свідчить значне збільшення ЦІК у сироватці крові тварин із фіброзом.

Отже, за Cu-індукованого фіброзу печінки має місце формування системних реакцій, у яких беруть участь печінка, кістковий мозок та імунна система, зокрема і її клітинна ланка, видільна система, а НКМ можуть забезпечити відновлення низки змінених гомеостатичних показників або призводити до формування нових функціональних характеристик.

3.5.2. Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники активності печінки у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки та фізіологічні характеристики таких тварин

Визначення вмісту гідроперекисів ліпідів сироватки крові у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки виявило, що їхній вміст збільшився на 90 % порівняно з інтактним контролем (рис. 3.36 А). Водночас активність одного з основних антиоксидантних ферментів - глутатіонпероксидази була знижена на 36 % порівняно з інтактним контролем (рис. 3.36 А). Ці дані ще раз підтверджують результати того, що за Cu-індукованого фіброзу печінки має місце зсув рівноваги в редокс-системі в бік прооксидантів і це супроводжується активним синтезом сполучної тканини.

У тому випадку, якщо тварини з фіброзом печінки отримували НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла, то вміст гідропероксидних ліпідів у сироватці крові тварин був на 40 % нижчий за вміст тварин з фіброзом та достовірно не відрізнявся від такого у інтактному контролі (рис. 3.36 А). Важливо відзначити, що зменшення вмісту гідроперекисів ліпідів у тварин із фіброзом після введення НКМ відбувалося на тлі значного збільшення активності глутатіонпероксидази (збільшено на 82 %), при цьому вона перевищувала й активність порівняно з контролем на 24 % (рис. 3.36 А). Наявність кореляції між вмістом гідроперекисів

ліпідів та активністю глутатіонпероксидази може свідчити про те, що компоненти молозива виявляють антиоксидантну та імуномодулюючу активності.

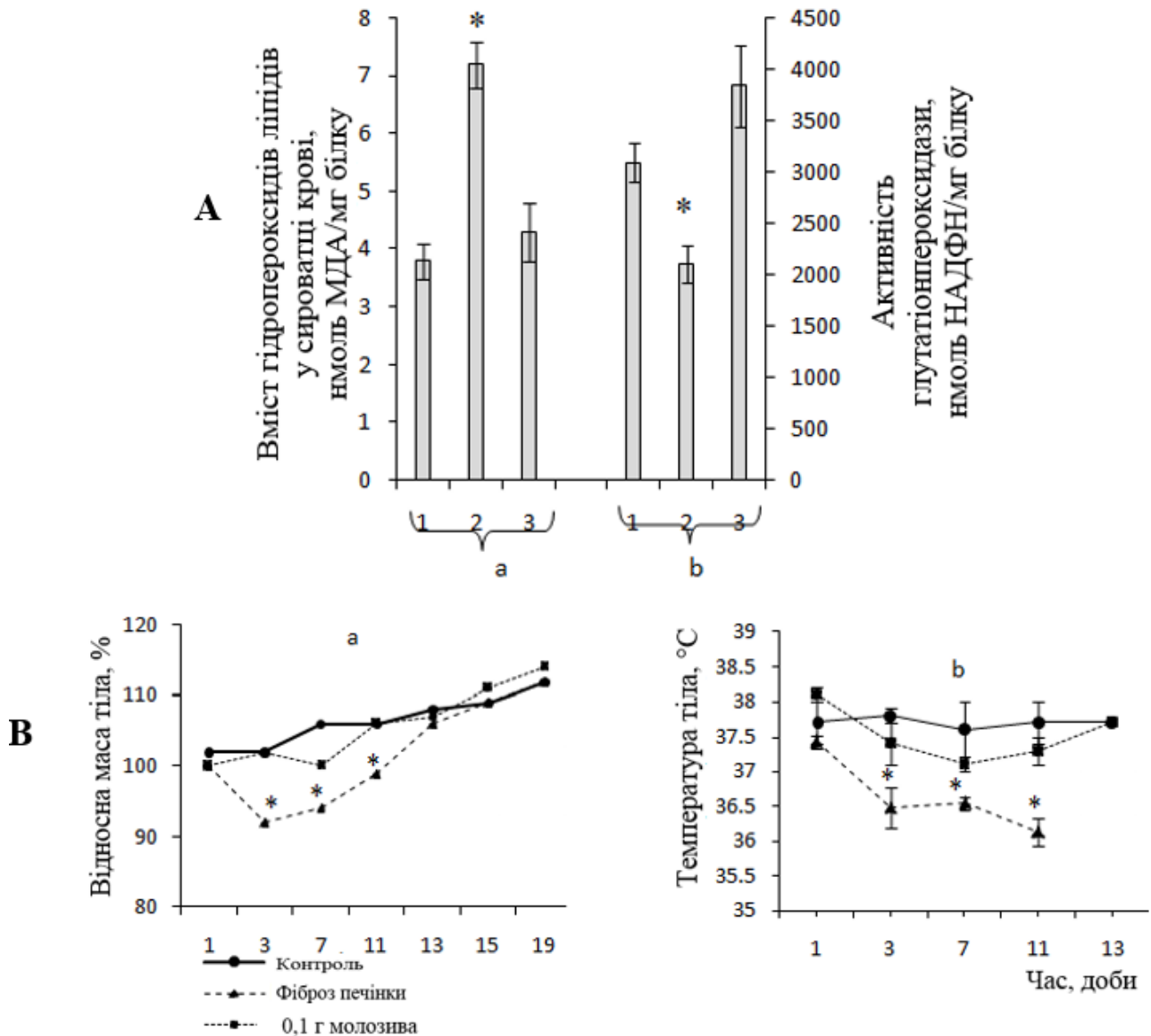


Рис.3.36. Показники про-/антиоксидантної системи (А); вміст гідропероксидів ліпідів у сироватці крові (а) та активність глутатіонпероксидази (b) в інтактних тваринах (1), тварин із фіброзом печінки (2) і тварин із фіброзом, які отримували НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварини (3); деякі фізіологічні дані (В), зміна маси тіла (а) і зміна температури тіла (b) в інтактних тварин — (—), тварин із фіброзом (.....) і тварини з фіброзом, які отримували НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварини (- - -). Наведено середні значення та їхні стандартні

помилки для 5 тварин у кожній експериментальній групі. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Про функціональну активність печінки в експериментальних тварин оцінювали за такими загальноприйнятими показниками, як вміст у сироватці крові холестерину, триацилгліцеридів, альбуміну та креатиніну. Ці показники у тварин із Си-індукованим фіброзом зберігалися на рівні контрольних тварин (табл. 3. 12).

Таблиця 3. 12

Деякі біохімічні показники, які визначали в сироватці крові піддослідних тварин

Групи тварин	Показник			
	Холестерол	Тригліцерол	Креатинін	Альбумін
Інтакт	$1,6 \pm 0,2$	$0,77 \pm 0,13$	$69,7 \pm 15,1$	$32,3 \pm 0,4$
Си-індукований фіброз	$1,2 \pm 0,4$	$0,79 \pm 0,27$	$50,0 \pm 3,9$	$29,3 \pm 2,6$
Си-індукований фіброз + НКМ (0,01 г/1000 г маси тварини)	$1,5 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,48$	$93,0 \pm 20,0$	$33,5 \pm 4,0$

Виявили, що всі досліджувані показники у тварин із фіброзом печінки не відрізнялися від показників контрольних тварин (табл. 3.12). Введення експериментальним тваринам НКМ так само не призводило до достовірних змін цих показників (табл.3. 12).

Отримані результати дають змогу дійти двох важливих висновків. Незважаючи на наявність структурних зміни печінки, прояви помірного окисного стресу, функціональна активність на ранніх етапах розвитку фіброзу печінки, що був індукований сірчаноокислим міддю, зберігалася за досліджуваними показниками на рівні контрольних тварин. Це вказує на те, що на ранніх етапах розвитку фіброзу організм здатний забезпечити компенсаторну відповідь на дії токсичних агентів, принаймні у випадку дії іонів міді, і в утриманні функції печінки на компенсаторному рівні беруть участь клітинна ланка імунної системи. По-друге, відсутність функціональних змін на рівні печінки після введення тваринам НКМ із фіброзом печінки вказує на відсутність негативної дії

компонентів молозива в разі збереження показників активності печінки на рівні норми.

Як відомо, найважливішим інтегральним показником дії екзогенних факторів на організм є фізіологічний рівень.

Незважаючи на те, що функціональна активність печінки за досліджуваними показниками залишалась у межах норми, у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки спостерігали виражені зміни у швидкості росту маси тіла. Так, якщо за період проведення експерименту з 1-го по 15-й день маса тіла у тримісячних тварин (які продовжували активно рости) збільшилась на 12% від початкової, то у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки вона зменшилась на 10 г від початкової маси протягом перших 3 днів (рис. 3.36 В). Надалі вони повільно відновлювали набір маси тіла і тільки до 13 доби після індукції фіброзу вона відновлювалася до контрольного рівня (рис. 3.36 В).

У тому випадку, якщо тварини з фіброзом печінки на ранніх етапах його розвитку отримували НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси, то вони не втрачали масу тіла та росли так само, як і група контрольних тварин (рис. 3.36 В).

Отже, НКМ усувало затримку росту тварин із Си-індукованим фіброзом печінки.

Ще одним важливим фізіологічним показником функціонального стану тварин є температура тіла. Виявили, що температура тіла тварин на початкових етапах формування Си-індукованого фіброзу печінки (з 3 до 11 дня від введення тваринам сірчаноокислої міді) була на 1°C нижчою, ніж у контрольні тварини (рис. 3.36 С). Ці результати свідчать про інгібування іонами міді загального метаболізму. Саме в цей час має місце критичний період для тварин і в деяких випадках може наставати загибель експериментальних тварин.

У тому разі, якщо тварини з фіброзом отримували низькомолекулярні компоненти молозива з розрахунку 0,1 г/100 г маси тіла, їхня температура тіла не відрізнялась від таких у контрольних тварин (рис. 3.36 С).

Нормалізація температури тіла у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки вказує на кілька важливих особливостей дії НКМ на організм. По-перше,

НКМ приводить у норму стан загального метаболізму в таких тварин. По-друге, між зміною швидкості росту, падінням температури тіла і зміщенням рівноваги в редокс-системі існує взаємозв'язок. Можна вважати, що при досягненні великих концентрацій іонів міді в організмі запускається каскад метаболічних перетворень (рис. 3.30), який, з одного боку, "спрямований" на виживання організму, тобто має місце адаптивний процес, а з другого - неминуче призводить до формування фібрози. Наші спостереження показали, що в деяких випадках, коли в експериментальних тварин не відбувалося розростання сполучної тканини навколо лопатей печінки, то такі тварини частіше гинули. Або іншими словами, розвиток фіброзу печінки, який посилювався введенням тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки вітаміну А на ранніх стадіях його формування, у кілька разів зменшував смертність тварин [389].

Наявні дані дають змогу припустити, що назкомолекулярні компоненти молозива, володіючи антиоксидантним та протизапальним ефектами, здатні модулювати відповідь на наявність більших концентрацій іонів міді в організмі та забезпечувати виживання організму за екстремальних умов, механізми яких ще слід дослідити.

3.5.3. Дослідження можливих механізмів дії низькомолекулярних компонентів молозива на моделі фіброзу

Численні дослідження та результати, отримані в нашій лабораторії, дали змогу встановити участь окисного стресу не тільки у формуванні різних патологій, а й його участь у регуляторних механізмах адаптації організму до широкого спектра різноманітних стрес-факторів [13, 255, 264, 366, 390]. Як уже зазначалося, зміна показників редокс-системи може розглядатися як одна з первинних відповідних реакцій на екзогенні впливи. Це може вказувати на те, що редокс-система, як одна з еволюційно стародавніх систем регуляції гомеостатичних показників, може бути тією базовою системою, на основі якої формуються і модифікуються інші ієрархічні рівні регуляції в організмі. Вплив НКМ на показники редокс-системи, показаний у наших дослідженнях, не суперечить

наявним даним і дає змогу припускати, що в механізмі дії НКМ прооксидантно-антиоксидантна система може відігравати важливу, а можливо, і провідну роль у відновленні змінених гомеостатичних показників за фіброзу печінки.

Дослідження механізмів регуляції метаболізму на моделі фіброзу печінки, які включають участь редокс-системи, представляє великий інтерес із кількох причин: це може дати змогу уточнити механізми розвитку патологій печінки та обґрунтувати нові підходи у створенні способів усунення цих функціональних змін; це розширить наші знання щодо ролі редокс-системи не лише чи не стільки у розвитку патологічних станів, скільки в регуляції гомеостазу в процесі адаптаційного генезу організму, що може сприяти розгляду цілої низки питань, що виникають у процесі адаптації організму у тому числі і в онтогенезі.

При розв'язанні таких складних питань, яким є дослідження механізмів дії природних біологічно активних сполук, що, як правило, представлені не моно сполуками, а є багатокomпонентними, можна використати щонайменше два різні підходи: пошук специфічних механізмів дії відокремлених компонентів із наступним розшифруванням їхньої інтеграції в єдину систему реалізації; або ж перевірка гіпотези неспецифічної (горметичної) дії багатокomпонентних природних сполук.

Наші багаторічні дослідження механізмів адаптації різних біологічних об'єктів до екстремальних умов існування дали змогу дійти розуміння, що механізм дії багатокomпонентних біологічних субстанцій складається не тільки, а можливо, і не стільки зі специфічної леганд-рецепторної взаємодії, а й із неспецифічного або горметичного механізму дії. Вважаємо, що перевірка цієї робочої гіпотези має важливе значення для розвитку фармацевтичної біотехнології і розумінні механізму дії НКМ.

При перевірці цього припущення виходили з кількох положень. По-перше, компоненти молозива проявляли як антиоксидантну, так і прооксидантну дію, і в цьому відношенні специфічність його дії залежить не тільки від складу субстанції, яку використовують, а, ймовірно, від функціональних особливостей організму в момент впливу на него або інших невідомих нам чинників.

По-друге, компоненти молозива впливали не тільки на редокс-систему, а й на функцію кісткового мозку, видільну систему та інші системи організму. Є численні дані, які були наведені в першому розділі цієї роботи, про те, що молозиво і його компоненти володіють дуже широким спектром дії на організм і можуть бути використані для лікування таких небезпечних хвороб, як Альцгеймер, розсіяний склероз, хвороба Крона, ревматоїдний артрит та інші [8, 18, 37, 46, 391].

По-третє, якщо компоненти молозива здатні чинити не тільки специфічну, а й неспецифічну дію на організм, то можна припускати, що схожі, але не ідентичні за складом біологічні субстанції, можуть спричиняти подібні дії на організм.

Раніше в нашій лабораторії було розроблено біотехнологію на основі культур *Sacharomyces cerevisiae* і *Pleurotus ostreatus* та отримано біологічно активну субстанцію - "Мікс-фактор", до складу якої входять відносно невелика кількість низькомолекулярних білків, досить велика кількість вуглеводів і вітаміни [392]. Необхідно зазначити, що НКМ і "Мікс-фактор" отримано абсолютно з різних джерел, вони дуже різняться за складом, схожі лише в тому, що до їхнього складу входять відносно низькомолекулярні, хоча й різні компоненти.

З метою перевірки можливого гормезисного (неспецифічного) механізму дії НКМ було проведено порівняльне дослідження за дією НКМ і "Мікс-фактору" на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки. Для цього визначали вміст гідроперекисів ліпідів, активність глутатіонпероксидази в сироватці крові, мітохондріях і цитозолі печінки, а також функціональну активність печінки (вміст холестерину, триацилгліцеринів, креатиніну та альбуміну) у тварин із Cu-індукованим фіброзом.

Порівняльне дослідження впливу НКМ і "Мікс-фактору" на вміст гідроперекисів ліпідів та активність глутатіонпероксидази в сироватці крові експериментальні тварини підтвердило, що вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) у сироватці крові тварин із фіброзом було збільшено на 90% порівняно з контролем, (рис. 3.37 А).

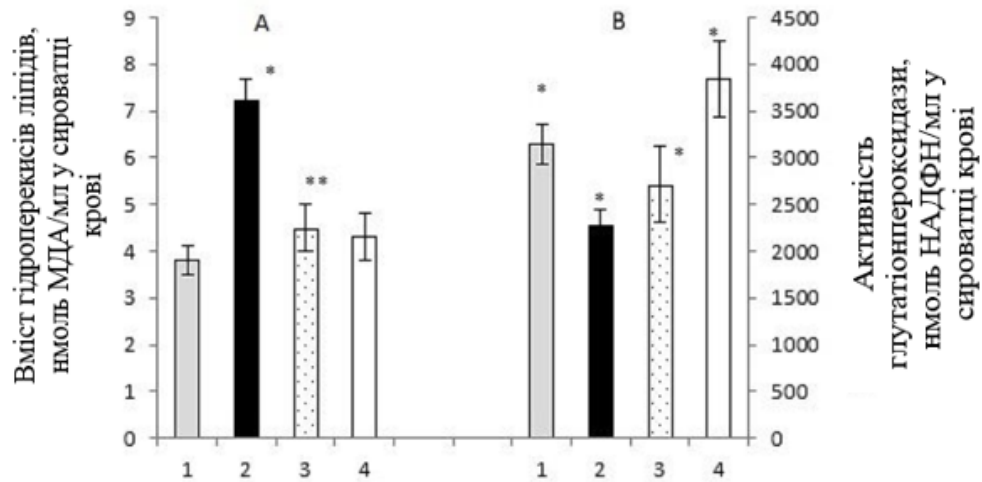


Рис. 3.37. Вміст гідроперексидів ліпідів (А) та активність глутатіонпероксидази (В) у сироватці крові контрольних тварин (1), тварин із Си-індукованим фіброзом (2), тварин, які отримували *per os* "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100 г маси, після індукції фіброзу тричі з інтервалом 24 години (3), тварин, які отримували НКМ в дозі 0,1 г/100 г маси, тричі з інтервалом 24 години на тлі фіброзу (4) * $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем, ** $P \leq 0,05$ порівняно з групою з Си-індукованим фіброзом.

У тварин із Си-індукованим фіброзом печінки, які отримували "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100 г маси. вміст гідроперексидів ліпідів у сироватці крові був нижчим на 37% порівняно з тваринами з фіброзом і мало відрізнявся від інтактного контролю (рис. 3.37 А). Введення тваринам із фіброзом НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла також приводило до зниження вмісту гідроперексидів ліпідів у сироватці крові на 40% та відповідало контрольній групі тварин (рис. 3.37 А).

Отже, "Мікс-фактор" і НКМ, що сильно різнилися за складом, практично однаковою мірою приводили до нормалізації вмісту продуктів вільнорадикальних реакція, принаймні гідроперексидів ліпідів, тобто усували розвиток окислювального стресу, індукованого іонами міді.

Одним із можливих механізмів антиоксидантної дії "Мікс-фактору" та НКМ може бути досягнута за рахунок підвищення активності антиоксидантних ферментів. Виявили, що активність глутатіонпероксидази в сироватці крові, що була достовірно знижена у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки, не

відрізнялася від контрольного рівня після введення їм "Мікс-фактору" та особливо після одержання НКМ (рис.3.37 В). Дійсно, усунення окисного стресу у тварин із фіброзом печінки "Мікс-фактором" і НКМ може пояснюватися активацією антиоксидантних ферментів.

У наступній серії експериментів визначали вміст гідроперекисів ліпідів та активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки.

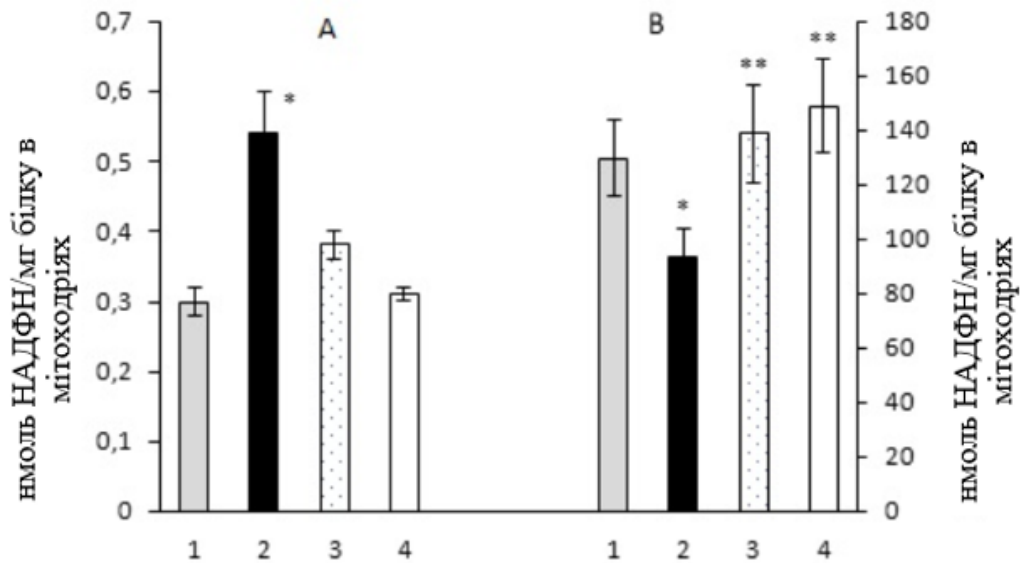


Рис. 3.38. Вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки (А) та активність глутатіонпероксидази в мітохондріях (В) у контрольній групі (1), групі з Си-індукованим фіброзом (2), та у групі з фіброзом, що отримувала триразове введення "Мікс-фактору" у дозі 0,1 г/100 г маси (3), а також після триразового введення НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси (4). Наведено середні значення та статистичну похибку 8 повторень. * $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем, ** $P \leq 0,05$ порівняно з групою з Си-індукованим фіброзом.

Виявилося, що вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки щурів із Си-індукованим фіброзом був збільшений на 83% порівняно з мітохондріями печінки інтактних тварин (рис. 3.38 А), що є порівнянним із таким сироватки крові.

Якщо тварини із Си-індукованим фіброзом отримували "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100 г маси тіла, то вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки

знижувався на 45%, а після тваринам із фіброзом печінки вмісту гідроперекисів ліпідів зменшився на 71% порівняно із групою тварин із фіброзом (рис. 3.38 А).

Активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки тварин із фіброзом, що була достовірно нижчою порівняно з контролем, відновлювалася до рівня контрольних значень після введення таким тваринам "Мікс-фактору" та НКМ (рис.3.38 В). Так після введення тваринам із фіброзом "Мікс-фактору" активність цього ферменту підвищувалася на 48% порівняно з тваринами з фіброзом, а у випадку НКМ - на 59% (рис. 3.38 В).

Якщо оцінювати антиоксидантну активність мітохондріальної системи печінки за співвідношенням глутатіонпероксидаза/гідроперекису ліпідів, то після введення "Мікс-фактору" тваринам із фіброзом це співвідношення становило 1:2,1, а після введення тваринам НКМ воно відповідало співвідношенню 1:2,8, що свідчить про те, що дві різні за складом багатокomпонентні біологічні субстанції чинять схожі ефекти на редокс-систему в експериментальних тварин із фіброзом печінки.

На користь цього свідчать і результати щодо впливу досліджуваних субстанцій на активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у фракції цитозолу клітин печінки. Необхідно враховувати, що нині відомо 7 ізоформ глутатіонпероксидази, які локалізуються в різних клітинних компартментах. Ці ізоформи розрізняються за активністю і ступенем реакції на різні впливи [393].

Виявилося, що після введення "Мікс-фактору" та НКМ тваринам із Су-індукованим фіброзом печінки активність глутатіонпероксидази у фракції цитозоля печінки, що була достовірно зниженою порівняно з контрольним рівнем, збільшилась однаковою мірою на 38 % та 36 % і достовірно не відрізнялась від контролю (рис.3.39 А). Примітним є те, що активність глутатіонредуктази в цитозолі печінки, що не змінювалася порівняно з контролем у тварин із фіброзом печінки, залишилася на тому самому рівні й після введення експериментальним тваринам досліджуваних біологічних субстанцій (рис. 3.39 В).

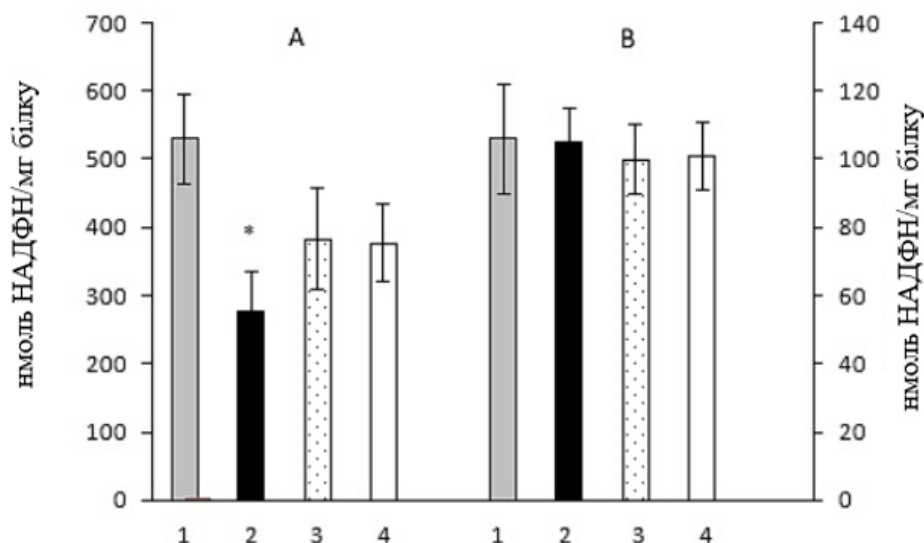


Рис. 3.39. Активність глутатіонпероксидази (А) і глутатіонредуктази (В) у цитозольній фракції клітин печінки: інтактній групі тварин (1), тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки (2), а також у тварин із фіброзом, які тричі отримували субстанцію "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100 г маси (3), та тварин із фіброзом, які тричі отримували НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси (4). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для 8 визначень. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Отримані результати дають змогу зробити висновок: 1 - дія низькомолекулярних компонентів із різним складом ("Мікс-фактор" та НКМ) та які були отримані з різних біологічних джерел, індукують схожі біологічні відповіді у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки; 2 - "Мікс-фактор" і НКМ стимулюють активність різних ізоформ глутатіонпероксидази, що локалізовані в сироватці крові, мітохондріях і цитозолі клітин печінки, якщо їхня активність була знижена на тлі Cu-індукованого фіброзу; 3 - "Мікс-фактор" і НКМ не впливали на активність глутатіонредуктази у тварин із фіброзом, якщо вона залишалася на рівні контрольних значень.

З метою оцінки функціональної активності печінки на ранніх стадіях розвитку фіброзу печінки визначали вміст холестерину, триацилгліцерину, альбуміну та креатиніну в сироватці крові. Було виявлено, що, незважаючи на прояв окисного стресу, деякі морфологічні зміни печінки та фізіологічні

перебудови у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки, вміст холестерину, триацилгліцерину, альбуміну та креатиніну в сироватці таких тварин залишався в межах норми (табл.3. 13).

Таблиця 3.13

Вміст холестерину, триацилгліцерину, альбуміну та креатиніну в сироватці крові інтактних контрольних тварин, тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки, тварин з фіброзом печінки, яким додатково вводили триразово "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100г маси або НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла. Наведено середні значення для 5 тварин у групі та їх стандартні помилки.

Група	Показники			
	Холостерин	Триацилгліцерин	Креатинін	Альбумін
Інтакт	1,6 ±0,2	0,77±0,13	69,7±15,1	32,3±0,4
Фіброз	1,2±0,4	0,79±0,27	50,0±3,9	29,3±2,6
Фіброз при введенні «НКМ»	1,5±0,5	1,0±0,48	93,0±20,0	33,5±4,0
Фіброз при введенні «Мікс-фактору»	1,2±0,2	0,91±0,84	49,0±2,6	30,3±2,3

У тому випадку, якщо тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки вводили "Мікс-фактор" або НКМ, то вміст холестерину, триацилгліцерину, альбуміну і креатиніну в сироватці крові таких тварин залишався в межах норми (табл. 13).

Ці результати підтверджують висновок про те, що якщо досліджувані показники у тварин із фіброзом залишаються в межах норми, то "Мікс-фактор" і НКМ не впливали на такі показники. Можна припустити, що досліджувані біологічно активні субстанції впливають "тільки" на ті показники, які перебувають за межами гомеостатичних значень. У тому разі, якщо досліджувані параметри залишаються в гомеостатичних межах, то "Мікс-фактор" і НКМ на них не впливають.

На перший погляд, таке припущення здається необґрунтованим і мало ймовірним. Однак, якщо виходити з того, що біологічні системи здатні зберігати свої гомеостатичні характеристики навіть за наявності зовнішніх (екзогенних)

"обурень", то такі стани характеризуються певною "буферною стійкістю". У тому ж разі, якщо з якихось причин ця стійкість порушена і параметри системи виходять за межі гомеостатичного коридору, то така система набуває нестійкого стану. Якщо біологічна система перебуває в такому нестійкому стані, то введення в таку нестійку систему додаткових біологічно активних і передусім багатокomпонентних субстанцій сприятиме відновленню або має місце корекція метаболічного стану. Таке відновлення гомеостатичних характеристик може розглядатися як неспецифічна дія і цим може пояснюватися подібна дія двох різних за складом багатокomпонентних біологічних субстанцій.

Якщо виходити з того, що дійсно багатокomпонентні біологічні субстанції чинять неспецифічну, а гормезисну дію на організм, то можна припустити, що подібні субстанції здатні чинити системну дію на організм. Найбільший інтерес у цьому відношенні представляє дія подібних біотехнологічних багатокomпонентних субстанцій на тривалість життя, оскільки є дані про наявність взаємозв'язку між показниками редокс-системи та тривалістю життя.

Висновок до розділу 3.5.

Показали, що при Cu-індукованому фіброзі печінки мало місце пригнічення деяких показників активності клітинної ланки імунітету, зокрема активності фагоцитозу та збільшення циркулюючих імунних комплексів у крові. Ці результати можуть вказувати на те, що під час розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки посилюються аутоімунні процеси внаслідок деградації компонентів клітин. У разі, якщо тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки вводили низькомолекулярні компоненти молозива 3 рази з інтервалами між введеннями 24 години в дозі 0,1 г/100 г маси тварини, то фагоцитарний індекс у таких тварин збільшився на 40 % порівняно із групою тварин із фіброзом і на 25 % порівняно з інтактним контролем. Зменшення дози НКМ до 0,05 г/100 г маси не впливало на індукцію фагоцитозу, і тільки за дози 0,01 г/100 г маси він незначною мірою зменшувався, проте залишався підвищеним порівняно з групою тварин із фіброзом печінки. При цьому фагоцитарне число та індекс завершеності фагоцитозу зберігалися без змін порівняно з фіброзом печінки. Збільшення кількості ЦІК у тварин із фіброзом печінки, які одержували НКМ, можна трактувати, з одного боку, як прояв імуногенності компонентів молозива і, можливо, як збільшення швидкості утворення імунних комплексів на тлі розвитку фіброзу, що може вказувати на відновлення (ремоделювання) функціональної активності печінки, тобто мати адаптивний характер. Встановили, що НКМ може збільшувати як спонтанний, так і стимульований рівні фагоцитарної активності нейтрофілів у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки. Ефект збільшення фагоцитарної активності нейтрофілів залежить від дози НКМ, найбільший ефект спостерігався при дозі 0,1 г/100 г маси тіла. Нормалізація температури тіла у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки після дії НКМ вказує на кілька важливих особливостей дії НКМ на організм. По-перше, НКМ приводить у норму стан загального метаболізму у таких тварин. По-друге, між зміною швидкості росту, падінням температури тіла і зміщенням рівноваги в редокс-системі існує взаємозв'язок. Можна вважати, що при досягненні великих концентрацій іонів міді в організмі запускається каскад метаболічних перетворень, який, з одного

боку, "спрямований" на виживання організму, тобто має місце адаптивний процес, а з іншого - неминуче призводить до формування фіброзу. Наші спостереження показали, що в деяких випадках, коли в експериментальних тварин не відбувалося розростання сполучної тканини навколо лопатей печінки, то такі тварини частіше гинули. Або іншими словами, розвиток фіброзу печінки, який посилювався введенням тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки вітаміну А на ранніх стадіях його формування, у кілька разів зменшував смертність тварин [389]. Наявні дані дають змогу припустити, що назкомолекулярні компоненти молозива, маючи антиоксидантний і протизапальний ефекти, здатні модулювати відповідь на наявність великих концентрацій іонів міді в організмі та забезпечувати виживання організму в екстремальних умовах. Отримані результати дали змогу висловити гіпотезу про неспецифічну дію НКМ за Cu-індукованого фіброзу печінки, суть якої полягає в тому, що НКМ можуть володіти герметичними властивостями, тобто бути герметинами, і як герметини вони можуть забезпечувати корекцію змінених метаболічних показників. З метою перевірки цієї гіпотези використовували порівняльний підхід. Суть якого в тому, що порівнювали дію на організм двох різних багатокомпонентних біологічних субстанцій: НКМ і "Мікс-фактор".

Виявили, що "Мікс-фактор" і НКМ, які значно різнилися за складом, практично однаковою мірою приводили до нормалізації вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій, принаймні гідроперекисів ліпідів, тобто усували розвиток окисного стресу, індукованого іонами міді. Усунення окисного стресу у тварин із фіброзом печінки "Мікс-фактором" і НКМ може пояснюватися активацією антиоксидантних ферментів. Якщо оцінювати антиоксидантну активність мітохондріальної системи печінки за співвідношенням глутатіонпероксидаза/гідроперекис ліпідів, то після введення "Мікс-фактору" тваринам із фіброзом це співвідношення становило 1:2,1, а після введення тваринам НКМ воно відповідало співвідношенню 1:2,8, що свідчить про те, що дві різні за складом багатокомпонентні біологічні субстанції чинять схожі ефекти на редокс-систему в експериментальних тварин із фіброзом печінки. Отримані

результати дають змогу зробити висновок: 1 - дія низькомолекулярних компонентів із різним складом ("Мікс-фактор" і НКМ) та отриманих із різних біологічних джерел, індукують схожі біологічні відповіді у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки; 2 - "Мікс-фактор" і НКМ стимулюють активність різних ізоформ глутатіонпероксидази, локалізованих у сироватці крові, мітохондріях і цитозолі клітин печінки, якщо їхня активність була знижена на тлі Cu-індукованого фіброзу; 3 - "Мікс-фактор" і НКМ не впливали на активність глутатіонредуктази у тварин із фіброзом, якщо вона залишалася на рівні контрольних значень; 4 - "Мікс-фактор" і НКМ можуть мати неспецифічну герметичну дію на організм і забезпечувати корекцію змінених метаболічних показників.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. Bozhkov, A. I., Linkevych, O. S., **Ivanov, E. G.**, Klimova, O. M., & Al Begai, M. A. Y. (2016). Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis. *International Journal of Current Research*, 8(12), 44129-44137. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Lebid, K. M., **Ivanov, E. G.**, Kurguzova, N. I., Gayevoy, S. S., & Al Begai, M. A. Y. (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*, 8(2), 2172-0479. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
3. Bozhkov, A. I., Ohienko, S. L., Bondar, A. Y., Klimova, E. M., & **Ivanov, E. G.** (2019). Induced Liver Fibrosis Is Accompanied in Young and Old Animals by Age-Dependent Changes in Bone Marrow Cells. *Advances in Gerontology*, 9(3), 289-297. **SCOPUS (Q4)** (Особистий внесок здобувача: планування та

участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

4. Bozhkov, A. I., Ohienko, S. L., Bondar, A. Y., Klimova, E. M., & **Ivanov, E. G.** (2019). Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells. *Advances in Gerontology*, 32(1-2), 45-54. **SCOPUS (Q4)** (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
5. Bozhkov, A. I., Ohienko, 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. **SCOPUS** (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
6. **Ivanov, I.**, Bondar, A., & Bozhkov, A. (2024). Age-dependent features of the bone marrow response to toxicogenic liver fibrosis in the experiment. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (March 1, 2024; Paris, France), 126-134. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

3.6. Дослідження дії "Мікс-фактору" як представник горметинів на показники редокс-системи та тривалість життя тварин в експеримент

3.6.1. Вплив "Мікс-фактору" на показники редокс-системи експериментальних тварин, які його отримували з 22 місячного віку.

Спроби знайти або створити засоби, які здатні збільшити тривалість життя, робили задовго до становлення геронтології як науки. Незважаючи на успіхи у вивченні механізмів старіння і соціальної значущості цієї проблеми, значущих результатів у цьому напрямку поки що не досягнуто. Цілком імовірно, що розробка геропротекторів (засобів, що збільшують тривалість життя) має базуватися на знанні механізмів старіння [394]. Численні дослідження можливих механізмів онтогенетичних змін дали змогу сформулювати кілька десятків гіпотез. Незважаючи на все розмаїття, вільнорадикальна гіпотеза старіння, як і раніше, залишається найбільш обговорюваною і, як і раніше, остаточно не вирішеною [395–398]. Якщо причиною вікових патологій є збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій, то при зниженні їхнього вмісту у старих тварин до рівня дорослих або молодих здорових тварин можна було б очікувати збільшення тривалості їхнього життя. Як правило, перевірка гіпотез ґрунтується на пошуку кореляцій між функціональними показниками (зокрема, прооксидантно-антиоксидантної системи) і тривалістю життя тварин. Цей підхід використано і в цій роботі. Вивчення показників активності окисно-відновної системи організму в онтогенезі представляє інтерес не тільки з погляду перевірки вільнорадикальної гіпотези старіння, а й тому, що редокс-система - одна з найдавніших еволюційних систем регуляції в біологічних системах [399], що відіграє важливу роль у регуляції метаболізму та, як наслідок, у тривалості онтогенезу.

Численні спроби регулювати окисно-відновну систему за допомогою різних екзогенних антиоксидантів дали суперечливі результати [400, 401]: 1 - екзогенні антиоксиданти не можуть надати істотного ефекту; 2 - продукти вільнорадикальних реакцій виконують важливі регуляторні функції [402, 403] і напрямок їхньої дії залежить від великої кількості чинників, що можуть змінюватися в онтогенезі, або, інакше кажучи, не варто очікувати прямої кореляції

між про- та антиоксидантною системами та тривалістю життя; 3 - старіння реалізується не за одним механізмом, а може мати індивідуально виражені особливості вікзалежних змін, тобто є виражені індивідуальні особливості старіння.

Виходячи з цього, при розробці геропротекторів необхідно виходити з того, що вони можуть збільшувати тривалість життя, якщо: 1 - забезпечують регуляцію не однієї, а кількох важливих функціональних систем організму (окисно-відновна система, імунна система, система детоксикації тощо), тобто матимуть системну дію; 2 - мають покращити якість життя та збільшувати його тривалість після надходження до організму не на ранніх, а на пізніших стадіях онтогенезу, тобто після надходження до організму дорослих і старих тварин. У зв'язку з цим пошук нових геропротекторів має включати вивчення особливостей окисно-відновної системи як основної регуляторної системи, а також потенційні геропротектори, принаймні, повинні забезпечувати збільшення тривалості життя на пізніших стадіях онтогенезу. Раніше було показано, що розроблений у нашій лабораторії багатокомпонентний низькомолекулярний природний комплекс - "Мікс-фактор" може усувати патологічні прояви, індуковані іонами важких металів [253, 256]. "Мікс-фактор" брав участь у регуляції функцій окисно-відновної системи [253, 256], імунної системи [264] і низки фізіологічних функцій в експериментальних тварин і має схожий механізм дії на тварин як і НКМ [253]. При цьому вплив "Мікс-фактора" залежав від віку тварин [366]. У зв'язку з цим на цьому етапі дослідження визначали вміст гідропероксидів ліпідів та активність антиоксидантних ферментів: глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази і малатдегідрогенази в мітохондріях печінки і сироватці крові дорослих тварин, що приймали "Мікс-фактор" щоденно з 22 місяців або 30,5 місяців до кінця життя.

Експерименти було проведено на дорослих (12 і 22 місяці) і старих (33 місяці) щурах-самцях лінії *Wistar*. Тварин утримували в стандартних умовах віварію. В експерименті щодо впливу "Мікс-фактору" на тривалість життя дорослих тварин було сформовано шість груп тварин (рис. 3.40).



Рис. 3.40. Схема експерименту. У тварин віком 12 і 33 місячні (1-ша і 6-та дослідні групи) вивчали біохімічні показники. Із 22-місячних тварин було сформовано 2-гу (контрольну) групу і 3-тю (дослідну), які отримували «Мікс-фактор» з питною водою в дозі 0,05-0,06 мл/100 г маси тіла. Із тварин 30,5-місячного віку також було сформовано дві групи - 4-ту (контрольну) та 5-ту (дослідну), у яких визначали тривалість життя та працездатність тривалість життя.

"Мікс-фактор" є харчовою добавкою та отриманий згідно з ТУУ 10.8-33206207-002:2018. Це природний комплекс, отриманий шляхом культивування грибів *Pleurotus ostreatus* із внесенням у водній культурі *Sacharomyces cerevisiae* з подальшим очищенням екзометаболітів. До складу яких входять: 67,2% олігосахаридів, вільні амінокислоти (тріонін - 3%, валін - 23%, цистеїн - 16%, метіонін - 11%, лейцин - 10%, аргінін - 4%, ізолейцин - 4%, лізин - 1%, решта в слідових кількостях) і олігопептиди - 23,3%, ліпіди - 11,5% і невелика кількість вітамінів (В1 - 0,38 мг/л, В2 - 3,24 мг/л, РР - 8,3 мг/л). Усі компоненти добре розчиняються у воді, розчин стабільний не менше 2 років. "Мікс-фактор" нетоксичний, чинить імуномодулюючу дію [300], гепатотропну дію [300] та усуває токсичну дію сірчанокислої міді як і НКМ [256]. У тривалих експериментах на дорослих тваринах (середня маса 320-350 г) "Мікс - фактор" отримували з питною водою. Поїлки з "Мікс-фактором" міняли щодня, кожен щур випивав

близько 20 мл води щодня, в якій містилося 160 мкл Мікс-фактором, тобто доза "Мікс-фактора" становила 50 мкл/100 г маси тіла на день. Під час експерименту маса тіла і температура тіла (контролювалися щотижня) не змінювалися порівняно з контрольними групами тварин. У дослідних щурів явних патологій не було виявлено.

На рис. 3.40 представлено дані щодо вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки дорослих-12 місячних щурів і 33 місячних тварин, яких утримували в стандартних умовах віварію. Виявили, що кількість гідроперекисів ліпідів у старих (33 місячних) тварин була збільшена порівняно з 12 місячними на 25%. У тому разі, якщо тварини починаючи з 22 міс. віку отримували з питною водою "Мікс-фактор" щодня до 33 місячного віку, то вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки таких тварин не відрізнявся від їхнього вмісту в 12-місячних тварин (рис. 3.41 А).

Ще яскравіше ці вікові відмінності проявлялися за вмістом гідроперекисів ліпідів у сироватці крові. Так, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові 33-місячних тварин був збільшений на 41% порівняно з 12-місячними тваринами (рис. 3.41 В). У тому разі, якщо тварини отримували щоденно "Мікс-фактор", починаючи з 22 міс. віку, то при досягненні 33 міс. віку кількість гідроперексидів ліпідів у мітохондріях печінки таких тварин не відрізнялася від їхньої кількості в 12-місячних щурів (рис. 3.41 В).

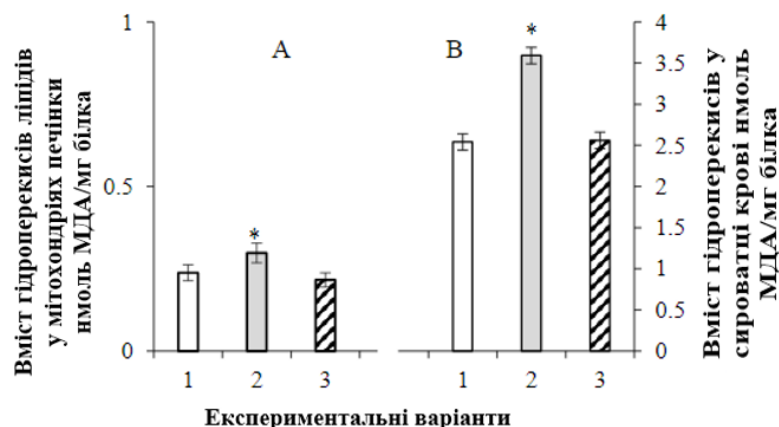


Рис. 3.41. Вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки (А) та сироватці крові (В) у 12-місячних тварин (1) та 33-місячних тварин (2), яких

утримували у стандартних умовах, та 33-місячних тварин, які отримували "Мікс-фактор" щоденно з питною водою, починаючи з 22-місячного віку, у дозі 0,05-0,06 мл/100 г маси тіла. (3) Наведено середні значення по 8 тваринам у кожному варіанті, * - зазначено відмінності порівняно з інтактним контролем 12-місячного віку. Вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові, нмоль МДА/мг вміст гідроперекисів ліпідів, нмоль МДА/мг білка.

Таким чином, з 12 до 33 місяців у тварин, які утримувалися в стандартних умовах віварію, збільшувався вміст продуктів вільнорадикальних реакцій. Існує добре виражений зв'язок між вмістом гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки та організмі загалом, що дає змогу використовувати мітохондрії печінки як "маркер" вікових змін в організмі. Якщо починаючи з 22-місячного віку, щури вживали щодня "Мікс-фактор" з питною водою в дозі 0,05-0,06 мл/100 г маси тіла, то вміст гідроперекисів ліпідів як у мітохондріях, так і в сироватці крові в таких тварин не відрізнявся від їхнього вмісту в 12-місячних інтактних тварин. Звичайно, цей факт не вказує на те, що такі щури "помолодшали", але він свідчить про те, що компоненти "Мікс-фактора" впливають на деякі характеристики редокс-системи. У зв'язку з цим, важливо розуміти механізми його дії.

Як відомо, процес підтримання кількості гідроперекисів ліпідів на стабільному рівні можна реалізувати декількома способами. По-перше, компоненти "Мікс-фактору" можуть бути здатні активувати систему антиоксидантного захисту дорослого організму, а подруге, самі компоненти "Мікс-фактору" можуть діяти як антиоксиданти та "попереджувати" утворення продуктів вільнорадикальних реакцій, тобто вони можуть індукувати гормезисний ефект, не можна виключати і те, що "Мікс-фактор" може як і НКМ чинити поліфункціональну дію, результатом чого і може бути зменшення гідропероксидів ліпідів у старих тварин.

Раніше було показано, що глутатіонпероксидаза є одним з антиоксидантних ферментів глутатіонового циклу, яка активно реагує на різні екзогенні впливи [300]. У цій роботі було показано, що вміст гідроперекисів ліпідів в організмі добре корелює зі зміною активності глутатіонпероксидази. З огляду на це,

визначали активність глутатіонпероксидази в мітохондрій печінки, постмітохондріальній фракції (цитозолі), еритроцитах і сироватці крові експериментальних тварин.

Виявилося, що активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки у старих тварин (33 місяців), які утримувалися в стандартних умовах, була на 25% менш активною порівняно з її активністю 12-місячних тварин, яких утримували за тих самих стандартних умов (рис. 3.41 А). Важливо відзначити, що активність цього ферменту у 33-місячних тварин була знижена порівняно з 12-місячними тваринами і в постмітохондріальній фракції печінки на 30%, в еритроцитах на 25%, а в сироватці крові на 35% (рис. 3.42).

Як уже зазначалося, наразі виділено 7 ізоформ глутатіонпероксидази, що мають різну тканинну і клітинну локалізацію [404]. У цій роботі було виявлено досить високу активність глутатіонпероксидази в постмітохондріальній фракції печінки. Це можна пояснити тим, що ця фракція містить щонайменше дві ізоформи цього ферменту: мікросомальну та цитозольну. Отже, у процесі природного старіння мало місце зниження активності різних ізоформ глутатіонпероксидази і це частково корелювало зі збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів в організмі тварин.

У тому разі, якщо тваринам, починаючи з 22-місячного віку, давали "Мікс-фактор" щодня з питною водою, то активність глутатіонпероксидази в 33-місячних тварин не відрізнялася від такої для 12-місячних інтактних тварин, і це було характерно для всіх досліджених фракцій печінки, сироватки крові та еритроцитів (рис. 3.42).

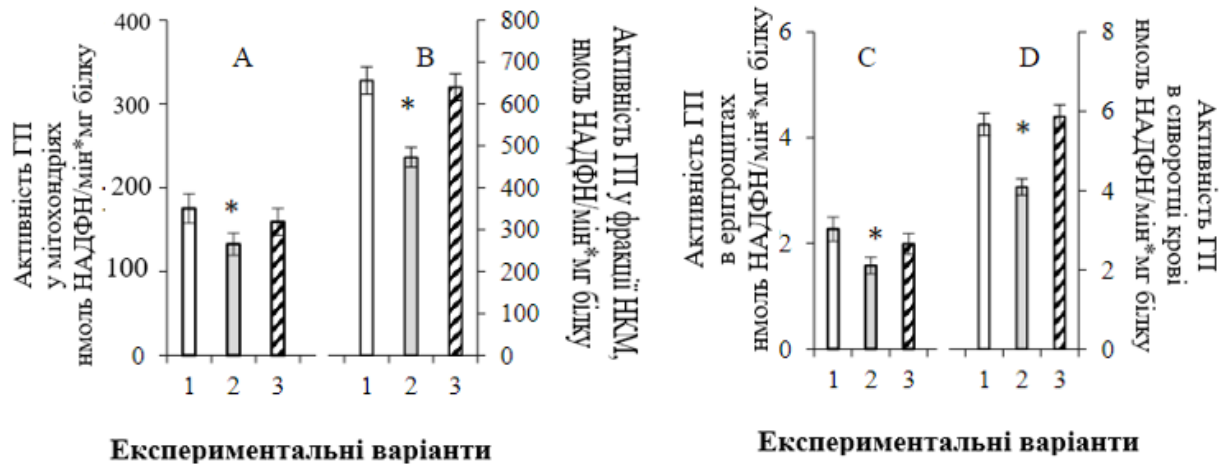


Рис. 3.42. Активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки (А), постмітохондріальній фракції печінки (В), еритроцитах (С) та сироватці крові (D) у 12-місячних тварин (1) та 33-місячних тварин (2), які утримували у стандартних умовах, та тварин, які щодня отримували "Мікс-фактор" з питною водою, починаючи з 22-міс, у дозі 0,05-0,06 мл/100 г маси тіла (3). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки по 8 тваринам у кожному варіанті, * - відмінності порівняно з інтактним контролем у віці 12 міс.

Отже, "Мікс-фактор" призводив до збільшення активності глутатіонпероксидази в різних клітинах (гепатоцити та еритроцити) і компартментах клітин печінки (мітохондрії, цитозоль) у тварин, які його приймали починаючи з 22 місячного віку аж до 33 місячного віку до рівня дорослих тварин (12 міс.), що корелювало зі зменшенням у таких тварин вмісту гідроперекисів ліпідів.

Представляло інтерес визначити активність й інших антиоксидантних ферментів, зокрема, активність глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази та малатдегідрогенази в мітохондріях і постмітохондріальній фракції печінки у досліджуваних груп тварин. Виявили, що активність глутатіонредуктази в мітохондріях печінки старих тварин зберігалася на рівні 12-місячних щурів, а вживання експериментальними тваринами "Мікс-фактора" не чинило на неї впливав.

Поряд із цим, активності: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази в мітохондріях печінки в 33 міс. щурів не відрізнялися від їхніх активностей у 12 міс. щурів (табл. 3.14). Важливо зазначити, що прийом "Мікс-фактора" не впливав на активність цих ферментів. Необхідно звернути увагу на те, що якщо досліджуваний показник перебуває в межах гомеостатичного рівня, то він виявляє більшу стабільність у разі дії екзогенних чинників. Такі особливості були встановлені і в багатьох інших дослідках.

Таблиця 14

Активність деяких ферментів у мітохондрій та постмітохондріальній фракціях печінки 12-місячних щурів та 33-місячних щурів контрольних груп тварин та тварин, які отримували "Мікс-фактор" з 22 міс. віку і до 33 місячного віку. Представлені середні значення отриманих даних для 8 тварин у кожній з груп. * - варіанти для яких $P \leq 0,05$ порівняно з 33 міс. тваринами які не отримували "Мікс-фактор".

Активність ферментів	Фракції			
	Мітохондрії		Постмітохондріальна	
	вік, місяці		вік, місяці	
нмоль NADPH / мін * мг білку	12	33	12	33
		Контроль		Контроль
		Мікс-фактор		Мікс-фактор
Глюкоза-6-фосфат-егідрогеназа	31.8 ± 7.4	31.1 ± 3.8 25.5 ± 4.1	72.3 ± 15.6	77.1 ± 7.6 72.6 ± 18.4
ізоцитратдегідрогеназа	306.0 ± 29.0	325.5 ± 20.6 308.1 ± 28.1	252.0 ± 34.9	263.4 ± 22.2 233.8 ± 50.9
малатдегідрогеназа	4.03 ± 0.67	3.61 ± 0.74 3.93 ± 1.05	69.1 ± 9.6	40.4 ± 5.8* 37.3 ± 8.7*

Визначення активності цих ферментів у постмітохондріальній фракції печінки підтвердило їхню стабільність в онтогенезі та після приймання "Мікс-фактору", за винятком малатдегідрогенази, активність якої знижувалась із віком, а "Мікс-фактор" на неї не впливав (табл.3. 14).

Як було зазначено, дія "Мікс-фактора" може бути зумовлена його впливом на активність антиоксидантних ферментів, а можливо, що його компоненти також

мають і прямі антиоксидантні властивості. У наступній серії експериментів було визначено антирадикальні та антиоксидантні властивості компонентів молозива в системі *in vitro*. Виявили, що додавання в модельну систему "Мікс-фактора" в концентрації 2,5 мкл на 1 мл середовища сповільнило окиснення ліпопротеїнів жовтка на 28 %, причому зі збільшенням концентрації до 5 і 10 мкл цей ефект лінійно зростав і становив понад 70 % (рис. 3.43).

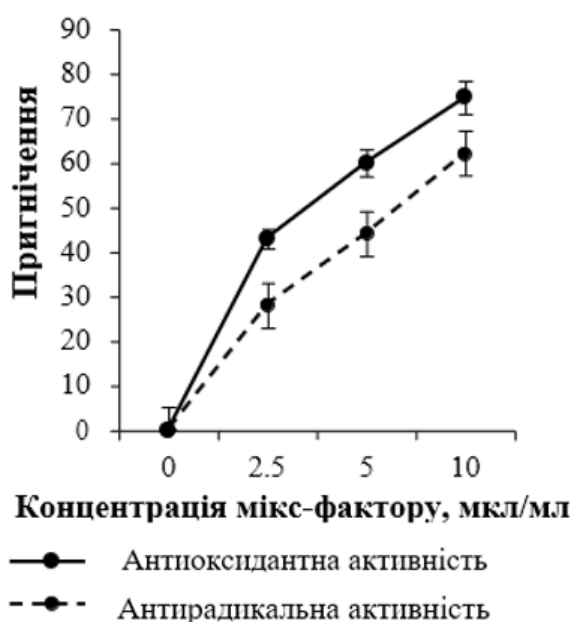


Рис.3.43. Антиоксидантна та антирадикальна активність "Мікс-фактора" при тестуванні в системі *in vitro*, які виражені у відсотках від контрольних значень

Якщо порівняти антиоксидантну активність "Мікс-фактора" з кверцетином (флавоноїдом з відомою антиоксидантною активністю [405]), то їхня антиоксидантна активність була подібною.

Компоненти "Мікс-фактора" виявляли і виражений ефект перехоплення ОН- радикалів у модельна система. Так, за концентрації 2,5 мкл на 1 мл він "перехоплює" до 43 % ОН-радикалів, а за концентрації 10 мкл на 1 мл - до 60 %, індукованих у модельній системі радикалами (рис. 3.43).

Отже, самі компоненти "Мікс-фактора" мали виражені антиоксидантні та антирадикальні активності в модельній системі.

3.6.2. Вплив "Мікс-фактору" на тривалість життя експериментальних тварин, які його отримували з 22 місячного віку

Цілком, очевидно, що тривалість життя тварин залежить не тільки від характеристик редокс-системи, а є інтегральною характеристикою всієї гомеостатичної системи організму. Водночас визначення можливого взаємозв'язку між показниками редокс-системи та тривалістю життя представляє інтерес не тільки в рамках вільнорадикальної гіпотези старіння, а й у розумінні регуляторних механізмів антиоксидантно-прооксидантної системи. Виходячи з цього на наступному етапі роботи визначали можливий вплив "Мікс-фактору" на тривалість життя експериментальних тварин. З цією метою було сформовано дві експериментальні групи з 61 самця 22-місячних щурів. До контрольної групи була включена 31 тварина, усі тварини цієї групи утримувалися в стандартних умовах віварію, а дослідна група з 30 тварин, починаючи з 22 місячного віку, щоденно одержувала "Мікс-фактор" із питною водою в середньому по 0,05 мл на 100 г маси тіла до кінця життя (рис. 3.44).

Виявили, що тривале приймання "Мікс-фактора" з 22-місячного віку уповільнювало природну загибель тварин у період від 740 днів (25,6 міс) до 860 днів (28,6 міс) спостережень (рис. 3.44 А).

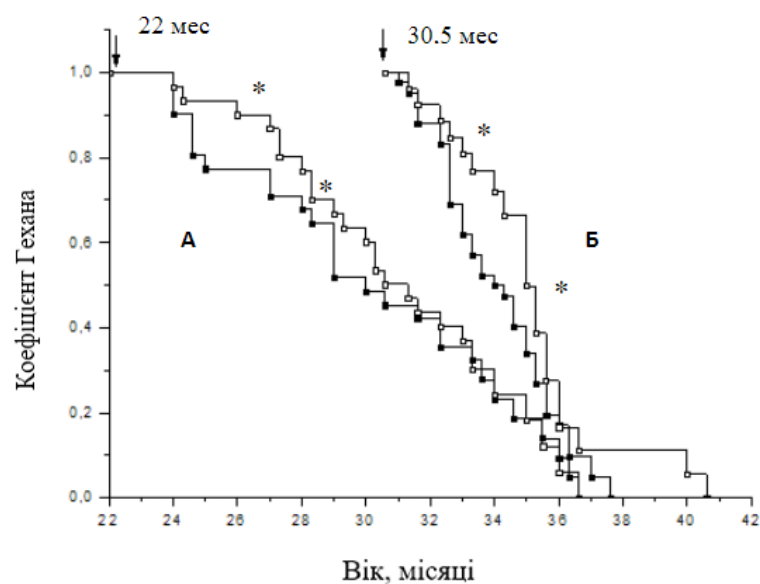


Рис.3.44. Криві виживаності контрольної групи тварин) (■—) і тварин, які отримували щоденно "Мікс-фактор"(□—), від 22-місячного віку до кінця життя (А)

і отримували щоденно "Мікс-фактор" з 30,6-місячного віку до кінця життя (Б). * - початкові та кінцеві достовірні відмінності порівняно з контролем.

Однак, починаючи з 940-го дня (31,3 міс), контрольна та дослідна групи за показниками часу настання смертності не різнилися (рис.3.44 А). При оцінці тривалості життя часто використовують критерій - максимальна тривалість життя (загибель останньої тварини у дослідній групі), яка припала на 1100 день (36,6 міс).

Отже, вживання "Мікс-фактору" старими тваринами (22 міс.віку) призвело до достовірного зменшення смертності на короткий період з 25 до 28 місяців (рис.3.44). Було цікаво перевірити цей ефект на пізніших етапах онтогенезу, приміром, у 30 місячних тварин, тобто в той період, коли дослідна і контрольна групи не відрізнялися за смертністю.

У зв'язку з цим у другій серії експериментів також було сформовано дві групи: контрольну (40 щурів) і дослідну (26 щурів) із тварин віком 920 днів (30,5 міс). Експериментальна група щурів отримувала "Мікс-фактор" щодня так само з питною водою в тій самій дозі (0,05 мл/100 г маси тіла) до кінця життя.

Отримані результати, які представлені на рис. 3.44 Б показали, що: 1 - максимальна тривалість тварин контрольної групи становила 36-37 місяців; 2 - починаючи з віку тварин 30 місяців у контрольній групі "вимирання" відбувалося з більшою швидкістю, порівняно з віковим періодом у 22 місяці; 3 - щоденне приймання "Мікс-фактора", так само на короткий період, у даній віковій групі сповільнювало процес "вимирання" з 34 до 38 місяців; 4 - у дослідній групі, яка щоденно приймала "Мікс-фактор", починаючи з 30,5 місячного віку, максимальна тривалість життя сягала 1220 днів, або 40,6 місяця (рис. 3.44 Б).

Отримані результати становлять інтерес у кількох аспектах.

По-перше, вживання "Мікс-фактору" на дуже пізніх етапах онтогенезу спричиняє більш виражений ефект зі зменшення смертності та збільшення максимальної тривалості життя, що є дещо несподіваним.

По-друге, збільшення максимальної тривалості життя в окремих особин дає змогу припустити, що якщо екстраполювати криву смертності для дослідної групи

на всіх тварин із 36-місячного до 40-місячного віку, тобто до досягнення максимальної тривалості життя, то можна було б одержати збільшення не тільки максимальної, як для деяких тварин, а й середньої тривалості життя для всієї групи (рис. 3.44 Б).

І нарешті, можна припустити, що в основної маси тварин "спрацьовує заборона" на збільшення тривалості життя, водночас у деяких тварин має місце збільшення тривалості життя, але тільки в тому разі, якщо приймання "Мікс-фактора" розпочинали з 30 місячного віку. Ці припущення, звісно, потребують додаткових досліджень, а на даному етапі можна стверджувати, що між показниками редокс-системи та тривалістю життя існує досить складний взаємозв'язок.

Як відомо, однією з вікозалежних характеристик тварин є їхня здатність адаптуватися до дії різноманітних екзогенних чинників, і в цьому відношенні особлива роль відводиться здатності молодих і старих тварин виконувати роботу (працездатність). Здатність виконувати фізичні навантаження свідчить про ефективність м'язової, "енергетичної" та дихальної систем до узгодженої діяльності в екстремальних умовах і про потенційний резерв організму. Дослідження впливу "Мікс-фактора" на працездатність тварин на пізніх етапах онтогенезу може бути інтерпретовано як його вплив на якість життя.

У наступній серії експериментів визначали здатність 22-місячних щурів виконувати максимально можливе фізичне навантаження шляхом бігу на біговій доріжці до повної знемоги.

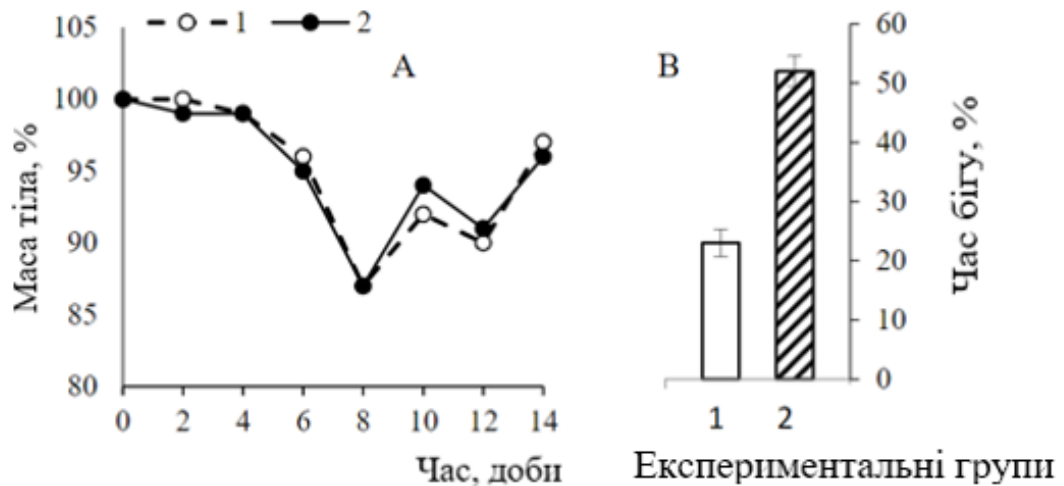


Рис. 3.45. Зміна маси тіла від вихідної (А) у тварин контрольної групи (1) і тварин, які отримували щоденно "Мікс-фактор" при тренуванні на біговій доріжці впродовж 14 днів (2), збільшення часу бігу на біговій доріжці через 14 днів навчання тварин контрольної групи (1) і групи, що отримала "мікс-фактор" (2) від вихідного часу (В). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для 8 тварин у кожній групі.

Виявилося, що такі виснажливі фізичні тренування супроводжувалися втратою маси тіла однаковою мірою в контрольних і піддослідних тварин, що особливо виражено було на 8-й день тренувань (рис. 3.45 А). Однак після 8-ї доби «тренувань» у них маса тіла відновлювалася, незважаючи на триваючі фізичні навантаження як у групі контрольних, так і дослідних тварин (рис. 3.45 А).

Ці результати показують, що тварини зазнали стресу і добре до нього адаптувалися.

Під час оцінки здатності здійснювати роботу виявили, що таке тренування забезпечувало збільшення часу бігу на біговій доріжці на 22% порівняно з їхнім першим забігом у контрольній групі (рис. 3.45 В). Якщо тварини щодня отримували "Мікс-фактор", то час бігу в них збільшувався на 55% від початкового часу бігу (рис. 3.45 В). Ці дані добре узгоджуються з даними про вплив НКМ на збільшення працездатності під час тесту плавлення з вантажем і наявними даними в літературі про вплив молозива на працездатність.

Отже, "Мікс-фактор" покращував здібності старих тварин адаптуватися до фізичного навантаження і виконувати роботу. Необхідно зазначити, що за даними ООН, до 2025 року кількість літніх людей сягне 1 мільярда осіб, що становитиме 13,7% населення світу. Проблема поліпшення якості життя літніх людей, зокрема, здатність виконувати фізичну роботу, є найважливішою медико-соціальною проблемою.

Висновок до розділу 3.6.

Таким чином, з 12 до 33 місяців у тварин, які утримувалися в стандартних умовах віварію, збільшувався вміст продуктів вільнорадикальних реакцій. Існує добре виражений зв'язок між вмістом гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки та організмі загалом, що дає змогу використовувати мітохондрії печінки як "маркер" вікових змін в організмі на рівні редокс-системи. Якщо починаючи з 22-місячного віку щури вживали щоденно "Мікс-фактор" із питною водою в дозі 0,05-0,06 мл/100 г маси тіла, то вміст гідроперекисів ліпідів як у мітохондріях, так і в сироватці крові в таких тварин не відрізнявся від їхнього вмісту в 12-місячних інтактних тварин. Звичайно, цей факт не вказує на те, що такі щури "помолодшали", але він свідчить про те, що компоненти "Мікс-фактора" впливають на деякі характеристики редокс-системи. У зв'язку з цим, важливо розуміти механізми його дії. У тому разі, якщо тваринам, починаючи з 22-місячного віку, давали "Мікс-фактор" щодня з питною водою, то активність глутатіонпероксидази в 33-місячних тварин не відрізнялася від такої для 12-місячних інтактних тварин, і це було характерно для всіх досліджених фракцій печінки, сироватки крові та еритроцитів. Отже, "Мікс-фактор" спричиняв збільшення активності глутатіонпероксидази в різних клітинах (гепатоцити та еритроцити) і компартментах клітин печінки (мітохондрії, цитозоль) у тварин, які його приймали, починаючи з 22-місячного віку до 33-місячного віку до рівня дорослих тварин (12 міс.), що корелювало зі зменшенням у таких тварин вмісту гідроперекисів ліпідів. Виявили, що компоненти "Мікс-фактора" мали виражені антиоксидантні та антирадикальні активності як у модельній системі, так і на рівні організму. Установили, що: 1 - максимальна тривалість тварин контрольної групи становила 36-37 місяців; 2 - починаючи з віку тварин 30 місяців у контрольній групі "вимирання" відбувалося з більшою швидкістю, порівняно з віковим періодом у 22 місяці; 3 - щоденне приймання "Мікс-фактора", так само на короткий період, у даній віковій групі сповільнювало процес "вимирання" з 34 до 38 місяців; 4 - у дослідній групі, яка щоденно вживала препарат, починаючи з 30,5

місячного віку, максимальна тривалість життя сягала 1220 днів, або 40,6 місяця. "Мікс-фактор" як і НКМ покращував якість життя.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Lebid, K. M., **Ivanov, E. G.**, Kurguzova, N. I., Gayevoy, S. S., & Al Begai, M. A. Y. (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*, 8(2), 2172-0479. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. Bozhkov, A., **Ivanov, I.**, Klimova, E., Kurguzova, N., Bozhkov, A., Goltvyanskiy, A., & Nikitchenko, Y. (2021). "Mix-Factor" is involved in the regulation of the organism's redox systems in the late stages of ontogenesis and affects the lifespan of animals. *Ageing and longevity*, 2(2), 24-36. (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

3.7. Розробка способу контролю якості фракцій молозива на основі визначення електропровідності компонентів молозива як інтегральний показник

3.7.1. Обґрунтування використання методу визначення електропровідності як інтегрального показника характеристик компонентів молозива

Як уже зазначалося, однією з проблем розширення сфер використання такої багатокомпонентної біологічно активної субстанції як молозиво і «Мікс-фактор» є складність в отриманні стандартних зразків або відсутність способів стандартизації. Одним із підходів у розв'язанні цієї проблеми може бути використання "селективно-інтегративного підходу", як етапу стандартизації при отриманні компонентів із молозива. Однак, існуючі сучасні аналітичні методи аналізу багатокомпонентних сумішей, такі як мас-спектрометрія, високоефективна хроматографія та ін., є трудомісткими та дорогими, що ускладнює їхнє практичне застосування у виробничих лабораторіях. У зв'язку з цим, поряд з наявними методами визначення таких показників, як жирність, рН, загальний вміст білка та інших показників, необхідна розробка і впровадження додаткових фізико-хімічних методів аналізу компонентів молозива. Виходили з того, що при доборі додаткових методів контролю за якістю компонентів молозива або незбираного молозива методи мають бути експресними, надійними, доступними, а з огляду на багатокомпонентність складу - інтегративними.

Вважаємо, що таким критерієм може задовольняти такий біофізичний показник як електропровідність різноманітних біологічних субстанцій. Необхідно зазначити, що електропровідність залежить щонайменше від співвідношення заряджених молекул у розчині та нейтральних молекул (діелектриків), на цей показник впливає наявність електропровідних структур, можна припустити, що електропровідність може залежати від характеристик редокс-системи досліджуваної біологічної субстанції, тобто рівень електропровідності може слугувати інтегративним показником якості молозива. Вимірювання електропровідності займає кілька хвилин, тобто може бути експресним, простим у виконанні та інтерпретації отриманих результатів і досить надійним.

3.7.2. Дослідження впливу температури та індивідуальних особливостей продуцентів молозива на електропровідності цільного молозива та його компонентів

У першій серії експериментів визначали електропровідність цільного молозива та знежиреного молозива. Виявили, що видалення ліпідів із молозива призводило до збільшення електропровідності (рис. 3.46). Як відомо, ліпіди виявляють властивості діелектриків [406]. Це підтверджує те, що електропровідність визначається співвідношенням між зарядженими молекулами і діелектриками.

Температура, за якої вимірювали електропровідність, має відносно невеликий вплив на електропровідність молозива. Так, у діапазоні від 14°C до 19°C мало місце відносно невелике лінійне збільшення електропровідності, що проявлялося однаковою мірою як для цільного, так і знежиреного молозива (рис. 3.46).

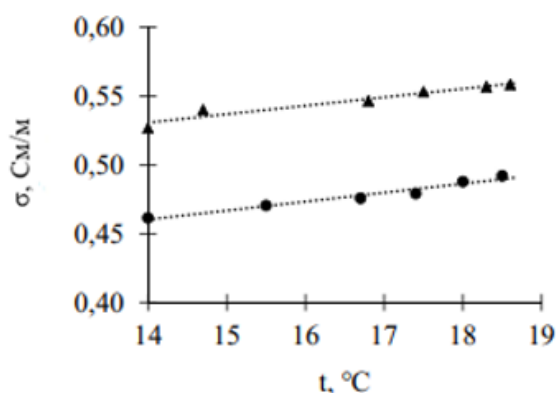


Рис. 3.46. Електропровідність незбираного молозива (●) і знежирене молозиво (▲), яку визначали за частотою електричного струму 0,49 МГц у діапазоні температур від 14 °C до 19 °C, представлено типові криві провідності трьох незалежних визначень.

Надалі всі вимірювання електропровідності проводили за температури 18°C.

Як уже зазначалося, склад молозива залежить від великої кількості ендогенних та екзогенних чинників, у зв'язку з цим становило інтерес визначення

електропровідності молозива та його компонентів, що було отримано в різних корів однієї породи, одного віку, в один сезон та утримувались в однакових умовах одного господарства. Такий підхід може дати змогу оцінити можливості методу електропровідності при оцінці впливу ендогенних чинників на склад молозива.

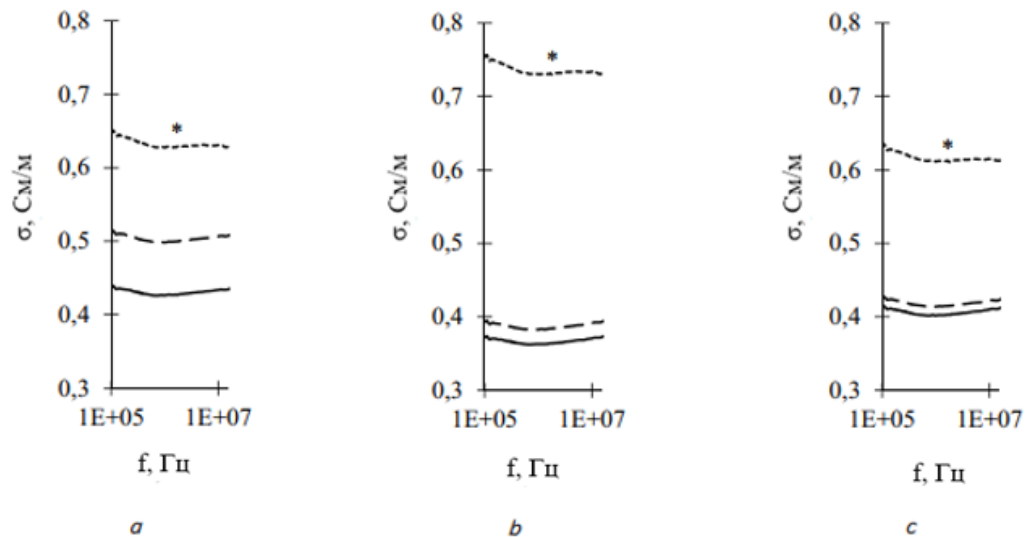


Рис.3.47. Електропровідність цілого молозива (—), знежиреного молозива (— — —) і низькомолекулярних компонентів молозива (.....) у діапазоні частот 100 кГц-100 МГц: а - молозиво та його компоненти, отримані від корови на прізвисько "Аврора"; б - молозиво та продукти молозива, отримані від "Бариня"; с - молозиво та продукти молозива, отримані від "Муха". Показано типові криві електропровідності з трьох незалежних повторів; * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з цілим молозивом.

Як, видно, з результатів представлених на рис. 3.47 електропровідність незбираного молозива отриманого у трьох корів незначно варіювала в діапазоні від 0,37 до 0,43 См/см і не залежала від частот напруги в діапазоні 100 кГц-10 МГц.

Видалення ліпідів із молозива супроводжувалося збільшенням електропровідності порівняно з цілісним молозивом; однак для "Аврори" збільшення електропровідності порівняно з цілісним молозивом становило 17,0 %

від початкового рівня, а для "Барині" та "Мухи" - лише 5,6 і 2,9 % відповідно від цільного молозива (рис. 3.47).

Ці результати дають змогу припустити, що кількість жиру в молозиві у різних корів була різною, і його видаляли під час знежирення різною мірою, і "внесок" ліпідів у показник електропровідності не справляє істотного впливу.

Отримані результати також дозволяють припустити, що видалення відносно високомолекулярних білків збільшують електропровідність, або ж видалення високомолекулярних білків збільшує відносний вміст заряджених молекул (іонного складу, вільних амінокислот, коротких пептидів і низькомолекулярних білків).

З метою вирішення цього важливого питання для розуміння механізму електропровідності в складних за складом біологічних сумішей, визначали можливий взаємозв'язок електропровідності зі складом білків компонентів молозива.

3.7.3. Вплив білкового складу молозива та його компонентів на електропровідність.

Загальний склад знежиреного молозива являє собою концентрований розчин білків. Так, об'єднане молозиво, отримане у трьох виробників, містить 92 % білків із різними молекулярними масами, 7,69 % вуглеводів і 0,31 % вітамінів та інших речовин, зокрема різноманітних іонів (рис. 3.48).

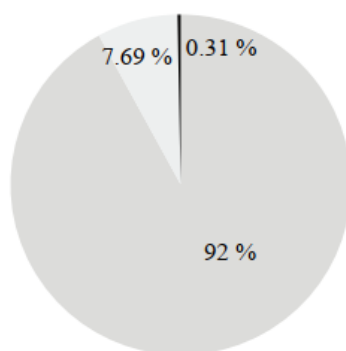


Рис.3.48. Вміст білка (■) , вуглеводів (■) та інших неідентифікованих компонентів (■) у знежиреному молозива, який виражено у відсотках на сухі речовини.

Білковий склад знежиреного молозива представлений сотнями різноманітних білків із молекулярними масами від 4 до 20 кДа і більше (рис. 3.49).

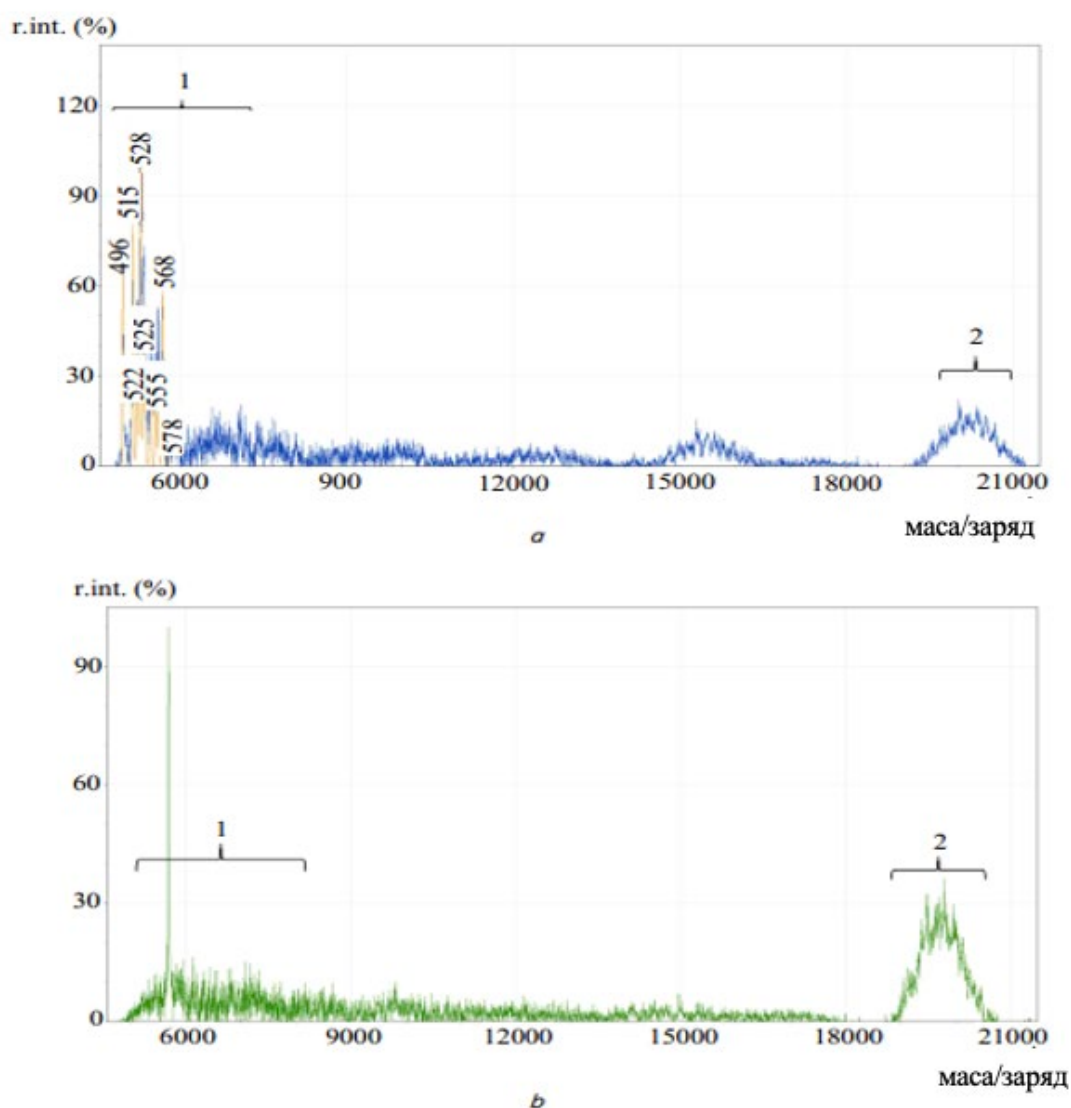
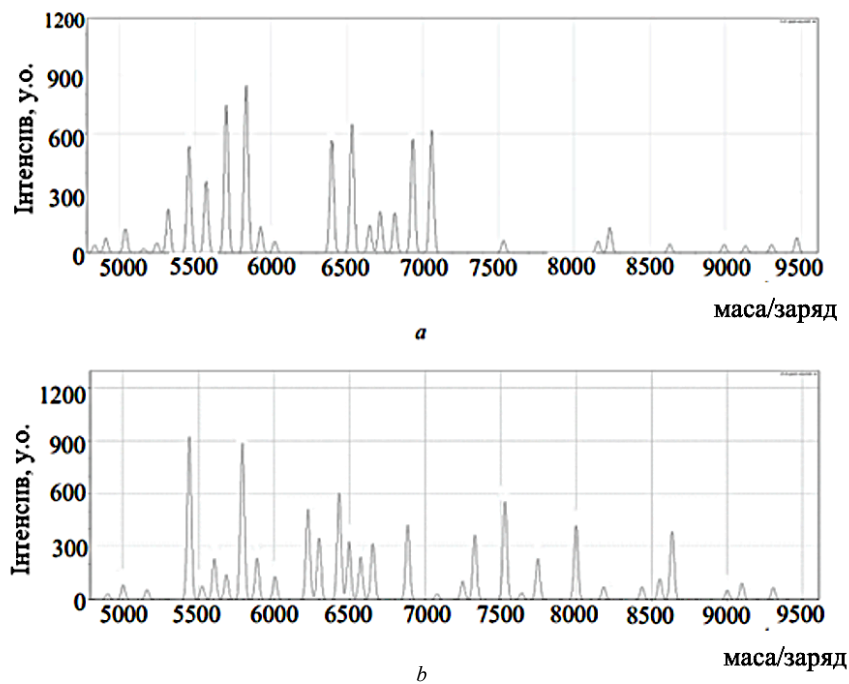


Рис. 3.49. Склад білків знежиреного молозива за даними мас-спектрометрії: а - молозиво, отримане в "Аврори", б - молозиво, отримане в "Барині" 1 - склад білків із молекулярною масою від 4 до 9 кДа, 2 - склад білків із молекулярною масою від 19 до 20,5 кДа.

Найбільша кількість білків припадала на білки з молекулярними масами від 4 до 9 кДа (рис. 3.49, зони 1) і з молекулярними масами від 19 до 20,5 кДа (рис. 3.49, зона 2). Важливо відзначити, що молозиво, отримане від різних корів, різнилося як кількісно, так і якісно.

Після видалення більшості високомолекулярних білків (тих, що мають мол. масу понад 10 кДа) методом мембранної фільтрації дало змогу ідентифікувати 27 фракцій білків із молекулярною масою від 4835 до 9470 Да для "Аврори" та 30 фракцій білків у тому самому діапазоні молекулярних мас у "Барині" (рис.. 3.50). Слід зазначити, що для білків молозива, отриманих від "Аврори" та "Барині", серед низькомолекулярних білків можна видокремити лише 5 фракцій білків, що були схожими (рис. 3.50).



Діапазон значень маса/заряд, Да	Ім'я корови	Групи білків за співвідношенням маси та заряду маса/заряд, Да в заданих діапазонах						
4800-5300	Аврора	4 835	4909			5037	5159	5245
	Бариня			4897	5000		5158	
5300-5700	Аврора	5321		5458		5571		
	Бариня		5438		5524		5603	5683
5700-6100	Аврора	5703		5835		5930		6024
	Бариня		5790		5886		6005	
6100-6600	Аврора			6400			6534	
	Бариня	6224	6297		6430	6496		6573
6600-7100	Аврора	6650	6720	6816		6934	7059	
	Бариня	6653			6884			7078
7100-8000	Аврора			7534				
	Бариня	7248	7329	7528	7639	7747	7999	
8000-9000	Аврора	8157		8235			8635	8990
	Бариня		8183		8436	8553	8631	
9000-9500	Аврора			9131	9304	9470		
	Бариня	9001	9097		9305			

Рис. 3.50. Склад нізкомолекулярних білків молозива отриманих у «Аврови» (а), та у «Барині» (b), а також класифікація цих білків на групи у цих корів. Продемонстровані типові результати, які було отримано для 5 осіб.

Висока варіабельність складу білків молозива підтверджується даними інших досліджень. Найбільший інтерес з погляду біологічної активності становлять білки молозива з молекулярною масою близько 5 кДа - так званий антигенспецифічний фактор перенесення - SFT [407]. Молекулярний аналіз антигенспецифічних білків молозива було вперше описано в роботі [408]. Є дані, що понад 200 різних білків молозива мають імуномодуючу дію та імунозамісні властивості [409]. Результати цієї роботи розширюють наші знання про біологічну дію НКМ на цілу низку функціональних систем організму, зокрема на функції печінки, кісткового мозку та клітинної ланки імунної системи.

Видалення високомолекулярних білків зі знежиреного молозива після мембранної фільтрації супроводжувалося зменшенням кількості білка в 3,3 раза порівняно з цільним молозивом. Важливо зазначити, що видалення високомолекулярних білків та/або зменшення кількості білків у складі молозива супроводжувалося значним збільшенням електропровідності для всіх трьох варіантів, незалежно від джерела їхнього отримання.

Так, електропровідність низькомолекулярних компонентів молозива, що було отримано в «Аврори», підвищилася на 40,5 % і 47,4 % порівняно зі знежиреним і цільним молозивом відповідно. Ще більшою мірою збільшилася електропровідність для НКМ, отриманого у "Барині", відповідно на 96,1 % і 101 % порівняно зі знежиреним і цільним молозивом, а для НКМ «Мухи» - збільшення електропровідності становило - 50,1 % і 52,3 % відповідно.

Слід зазначити, що найбільше збільшення електропровідності порівняно з цільним молозивом після видалення високомолекулярних білків, тобто фракції НКМ, було виявлено для молозива, отриманого від "Барині", для нього був характерний найбільший спектр низькомолекулярних білків порівняно з іншими зразками .

Отже, високомолекулярні білки (молекулярна маса яких перевищує 10 кДа), що формують більшу частину пулу білків молозива, знижують рухливість іонів в електричному полі. Це може пояснюватися тим, що ці білки не заряджені та/або тим, що навіть за наявності в них заряду їхня рухливість в електричному полі буде

низькою через великий опір, спричинений іншими полімерами. Можна стверджувати, що між білковим складом компонентів молозива та електропровідністю існує взаємозв'язок. Зрозуміло, що на електропровідність водних розчинів найбільший вплив має кількісний і якісний склад іонів. Так само, немає сумнівів і в тому, що наявність ліпідів у молозиві, які є діелектриками, здатні зменшувати електропровідність таких сумішей. Виходячи з цього можна зробити висновок, що електропровідність таких багатокомпонентних сумішей, як молозиво, буде залежати від балансу між кількістю та складом білків, іонів, що входять до складу, та кількості ліпідів, тобто електропровідність є інтегральною характеристикою таких багатокомпонентних сумішей. Використання показників електропровідності як цільного молозива, так і його компонентів є виправданим і перспективним у стандартизації субстанцій, які отримують із молозива.

Як відомо, склад молозива змінюється в процесі зберігання. Це пояснюється кількома причинами. По-перше, до складу молозива входять різноманітні ферменти, зокрема й гідролітичні, які призводять до зміни його компонентів. По-друге, воно досить швидко інфікується, що так само супроводжується зміною його складу. У зв'язку з цим, оцінка показників електропровідності компонентів молозива в процесі зберігання може слугувати підтвердженням висловлених суджень щодо факторів, які впливають на електропровідність, і бути використаною для оцінки термінів зберігання.

3.7.4. Дослідження впливу термінів зберігання на електропровідність компонентів молозива

Важливим завданням під час практичного використання молозива є можливості зберігання та умови за яких його склад залишиться незмінним порівняно з його вихідними характеристиками. Оскільки біологічно активні сполуки можуть втрачати свої активності під час заморожування та розморожування, було проведено визначення електропровідності під час зберігання молозива при температурі 3-4 °C протягом 18 діб.

Виявилося, що електропровідність незбираного молозива залишалася незмінною з 1 до 10 доби зберігання за температури 3-4°C, починаючи з 10 до 18

добі зберігання електропровідність незначно збільшувалася порівняно з початковими зразками, що було характерно для всіх досліджуваних зразків (рис. 3.51). Такий самий характер зміни електропровідності в процесі зберігання мав місце і для знежиреного молозива (рис. 3.51).

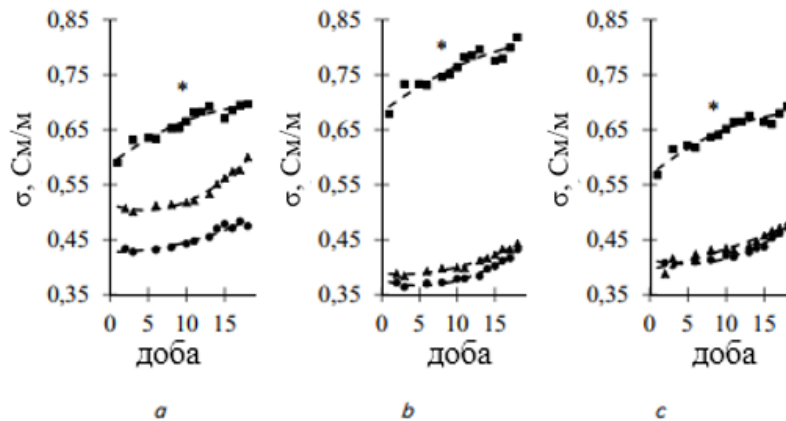


Рис. 3.51. Електропровідність цільного молозива (●), знежиреного молозива (▲), і низькомолекулярних компонентів молозива (■) на частоті 0,49 МГц за температури 18°C з 1 по 18 день зберігання зразків за 3°C: а - молозиво, отримане від корови "Аврори"; b - молозиво, отримане від "Барині"; c - молозиво, отримане від "Мухи". Представлено типові криві для кожного з виробників. * - варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з цільним молозивом для трьох незалежних вимірювань.

Водночас електропровідність НКМ майже лінійно збільшувалися з 1-го до 18-го дня зберігання і до 18 дня електропровідність була збільшена на 18, 20 і 22 % порівняно з вихідними значеннями для "Аврори", "Барині" і "Мухи" відповідно (рис. 3.51).

Отримані результати дають змогу дійти кількох важливих висновків. По-перше, метод визначення електропровідності молозива та його фракцій може бути використаний як інтегральна оцінка якості молозива. По-друге, він дає змогу виявляти індивідуальні відмінності у складі молозива і може бути використаний під час стандартизації молозива та його компонентів. По-третє, незбиране та знежирене молозиво довше можуть зберігатися без змін характеристик електропровідності за температури 3-4°C порівняно з фракцією НКМ. Можна

вважати, що висока концентрація речовин у незбираному молозиві забезпечує "стабілізацію" його компонентів, після видалення більшої частини білків (їхня кількість зменшувалася більш ніж у 3 рази у фракції НКМ порівняно з незбираним молозивом) мала місце деградація компонентів, що супроводжувалося збільшенням електропровідності.

Отже, метод електропровідності може бути використаний не тільки під час стандартизації молозива та його фракцій, а й інших біологічних субстанцій.

3.7.5. Дослідження можливості використання біотесту на основі мікроводорості *Dunaliella viridis* при оцінці біологічної активності компонентів молозива

Раніше в нашій лабораторії було показано, що мікроводорості *Dunaliella viridis*, які позбавлені клітинної стінки та здатні до міксотрофного живлення, можуть бути використані під час біотестування різноманітних сполук, що можуть володіти як анаболічними, так і токсичними властивостями. Представляло інтерес використання культури *D. Viridis* в оцінці впливу НКМ з двох позицій: відсутності токсичності та/або стимулювання росту культури. У першій серії експериментів визначали динаміку росту та склад біомаси клітин *D. Viridis* після внесення в культуру мікроводоростей 0,5, 1,5 і 0,3 мг/л на 2 млн. клітин у мл. Виявили, що внесення в культуру мікроводоростей 0,5 мг/л НКМ не впливало на динаміку росту *D. Viridis*. (рис. 3.51 А). Однак за дози 1,5 мг/л мало місце збільшення швидкості росту культури, яке спостерігалось з 8 по 14 добу росту (рис. 3.52 А).

Збільшення дози НКМ у 2 рази не впливало на швидкість росту культури порівняно з контрольним варіантом (рис.3.52 А.).

Отже, внесення в культуру мікроводоростей НКМ призводило до невеликого ефекту стимуляції динаміки росту *D. Viridis*, яка характеризувалася U-подібною дозовою залежністю. Така дозова залежність вказує на те, що подібний ефект має герметичну природу. На користь цього свідчать і результати щодо складу клітин мікроводоростей після внесення в культуру НКМ. Так, вміст каротиноїдів, хлорофілів і білка в клітинах контрольної та дослідних культур

після внесення різних концентрацій НКМ не відрізнялися між собою (Рис. 3.52 В, Г).

Як було показано на тваринах, НКМ має антитоксичну дію в разі інтоксикації організму іонами міді. Численними дослідженнями, які були проведені в нашій лабораторії було показано, що іони міді інгібують ріст культури *D. viridis*. Представляло інтерес провести оцінку можливої антитоксичної дії НКМ на культурі мікроводоростей.

З цією метою в культуру *D. viridis* вносили сірчаноокислу мідь до кінцевої концентрації 50 мг/л, а через добу в дослідний варіант вносили НКМ у дозі 1,5 мг/л. Виявили, що через 4 доби інтенсивність росту культури мікроводоростей була на % вищою за інтенсивність росту культури, в яку вносили сірчаноокислу мідь (рис. 3.52 Б). Необхідно зазначити, що після внесення в культуру сірчаноокислої міді в концентрації 50 мг/л відбулася втрата більшої частини клітин рухливості. У тому разі якщо в культуру *D. viridis* вносили НКМ через добу після інтоксикації, то мало місце збільшення кількості рухливих клітин мікроводоростей.

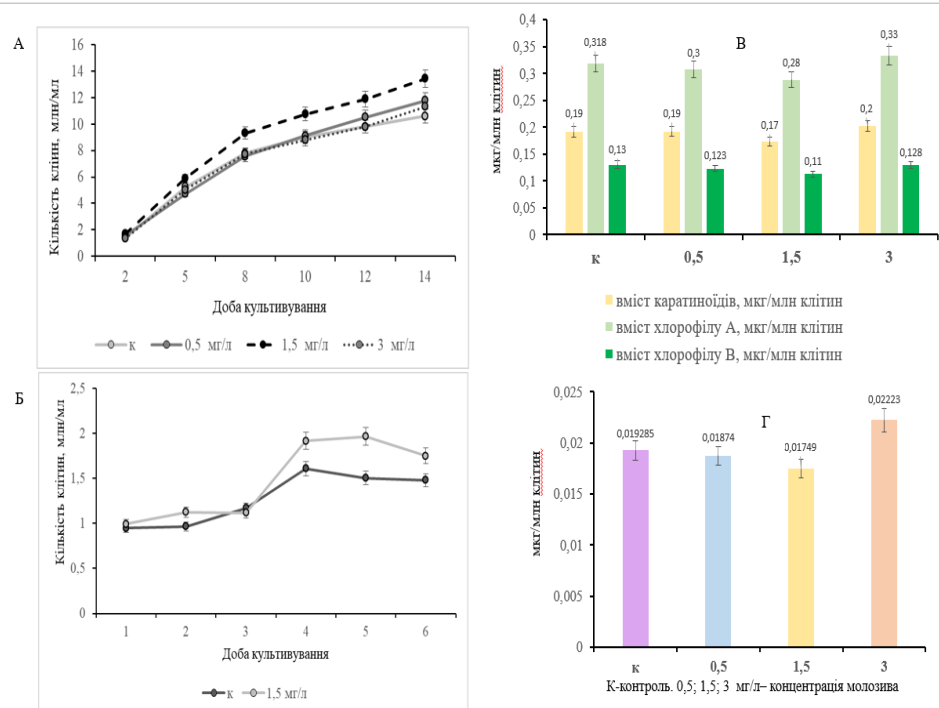


Рис. 3.52. Динаміка росту клітин *Dunaliella viridis* після внесення НКМ в концентрації 0,5 мг/л, 1,5 мг/л та 3 мг/л (А); динаміка росту *D. viridis* після

послідовного внесення в середовище сірчаноокислої міді в концентрації 50 мг/л і молозива в концентрації 1,5 мг/л (Б); вміст хлорофілів, загальних каротиноїдів (В) і білка (Г) в клітинах водоростей *D. viridis* після внесення різних концентрацій молозива порівняно з контролем.

Отримані результати дають змогу зробити висновок: 1 - культура мікроводоростей може бути використана при тестуванні компонентів молозива; 2 - механізм збільшення швидкості росту мікроводоростей має гормезисну природу, тобто НКМ чинить неспецифічну дію на мікроводорості; 3 - НКМ проявляє ефект антидоту не лише на моделі інтоксикації тварин, а й на культурі клітин мікроводоростей, що також може свідчити про його неспецифічну дію.

Висновок до розділу 3.7.

Експериментально показано, що електропровідність молозива залежить від кількості ліпідів, якісного та кількісного складу білків, термінів і умов зберігання молозива, температури вимірювання, а також від балансу заряджених і незаряджених молекул. Встановлені відмінності в електропровідності молозива та його компонентів у різних корів однієї породи, одного віку, що утримуються в одному господарстві за однакових умов, свідчить про те, що цей показник здатний відображати й індивідуальні особливості якісних та кількісних характеристик молозива та його компонентів. Визначення електропровідності молозива та його компонентів є простим швидким і надійним методом визначення якісних і кількісних характеристик продуктів із молозива.

Культура мікроводоростей *Dunaliella viridis* може бути використана під час біотестування та вивчення можливих механізмів дії компонентів молозива та інших біологічно активних багатокомпонентних субстанцій. На культурі клітин мікроводоростей підтверджено припущення про неспецифічну горметичну дію компонентів молозива на біологічні об'єкти.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. **Ivanov, I.**, Kozheshkurt, V., Bozhkov, A., Goltvjansky, A., Katrich, V., Sidorov, V., & Gromovoy, T. (2021). Low-molecular components of colostrum as a regulator of the organism redox-system and biological antidote. *EUREKA: Life Sciences*, (2), 56-64. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. Kozheshkurt V., **Ivanov I.**, Antonenko Y., Katrich V., Bozhkov A., Gromovoy T. (2021). Devising an express method for estimating the quality of colostrum and its components based on electrical conductivity. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. Vol. 1, N 11 (109), 69-77. **SCOPUS (Q3)** (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).

3. **Ivanov, I., & Kozheshkurt, V.** (2023). Individual features of the bovine colostrum proteome. *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (August 18, 2023; Cambridge, UK), 91-94. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)
4. **Ivanov, I., Kozheshkurt, V., & Bondar, A.** (2023). Low-molecular components of colostrum perform the function of antidote in copper sulphate toxication of the body. *Grail of Science*, (31), 163-167. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

3.8. Дослідження можливостей використання казеїну молозива як "носіїв" біологічно активних субстанцій

3.8.1. Обґрунтування актуальності розробки способу отримання комплексу "казеїн-поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою"

Під час отримання низькомолекулярних компонентів молозива необхідно видаляти ліпіди та казеїн. Як зазначалося, вміст казеїну в молозиві першого доїння у 2-3 рази більший, ніж у зрілому молоці [297, 410] проте на його частку в молозиві припадає від 30 до 37% від усіх білків, тому що в молозиві збільшено кількість інших білків порівняно з молоком [8, 411]. У великої рогатої худоби казеїн представлений чотирма ізоформами: $\alpha S1$, $\alpha S2$, β і κ , що розрізняються за амінокислотним складом, вмістом фосфору та вуглеводів, але подібні за своїм амфіфільним характером [41, 412]. У молозиві міститься значно більше κ -казеїну стосовно інших ізоформ казеїну. Так, співвідношення β -казеїну до κ -казеїну в молозиві 0,61, а в зрілому молоці це співвідношення становить 0,30 [53]. У зв'язку з цими особливостями, казеїн молозива становить великий інтерес як потенційна фармацевтична субстанція.

Нині ведуться інтенсивні дослідження структурних особливостей ізоформ казеїну, оскільки це може забезпечити одержання специфічних надмолекулярних комплексів і їхнє використання в медичних цілях.

Особливий інтерес представляє здатність ізоформ казеїну формувати нанокластери (рис. 1.4), тобто вони здатні до самозбирання міцеліальних наноструктур [54, 413–415]. У процесі формування наноструктур можуть бути вбудовані різноманітні біологічно активні сполуки. Ці знання стимулювали дослідження структурних особливостей ізоформ казеїну та можливості їхнього використання як доставки в організм біологічно активних сполук. Однак досліджень щодо використання казеїну молозива як носія біологічно активних сполук поки що не проводили.

Використання міцел казеїну як біологічної матриці для біологічно активних сполук має ще одну важливу особливість. Це дає змогу стабілізувати такі сполуки, і це особливо актуально для сполук, що швидко окиснюються і не є стабільними.

Зокрема, це стосується і поліфенольних сполук і особливо хлорогенової кислоти, які активно досліджуються.

Крім цього, не можна виключати і вплив поліфенольних сполук, що входять до складу міцел казеїну, на його структуру і засвоюваність.

Великий інтерес як біоактивні сполуки становлять поліфенольні сполуки - флавоноїди. Вони утворюються в рослинах і забезпечують їм захист від окисного стресу, запобігають інфікуванню вірусами та бактеріями [416]. Нині ідентифіковано понад 300 різних поліфенольних сполук. Потрапляючи у складі їжі, більшість флавоноїдів метаболізуються в ентероцитах, піддаються метилюванню, сульфатуванню, потрапляють у кров'яне русло, досягають печінки, там піддаються додатковій модифікації та знову надходять у кров [417]. Завдяки великому природному розмаїттю та додатковій модифікації в організмі поліфенольні сполуки виявляють широкий спектр біологічних дій [418, 419]. Зокрема, показано, що поліфенольні сполуки здатні регулювати сигнальні метаболічні шляхи, проявляють антиконцерогенні ефекти, а також можуть бути використані для захисту рослин від окиснення, беруть участь в регуляції запальних реакцій та інше [419–421].

Деякі фахівці вважають, що харчові добавки на основі поліфенольних сполук можуть знайти застосування під час лікування таких небезпечних патологій, як атеросклероз, діабет та інсульт [422].

Рослинні поліфеноли є основним джерелом антиоксидантів у раціоні людини [423]. Як антиоксиданти поліфенольні сполуки часто використовують для поліпшення якості та терміну зберігання продуктів харчування і напоїв [424].

Показано, що поліфеноли можуть взаємодіяти з білками за допомогою ковалентних і нековалентних взаємодій [425, 426]. Ковалентне зв'язування поліфенолів з білками є незворотною взаємодією, зазвичай це відбувається, коли фенольна сполука окислюється до хінону в присутності поліфенолоксидази або в лужному середовищі [427, 428].

Однак набагато частіше поліфенольні сполуки з білками формують нековалентні, слабкі зв'язки, внаслідок гідрофобної асоціації, водневих зв'язків,

електростатичного тяжіння та сил Ван-дер-Ваальса. Гідрофобна взаємодія та водневий зв'язок вважаються найбільш важливими нековалентними зв'язками у поліфенольно-білковому комплексоутворенні [429]. Це пояснюється наявністю гідроксильних груп у поліфенолів та карбонільних груп у білків, що можуть утворювати водневі зв'язки, а гідрофобні ділянки амінокислот білка (бензол і аліфатичні бічні ланцюги) та ароматичні ядра поліфенолів відіграють ключову роль у стабілізації поліфенол-білкових комплексів [422]. Наявність слабких міжмолекулярних взаємодій у поліфенол-білкових комплексах, з одного боку, може забезпечувати стабілізацію та збереження поліфенолів у таких асоціатах, а з іншого боку, поліфеноли можуть відносно легко вивільнятися з таких асоціатів при зміні умов.

Поряд із цим, наявні відомості, які вказують на те, що поліфеноли взаємодіючи з білками, можуть ініціювати зміни активності ферментів, розчинність білків, їхню термічну стабільність та засвоюваність [430]. Також було показано, що певні структурні зміни в білках, спричинені зв'язуванням із поліфенолами, можуть підвищити функціональність білка [431, 432].

Відомо, що білки молока, зокрема й казеїн, широко використовуються в білкових напоях, таких як лате, чай з молоком та інших молочних продуктах, приправлених фруктовим соком. Поліфеноли, включені в такі білкові напої, забезпечують стабільність продукту під час зберігання. У цьому відношенні особливий інтерес представляє "включення" в міцели казеїну молозива хлорогенової кислоти (ХК).

На думку низки дослідників, хлорогенова кислота (складний ефір кавової - 3,4-діоксикоричної та одного зі стереоізомерів хінної кислоти) представляє великий інтерес як біоактивна сполука [433–435]. У рослинах вона міститься в різних кількостях. Однак, найкращим із відомих об'єктів за кількістю хлорогенової кислоти поряд із кавовими зернами є насіння соняшнику. Воно багате на поліфенольні сполуки, на його частку припадає від 2 до 4 % від усіх сполук, що входять до складу насіння, а на хлорогенову кислоту, своєю чергою, припадає від 43 до 73 % від усіх поліфенольних сполук.

Незважаючи на перспективність і актуальність розробки біоактивних сполук на основі хлорогенової кислоти, гідного практичного застосування вона поки ще не знайшла. Це пов'язано з тим, що під час отримання хлорогенової кислоти дослідники стикаються з тим, що вона утворює комплекси з білками та вуглеводами, не стабільна та швидко окислюється, а її екстракція та очищення з рослинних об'єктів є досить трудомісткими та потребують значних витрат.

У зв'язку з цим, була здійснена спроба розробки способу включення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, в міцели казеїну молозива.

3.8.2. Розробка способу отримання комплексу "казеїн-поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою"

Для цього, поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою, виділяли із соняшникового шроту, як описано в роботі [436], спектри поглинання яких представлено на Рис. 3.53. Як видно з наведених даних, поліфенольні сполуки (ПФ), які поглинали світло в діапазоні від 310-360 нм, а на частку ізоформ хлорогенової кислоти припадає від 40 до 70%

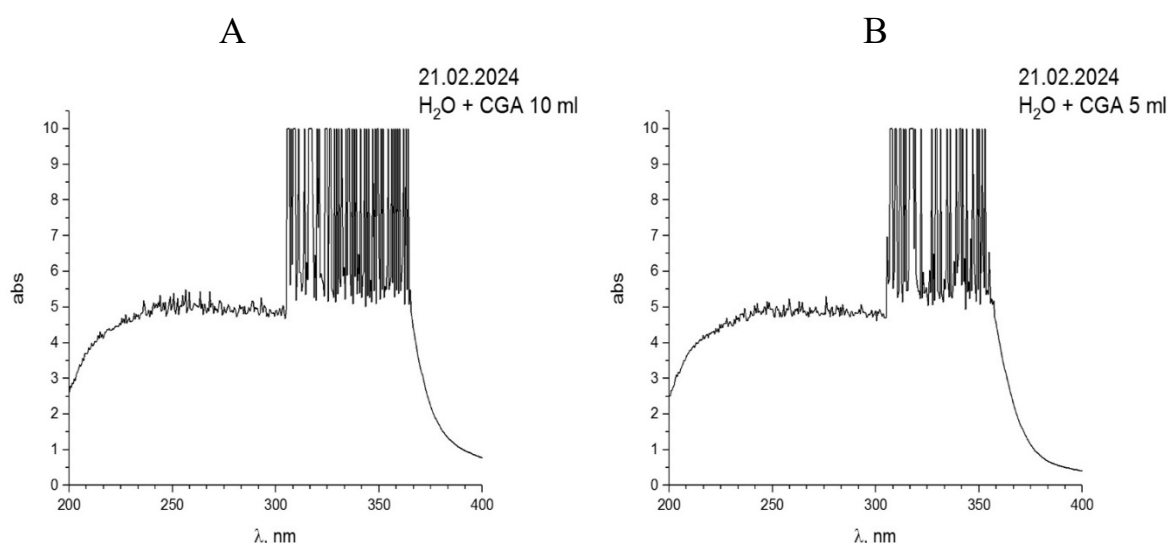


Рис. 3.53. Спектри поглинання поліфенольних сполук у водному розчині в ділянці від 310 до 360 нм у разі великої концентрації - 1,5 г у 10 мл розчину - (А) та у разі меншої концентрації - 0,75 г у 10 мл розчину (В). Представлено типові спектри поглинання поліфенольних сполук

Виявили, що в контрольному варіанті без внесення ПФ та після формування казеїнових міцел і їхнього подальшого видалення у водному розчині була присутня невелика кількість амінокислот і білків, що поглинали в ультрафіолетовій частині спектра (220 до 300 нм) (рис. 3.54 А).

Після внесення ПФ у кількості 1,5 г на 30 г казеїну до формування казеїнових міцел з подальшою індукцією міцелоутворення, то кількість ПФ сполук у надосадовій рідині, тобто не зв'язаних із міцелами казеїнів, у варіанті з великою концентрацією ПФ була зменшена лише на 20 % порівняно з вихідною кількістю ПФ (кількість ПФ визначали за площею піків поглинання) (рис.3.54 В і 3.53 А). Водночас, якщо до зразків казеїну вносили в 2 рази менше ПФ сполук, то у водному розчині залишалося в 3 рази менше ПФ сполук порівняно з початковою кількістю внесених ПФ (рис.3.54 С і 3.53 В).

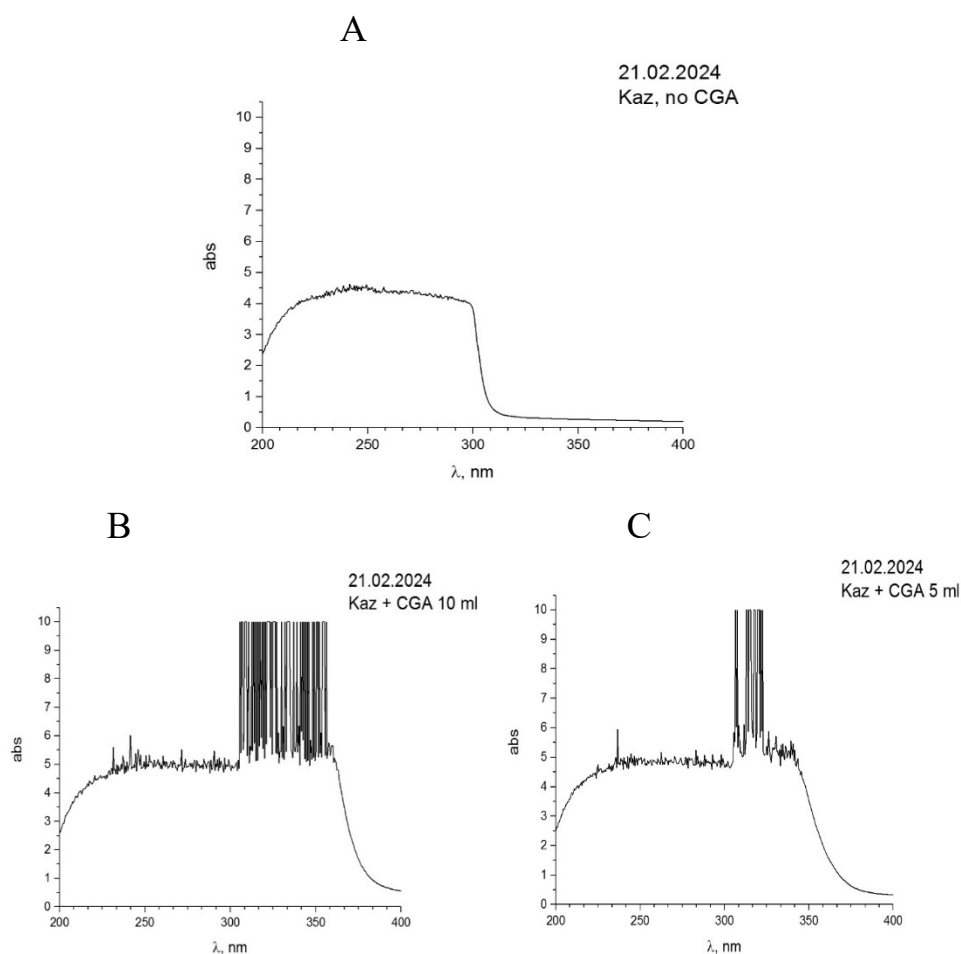


Рис. 3.54. Спектри поглинання постказеїнової фракції без внесення ПФ, до складу якої виявляються невеликі кількості білків молозива (А), та спектри поглинання ПФ, що не включалися з казеїновими міцелами, в разі внесення

великої кількості ПФ (1,5 г на 30 г казеїну) (В) та також після внесення ПФ у кількості 0,75 г на 30 г казеїну (С). Представлено типові спектри з трьох серій визначень.

Отже, внесення ПФ, збагачених хлорогеновою кислотою, до розчину казеїну з подальшою індукцією міцелоутворення супроводжувалося включенням ПФ до складу міцел. Ефективність включення ПФ у міцели казеїну (співвідношення внесеного в розчин до включеного в міцели ПФ) залежить від співвідношення між кількістю казеїну і поліфенольних сполук.

Як уже зазначалося, поліфенольні сполуки можуть утворювати з білками слабкі міжмолекулярні взаємодії, зокрема й водневі зв'язки. З метою визначення ступеня зв'язування ПФ з міцелами казеїну проводили серію "промивок" - водної екстракції утворених комплексів "казеїн-ПФ".

Виявили, що за додаткового водного промивання міцел казеїну, що не містили ПФ, у водну фазу переходила невелика кількість сполук, які поглинали в ділянці 220-240 нм (амінокислоти) та 260-280 нм (білки), водночас у водному розчині були відсутні сполуки, які поглинали при 250 нм (рис. 3.54).

Дуже цікавим є те, що після водного промивання казеїну, до складу якого були включені ПФ сполуки, навпаки, значно збільшився перехід у водну фазу пептидів, що поглинають при 250 нм (рис. 3.55 В).

Ці результати підтверджують дані [297, 436] про те, що ПФ здатні взаємодіяти з білками і змінювати їхню характеристику.

Отже, включення ПФ до складу казеїнових міцел супроводжувалося такими перебудовами білкової частини міцел, що призводили до зменшення ступеня їхнього "утримання" у складі цих комплексів, і це може слугувати непрямым доказом взаємодії поліфенольних сполук із міцелами казеїну. Ще одним доказом включення ПФ до складу міцел є зменшення кількості поліфенольних сполук, що екстрагуються, з казеїнових міцел порівняно з кількістю ПФ, що залишилися у складі міцел (рис. 3.55 В).

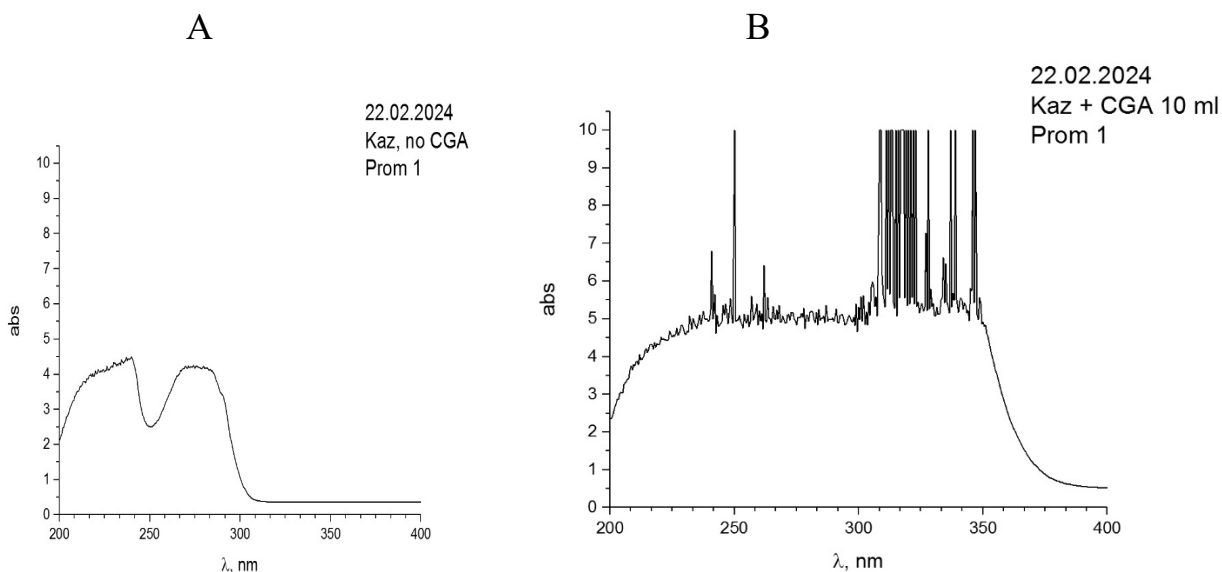


Рис. 3.55. Спектри поглинання речовин, що вивільнялися з казеїну, який не містив ПФ, після промивання 30 г казеїну 45 мл води та 15 хв. інтенсивного перемішування з наступним осадженням казеїну центрифугуванням за 4 000 g упродовж 15 хв (А) та спектри поглинання речовин, що вивільнялися за тих самих умов, але з казеїну, що містив ПФ, після додавання до нього великої концентрації ПФ (1,5 г ПФ на 30 г казеїну) (В). Представлено типові спектри із серій визначень.

Після другого промивання комплексу "казеїн-ПФ", який включав найбільшу концентрацію ПФ - 1,5 г/30 г казеїну, виявили, що після промивання казеїну, який не містив ПФ, у 2 рази зменшувався вихід пептидів у водну фазу порівняно з першим відмиванням (рис. 3.56 А). Водночас вивільнення ПФ із комплексу "казеїн-ПФ" зменшувалося незначною мірою, а пік, що з'явився при 250 після першого промивання, виявлявся при 240 нм (рис. 3.56 В).

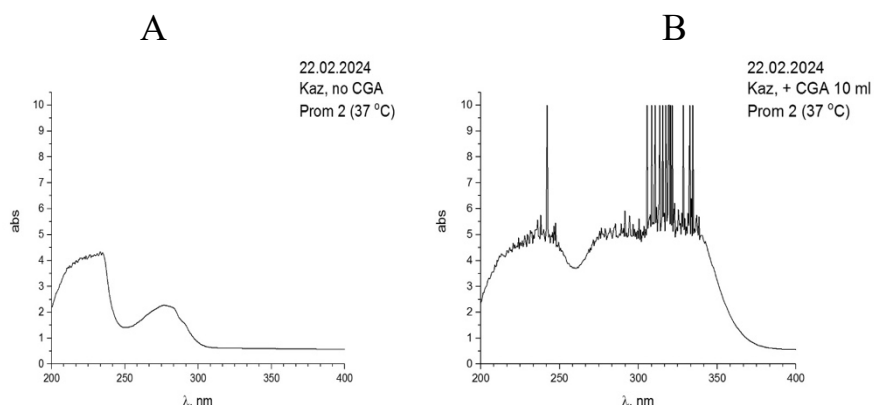


Рис.3.56. Спектри поглинання речовин, що вивільнялися з казеїну, після промивання 5 г казеїну 15 мл води після 5 хв інтенсивного перемішування з

наступним інтенсивним перемішуванням за 37°C впродовж 15 хв та наступним осадженням казеїну центрифугуванням за 4 000 g впродовж 15 хв (А) та спектр поглинання речовин, що вивільнялися за тих самих умов, але з казеїну, що містив ПФ, речовини, після додавання до неї великої концентрації ПФ (10 мл на 250 мл вихідної суспензії) (В). Представлено типові спектри із серій визначень.

Ці результати підтверджують те, що ізоформи білків казеїну, які формують міцели, утримуються слабкими міжмолекулярними зв'язками та легко руйнуються за умови інтенсивного перемішування у фізіологічному розчині. Внесення поліфенольних сполук у казеїнові міцели забезпечувало їхнє включення до складу міцел, при цьому поліфенольні сполуки так змінювали взаємодії між білковими ізоформами казеїну у складі міцел, що вони відносно легко екстрагувалися водою та фізіологічним розчином [297].

Подальші дослідження механізмів взаємодії поліфенольних сполук і насамперед хлорогенової кислоти з білковими компонентами казеїнових міцел дадуть змогу обґрунтувати застосування таких комплексів під час профілактики та лікування таких патологій, як захворювання печінки, та низки інших патологій.

Розроблено метод включення поліфенольних сполук у міцели казеїну молозива. Ефективність включення поліфенольної сполуки залежить від співвідношень між кількістю казеїну та ПФ, оптимальним є не менше 0,75 та не більше 1,5 г до 30 г казеїну (за сухим залишком). Поліфенольні сполуки у складі міцел казеїну впливають на екстрактивність білків казеїну, що доводить їхню участь у зміні структурних характеристик білків у складі міцел.

Висновок до розділу 3.8

Розроблено метод формування комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками, що були отримані з соняшникового шроту та збагачені хлорогеновою кислотою. Раніше на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки було показано, що хлорогенова кислота бере участь у регуляції клітинної ланки імунітету та нормалізує функціональну активність пошкодженої печінки. Підтвердили наявні дані про те, що формування комплексу "казеїн-ПФ" забезпечується слабкими міжмолекулярними взаємодіями (водневі, гідрофобні, електростатичні), при цьому має місце і зміна структурних характеристик білкової частини міцел. Можна припустити, що такі надмолекулярні комплекси можуть забезпечити, з одного боку, стабілізацію хлорогенової кислоти та її пролонговану дію під час прийому *per os*, а з другого - прискорити перетравлюваність казеїну.

Результати дослідження, що обговорені у розділі, були опубліковані:

1. Andrey Bozhkov, Alina Belous, Anatoly Bozhkov, Vladimir Ganin, **Evgeny Ivanov** and Oleg Yurchenko. (2023). 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*, 9: 172. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
2. Bozhkov, A. A., Ganin, V. Y., Akzhyhitov, R. A., **Ivanov, E. G.**, Bilovetska, S. G., Dobrianska, N. I., ... & 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. **SCOPUS (Q 3)**. (Особистий внесок здобувача: планування та участь у проведенні експериментів, участь у написанні рукопису та підготовці статті до друку).
3. **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. (Здобувач брав участь в проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, написанні тексту рукопису)

ВИСНОВКИ

Отримані результати розширюють наші знання про механізми дії багатокомпонентних субстанцій природного походження на біологічні системи, що перебувають у різних функціональних станах (вікові особливості, токсикози, фібрози). Запропонована концепція неспецифічної – горметичної дії низькомолекулярних компонентів на прикладі молозива, та інших біологічно активних субстанцій («Мікс-фактор»). Показано відсутність токсичної дії низькомолекулярних компонентів молозива та можливість їх використання як продуктів функціонального харчування, які мають антитоксичну та гепатопротекторну дії. Розроблено новий підхід використання казеїну молозива як стабілізатора і доставки в організм поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою.

1. Встановлено високу індивідуальну варіабельність білкового складу молозива методом мас-спектроскопії, та здійснено аналіз природних факторів які впливають на варіабельність складу молозива.
2. Розроблено "селективно-інтегративну" технологію одержання чотирьох субстанцій з молозива: ліпідну; казеїнову; фракцію низькомолекулярних білків та "ультрафільтрату", яка дозволяє зменшити природну варіабельність молозива і забезпечити стандартизацію отриманих субстанцій.
3. На моделі інтоксикації організму важкими металами (на прикладі іонів міді) показано можливість використання низькомолекулярних компонентів молозива у якості продуктів функціонального харчування, що усувають затримку росту експериментальних тварин, відновлюють температуру тіла і здатність виконувати роботу та нормалізують змінені функції печінки.
4. Доведено роль низькомолекулярних компонентів молозива в регуляції якісних і кількісних характеристик клітин кісткового мозку на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки, що забезпечує корекцію функціональної активності клітинної ланки імунної системи при фіброзі печінки.
5. Експериментально засвідчено відсутність токсичності у низькомолекулярних компонентів молозива і те, що тільки за супервеликих

доз (1-5 г/100г маси) має місце індивідуальна непереносимість, що проявляється в порушенні функції травлення. У разі відсутності непереносимості, прийом таких великих доз низькомолекулярних компонентів молозива призводив до збільшення маси тіла тварин, тобто вони виконували трофічну функцію.

6. Розроблено нову експериментальну модель Cu-індукованого фіброзу печінки та показали, що іони міді після багаторазових послідовних введень у дозі близько 33% від летальної, так само як і відома модель тетрахлорметану, спричиняють прояв окислювального стресу, який і запускає формування фіброзу печінки.
7. Доведено, що низькомолекулярні компоненти молозива можуть проявляти властивості як прооксидантів, так і антиоксидантів, і це залежить від дози. У малих дозах низькомолекулярні компоненти молозива (0,01-0,1 г/100 г маса тіла) є антиоксидантами, а у великих дозах (1-3 г/100 г) є прооксидантами.
8. Встановлено, що механізм дії низькомолекулярних компонентів молозива реалізується шляхом корекції характеристик редокс-системи та запуску ієрархічної системи регуляції на рівні функції печінки та кісткового мозку. Така системна регуляція метаболізму забезпечує поліфункціональну дію низькомолекулярних компонентів молозива, а спрямованість їх дії залежить від характеристик біологічної системи на момент їхньої дії.
9. Доведено, що низькомолекулярні компоненти отримані сучасними методами біотехнології з інших біологічних джерел (*Pleurotus ostreatus* і *Sacharomyces cerevisiae*) (харчова добавка "Мікс-фактор") проявляли схожі ефекти на показники редокс-системи та фізіологічні показники тварин із фіброзом як і низькомолекулярні компоненти з молозива, що підтверджує гіпотезу про неспецифічний горметичний механізм дії таких різних за природою низькомолекулярних компонентів біологічного походження.
10. Виявлено, що щоденне приймання "Мікс-фактору" з питною водою в малих дозах (0,05-0,06 мл/100 г маси тіла) на пізніх етапах онтогенезу щурів (з 22 і навіть з 31 місячного віку) дещо підвищує тривалість життя, а у разі

приймання "Мікс-фактору" з 31 міс. віку збільшує максимальну тривалість життя і здатність таких тварин виконувати фізичні навантаження.

11. Доведено доцільність використання електропровідності молозива та/чи його окремих фракцій (незбиране, знежирене молозиво, низькомолекулярні компоненти молозива) та клітинну культуру *Dunaliella viridis* у якості процедури стандартизації.
12. Розроблено метод включення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, до складу казеїнових міцел молозива і показано, що включення поліфенольних сполук до складу міцел супроводжувалося і перебудовою білкової частини міцел. Такі комплексні надмолекулярні сполуки можуть використовуватися як функціональні сполуки харчування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fischer-Tlustos A.J., Lopez A., Hare K.S., Wood K.M., Steele M.A. Effects of colostrum management on transfer of passive immunity and the potential role of colostral bioactive components on neonatal calf development and metabolism. *Can. J. Anim. Sci.* 2021. 101, P. 405–426. <https://doi.org/10.1139/cjas-2020-0149>
2. Hurley W.L., Theil P.K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*. 2011. 3, P. 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
3. Polidori P., Rapaccetti R., Klimanova Y., Zhang J.-J., Santini G., Vincenzetti S. Nutritional Parameters in Colostrum of Different Mammalian Species. *Beverages*. 2022. 8, P. 54. <https://doi.org/10.3390/beverages8030054>
4. Hardy G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*. 2000. 16, P. 688–689. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00332-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00332-4)
5. Mehra R., Singh R., Nayan V., Buttar H.S., Kumar N., Kumar S., Bhardwaj A., Kaushik R., Kumar H. Nutritional attributes of bovine colostrum components in human health and disease: A comprehensive review. *Food Biosci.* 2021. 40, P. 100907. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100907>
6. Mehra R., Kumar S., Verma N., Kumar N., Singh R., Bhardwaj A., Nayan V., Kumar H. Chemometric approaches to analyze the colostrum physicochemical and immunological (IgG) properties in the recently registered Himachali Pahari cow breed in India. *LWT*. 2021. 145, P. 111256. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111256>
7. Mehra R., Sangwan K., Garhwal R. Composition and Therapeutic Applications of Goat Milk and Colostrum. *RRJoDST*. 2021. 10, P. 1–7. <https://doi.org/10.37591/rrjodst.v10i2.3163>
8. McGrath B.A., Fox P.F., McSweeney P.L.H., Kelly A.L. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Sci. Technol.* 2016. 96, P. 133–158. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
9. Neville M.C. Lactation in the human. *Anim. Front. Rev. Mag. Anim. Agric.* 2023. 13, P. 71–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfad021>

10. Golan Y., Assaraf Y.G. Genetic and Physiological Factors Affecting Human Milk Production and Composition. *Nutrients*. 2020. 12, P. 1500. <https://doi.org/10.3390/nu12051500>
11. Demuth J.P., Bie T.D., Stajich J.E., Cristianini N., Hahn M.W. The Evolution of Mammalian Gene Families. *PLoS ONE*. 2006. 1, P. e85. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000085>
12. Zhou Y., Shearwin-Whyatt L., Li J., Song Z., Hayakawa T., Stevens D., Fenelon J.C., Peel E., Cheng Y., Pajpach F., Bradley N., Suzuki H., Nikaido M., Damas J., Daish T., Perry T., Zhu Z., Geng Y., Rhie A., Sims Y., Wood J., Haase B., Mountcastle J., Fedrigo O., Li Q., Yang H., Wang J., Johnston S.D., Phillippy A.M., Howe K., Jarvis E.D., Ryder O.A., Kaessmann H., Donnelly P., Korlach J., Lewin H.A., Graves J., Belov K., Renfree M.B., Grutzner F., Zhou Q., Zhang G. Platypus and echidna genomes reveal mammalian biology and evolution. *Nature*. 2021. 592, P. 756–762. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03039-0>
13. Bozhkov A.I., Ohienko S.L., Bondar A.Y., Ivanov E.G., Kurguzova N.I. Low-molecular weight components of cow colostrum regulate bone marrow functions by modelling the redox-system of the organism. *Regul. Mech. Biosyst.* 2020. 11, P. 272–277. <https://doi.org/10.15421/022040>
14. Kumar S., Kumar N. Composition, Properties, and Health Attributes of Bovine Colostrum. *Presented at the March 16*. 2020. <https://doi.org/10.1007/S13594-015-0258-X>
15. Puppel K., Gołębiewski M., Grodkowski G., Slószarz J., Kunowska-Slószarz M., Solarczyk P., Łukasiewicz M., Balcerak M., Przysucha T. Composition and Factors Affecting Quality of Bovine Colostrum: A Review. *Anim. Open Access J. MDPI*. 2019. 9, P. 1070. <https://doi.org/10.3390/ani9121070>
16. Mane S., Taneja S., Madala J.S., Agarkhedkar S., Khetan M. Study of Stem Cells in Human Milk. *Cureus*. 14, P. e23701. <https://doi.org/10.7759/cureus.23701>
17. Hassiotou F., Hartmann P.E. At the Dawn of a New Discovery: The Potential of Breast Milk Stem Cells. *Adv. Nutr.* 2014. 5, P. 770–778. <https://doi.org/10.3945/an.114.006924>

18. Golinelli L., Mere Del Aguila E., Paschoalin V., Silva J., Conte Junior C. Functional aspect of colostrum and whey proteins in human milk. *J. Hum. Nutr. Food Sci.* 2014. 2, P. 1035.
19. Livney Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2010. 15, P. 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>
20. Abrahamse E., Minekus M., van Aken G.A., van de Heijning B., Knol J., Bartke N., Oozeer R., van der Beek E.M., Ludwig T. Development of the Digestive System—Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion. *Food Dig.* 2012. 3, P. 63–77. <https://doi.org/10.1007/s13228-012-0025-x>
21. Armengol R., Fraile L. Colostrum and milk pasteurization improve health status and decrease mortality in neonatal calves receiving appropriate colostrum ingestion. *J. Dairy Sci.* 2016. 99, P. 4718–4725. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10728>
22. Ganz S., Failing K., Hassan A.A., Bülte M., Wehrend A. Influence of first colostrum pasteurization on serum immunoglobulin G, iron, and activity of gamma-glutamyltransferase in newborn dairy calves. *Vet. World.* 2021. 14, P. 2267–2272. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2267-2272>
23. Korhonen H.J., Marnila P. Bovine milk immunoglobulins against microbial human diseases. *Dairy-Deriv. Ingrid.* 2009. P. 269–289. <https://doi.org/10.1533/9781845697198.2.269>
24. Štrkalj G. Robert Broom's theory of evolution. *Trans. R. Soc. South Afr.* 2003. 58, P. 35–39. <https://doi.org/10.1080/00359190309519933>
25. Benoit J., Manger P.R., Rubidge B.S. Palaeoneurological clues to the evolution of defining mammalian soft tissue traits. *Sci. Rep.* 2016. 6, P. 25604. <https://doi.org/10.1038/srep25604>
26. Oftedal O.T. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2002. 7, P. 225–252. <https://doi.org/10.1023/a:1022896515287>
27. Oftedal O.T. The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal.* 2012. 6, P. 355–368. <https://doi.org/10.1017/S1751731111001935>

- 28.Kawasaki K., Lafont A.-G., Sire J.-Y. The Evolution of Milk Casein Genes from Tooth Genes before the Origin of Mammals. *Mol. Biol. Evol.* 2011. 28, P. 2053–2061. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr020>
- 29.Peaker M. The mammary gland in mammalian evolution: a brief commentary on some of the concepts. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2002. 7, P. 347–353. <https://doi.org/10.1023/a:1022860902083>
- 30.Hayssen V., Blackburn D. α -Lactalbumin and the Origins of Lactation. *Evolution.* 1985. 39, P. 1147–1149. <https://doi.org/10.2307/2408741>
- 31.Blackburn D.G., Hayssen V., Murphy C.J. The origins of lactation and the evolution of milk: a review with new hypotheses. *Mammal Rev.* 1989. 19, P. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1989.tb00398.x>
- 32.Butler J.E. Immunologic aspects of breast feeding, antiinfectious activity of breast milk. *Semin. Perinatol.* 1979. 3, P. 255–270. https://doi.org/10.1007/978-3-031-33278-4_3
- 33.Gillin F.D., Reiner D.S., Wang C.S. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. *Science.* 1983. 221, P. 1290–1292. <https://doi.org/10.1126/science.6310751>
- 34.Reiner D.S., Wang C.-S., Gillin F.D. Human Milk Kills Giardia lamblia by Generating Toxic Lipolytic Products. *J. Infect. Dis.* 1986. 154, P. 825–832. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.5.825>
- 35.Lopez A.J., Heinrichs A.J. Invited review: The importance of colostrum in the newborn dairy calf. *J. Dairy Sci.* 2022. 105, P. 2733–2749. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20114>
- 36.Barry J., Bokkers E.A.M., Berry D.P., de Boer I.J.M., McClure J., Kennedy E. Associations between colostrum management, passive immunity, calf-related hygiene practices, and rates of mortality in preweaning dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2019. 102, P. 10266–10276. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16815>
- 37.Playford R.J., Weiser M.J. Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses. *Nutrients.* 2021. 13, P. 265. <https://doi.org/10.3390/nu13010265>
- 38.Godhia M.L., Patel N. Colostrum—its composition, benefits as a nutraceutical—A review. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal.* 2013. 1(1), P. 37–47. <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.1.1.04>

39. Frieten D., Gerbert C., Koch C., Dusel G., Eder K., Kanitz E., Weitzel J.M., Hammon H.M. Ad libitum milk replacer feeding, but not butyrate supplementation, affects growth performance as well as metabolic and endocrine traits in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 2017. 100, P. 6648–6661. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12722>
40. Barrington G.M., Parish S.M. Bovine neonatal immunology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2001. 17, P. 463–476. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30001-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30001-3)
41. Bhat M.Y., Dar T.A., Singh L.R. Casein Proteins: Structural and Functional Aspects. *Milk Proteins - Struct. Biol. Prop. Health Asp.* 2016. P. undefined–undefined. <https://doi.org/10.5772/64187>
42. Kazimierska K., Kalinowska-Lis U. Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules.* 2021. 26, P. 3253. <https://doi.org/10.3390/molecules26113253>
43. Ontsouka E.C., Albrecht C., Bruckmaier R.M. Invited review: Growth-promoting effects of colostrum in calves based on interaction with intestinal cell surface receptors and receptor-like transporters. *J. Dairy Sci.* 2016. 99, P. 4111–4123. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9741>
44. Dupont D., Tomé D. Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. *Presented at the January 1.* 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00020-7>
45. Boirie Y., Dangin M., Gachon P., Vasson M.-P., Maubois J.-L., Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. 94, P. 14930–14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>
46. Foley J.A., Otterby D.E. Availability, Storage, Treatment, Composition, and Feeding Value of Surplus Colostrum: A Review. 1978. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83686-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8)
47. Asaduzzaman M., Mahomud M.S., Haque M.E. Heat-Induced Interaction of Milk Proteins: Impact on Yoghurt Structure. *Int. J. Food Sci.* 2021. P. 5569917. <https://doi.org/10.1155/2021/5569917>
48. Marnila P., Korhonen H. Milk | Colostrum. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2011. P. 591–597. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00322-8>

- 49.Sarode A.R., Sawale P.D., Khedkar C.D., Kalyankar S.D., Pawshe R.D. Casein and Caseinate: Methods of Manufacture. In: Caballero B., Finglas P.M., Toldrá F. (eds.) *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. 2016. P. 676–682. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00122-7>
- 50.Bingham E.W., Farrell H.M. Phosphorylation of casein by the lactating mammary gland: a review. *J. Dairy Sci.* 1977. 60, P. 1199–1207. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(77\)84011-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(77)84011-3)
- 51.Le T.T., Deeth H.C., Larsen L.B. Proteomics of major bovine milk proteins: Novel insights. *Int. Dairy J.* 2017. 67, P. 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.016>
- 52.Dupont D., Croguennec T., Pochet S. Milk Proteins - Analytical Methods. In: *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22616-4>
- 53.Cuillière M.L., Trégoat V., Béné M.C., Faure G., Montagne P. Changes in the κ -casein and β -casein concentrations in human milk during lactation. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999. 13, P. 213–218. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2825\(1999\)13:5<213::AID-JCLA4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:5<213::AID-JCLA4>3.0.CO;2-F)
- 54.Głąb T.K., Boratyński J. Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. *Top. Curr. Chem. Cham.* 2017. 375, P. 71. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0158-z>
- 55.Thienel K.J.F., Holder A., Schubert T., Boom R.M., Hinrichs J., Atamer Z. Fractionation of milk proteins on pilot scale with particular focus on β -casein. *Int. Dairy J.* 2018. 79, P. 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.12.006>
- 56.McMahon D.J., Oommen B.S. Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *J. Dairy Sci.* 2008. 91, P. 1709–1721. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0819>
- 57.Yao R., Cools A., Matthijs A., Deyn P.P.D., Maes D., Janssens G.P.J. Peculiarities in the Amino Acid Composition of Sow Colostrum and Milk, and Their Potential Relevance to Piglet Development. *Vet. Sci.* 2023. 10, P. 298. <https://doi.org/10.3390/vetsci10040298>
- 58.Veldhorst M., Postma-Smeets A., Soenen S., Hochstenbach-Waelen A., Hursel R., Diepvens K., Lejeune M., Luscombe N., Westerterp-Plantenga M. Protein-induced

- satiety: Effects and mechanisms of different proteins. *Physiol. Behav.* 2008. 94, P. 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.01.003>
59. Kim J. Pre-sleep casein protein ingestion: new paradigm in post-exercise recovery nutrition. *Phys. Act. Nutr.* 2020. 24, P. 6–10. <https://doi.org/10.20463/pan.2020.0009>
60. Abd El-Salam M.H., El-Shibiny S. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy Sci. Technol.* 2015. 95, P. 393–412. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0223-8>
61. El-Shibiny S., El-Salam M.H.A. Action of milk-clotting enzymes on β -caseins from buffalo's and cow's milk. *J. Dairy Res.* 1976. 43, P. 443–448. <https://doi.org/10.1017/S0022029900016022>
62. Abd El-Salam M.H., El-Shibiny S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017. 57, P. 1119–1132. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.899200>
63. El-Salam M.H.A., El-Shibiny S., Buchheim W. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *Int. Dairy J.* 1996. 6, P. 327–341. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00026-7](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00026-7)
64. Malkoski M., Dashper S.G., O'Brien-Simpson N.M., Talbo G.H., Macris M., Cross K.J., Reynolds E.C. Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. 45, P. 2309–2315. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2309-2315.2001>
65. Wang Z., Zhang W., Wang B., Zhang F., Shao Y. Influence of Bactrian camel milk on the gut microbiota. *J. Dairy Sci.* 2018. 101, P. 5758–5769. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13860>
66. Beermann C., Hartung J. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food Funct.* 2013. 4, P. 185–199. <https://doi.org/10.1039/c2fo30153a>
67. Mati A., Senoussi-Ghezali C., Si Ahmed Zennia S., Almi-Sebbane D., El-Hatmi H., Girardet J.-M. Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities – A review. *Int. Dairy J.* 2017. 73, P. 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.001>

68. Tahir M.J., Ejima K., Li P., Demerath E.W., Allison D.B., Fields D.A. Associations of breastfeeding or formula feeding with infant anthropometry and body composition at 6 months. *Matern. Child. Nutr.* 2020. 17, P. e13105. <https://doi.org/10.1111/mcn.13105>
69. Chauhan A.K., Saini R., Kumar P. Encapsulation of Antioxidants Using Casein as Carrier Matrix. In: *Nanotechnology Applications in Dairy Science*. Apple Academic Press, 2019. <https://doi.org/10.1201/9780429425370-10>
70. Flajnik M.F., Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 2010. 11, P. 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrg2703>
71. Flajnik M.F. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2018. 18, P. 438–453. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0003-9>
72. Hirano M., Das S., Guo P., Cooper M. The Evolution of Adaptive Immunity in Vertebrates. *Adv. Immunol.* 2011. 109, P. 125–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00004-2>
73. Ahmann J., Steinhoff-Wagner J., Büscher W. Determining Immunoglobulin Content of Bovine Colostrum and Factors Affecting the Outcome: A Review. *Anim. Open Access J. MDPI*. 2021. 11, P. 3587. <https://doi.org/10.3390/ani11123587>
74. Rainard P., Foucras G., Martins R.P. Adaptive Cell-Mediated Immunity in the Mammary Gland of Dairy Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 2022. 9, P. 854890. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.854890>
75. Peroni D.G., Chirumbolo S., Veneri D., Piacentini G.L., Tenero L., Vella A., Ortolani R., Raffaelli R., Boner A.L. Colostrum-derived B and T cells as an extra-lymphoid compartment of effector cell populations in humans. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* 2013. 26, P. 137–142. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.733744>
76. Ciardelli L., Garofoli F., Stronati M., Mazzucchelli I., Avanzini M.A., Figar T., Gasparoni A., De Silvestri A., Sabatino G., Chirico G. Human colostrum T lymphocytes and their effector cytokines actively aid the development of the newborn immune system. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2008. 21, P. 781–786. <https://doi.org/10.1177/039463200802100402>

77. Maccari P., Wiedemann S., Kunz H.-J., Piechotta M., Sanftleben P., Kaske M. Effects of two different rearing protocols for Holstein bull calves in the first 3 weeks of life on health status, metabolism and subsequent performance. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2015. 99, P. 737–746. <https://doi.org/10.1111/jpn.12241>
78. Liebler-Tenorio E.M., Riedel-Caspari G., Pohlenz J.F. Uptake of colostral leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002. 85, P. 33–40. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(01\)00404-4](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(01)00404-4)
79. Miller-Cushon E.K., Bergeron R., Leslie K.E., DeVries T.J. Effect of milk feeding level on development of feeding behavior in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2013. 96, P. 551–564. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5937>
80. Kussendrager K.D., van Hooijdonk A.C. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 2000. 84 Suppl 1, P. S19–25. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002208>
81. Tripathi V., Vashishtha B. Bioactive Compounds of Colostrum and Its Application. *Food Rev. Int.* 2006. 22, P. 225–244. <https://doi.org/10.1080/87559120600694606>
82. Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S., Donkor O.N. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018. 58, P. 726–740. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1217825>
83. Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S., Donkor O.N. Identification of Anticancer Peptides from Bovine Milk Proteins and Their Potential Roles in Management of Cancer: A Critical Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015. 14, P. 123–138. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12126>
84. Johanson B., Virtanen A.I., Tveit R.C., Dodson R.M. Isolation of an Iron-Containing Red Protein from Human Milk. *Acta Chem. Scand.* 1960. 14, P. 510–512. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.14-0510>
85. Birgens H.S. Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukaemia. *Scand. J. Haematol.* 1985. 34, P. 326–331. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1985.tb00757.x>

86. Baker H.M., Anderson B.F., Kidd R., Shewry S.C., Baker E. Lactoferrin three-dimensional structure: a framework for interpreting function. In: Shimazaki K., Tomita M., Tsuda H. (Eds.) *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*. Elsevier Sci. Amst. 2000. P. 3–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2548-6_1
87. Baker E.N., Baker H.M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 2005. 62, P. 2531–2539. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5368-9>
88. Jameson G.B., Anderson B.F., Norris G.E., Thomas D.H., Baker E.N. Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 1998. 54, P. 1319–1335. <https://doi.org/10.1107/s0907444998004417>
89. Håkansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H., Svanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. 92, P. 8064–8068. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8064>
90. Farnaud S., Evans R.W. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 2003. 40, P. 395–405. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(03)00152-4)
91. Montagne P., Cuillière M.L., Molé C., Béné M.C., Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001. 501, P. 241–247. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_30
92. Yang Z., Jiang R., Chen Q., Wang J., Duan Y., Pang X., Jiang S., Bi Y., Zhang H., Lönnnerdal B., Lai J., Yin S. Concentration of Lactoferrin in Human Milk and Its Variation during Lactation in Different Chinese Populations. *Nutrients*. 2018. 10, P. 1235. <https://doi.org/10.3390/nu10091235>
93. Canfield R.E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.* 1963. 238, P. 2698–2707. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67888-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67888-3)
94. Ferraboschi P., Ciceri S., Grisenti P. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics*. 2021. 10, P. 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>

95. Jiang L., Li Y., Wang L., Guo J., Liu W., Meng G., Zhang L., Li M., Cong L., Sun M. Recent Insights Into the Prognostic and Therapeutic Applications of Lysozymes. *Front. Pharmacol.* 2021. 12, P. 767642. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.767642>
96. Goldman A.S., Prabhakar B.S. Immunology Overview. In: Baron S. (ed.) *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX), 1996.
97. M.G.M. Modern Treatment of Diseases of the Oral Mucosa and Periodontal Under the Influence of Covid 19. *Int. J. Integr. Educ.* 2021. 4, P. 96–97. <https://doi.org/10.31149/ijie.v4i10.2277>
98. Surna A., Kubilius R., Sakalauskiene J., Vitkauskiene A., Jonaitis J., Saferis V., Gleiznys A. Lysozyme and microbiota in relation to gingivitis and periodontitis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2009. 15, P. CR66–73. <https://doi.org/10.12659/MSM.869557>
99. Christiansen S., Guo M., Kjelden D. Chemical composition and nutrient profile of low molecular weight fraction of bovine colostrum. *Int. Dairy J.* 2010. 20, P. 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.12.005>
100. Bezkorovainy A., Grohlich D. A low-molecular weight protein of bovine colostrum similar to immunoglobulin G. *Am. J. Vet. Res.* 1971. 32, P. 2081–2083.
101. Gál R., Zapletal D., Jakešová P., Straková E. Proximate Chemical Composition, Amino Acids Profile and Minerals Content of Meat Depending on Carcass Part, Sire Genotype and Sex of Meat Rabbits. *Anim. Open Access J. MDPI.* 2022. 12, P. 1537. <https://doi.org/10.3390/ani12121537>
102. Yoo C., Patwa T.H., Kreunin P., Miller F.R., Huber C.G., Nesvizhskii A.I., Lubman D.M. Comprehensive analysis of proteins of pH fractionated samples using monolithic LC/MS/MS, intact MW measurement and MALDI-QIT-TOF MS. *J. Mass Spectrom. JMS.* 2007. 42, P. 312–334. <https://doi.org/10.1002/jms.1163>
103. Gutstein H.B., Morris J.S., Annangudi S.P., Sweedler J.V. MICROPROTEOMICS: ANALYSIS OF PROTEIN DIVERSITY IN SMALL SAMPLES. *Mass Spectrom. Rev.* 2008. 27, P. 316–330. <https://doi.org/10.1002/mas.20161>

104. Le H.-C., Am A., N C., A A. The colostrum proteome, ruminant nutrition and immunity: a review. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2014. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140221124622>
105. Hernandez-Castellano L.E., Almeida A.M., Castro N., Arguello A. The Colostrum Proteome, Ruminant Nutrition and Immunity: A Review. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2014. 15, P. 64–74. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140221124622>
106. Yamada M., Murakami K., Wallingford J.C., Yuki Y. Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2002. 23, P. 1153–1160. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200204\)23:7/8<1153::AID-ELPS1153>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200204)23:7/8<1153::AID-ELPS1153>3.0.CO;2-Y)
107. Nissen A., Bendixen E., Ingvarsen K.L., Røntved C.M. In-depth analysis of low abundant proteins in bovine colostrum using different fractionation techniques. *Proteomics.* 2012. 12, P. 2866–2878. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200231>
108. Tacoma R., Fields J., Ebenstein D.B., Lam Y.-W., Greenwood S.L. Characterization of the bovine milk proteome in early-lactation Holstein and Jersey breeds of dairy cows. *J. Proteomics.* 2016. 130, P. 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.024>
109. Zhang L., Boeren S., van Hooijdonk A.C.M., Vervoort J.M., Hettinga K.A. A proteomic perspective on the changes in milk proteins due to high somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 2015. 98, P. 5339–5351. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9279>
110. Zhang L., Boeren S., Hageman J.A., van Hooijdonk T., Vervoort J., Hettinga K. Bovine milk proteome in the first 9 days: protein interactions in maturation of the immune and digestive system of the newborn. *PLoS One.* 2015. 10, P. e0116710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116710>
111. Tacoma R., Gelsinger S.L., Lam Y.W., Scuderi R.A., Ebenstein D.B., Heinrichs A.J., Greenwood S.L. Exploration of the bovine colostrum proteome and effects of heat treatment time on colostrum protein profile. *J. Dairy Sci.* 2017. 100, P. 9392–9401. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13211>

112. Inoue R., Tsukahara T. Composition and physiological functions of the porcine colostrum. *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho*. 2021. 92, P. e13618. <https://doi.org/10.1111/asj.13618>
113. Nissen A., Andersen P.H., Bendixen E., Ingvarsen K.L., Røntved C.M. Colostrum and milk protein rankings and ratios of importance to neonatal calf health using a proteomics approach. *J. Dairy Sci.* 2017. 100, P. 2711–2728. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11722>
114. Mann S., Curone G., Chandler T.L., Moroni P., Cha J., Bhawal R., Zhang S. Heat treatment of bovine colostrum: I. Effects on bacterial and somatic cell counts, immunoglobulin, insulin, and IGF-I concentrations, as well as the colostrum proteome. *J. Dairy Sci.* 2020. 103, P. 9368–9383. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18618>
115. Novikova A., Ivanov E., Kurguzova N., Akzhigitov R., Bozhkov A. COLOSTRUM COMPONENTS INVOLVED IN REGULATING THE NUMBER OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN ANIMALS WITH LIVER FIBROSIS. *Nor. J. Dev. Int. Sci.* 2021. P. 3–11. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001738>
116. Molès J.-P., Tuaillon E., Kankasa C., Bedin A.-S., Nagot N., Marchant A., McDermid J.M., Van de Perre P. Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 2018. 29, P. 133–143. <https://doi.org/10.1111/pai.12841>
117. Probo M., Pascottini O.B., LeBlanc S., Opsomer G., Hostens M. Association between metabolic diseases and the culling risk of high-yielding dairy cows in a transition management facility using survival and decision tree analysis. *J. Dairy Sci.* 2018. 101, P. 9419–9429. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14422>
118. Renaville R., Van Eenaeme C., Breier B.H., Vleurick L., Bertozzi C., Gengler N., Hornick J.L., Parmentier I., Istasse L., Haezebroeck V., Massart S., Portetelle D. Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2000. 18, P. 165–176. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(99\)00076-4](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(99)00076-4)

119. Gross J.J., Bruckmaier R.M. Invited review: Metabolic challenges and adaptation during different functional stages of the mammary gland in dairy cows: Perspectives for sustainable milk production. *J. Dairy Sci.* 2019. 102, P. 2828–2843. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15713>
120. Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 2010. 285, P. 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>
121. Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence.* 2010. 1, P. 7. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-7>
122. Yan X., Pan X., Ding L., Dai Y., Chen J., Yang Y., Li Y., Hao H., Qiu H., Ye Z., Shen R.L., Li Y., Ritz C., Peng Y., Zhou P., Gao F., Jiang P.-P., Lin H.-C., Zachariassen G., Sangild P.T., Wu B. Bovine colostrum to supplement the first feeding of very preterm infants: The PreColos randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* 2023. 42, P. 1408–1417. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.06.024>
123. Ranganathan K., Sivasankar V. MicroRNAs - Biology and clinical applications. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP.* 2014. 18, P. 229–234. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.140762>
124. Wu F., Zhi X., Xu R., Liang Z., Wang F., Li X., Li Y., Sun B. Exploration of microRNA profiles in human colostrum. *Ann. Transl. Med.* 2020. 8, P. 1170. <https://doi.org/10.21037/atm-20-5709>
125. Cavaletto M., Giuffrida M.G., Conti A. The proteomic approach to analysis of human milk fat globule membrane. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2004. 347, P. 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.026>
126. Saeland E., de Jong M.A.W.P., Nabatov A.A., Kalay H., Geijtenbeek T.B.H., van Kooyk Y. MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol. Immunol.* 2009. 46, P. 2309–2316. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.03.025>
127. Vass R.A., Bell E.F., Colaizy T.T., Schmelzel M.L., Johnson K.J., Walker J.R., Ertl T., Roghair R.D. Hormone levels in preterm and donor human milk before and after

- Holder pasteurization. *Pediatr. Res.* 2020. 88, P. 612–617. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0789-6>
128. Myrzabekova M., Labeit S., Niyazova R., Akimniyazova A., Ivashchenko A. Identification of Bovine miRNAs with the Potential to Affect Human Gene Expression. *Front. Genet.* 2022. 12, P. 705350. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.705350>
129. Van Hese I., Goossens K., Vandaele L., Opsomer G. Invited review: MicroRNAs in bovine colostrum—Focus on their origin and potential health benefits for the calf. *J. Dairy Sci.* 2020. 103, P. 1–15. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16959>
130. Carrillo-Lozano E., Sebastián-Valles F., Knott-Torcal C. Circulating microRNAs in Breast Milk and Their Potential Impact on the Infant. *Nutrients.* 2020. 12, P. 3066. <https://doi.org/10.3390/nu12103066>
131. Leroux C., Chervet M.L., German J.B. Perspective: Milk microRNAs as Important Players in Infant Physiology and Development. *Adv. Nutr.* 2021. 12, P. 1625–1635. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab059>
132. Sangild P.T., Vonderohe C., Melendez Hebib V., Burrin D.G. Potential Benefits of Bovine Colostrum in Pediatric Nutrition and Health. *Nutrients.* 2021. 13, P. 2551. <https://doi.org/10.3390/nu13082551>
133. Shulman R. Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: a pilot study. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 2002. 86, P. F131–F133. <https://doi.org/10.1136/fn.86.2.F131>
134. Baier S.R., Nguyen C., Xie F., Wood J.R., Zemleni J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J. Nutr.* 2014. 144, P. 1495–1500. <https://doi.org/10.3945/jn.114.196436>
135. Melnik B.C., Stremmel W., Weiskirchen R., John S.M., Schmitz G. Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules.* 2021. 11, P. 851. <https://doi.org/10.3390/biom11060851>

136. Warren M., Zhang C., Vedadghavami A., Bokvist K., Dhal P., Bajpayee A. Milk Exosomes with Enhanced Mucus Penetrability for Oral Delivery of siRNA. *Biomater. Sci.* 2020. 9, P. 1–12. <https://doi.org/10.1039/D0BM01497D>
137. Ballard O., Morrow A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* 2013. 60, P. 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
138. Martin C.R., Ling P.-R., Blackburn G.L. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients.* 2016. 8, P. 279. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>
139. Usai-Satta P., Scarpa M., Oppia F., Cabras F. Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 2012. 3, P. 29–33. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v3.i3.29>
140. Mattar R., de Campos Mazo D.F., Carrilho F.J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2012. 5, P. 113–121. <https://doi.org/10.2147/CEG.S32368>
141. Jellema P., Schellevis F.G., van der Windt D.A.W.M., Kneepkens C.M.F., van der Horst H.E. Lactose malabsorption and intolerance: a systematic review on the diagnostic value of gastrointestinal symptoms and self-reported milk intolerance. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians.* 2010. 103, P. 555–572. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcq082>
142. Saito T., Itoh T., Adachi S. Presence of two neutral disaccharides containing N-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1984. 801, P. 147–150. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90223-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90223-X)
143. Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T.T. Immune components of bovine colostrum and milk. *J. Anim. Sci.* 2009. 87, P. 3–9. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>
144. Contarini G., Povolito M., Pelizzola V., Monti L., Bruni A., Passolungo L., Abeni F., Degano L. Bovine colostrum: Changes in lipid constituents in the first 5 days after parturition. *J. Dairy Sci.* 2014. 97, P. 5065–5072. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7517>

145. Quigley J.D., Drewry J.J. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *J. Dairy Sci.* 1998. 81, P. 2779–2790. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75836-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75836-9)
146. Weaver D.M., Tyler J.W., VanMetre D.C., Hostetler D.E., Barrington G.M. Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. *J. Vet. Intern. Med.* 2000. 14, P. 569–577. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x>
147. Klopp R.N., Ferreira C.R., Casey T.M., Boerman J.P. Relationship of cow and calf circulating lipidomes with colostrum lipid composition and metabolic status of the cow. *J. Dairy Sci.* 2022. 105, P. 1768–1787. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21008>
148. Hettinga K., Valenberg H. van, Vries S. de, Boeren S., Hooijdonk T. van, Arendonk J. van, Vervoort J. The Host Defense Proteome of Human and Bovine Milk. *PLoS ONE*. 2011. 6, P. e19433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019433>
149. Kim Y.J. Immunomodulatory Effects of Human Colostrum and Milk. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* 2021. 24, P. 337–345. <https://doi.org/10.5223/pghn.2021.24.4.337>
150. Garofalo R. Cytokines in human milk. *J. Pediatr.* 2010. 156, P. S36–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.019>
151. Kastin, A.J., Akerstrom, V. Glucose and insulin increase the transport of leptin through the blood-brain barrier in normal mice but not in streptozotocin-diabetic mice. *Neuroendocrinology*. 2001; 73(4): 237–242. <https://doi.org/10.1159/000054640>
152. Werner, H., LeRoith, D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 2014; 24(12): 1947–1953. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.01.020>
153. Shamir, R. et al. Oral insulin supplementation in paediatric short bowel disease: a pilot observational study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2009; 49(1): 108–111. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31819344db>
154. Lemas, D.J. et al. Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016; 103(5): 1291–1300. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.126375>

155. Meyer, L.R. et al. Growth Restriction, Leptin, and the Programming of Adult Behavior in Mice. *Behav. Brain Res.* 2014; 275: 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.054>
156. Erkonen, G.E. et al. Neonatal leptin administration alters regional brain volumes and blocks neonatal growth restriction-induced behavioral and cardiovascular dysfunction in male mice. *Pediatr. Res.* 2011; 69(5): 406–412. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182110c7d>
157. Ertl, T. et al. Postnatal changes of leptin levels in full-term and preterm neonates: their relation to intrauterine growth, gender, and testosterone. *Biol. Neonate.* 1999; 75(3): 167–176. <https://doi.org/10.1159/000014093>
158. Savino, F. et al. Mother and Infant Body Mass Index, Breast Milk Leptin and Their Serum Leptin Values. *Nutrients.* 2016; 8(6): 383. <https://doi.org/10.3390/nu8060383>
159. McKay, L.I., Cidlowski, J.A. Corticosteroids. In: *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. BC Decker; 2003.
160. Hinde, K. et al. Cortisol in mother's milk across lactation reflects maternal life history and predicts infant temperament. *Behav. Ecol. Off. J. Int. Soc. Behav. Ecol.* 2015; 26(2): 269–281. <https://doi.org/10.1093/beheco/arul86>
161. Schumacher, M. et al. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc.* 2004; 14(Suppl A): S18–33. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2004.03.007>
162. Arck, P. et al. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N.* 2007; 58(3): 268–279. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00512.x>
163. Arslan, A. et al. Bovine Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition. *Front. Nutr.* 2021; 8: 651721. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.651721>
164. Morrissey, P.A., Hill, T.R. Fat-Soluble Vitamins and Vitamin C in Milk and Milk Products. Presented at the *, New York, NY; 2009.

165. Jensen, S.K. et al. Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, beta-carotene and alpha-tocopherol into cows' milk. *J. Dairy Res.* 1999; 66(4): 511–522. <https://doi.org/10.1017/s0022029999003805>
166. Pereira, P.C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif.* 2014; 30(6): 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
167. Haug, A. et al. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis.* 2007; 6(1): 25. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
168. Geiger, A.J. et al. Growth, intake, and health of Holstein heifer calves fed an enhanced preweaning diet with or without postweaning exogenous estrogen. *J. Dairy Sci.* 2016; 99(5): 3995–4004. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10405>
169. Georgiev, I.P. et al. Insulin-like growth factor and insulin receptors in intestinal mucosa of neonatal calves. *J. Endocrinol.* 2003; 176(1): 121–132. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1760121>
170. Reber, A.J. et al. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system. Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008; 123(3–4): 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.009>
171. Hammon, H.M. et al. Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: endocrine changes and responses to milk-borne and systemic hormones. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2012; 43(2): 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.02.005>
172. Huber, K. Invited review: resource allocation mismatch as pathway to disproportionate growth in farm animals – prerequisite for a disturbed health. *Animal.* 2018; 12(3): 528–536. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002051>
173. Khan, M.A. et al. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *J. Dairy Sci.* 2007; 90(7): 3376–3387. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0104>

174. Goudarzi, N. et al. Comparative phenotypic characterization of human colostrum and breast milk-derived stem cells. *Hum. Cell.* 2020; 33(2): 308–317. <https://doi.org/10.1007/s13577-019-00320-x>
175. Joshi, P.A. et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature.* 2010; 465(7299): 803–807. <https://doi.org/10.1038/nature09091>
176. Tiede, B., Kang, Y. From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. *Cell Res.* 2011; 21(2): 245–257. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.11>
177. Hassiotou, F. et al. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2012; 30(10): 2164–2174. <https://doi.org/10.1002/stem.1188>
178. Woodbury, R.M. THE RELATION BETWEEN BREAST AND ARTIFICIAL FEEDING AND INFANT MORTALITY. *Am. J. Epidemiol.* 1922; 2(6): 668–687. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118563>
179. Scrimshaw, N.S. et al. Interactions of nutrition and infection. *Monogr. Ser. World Health Organ.* 1968; 57: 3–329.
180. Jones, G. et al. How many child deaths can we prevent this year? *Lancet Lond. Engl.* 2003; 362(9377): 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13811-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13811-1)
181. Bozhkov, A., Nikitchenko, Y. Thermogenesis and longevity in mammals. Thyroxin model of accelerated aging. *Exp. Gerontol.* 2014; 60C: 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.10.017>
182. Vasan, S.K. et al. The proposed systemic thermogenic metabolites succinate and 12,13-diHOME are inversely associated with adiposity and related metabolic traits: evidence from a large human cross-sectional study. *Diabetologia.* 2019; 62(12): 2079–2087. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4947-5>
183. Hammon, H.M. et al. Importance of colostrum supply and milk feeding intensity on gastrointestinal and systemic development in calves. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 2020; 14(Suppl 1): s133–s143. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003148>

184. Georgiev, I.P. Effect of colostrum insulin-like growth factors on growth and development of neonatal calves. *Bulg. J. Vet. Med.* 2008; 11(2): 75–88. <https://doi.org/10.15547/bjvm.274>
185. Roffler, B. et al. Intestinal morphology, epithelial cell proliferation, and absorptive capacity in neonatal calves fed milk-born insulin-like growth factor-I or a colostrum extract. *J. Dairy Sci.* 2003; 86(6): 1797–1806. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73765-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73765-5)
186. Blum, J.W., Baumrucker, C.R. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and other endocrine factors in milk: role in the newborn. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; 606: 397–422. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_16
187. Godden, S.M. et al. Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2019; 35(3): 535–556. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>
188. Schäff, C.T. et al. Effects of Feeding Milk Replacer Ad Libitum or in Restricted Amounts for the First Five Weeks of Life on the Growth, Metabolic Adaptation, and Immune Status of Newborn Calves. *PloS One.* 2016; 11(1): e0168974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168974>
189. Sinclair, J.C. ed. *Temperature regulation and energy metabolism in the newborn.* Grune & Stratton; 1978.
190. Stevens, E.E. et al. A History of Infant Feeding. *J. Perinat. Educ.* 2009; 18(2): 32–39. <https://doi.org/10.1624/105812409X426314>
191. Persson, B. Carbohydrate and lipid metabolism in the newborn infant. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* 1974; 55: 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1974.tb00706.x>
192. Stave, U. *Perinatal Physiology.* Plenum Medical Book Company; 1970.
193. Herrera, E., Amusquivar, E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2000; 16(3): 202–210. [https://doi.org/10.1002/1520-7560\(200005/06\)16:3<202::aid-dmrr116>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1520-7560(200005/06)16:3<202::aid-dmrr116>3.0.co;2-#)

194. Clària, J. et al. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2013; 304(11): C1141–C1149. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00351.2012>
195. Sullivan, E.M. et al. Mechanisms by Which Dietary Fatty Acids Regulate Mitochondrial Structure-Function in Health and Disease. *Adv. Nutr.* 2018; 9(3): 247–262. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy007>
196. Bensinger, S.J., Tontonoz, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature.* 2008; 454(7203): 470–477. <https://doi.org/10.1038/nature07202>
197. Krenkel, O., Tacke, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(5): 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
198. Boutens, L., Stienstra, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia.* 2016; 59(5): 879–894. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3904-9>
199. Rosen, E.D., Spiegelman, B.M. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014; 156(1–2): 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
200. Odegaard, J., Ganeshan, K., Chawla, A. Adipose Tissue Macrophages: Amicus adipem? *Cell Metab.* 2013; 18(6): 767–768. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.011>
201. Van Aerde, J.E., Wilke, M.S., Feldman, M., Clandinin, M.T. Increased lipids in the fetus and newborn. In: *Fetal and Neonatal Physiology*, 3rd ed.; Polin, RA, Fox, VV, Abman, SH, Eds. Presented at a conference, London, UK; 2004 year. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-3479-7.10042-4>
202. Whyte, R.K., Bayley, H.S. Energy metabolism of the newborn infant. *Adv. Nutr. Res.* 1990; 8: 79–108. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0611-5_4
203. Hoang, A.C., Yu, H., Röszer, T. Transcriptional Landscaping Identifies a Beige Adipocyte Depot in the Newborn Mouse. *Cells.* 2021; 10(9): 2368. <https://doi.org/10.3390/cells10092368>
204. Farkas, V., Kelenyi, G., Sandor, A. A dramatic accumulation of glycogen in the brown adipose tissue of rats following recovery from cold exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 365(1): 54–61. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1157>

205. Novak, M., Monkus, E., Pardo, V. Human neonatal subcutaneous adipose tissue. Function and ultrastructure. *Biol. Neonate.* 1971; 19(3–4): 306–321. <https://doi.org/10.1159/000240425>
206. Mayeuf-Louchart, A. et al. Glycogen Dynamics Drives Lipid Droplet Biogenesis during Brown Adipocyte Differentiation. *Cell Rep.* 2019; 29(5): 1410–1418.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.073>
207. Patel, D., Kalhan, S. Glycerol metabolism and triglyceride-fatty acid cycling in the human newborn: effect of maternal diabetes and intrauterine growth retardation. *Pediatr. Res.* 1992; 31(1): 52–58. <https://doi.org/10.1203/00006450-199201000-00010>
208. Insull, W. et al. The fatty acids of human milk. II. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. *J. Clin. Invest.* 1959; 38(3): 443–450. <https://doi.org/10.1172/JCI103819>
209. Furse, S. et al. Relationship between the lipid composition of maternal plasma and infant plasma through breast milk. *Metabolomics.* 2019; 15(10): 129. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1589-z>
210. Yin, J. et al. Maternal diet, breastfeeding and adolescent body composition: a 16-year prospective study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012; 66(12): 1329–1334. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.122>
211. Hamosh, M. Lingual lipase and fat digestion in the neonatal period. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1983; 2(Suppl 1): S236–241. <https://doi.org/10.1097/00005176-198300201-00035>
212. Yu, H. et al. Breast milk alkylglycerols sustain beige adipocytes through adipose tissue macrophages. *J. Clin. Invest.* 2019; 129(6): 2485–2499. <https://doi.org/10.1172/JCI125646>
213. Verduci, E. et al. Brown Adipose Tissue: New Challenges for Prevention of Childhood Obesity. A Narrative Review. *Nutrients.* 2021; 13(5): 1450. <https://doi.org/10.3390/nu13051450>
214. Hawdon, J.M. et al. Patterns of metabolic adaptation for preterm and term infants in the first neonatal week. *Arch. Dis. Child.* 1992; 67(4 Spec No): 357–365. https://doi.org/10.1136/adc.67.4_spec_no.357

215. Warshaw, J.B., Terry, M.L. Cellular energy metabolism during fetal development. *J. Cell Biol.* 1970; 44(2): 354–360. <https://doi.org/10.1083/jcb.44.2.354>
216. Roberto, M. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and mitochondria, back to the future. *Trends Food Sci. Technol.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.019>
217. Del Río, R. et al. Multi-centre study showed reduced compliance with the World Health Organization recommendations on exclusive breastfeeding during COVID-19. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992. 2021; 110(3): 935–936. <https://doi.org/10.1111/apa.15642>
218. Guttman, N., Zimmerman, D.R. Low-income mothers' views on breastfeeding. *Soc. Sci. Med.* 1982. 2000; 50(10): 1457–1473. [https://doi.org/10.1016/s0277-9536\(99\)00387-1](https://doi.org/10.1016/s0277-9536(99)00387-1)
219. Pietrobelli, A., Agosti, M. Nutrition in the First 1000 Days: Ten Practices to Minimize Obesity Emerging from Published Science. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2017; 14(12): 1491. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121491>
220. Kramer, M.S., Kakuma, R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012; CD003517. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003517.pub2>
221. Roberts C., Manchester K. Metabolic and Endocrine Disease. 2010.
222. Stantis C., Schutkowski H., Sołtysiak A. Reconstructing breastfeeding and weaning practices in the Bronze Age Near East using stable nitrogen isotopes. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2020. 172, P. 58–69. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23980>
223. Twiss K. The archaeology of food and social diversity. *J. Archaeol. Res.* 2012. 20, P. 357–395. <https://doi.org/10.1007/s10814-012-9063-4>
224. Howcroft R., Eriksson G., Lidén K. Conformity in diversity? Isotopic investigations of infant feeding practices in two iron age populations from Southern Öland, Sweden. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012. 149, P. 217–230. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22113>
225. French D. Robert F. Dons and Frank H. Wians Jr., Editors, Endocrine and metabolic disorders clinical lab testing manual (Fourth Edition). *Clin. Chim. Acta.* 2010. 411, P. 1839. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.012>

226. Rito A.I., Buoncristiano M., Spinelli A., Salanave B., Kunešová M., Hejgaard T., García Solano M., Fijałkowska A., Sturua L., Hyska J., Kelleher C., Duleva V., Musić Milanović S., Farrugia Sant'Angelo V., Abdrakhmanova S., Kujundzic E., Peterkova V., Gualtieri A., Pudule I., Petrauskienė A., Tanrygulyyeva M., Serali R., Huidumac-Petrescu C., Williams J., Ahrens W., Breda J. Association between Characteristics at Birth, Breastfeeding and Obesity in 22 Countries: The WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative – COSI 2015/2017. *Obes. Facts*. 2019. 12, P. 226–243. <https://doi.org/10.1159/000500425>
227. Godhia D.M.L., Patel N. Colostrum – its Composition, Benefits as a Nutraceutical – A Review. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J*. 2013. 1, P. 37–47. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.1.1.06>
228. Silva E.G. dos S.O., Rangel A.H. do N., Mürmam L., Bezerra M.F., Oliveira J.P.F. de. Bovine colostrum: benefits of its use in human food. *Food Sci. Technol*. 2019. 39, P. 355–362. <https://doi.org/10.1590/fst.14619>
229. Buttar H.S., Bagwe S.M., Bhullar S.K., Kaur G. Chapter 1 - Health Benefits of Bovine Colostrum in Children and Adults. In: Watson R.R., Collier R.J., Preedy V.R. (eds.) *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. Academic Press, 2017. P. 3–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804444-0.00001-0>
230. Korhonen H., Marnila P., Gill H.S. Bovine milk antibodies for health. *Br. J. Nutr*. 2000. 84 Suppl 1, P. S135–S146. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002361>
231. Kesser J., Hill M., Heinz J.F.L., Koch C., Rehage J., Steinhoff-Wagner J., Hammon H.M., Mielenz B., Sauerwein H., Sadri H. The rapid increase of circulating adiponectin in neonatal calves depends on colostrum intake. *J. Dairy Sci*. 2015. 98, P. 7044–7051. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9726>
232. Haisan J., Oba M., Ambrose D.J., Steele M.A. Short communication: The effects of offering a high or low plane of milk preweaning on insulin-like growth factor and insulin-like growth factor binding proteins in dairy heifer calves. *J. Dairy Sci*. 2018. 101, P. 11441–11446. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14339>

233. Struff W., Sprotte G. Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: A review – Part II: Clinical studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2008. 46, P. 211–225. <https://doi.org/10.5414/CP46211>
234. Saad K., Abo-Elela M.G.M., El-Baseer K.A.A., Ahmed A.E., Ahmad F.-A., Tawfeek M.S.K., El-Houfey A.A., Aboul Khair M.D., Abdel-Salam A.M., Abo-Elgheit A., Qubaisy H., Ali A.M., Abdel-Mawgoud E. Effects of bovine colostrum on recurrent respiratory tract infections and diarrhea in children. *Medicine (Baltimore)*. 2016. 95, P. e4560. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004560>
235. Eker F., Akdaşçi E., Duman H., Yalçıntaş Y.M., Canbolat A.A., Kalkan A.E., Karav S., Šamec D. Antimicrobial Properties of Colostrum and Milk. *Antibiotics*. 2024. 13, P. 251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13030251>
236. Lawrence H.S. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.* 1949. 71, P. 516–522. <https://doi.org/10.3181/00379727-71-17242>
237. Fudenberg H.H. Transfer factor: past, present and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989. 29, P. 475–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.29.040189.002355>
238. Kirkpatrick C.H. Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules. *Mol. Med.* 2000. 6, P. 332–341. <https://doi.org/10.1007/BF03401941>
239. Macias A.E., Guaní-Guerra E. Transfer Factor: Myths and Facts. *Arch. Med. Res.* 2020. 51, P. 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.06.016>
240. Wong E.B., Mallet J.-F., Duarte J., Matar C., Ritz B.W. Bovine colostrum enhances natural killer cell activity and immune response in a mouse model of influenza infection and mediates intestinal immunity through toll-like receptors 2 and 4. *Nutr. Res. N. Y. N.* 2014. 34, P. 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.02.007>
241. Du M., Xu W., Yi H., Han X., Wang C., Zhang L. Protective effects of bovine colostrum acid proteins on bone loss of ovariectomized rats and the ingredients identification. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. 55, P. 220–228. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900593>

242. Louhimies S. Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. *Altern. Lab. Anim. ATLA*. 2003. 30 Suppl 2, P. 217–219. <https://doi.org/10.1177/026119290203002S36>
243. Taoudi S., Bee T., Hilton A., Knezevic K., Scott J., Willson T.A., Collin C., Thomas T., Voss A.K., Kile B.T., Alexander W.S., Pimanda J.E., Hilton D.J. ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes Dev*. 2011. 25, P. 251–262. <https://doi.org/10.1101/gad.2009211>
244. Council Directive on the approximation of laws, regulation and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal*. 1986. N 358, P. 0001–0028.
245. Bozhkov A.I., Ohiienko S.L., Bondar A.Y., Klimova E.M., Ivanov E.G. Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells. *Adv. Gerontol. Uspekhi Gerontol*. 2019. 32, P. 45–54. <https://doi.org/10.1134/S2079057019020030>
246. Ohiienko S.L., Bondar A.Y., Ivanov E.G., Bozhkov A.I. Liver fibrosis has a different effect on the lifespan of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats. *MOJ Gerontol Ger*. 2019. 4, P. 36–40. <https://doi.org/10.15406/mojgg.2019.04.00103>
247. Bozhkov A.I., Ohiienko S.L., Kuznetsova Y.A., Bondar A.Y., Marchenko V.P., Gumennaya M.S. Donor age affects the behavior and sensitivity of bone marrow cells to copper ions in primary culture. *Adv. Gerontol. Uspekhi Gerontol*. 2017. 30, P. 457–467. <https://doi.org/10.1134/S2079057017030050>
248. Ohiienko S., Bozhkov A., Bondar A., Ivanov E., Ionov I. Bone marrow cells obtained from old animals differ from young cells in their ability to divide and respond to liver fibrosis in primary culture. *Adv. Aging Res*. 2019. 8, P. 14–27 <https://doi.org/10.4236/aar.2019.81002>
249. Bozhkov A.I., Ivanov E.G., Kuznetsova Y.A., Ohiienko S.L., Bondar A.Yu. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture. *Front. Biol*. 2017. 12, C271–279. <https://doi.org/10.1007/s11515-017-1458-y>

250. Ohienko S.L., Bondar A.Y., Ivanov E.G. Induced liver fibrosis influences bone marrow cells culture of rats of different ages. In: *The development of nature sciences: problems and solutions*. Brno, 2018. P. 405–407.
251. Ohienko S., Bondar A., Ivanov E. Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture. In: *Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts: XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students*, dedicated to the 185th anniversary of B. Dybowski, Lviv, 2018. P. 267–268.
252. Ohienko S.L., Bondar A.Y. Bone marrow cells behavior in the primary culture under influence of CCl₄–induced liver fibrosis. In: *Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances: XV International Scientific Conference of Students and Young Scientists*, Kyiv, 2017. P. 153.
253. Bozhkov A., Ivanov E.G., Begai M., Alsardia M., Kurguzova N.I. Low-Molecular Weight Cow Colostrum Components in Functional Nutrition. *J. Nutr. Ther.* 2017. 6, P. 11–17. <https://doi.org/10.6000/1929-5634.2017.06.01.2>
254. Bozhkov A., Ivanov E.G., Kurguzova N.I., Alsardia M., Akzhigitov R.A., Baranikova S.Y., Potapova V.I., Chuprikova A.S. The Toxic Effects of Low Molecular Weight Components of Cow Colostrum: The Short-Term and Long-Term Effects. *J. Nutr. Ther.* 2018. 6, P. 84–91. <https://doi.org/10.6000/1929-5634.2017.06.04.2>
255. Bozhkov A.I., Nikitchenko Y.V., Klimova E.M., Linkevych O.S., Lebid K.M., Al-Bahadli A.M.M., Alsardia M.M.A. Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis. *Adv. Gerontol.* 2017. 7, P. 41–50. <https://doi.org/10.1134/S2079057017010040>
256. Ai B., Nikitchenko Y.V., Lebid K.M., Ivanov E.G., Kurguzova N.I., Gumennaya M.S., Alsardia M.A.M., Al-Bahadli A.M. Low Molecular Weight Components from Various Sources Eliminate Oxidative Stress and Restore Physiological Characteristics of Animals at Early Stages of Cu-Induced Liver Fibrosis Development. *Transl. Biomed.* 2017. 8, P. 0–0. <https://doi.org/10.21767/2172-0479.1000107>

257. Igorevna Kurguzova N. Interconnection of Antitoxic and Antioxidant Systems of the Organism under the Action of Natural Low Molecular Complex – Fungidol. *Am. J. Biomed. Life Sci.* 2014. 2, P. 25. <https://doi.org/10.11648/j.ajbls.s.2014020601.15>
258. Pechkurenko A., Kulikov I. Method of Drying and Embedding Histological Material in Paraffin and Coloring of Sections Using Isopropyl Alcohol. *Selected Issues of Forensic Examination.* 1998. P. 69–70.
259. Bravo A.A., Sheth S.G., Chopra S. Liver biopsy. *N. Engl. J. Med.* 2001. 344, P. 495–500. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102153440706>
260. Brunt E.M., Janney C.G., Di Bisceglie A.M., Neuschwander-Tetri B.A., Bacon B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am. J. Gastroenterol.* 1999. 94, P. 2467–2474. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>
261. Bakkum E.A., Trimbos J.B., Trimbos-Kemper T.C. Postsurgical adhesion formation and prevention – recent developments with regard to the consecutive stages in adhesion formation. *Reprod. Med. Rev.* 1996. 5, P. 37–49. <https://doi.org/10.1017/S0962279900001228>
262. Merritt J.E., McCarthy S.A., Davies M.P., Moores K.E. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca²⁺ in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca²⁺. *Biochem. J.* 1990. 269, P. 513–519. <https://doi.org/10.1042/bj2690513>
263. Lee G.-A., Choi K.-C., Hwang K.-A. Kaempferol, a phytoestrogen, suppressed triclosan-induced epithelial-mesenchymal transition and metastatic-related behaviors of MCF-7 breast cancer cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2017. 49, P. 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.016>
264. Bozhkov A.I., Nikitchenko Y.V., Lebed' K.N., Linkevych O.S., Kurguzova N.I., Klimova O.M., Begai M.A.Y.A., Al-Bahadly A.M.M., Alsardia M.M.A. The Cyclic Feeding Regime Induces Decaying Age-Dependent Oxidative Stress and Regulates the Cell Chain of the Immunity. *Adv. Aging Res.* 2016. 5, P. 151. <https://doi.org/10.4236/aar.2016.56015>

265. Kamath S.A., Narayan K.A. Interaction of Ca²⁺ with endoplasmic reticulum of rat liver: A standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Anal. Biochem.* 1972. 48, P. 53–61. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90169-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90169-8)
266. Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo J.L., Jameson J.L. *Harrison's Principal of Internal Medicine*. 15th ed. USA: McGraw Hill, 2003. Vol. 2.
267. Botros M., Sikaris K.A. The De Ritis Ratio: The Test of Time. *Clin. Biochem. Rev.* 2013. 34, P. 117–130.
268. Karmen A., Wróblewski F., LaDue J.S. Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 1955. 34, P. 126–133. <https://doi.org/10.1172/JCI103055>
269. Ng V. Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests, 4th Edition, Vol. 1 and 2. D.S. Young and R.B. Friedman, eds. *Clin. Chem.* 2002. 48, P. 682–683. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.4.682a>
270. King E.J., Delory G.E. Ascorbic acid and phosphatase activity. *Biochem. J.* 1938. 32, P. 1157–1162. <https://doi.org/10.1042/bj0321157>
271. Rosalki S.B., Rau D., Lehmann D., Prentice M. Determination of Serum γ -Glutamyl Transpeptidase Activity and its Clinical Applications. *Ann. Clin. Biochem.* 1970. 7, P. 143–147. <https://doi.org/10.1177/000456327000700601>
272. Roeschlau P., Bernt E., Gruber W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 1974. 12, P. 226.
273. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979. 95, P. 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
274. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids.* 1980. 15, P. 137–140. <https://doi.org/10.1007/BF02540959>
275. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967. 70, P. 158–169.
276. Raghavachari N., Lou M.F. Evidence for the presence of thioltransferase in the lens. *Exp. Eye Res.* 1996. 63, P. 433–441. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0133>

277. Gallogly M.M., Shelton M.D., Qanungo S., Pai H.V., Starke D.W., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J., Mieyal J.J. Glutaredoxin regulates apoptosis in cardiomyocytes via NFkappaB targets Bcl-2 and Bcl-xL: implications for cardiac aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2010. 12, P. 1339–1353. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2791>
278. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1975. 250, P. 5475–5480. <https://doi.org/10.1074/jbc.250.14.5475>
279. Zaheer N., Tewari K.K., Krishnan P.S. Mitochondrial forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967. 120, P. 22–34. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90593-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90593-0)
280. Bauman D.E., Brown R.E., Davis C.L. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970. 140, P. 237–244. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90028-7)
281. Usatenko M.S., Berlin G.I. [Activity and isoenzyme composition of lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in the blood and erythrocytes of newborn children with hemolytic disease]. *Vopr. Med. Khim.* 1979. 25, P. 59–62.
282. Gardner P.R., Nguyen D.D., White C.W. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. 91, P. 12248. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12248>
283. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193, P. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
284. Miller G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 1959. 31, P. 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
285. Lv H., Cui X., Wahid F., Xia F., Zhong C., Jia S. Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLoS ONE.* 2016. 11, P. e0152226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152226>
286. Muniz-Junqueira M.I., Peçanha L.M.F., da Silva-Filho V.L., de Almeida Cardoso M.C., Tosta C.E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the

- phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003. 10, P. 1096–1102. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.1096-1102.2003>
287. Freeman R., King B. Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test. *J. Clin. Pathol.* 1972. 25, P. 912–914. <https://doi.org/10.1136/jcp.25.10.912>
288. Ríha I., Hasková V., Kaslík J., Maierová M., Stránský J. The use of polyethyleneglycol for immune complex detection in human sera. *Mol. Immunol.* 1979. 16, P. 489–493. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(79\)90075-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(79)90075-0)
289. Gabrieljan L., Levitsky E.R., Dmitriev A.A. et al. Screening method of middle molecules in biological fluids. Method. Recommended. *Medicine*, 1985. 18 p.
290. Massie H.R., Aiello V.R., Banziger V. Iron accumulation and lipid peroxidation in aging C57BL/6J mice. *Exp. Gerontol.* 1983. 18, P. 277–285. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(83\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0531-5565(83)90038-4)
291. Mai H., Cachot J., Brune J., Geffard O., Belles A., Budzinski H., Morin B. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 2012. 64, P. 2663–2670. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.009>
292. Antonenko Y., Kozheshkurt V., Shtoda D., Katrich V. An amplitude and phase detector for dielectric spectroscopy systems. *Radiofiz. Elektron.* 2020. 25, P. 68–77. <https://doi.org/10.15407/rej2020.03.068>
293. Kozheshkurt V., Ivanov I., Antonenko Y., Katrich V., Bozhkov A., Gromovoy T. Devising an express method for estimating the quality of colostrum and its components based on electrical conductivity. *East.-Eur. J. Enterp. Technol.* 2021. 1, P. 109. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2021.225007>
294. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях з використанням EXCEL*. Київ: Моріон, 2001. 408 с.
295. Огурцов О.М., Близнюк О.М., Антропова Л.А. *Фізико-хімічні засади біотехнології. Практикум*. Харків: НТУ «ХПІ», 2014.
296. Lotito D., Pacifico E., Matuozzo S., Musco N., Iommelli P., Zicarelli F., Tudisco R., Infascelli F., Lombardi P. Colostrum Composition, Characteristics and Management

for Buffalo Calves: A Review. *Vet. Sci.* 2023. 10, P. 358.
<https://doi.org/10.3390/vetsci10050358>

297. Bozhkov A.A., Ganin V.Yu., 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. *Clin. Nutr. Open Sci.* 2024. 53, P. 78–94. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2023.12.007>
298. Bozhkov A.I., Dlubovskaya V.L., Dmitriev Yu.V., Meshaikina N.I., Maleev V.A., Klimova E.M. Supposed role of “Metabolic memory” in formation of response reaction to stress factors in young and adult organisms. *Adv. Gerontol.* 2011. 1, P. 63–71.
<https://doi.org/10.1134/S2079057011010048>
299. Bozhkov A.I., Kurguzova N.I., Krivoruchko T.V., Lebed' E.N., Mikhailets A.O., Danladi S.D., Bozhkov A.A., Girich M.S. A cyclic feeding regime: A new model in experimental gerontology. *Adv. Gerontol.* 2014. 4, P. 252–259.
<https://doi.org/10.1134/S2079057014040079>
300. Bozhkov A.I., Linkevych O.S., Ivanov E.G., Klimova O.M., Al Begai M.A.Y. Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis. *Int. J. Curr. Res.* 2016. 8, P. 44129–44137.
301. Broom R. Robert Broom. 1866–1951. JSTOR. Available from:
<https://www.jstor.org/stable/768799>
302. Gélébart P., Riaublanc A., Famelart M.-H., Jonchère C., Beaumal V., Anton M., Garnier C. Protein aggregates modulate the texture of emulsified and acidified acid milk gels. *Food Hydrocoll.* 2019. 93, P. 176–188.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.007>
303. Samardžija B., Juković M., Zaharija B., Renner É., Palkovits M., Bradshaw N.J. Co-Aggregation and Parallel Aggregation of Specific Proteins in Major Mental Illness. *Cells.* 2023. 12, P. 1848. <https://doi.org/10.3390/cells12141848>
304. Siddiqi M.K., Alam P., Chaturvedi S.K., Shahein Y.E., Khan R.H. Mechanisms of protein aggregation and inhibition. *Front. Biosci. Elite Ed.* 2017. 9, P. 1–20.
<https://doi.org/10.2741/e781>

305. Matveev V.V. Native aggregation as a cause of origin of temporary cellular structures needed for all forms of cellular activity, signaling and transformations. *Theor. Biol. Med. Model.* 2010. 7, P. 19. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-7-19>
306. Uversky V.N. A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2013. 22, P. 693–724. <https://doi.org/10.1002/pro.2261>
307. González A.E. Colloidal Aggregation Coupled with Sedimentation: A Comprehensive Overview. In: *Advances in Colloid Science*. IntechOpen (2016).
308. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *JoVE J. Vis. Exp.* 2016. e53936. <https://doi.org/10.3791/53936>
309. Lewandowski K., Kowalik M.M., Pawlaczyk R., Rogowski J., Hellmann A. Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults – comparison of two techniques of slide preparation. *Int. J. Lab. Hematol.* 2012. 34, P. 254–261. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2011.01387.x>
310. Klein B.Y., Tamir H., Ludwig R.J., Glickstein S.B., Welch M.G. Colostrum oxytocin modulates cellular stress response, inflammation, and autophagy markers in newborn rat gut villi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. 487, P. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.011>
311. Davydov V.V., Bozhkov A.I., Kulchitsky O.K. *Physiological and Pathophysiological Role of Endogenous Aldehydes*. Palmarium Academic Publishing, Saarbrücken, 2012. 240 p.
312. Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* 2004. 32, P. 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.02.004>
313. Tak T., Tesselaar K., Pillay J., Borghans J.A.M., Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol.* 2013. 94, P. 595–601. <https://doi.org/10.1189/jlb.1112571>
314. Morgan R.K., Costello R.W., Durcan N., Kingham P.J., Gleich G.J., McLean W.G., Walsh M.-T. Diverse effects of eosinophil cationic granule proteins on IMR-32

- nerve cell signaling and survival. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005. 33, P. 169–177. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0056OC>
315. Mercier F.E., Ragu C., Scadden D.T. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011. 12, P. 49–60. <https://doi.org/10.1038/nri3132>
316. Grassinger J., Haylock D.N., Williams B., Olsen G.H., Nilsson S.K. Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biologic potential. *Blood.* 2010. 116, P. 3185–3196. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-260703>
317. Calabrese E.J., Baldwin L.A. Inorganics and Hormesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 2003. 33, P. 215–304. <https://doi.org/10.1080/713611040>
318. Gürler M., Martz W., Taştekin B., Najafova T., Dettmeyer R.B. Estimates of Non-Alcoholic Food-Derived Ethanol and Methanol Exposure in Humans. *J. Anal. Toxicol.* 2022. 46, P. 200–211. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa198>
319. Alsayed A.R., Hasoun L.Z., Khader H.A., Basheti I.A., Permana A.D. Bovine Colostrum Treatment of Specific Cancer Types: Current Evidence and Future Opportunities. *Molecules.* 2022. 27, P. 8641. <https://doi.org/10.3390/molecules27248641>
320. Klimova E.M., Bozhkov A.I., Lavinska O.V., Drozdova L.A., Kurhuzova N.I. Low molecular weight cytotoxic components (DAMPs) form the post-COVID-19 syndrome. *Immunobiology.* 2023. 228, P. 152316. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152316>
321. Klimova E.M., Bozhkov A.I., Boyko V.V., Drozdova L.A., Lavinskaya E.V., Skok M.V. Endogenic cytotoxic factors and formation of the clinic forms of myasthenia. *Transl. Biomed.* 2016. 7, P. 1–13. <https://doi.org/10.21767/2172-0479.100084>
322. Bozhkov A.I., Sidorov V.I., Kurguzova N.I., Dlubovskaia V.L. [Metabolic memory enhances hormesis effect to the copper ions in age-depended manner]. *Adv. Gerontol. Uspekhi Gerontol.* 2014. 27, P. 72–80.
323. Appukutty M., Radhakrishnan A.K., Ramasamy K., Ramasamy R., Abdul Majeed A.B., Noor M.I., Safii N.S., Koon P.B., Chinna K., Haleagrahara N. Colostrum

- supplementation protects against exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle in mice. *BMC Res. Notes*. 2012. 5, P. 649. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-649>
324. Shing C.M., Hunter D.C., Stevenson L.M. Bovine colostrum supplementation and exercise performance: potential mechanisms. *Sports Med. Auckl. NZ*. 2009. 39, P. 1033–1054. <https://doi.org/10.2165/11317860-000000000-00000>
325. Davison G. Bovine colostrum and immune function after exercise. *Med. Sport Sci*. 2012. 59, P. 62–69. <https://doi.org/10.1159/000341966>
326. Jones A.W., March D.S., Curtis F., Bridle C. Bovine colostrum supplementation and upper respiratory symptoms during exercise training: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Sports Sci. Med. Rehabil*. 2016. 8, P. 21. <https://doi.org/10.1186/s13102-016-0047-8>
327. Hałas M., Maciejewska D., Baśkiewicz-Hałas M., Machaliński B., Safranow K., Stachowska E. Oral Supplementation with Bovine Colostrum Decreases Intestinal Permeability and Stool Concentrations of Zonulin in Athletes. *Nutrients*. 2017. 9, P. 370. <https://doi.org/10.3390/nu9040370>
328. Sty A.C.F., Sangild P.T., Skovgaard K., Thymann T., Bjerre M., Chatterton D.E.W., Purup S., Boye M., Heegaard P.M.H. Spray Dried, Pasteurised Bovine Colostrum Protects Against Gut Dysfunction and Inflammation in Preterm Pigs. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2016. 63, P. 280–287. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001056>
329. Wang W., Uzzau S., Goldblum S.E., Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J. Cell Sci*. 2000. 113 Pt 24, P. 4435–4440. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4435>
330. Thiel A., Glávits R., Murbach T.S., Endres J.R., Reddeman R., Hirka G., Vértesi A., Béres E., Szakonyiné I.P. Toxicological evaluations of colostrum ultrafiltrate. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 2019. 104, P. 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.017>
331. Davis P.F., Greenhill N.S., Rowan A.M., Schollum L.M. The safety of New Zealand bovine colostrum: nutritional and physiological evaluation in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc*. 2007. 45, P. 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.034>

332. Mantegazza C., Molinari P., D'Auria E., Sonnino M., Morelli L., Zuccotti G.V. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacol. Res.* 2018. 128, P. 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.001>
333. Krause R., Krejs G.J., Wenisch C., Reisinger E.C. Elevated Fecal Candida Counts in Patients with Antibiotic-Associated Diarrhea: Role of Soluble Fecal Substances. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003. 10, P. 167–168. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.1.167-168.2003>
334. Heine R.G. Allergic gastrointestinal motility disorders in infancy and early childhood. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 2008. 19, P. 383–391. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2008.00785.x>
335. Albanis E., Friedman S.L. HEPATIC FIBROSIS: Pathogenesis and Principles of Therapy. *Clin. Liver Dis.* 2001. 5, P. 315–334. [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(05\)70168-9](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(05)70168-9)
336. Schreuder T.C., Verwer B.J., Nieuwkerk C.M. van, Mulder C.J. Nonalcoholic fatty liver disease: An overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J. Gastroenterol.* 2008. 14, P. 2474–2486. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2474>
337. Bozhkov A.I., Akzhyhitov R.A., Bilovetska S.G., Ivanov E.G., Dobrianska N.I., Bondar A.Y. The Effect of Retinol Acetate on Liver Fibrosis Depends on the Temporal Features of the Development of Pathology. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2024. 14, P. 101338. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2023.101338>
338. Tapper E.B., Parikh N.D. Mortality due to cirrhosis and liver cancer in the United States, 1999–2016: observational study. *BMJ.* 2018. 362, k2817. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2817>
339. Paik J.M., Golabi P., Biswas R., Alqahtani S., Venkatesan C., Younossi Z.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Alcoholic Liver Disease are Major Drivers of Liver Mortality in the United States. *Hepatol. Commun.* 2020. 4, P. 890. <https://doi.org/10.1002/hep4.1510>

340. Gu X., Manautou J.E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev. Mol. Med.* 2012. 14, e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
341. Polis S., Fernandez R. Impact of physical and psychological factors on health-related quality of life in adult patients with liver cirrhosis: a systematic review protocol. *JBI Evid. Synth.* 2015. 13, P. 39. <https://doi.org/10.11124/jbisrir-2015-1987>
342. Gruppuso P.A., Sanders J.A. Regulation of liver development: implications for liver biology across the lifespan. *J. Mol. Endocrinol.* 2016. 56, P. R115–R125. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0313>
343. Woolbright B.L., Jaeschke H. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity. *Curr. Pharmacol. Rep.* 2018. 4, P. 346–357. <https://doi.org/10.1007/s40495-018-0147-0>
344. Mandrekar P., Ambade A. Immunity and inflammatory signaling in alcoholic liver disease. *Hepatol. Int.* 2014. 8, P. 439–446. <https://doi.org/10.1007/s12072-014-9518-8>
345. Fausto N. Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* 2004. 39, P. 1477–1487. <https://doi.org/10.1002/hep.20214>
346. Iwakiri Y., Shah V., Rockey D.C. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis – Current status and future directions. *J. Hepatol.* 2014. 61, P. 912–924. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.047>
347. Pacifici R.E., Davies K.J.A. Protein, Lipid and DNA Repair Systems in Oxidative Stress: The Free-Radical Theory of Aging Revisited. *Gerontology.* 2009. 37, P. 166–180. <https://doi.org/10.1159/000213257>
348. Acharya P., Chouhan K., Weiskirchen S., Weiskirchen R. Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis. *Front. Pharmacol.* 2021. 12, e671640. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.671640>
349. Gole L., Liu F., Ong K.H., Li L., Han H., Young D., Marini G.P.L., Wee A., Zhao J., Rao H., Yu W., Wei L. Quantitative image-based collagen structural features predict the reversibility of hepatitis C virus-induced liver fibrosis post antiviral therapies. *Sci. Rep.* 2023. 13, P. 6384. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33567-4>

350. Pellicoro A., Ramachandran P., Iredale J.P. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012. 5, S26. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S26>
351. Sun, M., Kisseleva, T. Reversibility of liver fibrosis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol*. 2015. 39. P. S60–S63. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.015>
352. Dufour, J.-F., DeLellis, R., Kaplan, M.M. Reversibility of Hepatic Fibrosis in Autoimmune Hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1997. 127. P. 981–985. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-127-11-199712010-00006>
353. Muretto, P., Angelucci, E., Lucarelli, G. Reversibility of Cirrhosis in Patients Cured of Thalassemia by Bone Marrow Transplantation. *Ann. Intern. Med.* 2002. 136. P. 667–672. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-136-9-200205070-00009>
354. Bozhkov, A.I., Nikitchenko, Y.V., Sheremet, A.A., Bozhkov, A.A. The prooxidant-antioxidant system is the primary stage of the answer of organism on unbalanced diet. *J. Harmon. Res. Pharm.* 2014. 3. P. 78.
355. Zheng, W.V., Li, Y., Cheng, X., Xu, Y., Zhou, T., Li, D., Xiong, Y., Wang, S., Chen, Z. Uridine alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by regulating the activity of liver-related cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2022. 26. P. 840–854. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17131>
356. Sayed, E.A., Badr, G., Hassan, K.A.-H., Waly, H., Ozdemir, B., Mahmoud, M.H., Alamery, S. Induction of liver fibrosis by CCl₄ mediates pathological alterations in the spleen and lymph nodes: The potential therapeutic role of propolis. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. 28. P. 1272–1282. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.068>
357. Beinert, H., Kennedy, M.C., Stout, C.D. Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* 1996. 96. P. 2335–2374. <https://doi.org/10.1021/cr950040z>
358. Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 2007. 43. P. 477–503. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034>
359. Ruiz, L.M., Libedinsky, A., Elorza, A.A. Role of Copper on Mitochondrial Function and Metabolism. *Front. Mol. Biosci.* 2021. 8. P. 711227. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.711227>

360. Badiye, A., Kapoor, N., Khajuria, H. Copper Toxicity: A Comprehensive Study. *J. Drug Deliv. Ther.* 2013. 2. P. 58–67.
361. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015. 6. P. 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
362. Davydov, V.V., Bozhkov, A.I. Carbonyl stress is a nonspecific factor of pathogenesis. *J. Natl. Acad. Med. Sci. Ukr.* 2014. 20(1). P. 25–34.
363. Maródi, L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin. Immunol. Orlando Fla.* 2006. 118. P. 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.10.012>
364. Firth, M.A., Shewen, P.E., Hodgins, D.C. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim. Health Res. Rev.* 2005. 6. P. 143–158. <https://doi.org/10.1079/ahr2005107>
365. Crispe, I.N. Liver antigen-presenting cells. *J. Hepatol.* 2011. 54. P. 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.005>
366. 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. Ontogenetic Approach to the Study of Mechanisms of Copper-Induced Liver Fibrosis. *Adv. Aging Res.* 2017. 6. P. 39–54. <https://doi.org/10.4236/aar.2017.63005>
367. Liu, X., Xu, J., Brenner, D.A., Kisseleva, T. Reversibility of Liver Fibrosis and Inactivation of Fibrogenic Myofibroblasts. *Curr. Pathobiol. Rep.* 2013. 1. P. 209–214. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0018-7>
368. Czaja, A.J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2014. 20. P. 2515–2532. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2515>
369. Van Lint, P., Libert, C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2007. 82. P. 1375–1381. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607338>
370. Consolo, M., Amoroso, A., Spandidos, D.A., Mazzarino, M.C. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in

- chronic liver disease (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2009. 24. P. 143–152. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000217
371. Knapinska, A., Fields, G.B. Chemical biology for understanding matrix metalloproteinase function. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 2012. 13. P. 2002–2020. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200298>
372. Bozhkov, A.I., Klimova, E.M., Nikitchenko, Y.V., Davydov, V.V., Zvyagintseva, O.V., Kurguzova, N.I., Sidorov, V.I., Naglov, A.V. Stem Cells Take Part in Regulation of Prooxidant Activity and Immunity at Liver Fibrosis. *Am. J. Biomed. Life Sci.* 2014. 2. P. 5–12. <https://doi.org/10.11648/j.ajbls.s.2014020601.12>
373. Zhu, Y., Huang, W.E., Yang, Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Infect. Drug Resist.* 2022. 15. P. 735–746. <https://doi.org/10.2147/IDR.S345574>
374. Durand, G.A., Raoult, D., Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2019. 53. P. 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
375. Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E., Ziemert, N. Antibiotic drug discovery. *Microb. Biotechnol.* 2016. 9. P. 541–548. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12388>
376. Årdal, C., Balasegaram, M., Laxminarayan, R., McAdams, D., Outtersen, K., Rex, J.H., Sumpradit, N. Antibiotic development - economic, regulatory and societal challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. 18. P. 267–274. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>
377. Godoy-Gallardo, M., Eckhard, U., Delgado, L.M., de Roo Puente, Y.J.D., Hoyos-Nogués, M., Gil, F.J., Perez, R.A. Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioact. Mater.* 2021. 6. P. 4470–4490. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033>
378. Wyszogrodzka, G., Marszałek, B., Gil, B., Dorożyński, P. Metal-organic frameworks: mechanisms of antibacterial action and potential applications. *Drug Discov. Today.* 2016. 21. P. 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.009>
379. Mittapally, S., Taranum, R., Parveen, S. Metal ions as antibacterial agents. *J. Drug Deliv. Ther.* 2018. 8. P. 411–419. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i6-s.2063>

380. Mendes, C.R., Dilarri, G., Forsan, C.F., Sapata, V. de M.R., Lopes, P.R.M., de Moraes, P.B., Montagnolli, R.N., Ferreira, H., Bidoia, E.D. Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Sci. Rep.* 2022. 12. P. 2658. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06657-y>
381. Kędziora, A., Speruda, M., Krzyżewska, E., Rybka, J., Łukowiak, A., Bugla-Płoskońska, G. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. 19. P. 444. <https://doi.org/10.3390/ijms19020444>
382. Chatterjee, A.K., Chakraborty, R., Basu, T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology.* 2014. 25. P. 135101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/13/135101>
383. Calder, P.C. Feeding the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 2013. 72. P. 299–309. <https://doi.org/10.1017/S0029665113001286>
384. Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C., Roudot-Thoraval, F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J. Hepatol.* 2013. 58. P. 593–608. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>
385. García-Niño, W.R., Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem. Toxicol.* 2014. 69. P. 182–201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.016>
386. Pittman, K., Kubes, P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J. Innate Immun.* 2013. 5. P. 315–323. <https://doi.org/10.1159/000347132>
387. Gansner, J., Berliner, N. Disorders of Phagocytic Function: Diagnosis and Treatment. In: *Nonmalignant Hematology: Expert Clinical Review: Questions and Answers.* 2016. P. 585–594. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30352-9_50
388. Harbort, C.J., Soeiro-Pereira, P.V., von Bernuth, H., Kaindl, A.M., Costa-Carvalho, B.T., Condino-Neto, A., Reichenbach, J., Roesler, J., Zychlinsky, A., Amulic, B. Neutrophil oxidative burst activates ATM to regulate cytokine production and apoptosis. *Blood.* 2015. 126. P. 2842–2851. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-645424>

389. 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. Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2023. 13. P. 48–63. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006>
390. Ivanov, I., Kozheshkurt, V., Bozhkov, A., Goltvjansky, A., Katrich, V., Sidorov, V., Gromovoy, T. Low-molecular components of colostrum as a regulator of the organism redox-system and biological antidote. *EUREKA Life Sci.* 2021. P. 56–64. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001738>
391. Leszek, J., Inglot, A.D., Janusz, M., Byczkiewicz, F., Kiejna, A., Georgiades, J., Lisowski, J. Colostrinin proline-rich polypeptide complex from ovine colostrum--a long-term study of its efficacy in Alzheimer's disease. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2002. 8. P. PI93-96.
392. Bozhkov, A., Ivanov, I., Klimova, E., Kurguzova, N., Bozhkov, A., Goltvyanskiy, A., Nikitchenko, Y. "Mix-Factor" is involved in the regulation of the organism's redox systems in the late stages of ontogenesis and affects the lifespan of animals. *Ageing Longev.* 2021. 2. P. 24–36. <https://doi.org/10.47855/jal9020-2021-2-4>
393. Pei, J., Pan, X., Wei, G., Hua, Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Front. Pharmacol.* 2023. 14. P. 1147414. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1147414>
394. Anisimov, V.N. Means for the prevention of premature aging (geroprotectors). *Adv. Gerontol.* 2000. 4. P. 275–277.
395. Jones, D.P. Redox theory of aging. *Redox Biol.* 2015. 5. P. 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.03.004>
396. Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S.J., Fabbri, E., Navas, P., Ferrucci, L. Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging. *J. Gerontol. Ser. A.* 2015. 70. P. 1334–1342. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv070>
397. Sohal, R.S. The free radical hypothesis of aging: An appraisal of the current status. *Aging Clin. Exp. Res.* 1993. 5. P. 3–17. <https://doi.org/10.1007/BF03324120>

398. Ziegler, D.V., Wiley, C.D., Velarde, M.C. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell*. 2015. 14. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1111/accel.12287>
399. Mittler, R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci*. 2017. 22. P. 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
400. Vilhardt, F., Haslund-Vinding, J., Jaquet, V., McBean, G. Microglia antioxidant systems and redox signalling. *Br. J. Pharmacol*. 2017. 174. P. 1719–1732.
<https://doi.org/10.1111/bph.13426>
401. Zhang, H., Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci*. 2016. 8. P. 33–42.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
402. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2015.
403. Winterbourn, C.C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic. Biol. Med.* 2015. 80. P. 164–170.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.017>
404. Maiorino, M., Bosello-Travain, V., Cozza, G., Miotto, G., Roveri, A., Toppo, S., Zaccarin, M., Ursini, F. Understanding mammalian glutathione peroxidase 7 in the light of its homologs. *Free Radic. Biol. Med.* 2015. 83. P. 352–360.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.017>
405. Kostiuk, V.A., Potapovich, A.I., Kovaleva, Z.V. [A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation]. *Vopr. Med. Khim.* 1990. 36. P. 88–91.
406. Gramse, G., Dols-Perez, A., Edwards, M.A., Fumagalli, L., Gomila, G. Nanoscale Measurement of the Dielectric Constant of Supported Lipid Bilayers in Aqueous Solutions with Electrostatic Force Microscopy. *Biophys. J.* 2013. 104. P. 1257–1262.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.011>
407. Sánchez-González, D.J., Sosa-Luna, C.A., Vásquez-Moctezuma, I. [Transfer factors in medical therapy]. *Med. Clin. (Barc.)*. 2011. 137. P. 273–277.
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.05.002>

408. Bezkorovainy, A. Human Milk and Colostrum Proteins: A Review. *J. Dairy Sci.* 1977. 60. P. 1023–1037. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83984-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83984-2)
409. Grigalevičiūtė, R., Matusevičius, P., Plančiūnienė, R., et al. Understanding the Immunomodulatory Effects of Bovine Colostrum: Insights into IL-6/IL-10 Axis-Mediated Inflammatory Control. *Vet. Sci.* 2023. 10. P. 519. <https://doi.org/10.3390/vetsci10080519>
410. Boyko, T.V., Chaunina, E.A., Buzmakova, N.A., Zharikova, E.A. Biologically active additives for cows as a factor in the production of environmentally friendly products in animal husbandry. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2021. 624. P. 012063. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/624/1/012063>
411. Poonia, A. Bioactive compounds, nutritional profile and health benefits of colostrum: a review. *Food Prod. Process. Nutr.* 2022. 4. <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00104-1>
412. Huppertz, T. Chemistry of the Caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry*. 2013. P. 135–160. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_4
413. Runthala, A., Mbye, M., Ayyash, M., Xu, Y., Kamal-Eldin, A. Caseins: Versatility of Their Micellar Organization in Relation to the Functional and Nutritional Properties of Milk. *Molecules*. 2023. 28. P. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28052023>
414. Mikheeva, L., Grinberg, N., Grinberg, V., Khokhlov, A., De Kruif, C.G. Thermodynamics of Micellization of Bovine β -Casein Studied by High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Langmuir*. 2003. 19. <https://doi.org/10.1021/la026702e>
415. Sadiq, U., Gill, H., Chandrapala, J. Casein Micelles as an Emerging Delivery System for Bioactive Food Components. *Foods*. 2021. 10. P. 1965. <https://doi.org/10.3390/foods10081965>
416. Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2019. <https://ijpsr.com/bft-article/biological-activities-of-flavonoids-an-overview/>
417. Seyed Hameed, A.S., Rawat, P.S., Meng, X., Liu, W. Biotransformation of dietary phytoestrogens by gut microbes: A review on bidirectional interaction between

- phytoestrogen metabolism and gut microbiota. *Biotechnol. Adv.* 2020. 43. P. 107576. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107576>
418. Delgado, A.M., Issaoui, M., Chammem, N. Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. *J. AOAC Int.* 2019. 102. P. 1356–1364. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1356>
419. Zeb, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J. Food Biochem.* 2020. 44. P. e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>
420. Oršolić, N., Jazvinščak Jembrek, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Propolis and Its Polyphenolic Compounds against Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23. P. 10479. <https://doi.org/10.3390/ijms231810479>
421. Jantan, I., Haque, Md.A., Arshad, L., Harikrishnan, H., Septama, A.W., Mohamed-Hussein, Z.-A. Dietary polyphenols suppress chronic inflammation by modulation of multiple inflammation-associated cell signaling pathways. *J. Nutr. Biochem.* 2021. 93. P. 108634. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108634>
422. Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* 2013. 51. P. 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
423. Graf, B.A., Milbury, P.E., Blumberg, J.B. Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *J. Med. Food.* 2005. 8. P. 281–290. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.281>
424. Utrera, M., Estévez, M. Impact of trolox, quercetin, genistein and gallic acid on the oxidative damage to myofibrillar proteins: The carbonylation pathway. *Food Chem.* 2013. 141. P. 4000–4009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.107>
425. Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2012. 52. P. 213–248. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499808>
426. Maqsood, S., Benjakul, S., Shahidi, F. Emerging Role of Phenolic Compounds as Natural Food Additives in Fish and Fish Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013. 53. P. 162–179. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.518775>

427. Cao, Y., Xiong, Y.L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein. *Food Chem.* 2015. 180. P. 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.036>
428. Wang, X., Zhang, J., Lei, F., Liang, C., Yuan, F., Gao, Y. Covalent complexation and functional evaluation of (–)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin. *Food Chem.* 2014. 150. P. 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.127>
429. Cao, Y., Xiong, Y.L. Interaction of Whey Proteins with Phenolic Derivatives Under Neutral and Acidic pH Conditions. *J. Food Sci.* 2017. 82. P. 409–419. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13607>
430. Labuckas, D.O., Maestri, D.M., Perelló, M., Martínez, M.L., Lamarque, A.L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem.* 2008. 107. P. 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.051>
431. Balange, A., Benjakul, S. Enhancement of gel strength of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi using oxidised phenolic compounds. *Food Chem.* 2009. 113. P. 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.039>
432. Jia, Z., Zheng, M., Tao, F., Chen, W., Huang, G., Jiang, J. Effect of covalent modification by (–)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *LWT - Food Sci. Technol.* 2016. 66. P. 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.054>
433. Nwafor, E.-O., Lu, P., Zhang, Y., Liu, R., Peng, H., Xing, B., Liu, Y., Li, Z., Zhang, K., Zhang, Y., Liu, Z. Chlorogenic acid: Potential source of natural drugs for the therapeutics of fibrosis and cancer. *Transl. Oncol.* 2022. 15. P. 101294. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101294>
434. Miao, M., Xiang, L. Chapter Three - Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. In: Du, G. (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press, 2020. P. 71–88. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.002>
435. Zhang, W., Liu, X., Piao, L. Chlorogenic acid-enriched extract of *Ilex kudingcha* tea inhibits neutrophil recruitment in injured zebrafish by promoting reverse migration

via the focal adhesion pathway. *J. Food Biochem.* 2020. 44. P. e13279.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13279>

436. Bozhkov, A., Ionov, I., Kurhuzova, N., Novikova, A., Katerynych, O., Akzhyhitov, R. Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver. *Clin. Nutr. Open Sci.* 2022. 41. P. 82–97.
<https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.12.003>