

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»



ІВАНОВ ЄВГЕН ГЕННАДІЙОВИЧ

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

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

03.00.20 – Біотехнологія

РЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ 2025

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна

Офіційні опоненти:

Доктор біологічних наук, професор

ДУГАН Олексій Мартем'янович

Професор кафедри промислової біотехнології та біофармації КПІ ім. Ігоря Сікорського, м. Київ

Доктор технічних наук, професор

КАПРЕЛЬЯНЦ Леонід Вікторович

Професор кафедри харчової хімії, експертизи та біотехнологій Одеського національного технологічного університету, м. Одеса

Доктор біологічних наук, професор

ШВЕЦЬ Володимир Миколайович

Професор кафедри біологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, м. Запоріжжя

Захист відбудеться 7 травня 2025 р. о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 в Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою 03056, м. Київ, просп. Берестейський, 37, корп. 1, ауд. 05.

Захист транслюватиметься на YouTube-каналі Вченої ради

КПІ ім. Ігоря Сікорського:

<https://www.youtube.com/@vchenaradakpi/streams>

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», за адресою: 03056, м. Київ, проспект Берестейський, 37, та на сайті Вченої ради Університету за адресою: <https://rada.kpi.ua>.

Про дату та місце захисту громадськість проінформовано

«__» _____ 20__ р.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради,

д.т.н., доцент



Наталія ГОЛУБ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Збереження якості життя та реалізація природного, видового потенціалу тривалості життя є важливою соціальною проблемою. Попри значущість та інтенсивний розвиток 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. Водночас 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 (Fischer-Tlustos A.J. et al. 2021, Hurley W.L. et al. 2011, Polidori P et al., 2022)], 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 (Hardy G., 2000, Mehra R. et al., 2021), 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 (Mehra R. et al., 2021, Mehra R et al., 2021, McGrath B.A., 2016), а усунути їх неможливо, що ускладнює процеси стандартизації та сертифікації одержуваних продуктів і субстанцій із молозива.

Мета та завдання дослідження

Мета роботи – розроблення 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 як субстанції для стабілізації та доставки біологічно активних сполук в організм.

Досягнення поставленої мети передбачає виконання таких завдань:

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 моделлю 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.

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 конфокальна мікроскопія), біотехнологічні методи (виділення та культивування лейкоцитів та клітин кісткового мозку, фракціонування молозива, ліофілізація та інші), біохімічні (спектрофотометричні методи, аналіз активності ферментів, характеристика редокс-системи), аналітичні (мас-спектрометричні МАЛДІ-ТОФ), фізико-хімічні (отримання та характеристика наноструктурних комплексів) та методи статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше 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 тіла) 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 Си-індукованого фіброзу печінки, запропоновано механізм стадійного розвитку Си-індукованого фіброзу печінки та обґрунтовано можливість його використання при розробці засобів і способів корекції таких функціональних станів.

Уперше 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* як біоіндикацію, при стандартизації рідких полікомпонентних біологічних субстанцій.

Уперше показано можливість "включення" поліфенольних сполук до складу казеїнових міцел, що супроводжується змінами протеїнової частини таких міцел. Запропоновано й рекомендовано 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.

Особистий внесок здобувача. 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.

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.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на міжнародних та вітчизняних 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У вступі обґрунтовано наведені відомості про унікальність складу молозива та коротко розглянуто роль молозива в еволюції ссавців. Досить докладно розглянуто склад коров'ячого молозива, зокрема характеристики клітин, наявних у молозиві, характеристику білкового, ліпідного та вуглеводного складу, а також гормонів, цитокінів, чинників росту й екзосом та інших компонентів. Особливу увагу приділено варіабельності складу компонентів молозива і показано, що вона зумовлена особливостями "взаємодії" широкого кола ендогенних та екзогенних чинників.

Така природна варіабельність складу молозива є основною перешкодою у використанні молозива та його компонентів у сучасній фармацевтичній та біологічній технологіях, тому що не задовольняють наявним методам стандартизації та отримання стабільних продуктів.

Обґрунтовано роль молозива у формуванні термогенезу та епігенетичних характеристик, які можуть зберігатися протягом усього онтогенезу.

Схарактеризовані наслідки відмови від грудного вигодовування на формування онтогенетичних характеристик організму. В огляді сучасних даних наведено нечисленні відомості про використання молозива та його компонентів у медичній практиці та аналіз наявних обмежень щодо його застосування. Установлено, що розроблення методів, спрямованих на зменшення варіабельності складу молозива та/або його компонентів, і розроблення нових методів оцінювання не окремих речовин, а інтегративних характеристик, що можуть відображати баланс між його компонентами, та додатковими дослідженнями механізмів їхньої дії на організми, які перебувають у різних функціональних станах, зокрема й патологічних, дадуть змогу значно розширити наші знання щодо дії багатокомпонентних природних сполук на організм та використовувати ті знання на практиці.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження були проведені на самцях щурів лінії *Wistar*: молодих – 3 місяців і старих – 20 місяців, а в спеціальних експериментах із дослідження "Мікс-фактору" використовували дуже старих щурів – 22 і 33 місяці. 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 біотичними комітетом Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Дослідження на клітинному рівні проводили на первинних культурах клітин кісткового мозку щурів. Під час розроблення методів біотестування компонентів молозива використовували культури мікроводоростей *Dunaliella viridis*. Антибактеріальну активність оцінювали за стандартними мікробіологічними методами на культурах *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (Bozkov A.I. та ін., 2024).

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 й другого надоїв. Після отримання молозиво охолоджували та доставляли в лабораторію, де воно охолоджувалося до -15°C та зберігалася не більше місяця. Перед дослідженням молозиво розморожували впродовж 12 годин при кімнатній температурі, після цього його розділяли фракціонуванням на ліпідну фракцію, що за потреби зберігалася за температури $+15^{\circ}\text{C}$, фракцію казеїну, що висушували та зберігали за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Фракцію низькомолекулярних компонентів та "ультрафільтрату", які висушували в ротаційному випаровувачі, так само зберігали в сухому вигляді. Перед використанням готували водні розчини відповідних субстанцій молозива. Дотримуючись технічних умов (www.miks.org/engine.com/engine.ua) одержували "Мікс-фактор" з клітинних культур *Sacharomyces cerevisiae* та *Pleurotus ostreatus*, який є низькомолекулярними компонентами екзометаболітів цих культур та використовувався як аналог низькомолекулярних компонентів молозива під час

перевірки гіпотези щодо неспецифічної дії низькомолекулярних компонентів із різних біологічних джерел. Поліфенольні сполуки виділено зі шроту соняшникового, який розроблено у нашій лабораторії (Bozhkov et al., 2024).

У роботі використано фізіологічні методи дослідження: визначення динаміки маси тіла, температури тіла, здатності тварин виконувати роботу в тестах плавання з вантажем і час бігу в тредбані; аналіз поведінки тварин; спостереження динаміки маси внутрішніх організмів і деяких їхніх анатомічних особливостей (наявність сполучнотканинних спайок). Гістологічні зміни в тканині печінки. Під час аналізу складу білків молозива та його фракцій застосовано метод мас-спектроскопії, а під час визначення кількості кальцію та ROS у клітинах кісткового мозку – конфокальну мікроскопію (мікроскоп конфокальний Olympus FV10i). Аналіз кількості іонів міді в досліджуваних зразках проведено за допомогою атомно-абсорбційної спектрометрії з електротермічною атомізацією на спектрофотометрі КАС-120 типу С-115-МІ.

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

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

У першому розділі схарактеризовано виражену варіабельність білкового складу молозива, отриманого в різних корів однієї породи, одного віку в один сезон після першого надою (рис. 1).

Проведено аналіз екзогенних та ендогенних чинників, які лежать в основі біологічної варіабельності компонентів молозива та інших продуктів біотехнологічного походження, і зазначено, що під час аналізу біологічних засад варіабельності складу молозива необхідно враховувати те, що всі біологічні системи є відкритими, тобто вони безперервно перебудовують свій метаболізм відповідно до умов зовнішнього середовища, що постійно змінюються, і цю їхню фундаментальну властивість визначено 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. Водночас варіабельність біологічної продукції, зокрема й молозива, змінюється по-різному, залежно від характеристик та особливостей зміни чинників середовища й індивідуальних особливостей реакцій на ці чинники середовища, через унікальність генетичної системи кожного організму.

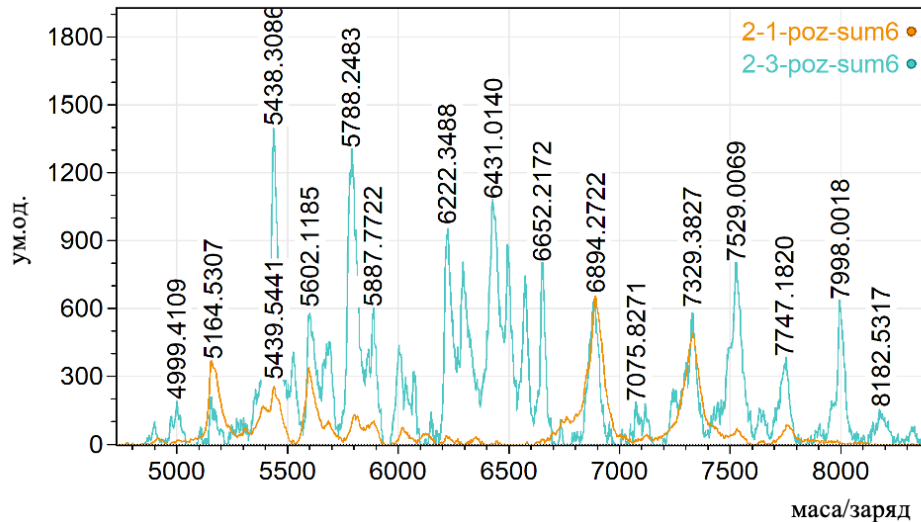


Рис. 1. Склад білків фракції "ультрафільтрату", за поділу методом мас-спектроскопії, отриманих від двох різних корів після першого надою однієї породи з схожими характеристиками, які показані різними кольорами.

Відповідно все різноманіття чинників зовнішнього середовища, що індукують будь-яку адаптивну відповідь організму, зокрема й молозива, можуть бути кваліфіковані за природою свого походження на глобальні та локальні, а за характером адаптивної відповіді організму на рівні метаболізму – на чотири категорії (рис. 2) зокрема, категорія 1 – адаптивно незначущі (функціонально варіабельні), 2 – адаптивно значущі (ті, що формують епігенетичну та метаболічну пам'ять), 3 – хронічні та 4 – летальні (рис. 2).

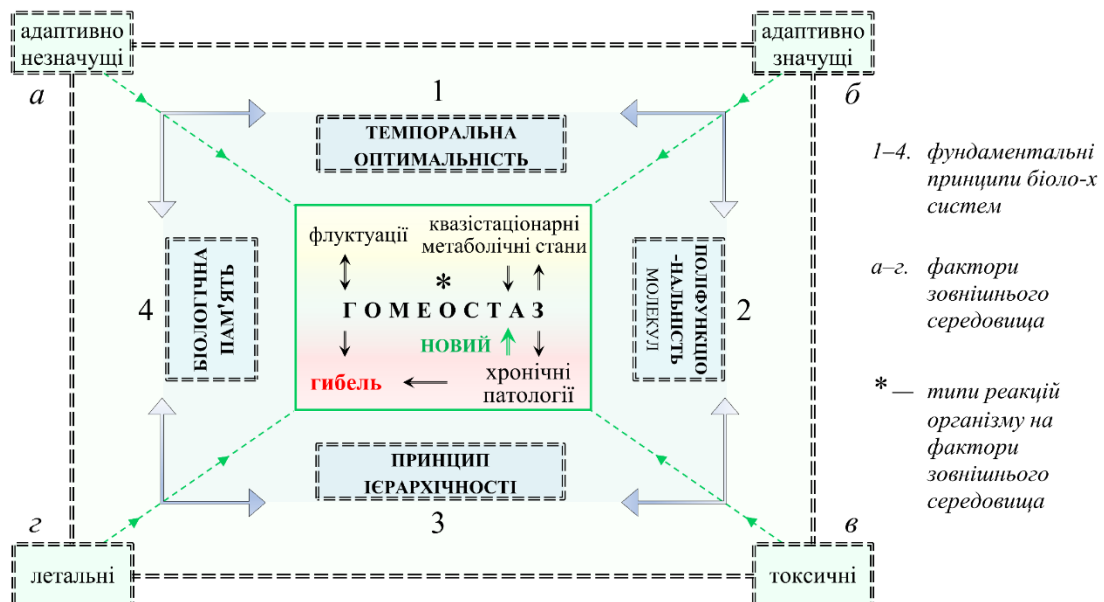


Рис. 2. Схема, що демонструє участь чотирьох базових принципів структурно-функціональної організації біосистем у формуванні єдиної системної відповіді на рівні гомеостазу у відповідь на дію різноманітних факторів зовнішнього середовища.

З огляду на те, що склад молозива природно дуже різноманітний, а відповідь організму залежить як від складу компонентів, що діють на нього, так і від особливостей його гомеостатичних характеристик, обґрунтовано та запропоновано "селективно-інтегративний" підхід зменшення біологічної варіабельності молозива та отримання функціональної відповіді організму.

Для часткового усунення варіабельності складу молозива на першому етапі запропоновано провести добір (селекцію) зразків молозива за основними характеристиками, які впливають на склад молозива: добирається молозиво в продуцентів однієї породи, близького віку, у тварин без патологій, що утримуються в однакових умовах одного господарства, в один і той самий сезон, і тільки після першого або другого надоїв, отримані зразки об'єднуються в єдину серію для подальшої переробки. На другому етапі зразки молозива, що пройшли "селекцію", а їхня кількість має бути щонайменше 10 зразків, однак, чим більша їхня кількість, тим менша очікувана варіабельність отриманих продуктів, об'єднуються ("інтегруються") в єдину серію. Надалі отримані субстанції документують як представники єдиної серії готової продукції.

На наступному етапі зразки єдиної серії поділяють на окремі базові субстанції (ліпіди; казеїн; низькомолекулярні компоненти молозива та "ультрафільтрат"), які можна використовувати в продуктах функціонального харчування та/або як субстанції для отримання фармацевтичних препаратів. Показано, що якщо порівняти вихід казеїну, НКМ фракції з різних зразків молозива за "інтегративного" підходу з "диференціальним" підходом, то можна відмітити, що вихід цих фракцій був більшим на 10 та 12 % відповідно у випадку використання "інтегративного підходу". Отже, "селективно-інтегративний" підхід під час одержання базових компонентів молозива дає змогу зменшити природну варіабельність за складом та збільшити кількісний вихід одержуваних базових субстанцій молозива.

Другий розділ присвячений дослідженню фракції низькомолекулярних компонентів молозива як продуктів функціонального харчування. Виявлено за Cu-індукованого токсикозу гальмування швидкості росту експериментальних тварин і навіть зменшення маси тіла порівняно з контрольними тваринами на 4-6 %, що підтверджує наявність токсикозу у тварин, які отримували сірчаноокислу мідь (рис. 3 А)

Поряд із пригніченням росту маси тіла у тварин із Cu-індукованим токсикозом спостережено і зниження температури тіла (рис. 3 В). Зокрема, 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 В).

Здатність виконувати "роботу" у тесті плавання з грузом у тварин з токсикозом зменшено порівняно з контролем (рис. 3 С).

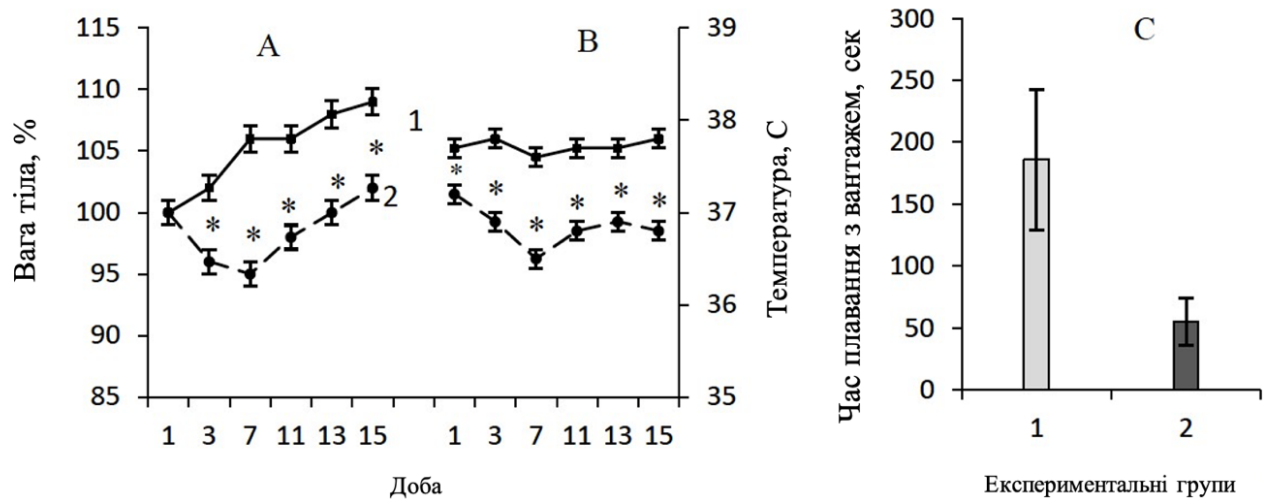


Рис. 3. Зміна маси тіла (А), ректальної температури тіла (В) і час плавання (С) в інтактній (контрольній) групі (1) і в групі тварин після інтоксикації сірчаною кислотою міддю (2). Сірчану кислоту мідь вводили тричі в дозі 1 мг/100г маси з інтервалом 48 годин між введеннями. * – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

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 припиненням росту маси тіла таких тварин.

Виявлено, що активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, які використовують як маркери цитолізу гепатоцитів, не відрізнялися від контрольних значень (рис. 4). Ці результати можуть засвідчувати те, що іони міді за такої схеми введення не спричиняють масового руйнування гепатоцитів.

Кількість холестерину та креатиніну незначною мірою зменшувалася порівняно з контрольними тваринами, а вміст триацилгліцеридів та альбуміну не відрізнялися від контролю (рис. 4).

Водночас активність гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) у тварин із токсикозом була збільшена на 263 % порівняно з контролем (рис. 4).

Вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові таких тварин було збільшено на 37 % (рис. 4). Таке збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій в організмі за інтоксикації, можливо, зумовлене інгібуванням антиоксидантних систем і, зокрема, антиоксидантних ферментів. Установлено, що активність одного з ключових антиоксидантних ферментів – глутатіонпероксидази – була достовірно знижена порівняно з контролем (рис. 4).

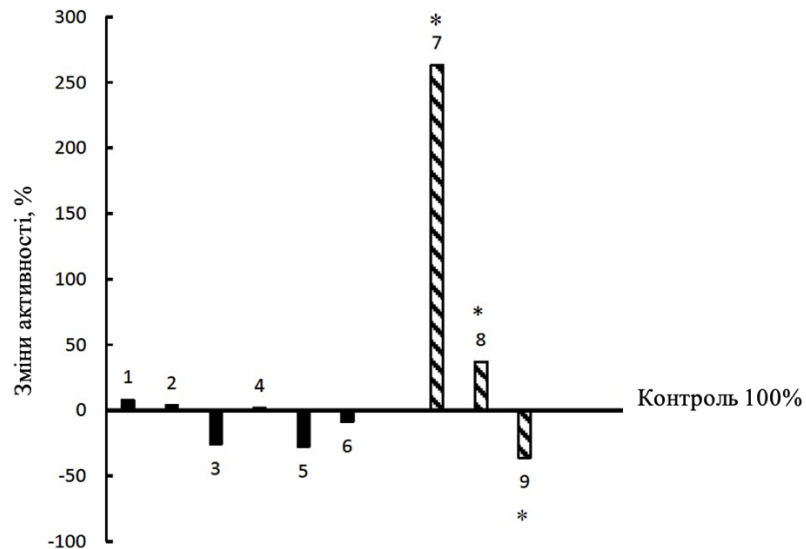


Рис. 4. Активність АЛТ (1), АСТ (2), вміст холестерину (3), триацилгліцериду (4), креатиніну (5), альбуміну (6), активність ГГТ (7), вміст гідропероксиду ліпідів (8) та активність глутатіонпіроксидрази (9) в сироватках крові тварин із Си-індукованим токсикозом по відношенню до контрольного рівня, що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

З'ясовано, що подібні зміни на рівні функціональних характеристик організму та печінки відбуваються під впливом низки чинників: алкоголю, наркотичних засобів, харчових токсинів, лікарських препаратів. Відповідно, Си-індукований токсикоз може розглядатися як типова модель відповідної реакції організму на токсичні сполуки. Виявлено, що вміст гідроперексидів 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. 5).

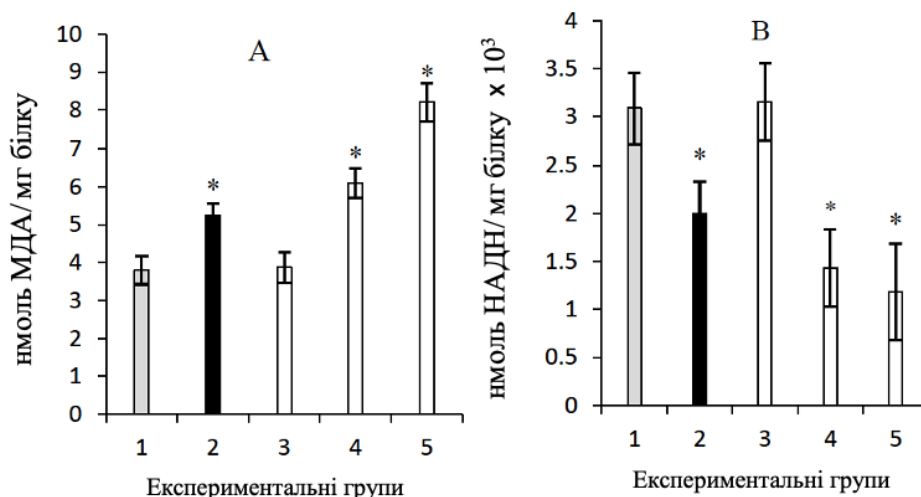


Рис. 5. Кількість гідроперексидів ліпідів (А) та активність глутатіонпіроксидрази (В) у сироватці крові контрольній групі тварин (1), у тварин після інтоксикації сірчаною міддю (2), а також після триразового введення тваринам НКМ на тлі інтоксикації сірчаною міддю в дозі 0,1 мг/100 г (3), у дозі 0,5 мг/100 г (4) та 2,0

мг/100 г (5). У кожній експериментальній групі було по п'ять тварин. Відмічені відмінності між групами достовірні, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Отже, інтоксикація організму сірчаною кислотою супроводжувалася проявом окисного стресу на рівні організму, що проявлялося в інгібуванні активності одного із центральних ферментів антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази) та як наслідок збільшенням гідроперекисів ліпідів. Ці зміни показників редокс-системи корелювали зі зниженням температури тіла та втратою маси тіла. Вияв окисного стресу є загально біологічною, первинною реакцією організму на всі відомі негативні фактори (Bozhkov et al., 2014).

Відстежено, що, якщо експериментальні тварини після інтоксикації щоденно впродовж трьох днів отримували НКМ *per os* у дозі 0,1 г/100 г маси тіла, то кількість гідроперекисів ліпідів не відрізнялася від їхньої кількості в інтактного контролю (рис. 5 А). Активність глутатіонпероксидази також відповідала контрольним значенням (рис. 5 В).

Якщо доза НКМ була збільшена до 0,5 г/100 г, и 2,0 г/100 г, то показники редокс-системи навіть зростали в порівнянні з тваринами, які отримували сірчаною кислотою мідь (рис. 5 А). Водночас зберігався взаємозв'язок між збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів і зниженням активності глутатіонпероксидази (рис. 5 В). Необхідно зазначити, що кількість холестерину, триацилгліцеридів, креатиніну та альбуміну в сироватці крові після введення тваринам з інтоксикацією різних доз НКМ залишилися незмінними порівняно з тваринами, що були після інтоксикації.

Додаткові дослідження дозової залежності НКМ на показники редокс-системи показали, що введення компонентів молозива в малих дозах (0,01 – 0,1 г/100 г маси тіла) проявляє антиоксидантні властивості, а під час збільшення дози до 1 і більше г/100 г проявляє прооксидантні властивості (рис. 6).

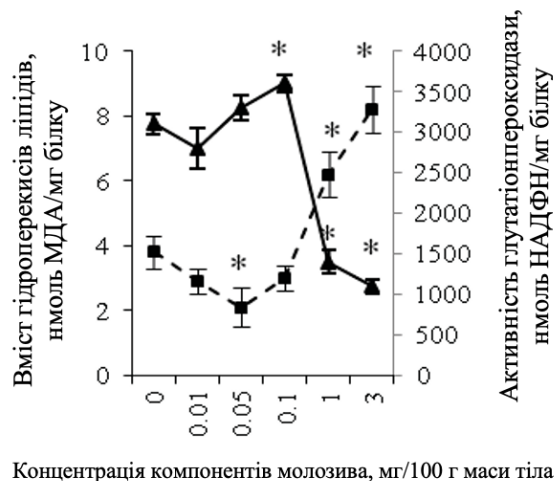


Рис. 6. Вміст гідроперекисів ліпідів (---) та активність глутатіонпероксидази (—) у сироватці крові тварин, контрольної групи (0 мг/100 г), та експериментальних груп тварин, через 24 години після приймання компонентів молозива в різних дозах (0,01, 0,05, 0,1, 1,0 і 3,0 мг/100 г). Наведено середні значення з п'яти експериментів та стандартні помилки, відмінності між варіантами аналізовано з використанням

непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. * – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

З'ясовано, що ці зміни показників редокс-системи добре корелюють зі змінами, маси тіла (рис. 7 А), температури тіла (рис. 7 В) і відновлення працездатності в таких тварин (рис. 7 С).

Отримані результати вказують на те, що НКМ може виконувати функцію антидоту за інтоксикації організму сірчаноокислою міддю, його ефективність залежить від дози, оптимальною є доза 0,01 мг/100 г. З огляду на вплив НКМ на відновлення працездатності та інших фізіологічних характеристик організму може бути рекомендований як продукт функціонального харчування. Це також підтверджують і дані щодо його впливу на функцію кісткового мозку у тварин з інтоксикацією.

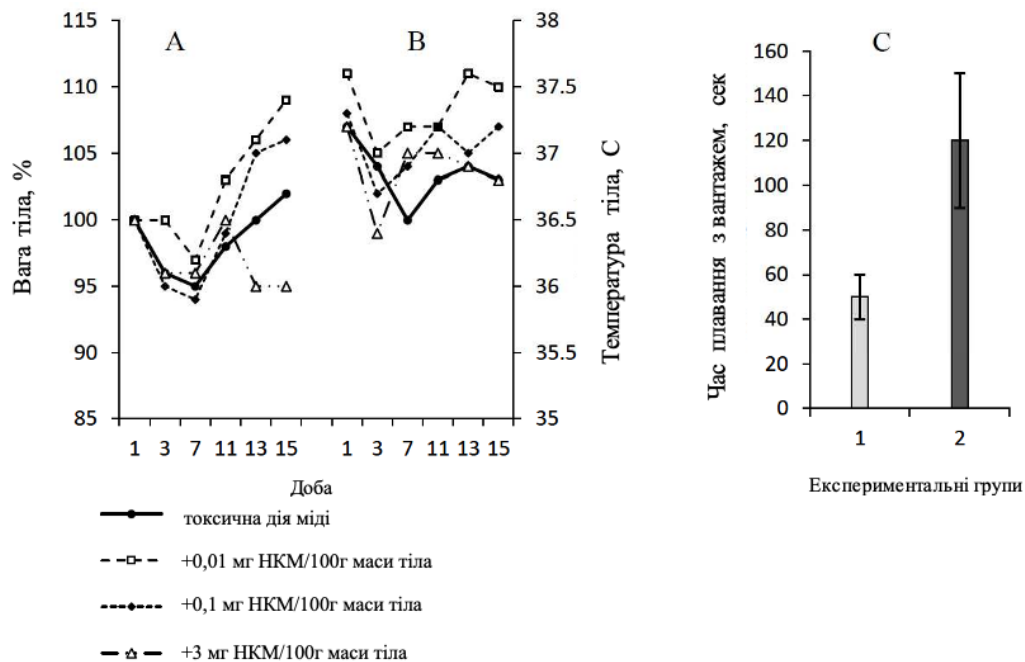


Рис. 7. Маса тіла (А), ректальна температура (В) і час плавання з вантажем (С) тварин із Cu-індукованим токсикозом (1), тварин, що отримували НКМ *per os* після початку інтоксикації в дозі 0,01 мг/100 г маси (2), у дозі 0,1 (3) і дозі 3 мг/100 г (3). * – відмінності між контрольним і дослідними варіантами, для яких $P \leq 0,05$.

У третьому розділі роботи досліджено можливі токсичні дії 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. Водночас цілком очевидно, що будь-які біологічно активні сполуки, які беруть участь у метаболізмі організму, можуть виявляти різні ефекти залежно від дози. Доведено значущість дози НКМ на вияв її прооксидантних, так і антиоксидантних властивостей (рис. 6). Незважаючи на наявні думки про

потенційну нешкідливість молозива та його компонентів, необхідні дослідження різних доз від мінімальної до максимально можливої на нешкідливість для організму.

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 цю дозу було визначено як максимально можливу або супердозу. Якщо порівняти ці дози для людини, то прийом дози НКМ у 5г/100г, відповідає одноразовому прийому дорослою людиною, дорівнює 3,5 кг за умови середньої маси в 70 кг. У кожній експериментальній групі було використано від 10 до 20 тварин.

Оцінено внутрішньо-шлункове введення НКМ, що в діапазоні доз від 0,01 і до 1 г/100 г супроводжувалося проявом тимчасової діареї, а за надвеликої дози – 5 г/100 г - вона виникала майже у 80 % тварин, що спричинило до загибелі деяких тварин, однак в тварин, які переносили такі великі дози НКМ, спостережено збільшення маси тіла, порівняно з контролем, у віддалений період, тобто НКМ виконувала трофічні функції в цих тварин.

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

Четвертий розділ присвячений розробленню експериментальної моделі фіброзу печінки для дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на функції печінки з фіброзом.

З огляду на те, що Си-індукований токсикоз може спричинити різні наслідки, які показані на рис. 2: 1 – незначні функціональні зміни, що можуть бути зворотними; 2 – адаптивно значущі, відносно стійких епігенетичних і метаболічних змін, тобто формування метаболічної пам'яті; 3 – стійкі хронічні зміни, які можуть бути визначені як відомі хронічні патології (наприклад, фібрози); 4 – летальні наслідки. Формування таких варіантів відповіді організму на екзогенні впливи залежать від низки чинників, які можна класифікувати як поєднану (інтегративну) дію екзогенних чинників (час дії, доза, послідовність впливів тощо) та ендогенних характеристик (функціональний стан організму на момент впливів) (Bozhkov et al., 2024). Однією із первинних реакцій біологічної системи на значущі екзогенні впливи є зміни в редокс-системі організму, або зміна балансу в прооксидантно-антиоксидантній системі в бік прооксидантів або окисників (Bozhkov et al., 2014).

Аналіз наявних даних показав, що найчастіше як індуктор фіброзу використовують тетрахлорметан (Sayed et al., 2021; Zheng et al., 2022). Проте це досить високотоксична сполука, що спричиняє розвиток цирозу печінки. 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.

Виявлено, що після триразового введення тваринам тетрахлорметану вміст малонового діальдегіду (МДА) в мітохондріях печінки збільшився на 35 % порівняно з інтактними молодими тваринами (рис. 8 А). Оскільки цей показник може мати вік-залежний характер, було визначено і його кількість у мітохондріях печінки старих тварин. Простежено, що у старих тварин його кількість була на 130 % більшою за їхній контрольний (вихідний) рівень (рис. 8 А). Натомість вихідний рівень вмісту продуктів гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки у старих тварин був меншим порівняно з вихідним рівнем молодих тварин на 39 % (рис. 8 А), а після введення їм тетрахлорметану вміст МДА в мітохондріях печінки був однаковим у молодих і старих щурів (рис. 8 А).

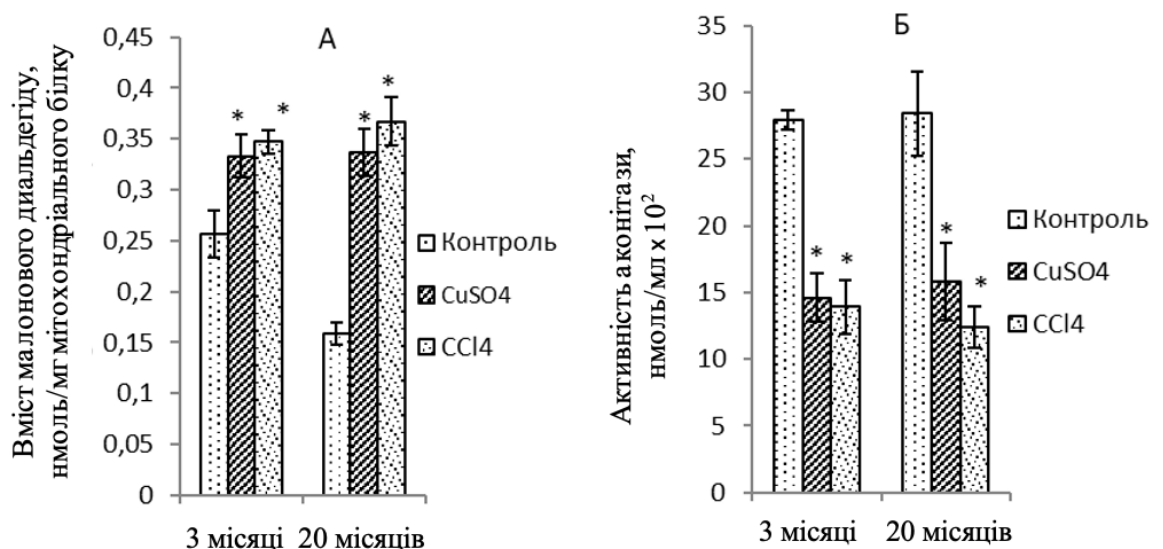


Рис. 8 Вміст малонового діальдегіду в мітохондріях печінки (А) та активність аконітази в мітохондріях печінки (Б) у молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) тварин у трьох експериментальних групах: контрольній; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси з інтервалом 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 вводили 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 подібним (рис. 8 А).

Встановлено, що важливим і досить інформативним показником окисного стресу є активність аконітази, або аконітатгідратази, – фермент (КФ 4.2.1.3), із сімейства гідратаз (клас ліази), який каталізує реакцію ізомеризації цитрату в ізоцитрат за допомогою утворення цис-аконітату в циклі Кребса (Beinert et al, 1996), що інгібується на тлі стресу.

Визначення активності аконітази в мітохондріях печінки молодих тварин після введення їм тетрахлорметану і сірчаноокислої міді спричиняло зниження активності цього ферменту на 50 і 48 % порівняно з контролем відповідно (рис. 8 В).

Хоча мітохондрії істотно впливають на формування рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти на рівні організму, це не єдине "джерело" продуктів вільнорадикальних реакцій в організмі. З огляду на це необхідно встановити вміст гідроперекисів і в сироватці крові. Виявлено, що вміст МДА в сироватці крові в молодих тварин, які одержували тетрахлорметан і сірчаноокислу мідь, було збільшено на 100 і 107 % відповідно, а в старих щурів було збільшено на 141 і 107% відповідно для тетрахлорметану й сірчаноокислої міді.

Відомо, що важливим показником антиоксидантної системи організму і клітин є активність різних ізоформ глутатіонпероксидази (ГП). Визначено, що її активність у мітохондріях печінки після одержання молодими тваринами тетрахлорметану була знижена на 23 % порівняно з контролем, а у старих тварин – на 25 % (рис. 9 А). Якщо тварини отримували сірчаноокислу мідь, то активність ГП у мітохондріях печінки знижувалася порівняно з вихідним рівнем у молодих і старих тварин на 20 і 22 % відповідно (рис. 9 А).

Глутатіонредуктаза (ГР) є ще одним із ферментів глутатіонового циклу, що забезпечує антиоксидантний захист організму. Її активність у мітохондріях печінки молодих і старих тварин після введення тетрахлорметану також була знижена на 20 % порівняно з їхніми вихідними рівнями (рис. 9 В). Уведення 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. 9 В). Визначення активності ГП у сироватці крові засвідчило, що вона також була знижена після введення тетрахлорметану 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. 9 В).

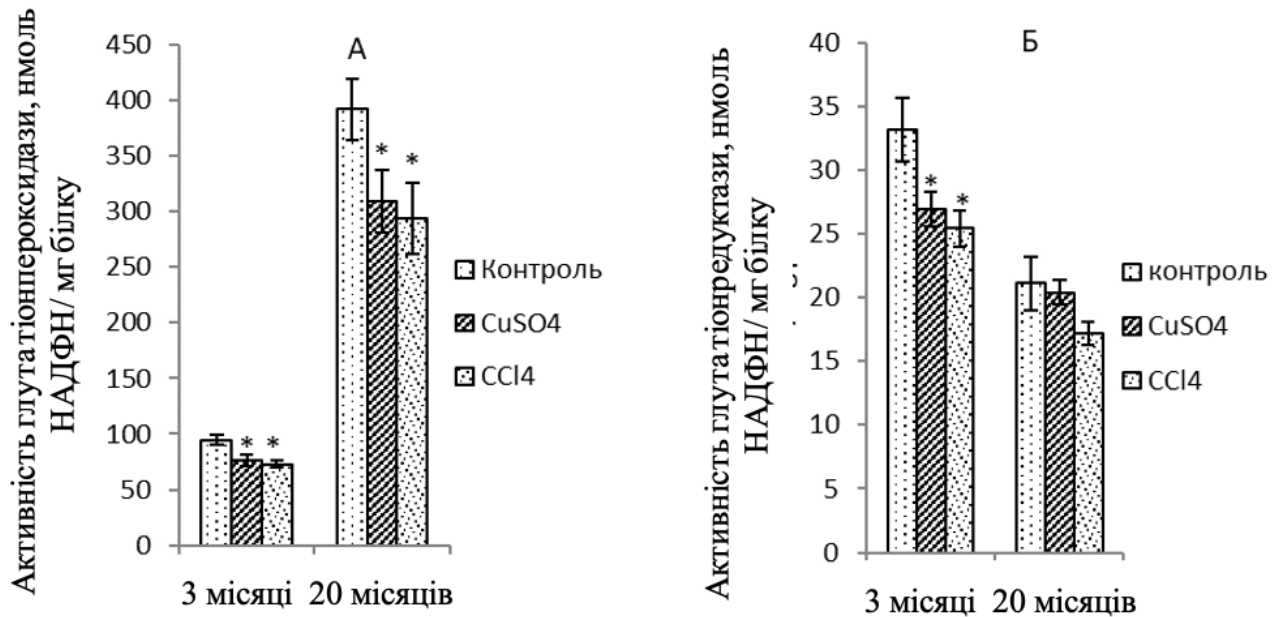


Рис. 9. Активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки (А) та активність глутатіонредуктази в мітохондріях печінки (Б) у молодих (3 міс.) і старих (20 міс.) тварин у трьох експериментальних групах: контрольній; групі, якій тричі внутрішньочеревно вводили сірчаноокислу мідь у дозі 1 мг/100 г маси 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 восьми експериментів та їхні стандартні помилки. * – варіанти, для яких значення $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, можна зробити висновок: 1) триразові послідовні введення експериментальним тваринам тетрахлорметану в дозі, що індукує розвиток фіброзу печінки, і триразове введення тваринам сірчаноокислої міді в дозі 1 мг/100 г маси індукують зсув рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти в бік прооксидантів практично так само, як і тетрахлорметан; 2) прояв окисного стресу на тлі дії цих гепатотропних токсичних сполук проявлявся схожим чином у тварин різного віку; 3) індукція та ймовірний розвиток фіброзу печінки здійснюється на тлі окисного стресу, як і більша частина відомих патологій.

Незважаючи на використання численних біохімічних показників як маркерів фіброзу печінки, як і раніше, найнадійнішим із них залишаються гістологічні критерії. Виявлено, що через шість діб після першого введення сірчаноокислої міді навколо печінки формувалася капсула зі сполучної тканини, що спричинило "зрощення" всіх долей печінки щура в єдину морфоструктуру (рис. 10). На гістологічному рівні спостережено помітне збільшення капсули Гліссона, яка була інкорпорована імунокомпетентними клітинами.

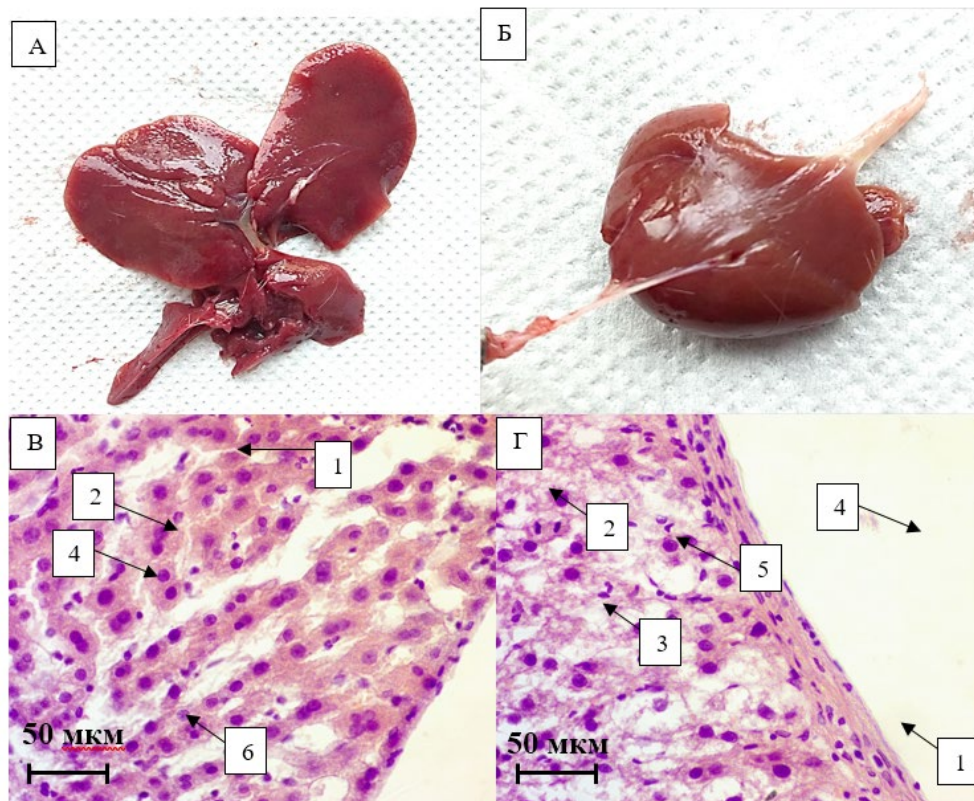


Рис. 10. Вигляд печінки контрольної групи тварин (А) і печінки після триразового послідовного внутрішньочеревного введення сульфатом міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 годин між введеннями (Б); гістологічний препарат печінки інтактних (контрольних) щурів (В) і печінки після введення сульфатом міді (Г) – формування з'єднувальної тканини навколо печінки, зміна форми лопастей печінки та їх зрощування з'єднувальною тканиною після інтоксикації сірчаною 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).

Отримані результати (наявність інкорпорованих лімфоцитів) можуть вказувати на важливу роль кісткового мозку у формуванні відповіді на тлі розвитку фіброзу печінки. Усі типи клітин у кістковому мозку можуть бути кваліфіковані як остаточно диференційовані, тобто морфологічно ідентифіковані: мієлоцити, метамієлоцити, паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли, лімфоцити, базофіли й моноцити, а також морфологічно неідентифіковані типи клітин, до яких належать 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. 11). Водночас у старих контрольних тварин це співвідношення становило 80 % ідентифікованих і лише 20 % неідентифікованих клітин (рис. 11).

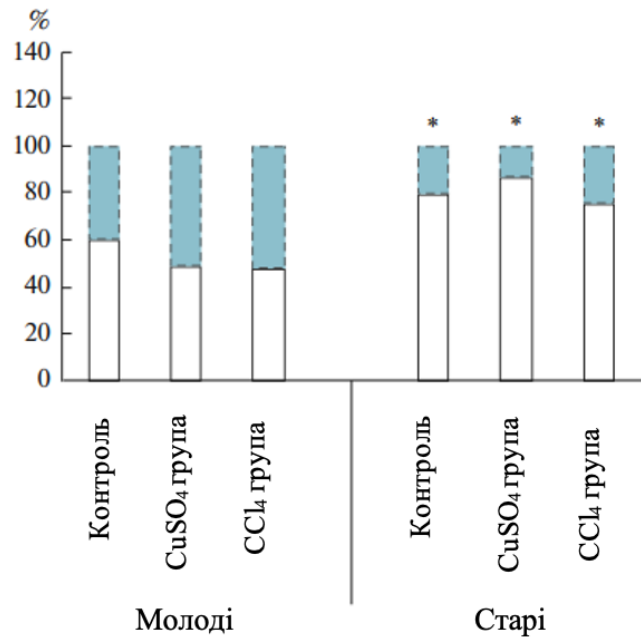


Рис. 11. Кількість морфологічно ідентифікованих клітин (□) і кількість неідентифікованих клітин (■) у відсотках від загальної кількості клітин кісткового мозку, отриманих у молодих та старих тварин відповідно у групі контрольних, у групі, що отримували сірчанокислу мідь, та, що отримували тетрахлорметан. Наведено середні значення, отримані у восьми тварин кожної групи, та їхні стандартні помилки. * р – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ старих тварин 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 (рис. 12), можуть супроводжуватися функціональними змінами імунокомпетентних клітин, що утворюються в цих тварин на тлі дії гепатотоксичних сполук.

Під час визначення проліферативної активності готували суспензію клітин кісткового мозку так, щоб початкова концентрація клітин у всіх досліджуваних варіантах була однаковою і завжди становила 2 млн клітин на 1 мл, а також щоб клітини перебували на однаковому поживному середовищі та культивувалися в однакових умовах одночасно. Виявлено, що за першу добу культивування кількість клітин кісткового мозку (ККМ), отримані в контрольних молодих тварин, збільшувалася на 60 % від вихідної кількості. Водночас за тих самих умов кількість ККМ, отриманих у старих тварин, збільшувалася на 112 % (рис. 13 а). Перевага ККМ у швидкості проліферації, отриманих у старих контрольних тварин, може пояснюватися збільшеною порівняно з молодими тваринами кількістю лімфоцитів, що мають вищу швидкість проліферації порівняно з іншими типами клітин кісткового мозку.

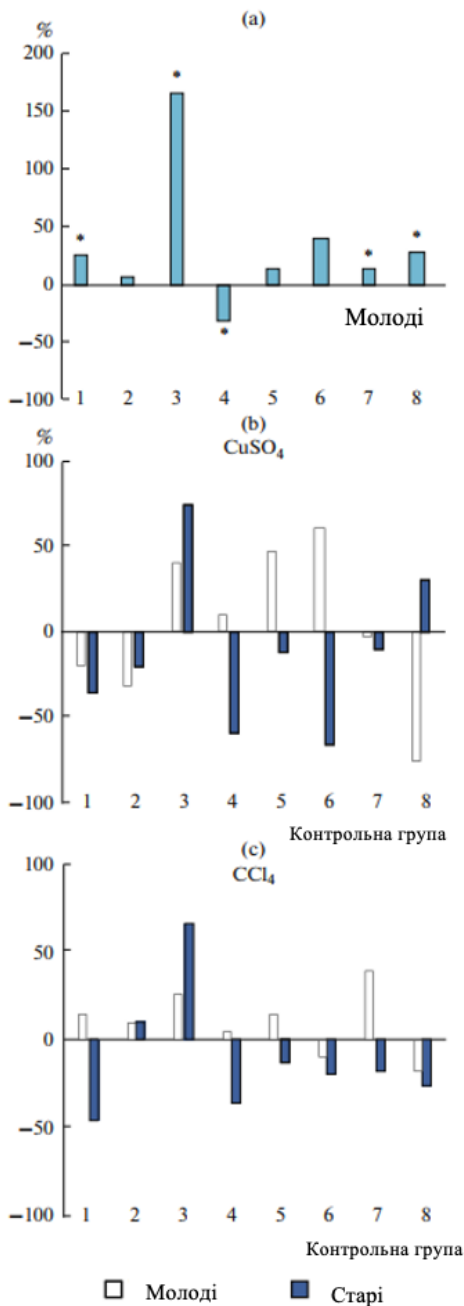


Рис. 12. Відмінності щодо кількості паличкоядерних нейтрофілів (1), метамієлоцитів (2), лімфоцитів (3), сегментоядерних нейтрофілів (4), мієлоцитів (5), еозинофілів (6), базофілів (7) і моноцитів (8) у старих тварин у відсотках порівняно з молодими, які прийняті за нульовий рівень (a) та зміни кількості цих типів клітин у молодих та старих тварин у відсотках на тлі розвитку Cu -індукованого фіброзу (b) та відповідно на тлі CCl_4 -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 вісім тварин. * – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ старих порівняно з молодими, за критерієм Манна-Уїтні.

Аналізуючи особливості проліферації клітин кісткового мозку в культурі, необхідно зазначити, що якщо ККМ були виділені в молодих тварин із Cu -індукованим фіброзом печінки, то протягом першої доби культивування їхня кількість збільшувалася навіть дещо швидше від контрольного рівня, проте на другу добу їхня кількість зменшувалася та не змінювалася в часі, натомість їхня кількість була значно меншою порівняно з контролем у цей час (рис. 13 b). Якщо ККМ були отримані з молодих тварин із CCl_4 -індукованим фіброзом печінки, то їхня кількість збільшувалася навіть швидше ніж у контролі (рис.13c). Отже, клітини кісткового мозку, що

утворюються на тлі різних індукторів фіброзу, різняться за своїми проліферативними властивостями, а можливо, і за іншими функціональними особливостями.

Було показано, що збільшення внутрішньоклітинного вмісту кальцію спричинює активацію проліферації клітин (Armengol, 2016).

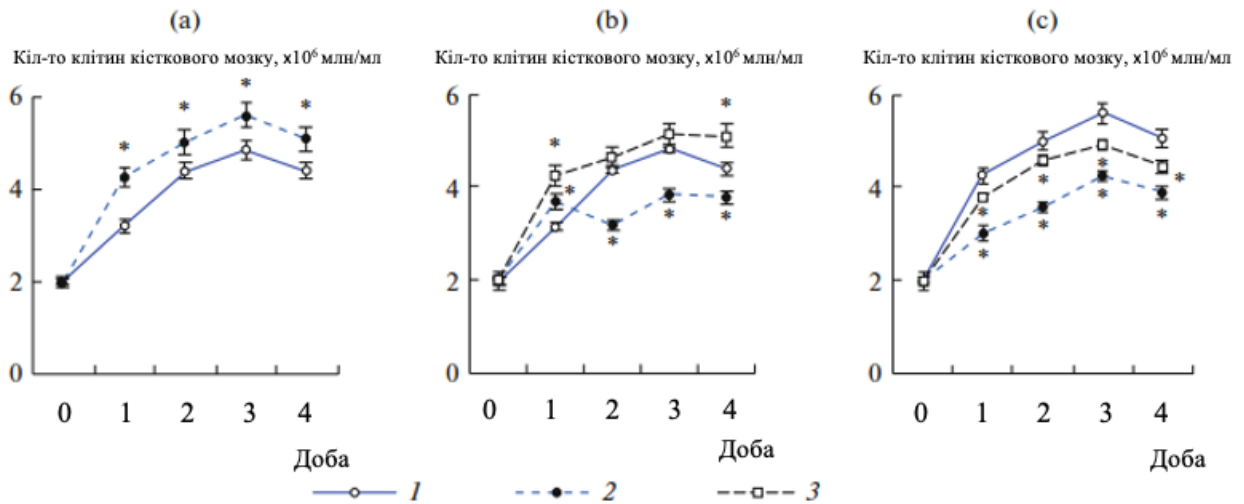


Рис.13. а – кількість клітин з 1 по 4 добу культивування на середовищі DMEM, що були отримані у молодих (—) і старих (----) тварин: б – кількість клітин з 1 по 4 добу культивування на середовищі DMEM, що були отримані у контрольних молодих тварин (1) у молодих із Cu-індукованим фіброзом (2) та CCl₄-індукованим фіброзом (3): с – кількості клітин з 1 по 4 добу культивування на середовищі DMEM, що були отримані у контрольних старих тварин (1), у старих із Cu-індукованим фіброзом (2), у старих із CCl₄-індукованим фіброзом (3). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для восьми тварин у кожній експериментальній групі. * – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним віковим контролем, за критерієм Манна-Уїтні.

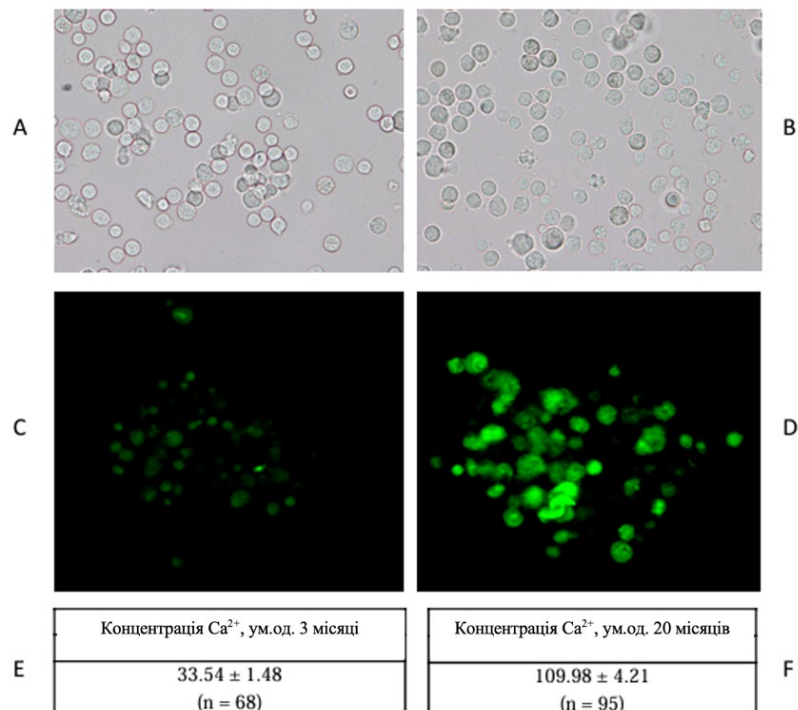


Рис. 14. Популяція клітин кісткового мозку молодих (А) і старих (В) тварин, світлова мікроскопія Carl Zeiss Primo Stari LED (Німеччина). Флуоресценція зонда Fluo-3 індикатор кальцію в клітинах молодих (С) і старих (D) тварин, конфокальна

лазерна сканувальна мікроскопія LSM 510 META Carl Zeiss (Німеччина) та інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях у клітинах кісткового мозку, отриманих від молодих (E) і старих (F) тварин, збільшення $\times 100$.

Виявлено, що кількість кальцію в клітинах кісткового мозку, отриманих від молодих тварин, була в три рази меншою, ніж у клітинах старих тварин (рис. 14).

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. 15 (I)). На наступному етапі формується специфічний метаболічний патерн із медіаторів запалення, продуктів клітинного розпаду та продуктів вільнорадикальних реакцій, що спричинює зсув рівноваги в бік прооксидантів (рис. 15 (II)). Далі ці продукти активують зірчасті клітини та фіброгенез як термінову реакцію, спрямовану на усунення розпаду печінки. На цій стадії проліферація гепатоцитів незначна, у подальшому на цьому етапі формується сполучнотканинна матриця (рис. 15 III). 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. 15 IV).

Метаболічна ситуація, що утворюється на тлі тривалої дії іонів міді може спричинювати розвиток кількох стратегій адаптації (рис. 15).

Розроблена модель Cu-індукованого фіброзу печінки, попри її схожість з відомою тетрахлорметановою моделлю, має і низку особливостей та переваг.

Під час дослідження механізму дії іонів міді на культурі бактеріальних клітин встановлено наявність антибактеріальної активності, що залежала від концентрації іонів міді (Bozhkov et al., 2024).

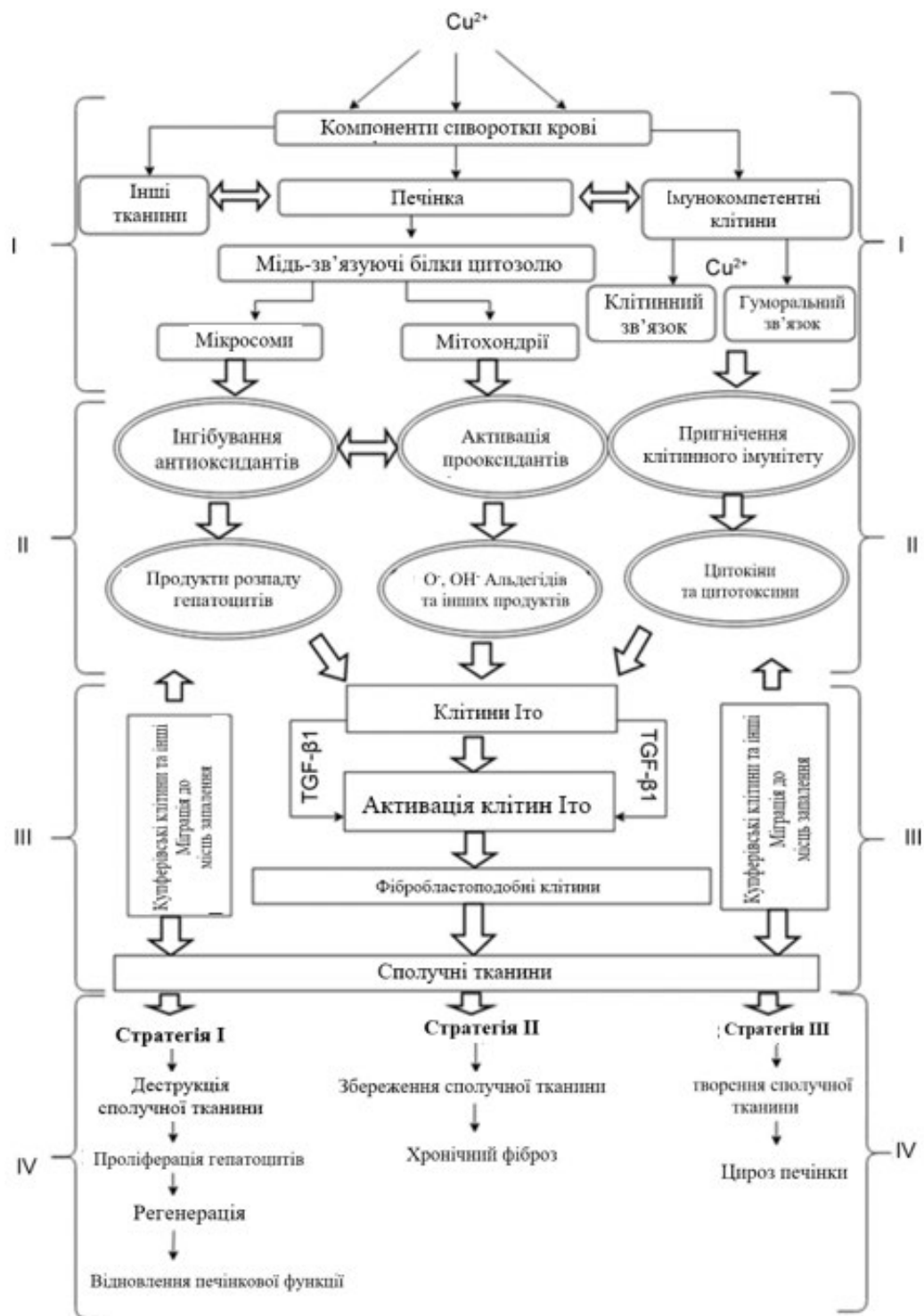


Рис. 15. Схема, що демонструє ієрархію формування Cu -індукованого фіброзу печінки.

П'ятий розділ присвячено дослідженню впливу низькомолекулярних компонентів молозива на моделі Cu -індукованого фіброзу печінки.

Установлено, що за Cu -індукованого фіброзу печінки має місце зсув рівноваги в редокс-системі в бік прооксидантів, це супроводжується активним синтезом

сполучної тканини. 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 % нижчим за вміст тварин із фіброзом і достовірно не відрізнявся від такого в інтактному контролі (рис. 16 А). З'ясовано, що зменшення вмісту гідроперексидів ліпідів у тварин із фіброзом після введення НКМ відбувалося на тлі значного збільшення активності глутатіонпероксидази (збільшено на 82 %), водночас вона перевищувала й активність порівняно з контролем на 24 % (рис. 16 А). Наявність кореляції між вмістом гідроперексидів ліпідів та активністю глутатіонпероксидази засвідчує те, що компоненти молозива виявляють антиоксидантну та імуномодельюючу активності.

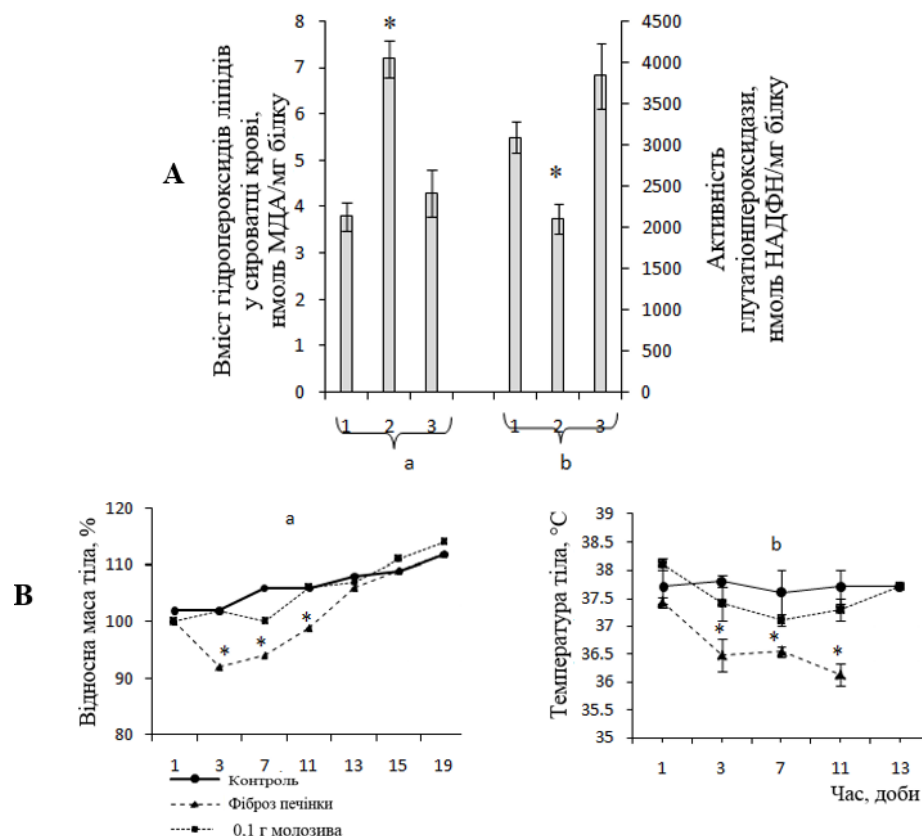


Рис.16. Показники про-/антиоксидантної системи (А); вміст гідропероксидів ліпідів у сироватці крові (а) та активність глутатіонпероксидази (b) в інтактних тваринах (1), тварин із фіброзом печінки (2) і тварин із фіброзом, які отримували НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла тварини (3); деякі фізіологічні 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 п'яти тварин у кожній експериментальній групі. * — варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Якщо тварини з фіброзом печінки на ранніх етапах його розвитку одержували 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. 16 В, а). У тому разі, якщо тварини з фіброзом

отримували низькомолекулярні компоненти молозива з розрахунку 0,1 г/100 г маси тіла, їхня температура тіла не відрізнялася від таких у контрольних тварин (рис. 16 В, б).

Нормалізація температури тіла у тварин із Су-індукованим фіброзом печінки вказує на кілька важливих особливостей дії НКМ на організм. По-перше, НКМ нормалізує стан загального метаболізму у таких тварин. По-друге, між зміною швидкості росту, падінням температури тіла та зміщенням рівноваги в редокс-системі існує взаємозв'язок.

Під час дослідження можливих механізмів дії низькомолекулярних компонентів молозива на моделі фіброзу для доказу неспецифічної дії використано порівняльне дослідження за дією НКМ та "Мікс-фактору", у складі якої є теж низькомолекулярні білки (Bozhkov et al., 2021). Необхідно зазначити, що НКМ і "Мікс-фактор" були отримані із різних джерел (*Sacharomyces cerevisiae* і *Pleurotus ostreatus*), дуже відрізняються за складом, та схожі лише в тому, що до їхнього складу належать відносно низькомолекулярні, хоча й різні компоненти.

Порівняння впливу НКМ і "Мікс-фактору" на вміст гідроперекисів ліпідів та активність глутатіонпероксидази в сироватці крові експериментальних тварин підтвердило, що вміст гідроперекисів ліпідів (ГП) у сироватці крові тварин із фіброзом збільшувався на 90 %, порівняно з контролем (рис. 17 А).

У тварин із Су-індукованим фіброзом печінки, які отримували "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100 г маси, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові був нижчим на 37 % порівняно з тваринами з фіброзом і мало відрізнявся від інтактного контролю (рис. 17 А). Введення тваринам із фіброзом НКМ у дозі 0,1 г/100 г маси тіла також спричинювало зниження вмісту гідроперекисів ліпідів у сироватці крові на 40 % і відповідало контрольній групі тварин (рис. 17 А).

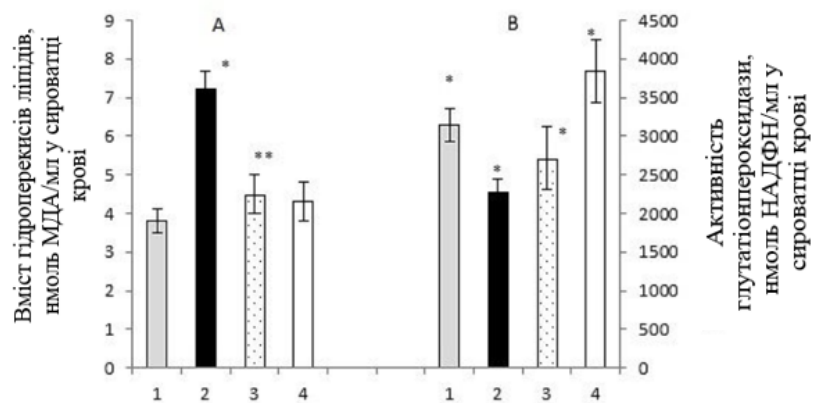


Рис. 17. Вміст гідроперекисів ліпідів (А) та активність глутатіонпероксидази (В) у сироватці крові контрольних тварин (1), тварин із Су-індукованим фіброзом (2), тварин, які отримували *per os* "Мікс-фактор" у дозі 0,1 г/100 г маси, після індукції фіброзу тричі з інтервалом 24 години (3), тварин, які 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 Су-індукованим фіброзом.

Отже, "Мікс-фактор" і НКМ, що різняться за складом, практично однаковою мірою нормалізують вміст продуктів вільнорадикальних реакцій, принаймні гідроперекисів ліпідів, тобто усували розвиток окислювального стресу, індукованого іонами міді.

Одним із можливих механізмів антиоксидантної дії "Мікс-фактора" та НКМ може бути досягнуто за рахунок підвищення активності антиоксидантних ферментів. Виявлено, що активність глутатіонпероксидази в сироватці крові, що була достовірно знижена у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки, не відрізняється від контрольного рівня після введення їм "Мікс-фактора" та особливо після отримання НКМ (рис. 17 В). Відсутність окисного стресу у тварин із фіброзом печінки "Мікс-фактором" і НКМ може пояснюватися активацією антиоксидантних ферментів.

З метою оцінки функціональної активності печінки на ранніх стадіях розвитку її фіброзу визначено вміст холестерину, триацилгліцерину, альбуміну та креатиніну в сироватці крові. Якщо тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки вводили "Мікс-фактор" або НКМ, вміст холестерину, триацилгліцерину, альбуміну та креатиніну в сироватці крові таких тварин залишався в межах норми.

Відповідно, якщо аналізовані показники у тварин із фіброзом залишаються в межах норми, то "Мікс-фактор" і НКМ не впливають на такі показники. Можна припустити, що досліджувані біологічно активні субстанції впливають тільки на ті показники, які перебувають за межами гомеостатичних значень. Якщо досліджувані параметри залишаються в гомеостатичних межах, то "Мікс-фактор" і НКМ на них не впливають.

Отримані результати дають змогу зробити такі висновки: 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 впливають на активність глутатіонредуктази у тварин із фіброзом, якщо вона залишається на рівні контрольних значень; 4) "Мікс-фактор" і НКМ можуть чинити неспецифічну герметичну дію на організм і забезпечувати корекцію змінених метаболічних показників.

У шостому розділі досліджували дію "Мікс-фактору" як представника горметинів на показники редокс-системи та тривалість життя тварин в експерименті.

Зміст положень численних досліджень щодо можливих механізмів онтогенетичних змін дають змогу сформулювати кілька десятків гіпотез, однак вільнорадикальна гіпотеза старіння все ще є найбільш обговорюваною і остаточно не вирішеною (Sohal, 1993; Gonzalez-Freire et al., 2015; Jones, 2015; Ziegler et al., 2015). Якщо причиною вікових патологій є збільшення продуктів вільнорадикальних реакцій, то під час зниження 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 привертає увагу не тільки в аспекті перевірки вільнорадикальної гіпотези старіння, а й тому, що редокс-система - одна з найдавніших еволюційних систем регуляції в біологічних системах (Mittler, 2017), що відіграє важливу роль у регуляції метаболізму, а отже, у тривалості онтогенезу.

Розроблений у нашій лабораторії багатокомпонентний низькомолекулярний природний комплекс "Мікс-фактор" може усувати патологічні прояви, індуковані іонами важких металів (Bozhkov et al., 2017). "Мікс-фактор" застосовано у регуляції функцій окисно-відновної системи (Bozhkov et al., 2017), імунної системи (Bozhkov et al., 2016) і низки фізіологічних функцій у експериментальних тварин та має схожий механізм дії на тварин як і НКМ (Bozhkov et al., 2017). Натомість вплив "Мікс-фактора" залежить від віку тварин (Bozhkov et al., 2017). У зв'язку із цим на цьому етапі дослідження визначено вміст гідропероксидів ліпідів та активність антиоксидантних ферментів: глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази та малатдегідрогенази в мітохондріях печінки й сироватці крові дорослих тварин, що вживали "Мікс-фактор" щоденно з 22 місяців або 30,5 місяця до кінця життя.

На рис. 18 представлено дані щодо вмісту гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки дорослих – 12-місячних щурів і 33-місячних тварин, яких утримували в стандартних умовах віварію. Виявлено, що кількість гідроперекисів ліпідів у старих (33 місячних) тварин була збільшена порівняно з 12 місячними на 25 %. Якщо тварини, починаючи з 22-місячного віку, отримували з питною водою "Мікс-фактор" щоденно до 33-місячного віку, то вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки таких тварин не відрізнявся від їхнього вмісту у 12-місячних тварин (рис. 18 А).

Ще яскравіше ці вікові відмінності проявлялися за вмістом гідроперекисів ліпідів у сироватці крові. Зокрема, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові 33-місячних тварин було збільшено на 41 % порівняно з 12-місячними тваринами (рис. 18 В). Якщо тварини отримували щодня "Мікс-фактор", починаючи з 22-місячного віку, то у віці 33 місяців кількість гідроперексидів ліпідів у мітохондріях печінки таких тварин не відрізнялася від їхньої кількості в 12-місячних щурів (рис. 18 В).

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. Відповідно, важливо розуміти механізми його дії.

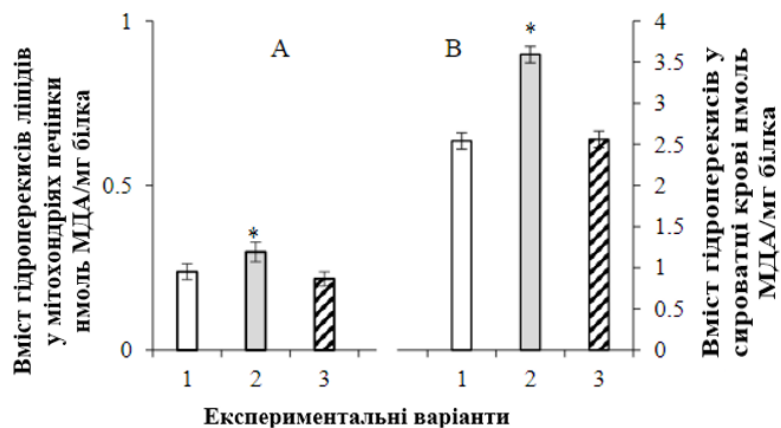


Рис. 18. Вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки (А) та сироватці крові (В) у 12-місячних тварин (1) та 33-місячних тварин (2), яких утримували в стандартних умовах, і 33-місячних тварин, які отримували "Мікс-фактор" щоденно з питною водою, починаючи з 22-місячного віку, у дозі 0,05-0,06 мл/100 г маси тіла. (3) Наведено середні значення по восьми тваринах у кожному варіанті, * – відмінності порівняно з інтактним контролем 12-місячного віку. Вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові, нмоль МДА/мг вміст гідроперекисів ліпідів, нмоль МДА/мг білка.

Якщо тваринам, починаючи з 22-місячного віку, давали "Мікс-фактор" щоденно з питною водою, то активність глутатіонпероксидази у 33-місячних тварин не відрізнялася від такої для 12-місячних інтактних тварин. Це було характерно для всіх досліджених фракцій печінки, сироватки крові та еритроцитів (рис. 19).

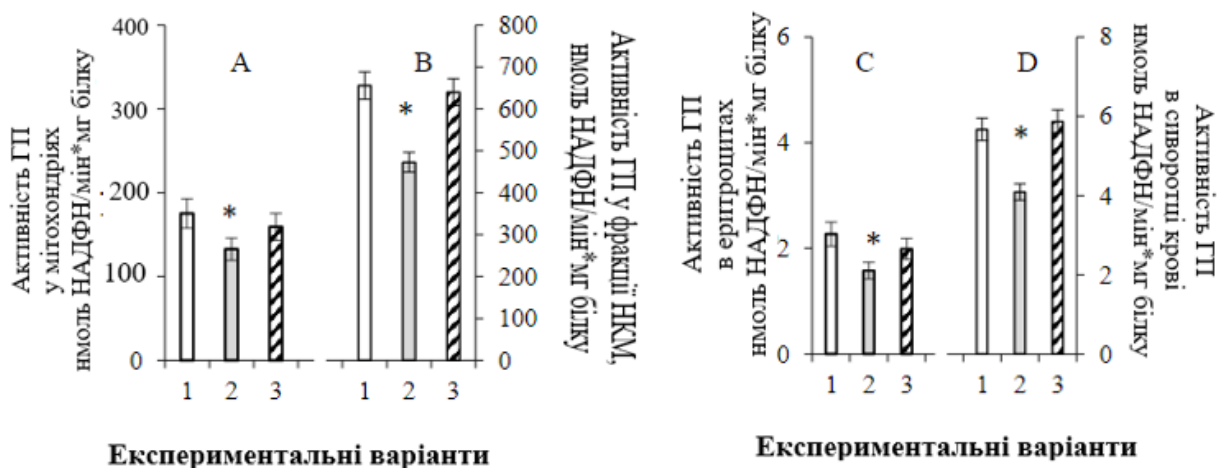


Рис. 19. Активність глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки (А), постмітохондріальній фракції печінки (В), еритроцитах (С) та сироватці крові (Д) у 12-місячних тварин (1) та 33-місячних тварин (2), яких утримували в стандартних умовах, і тварин, які щодня отримували "Мікс-фактор" з питною водою, починаючи з 22-місячного віку, у дозі 0,05 – 0,06 мл/100 г маси тіла (3). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки по восьми тваринах у кожному варіанті, * – відмінності порівняно з інтактним контролем у віці 12 міс.

Отже, застосування "Мікс-фактора" спричиняло 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. Натомість, активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази в мітохондріях печінки в 33-місячних щурів не відрізнялися від їхніх активностей у 12-місячних щурів. Необхідно звернути увагу на те, що якщо досліджуваний показник перебуває в межах гомеостатичного рівня, то він виявляє більшу стабільність під час впливу екзогенних чинників. Такі особливості були встановлені й у багатьох інших наших дослідках.

Виявлено, що тривале вживання "Мікс-фактора» з 22-місячного віку сповільнювало природну загибель тварин у період від 740 днів (25,6 міс.) до 860 днів (28,6 міс.) спостережень (рис. 20 А).

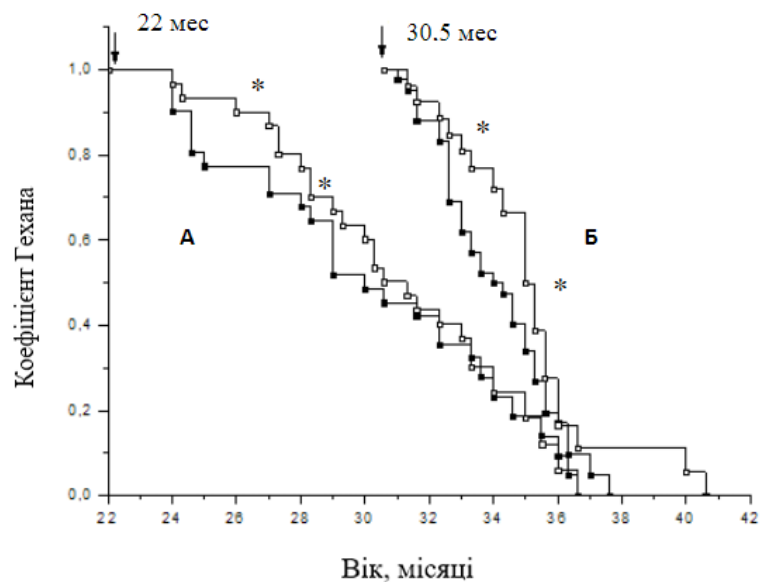


Рис. 20. Криві виживаності контрольної групи тварин (■—) і тварин, які отримували щоденно "Мікс-фактор" (□—), від 22-місячного віку до кінця життя (А) і отримували щоденно "Мікс-фактор" з віку 30,6 місяців до кінця життя (Б). * — початкові та кінцеві достовірні відмінності порівняно з контролем.

Однак, встановлено, що, починаючи з 940-го дня (31,3 міс.), контрольна та дослідна групи за показниками часу настання смертності не відрізнялися (рис. 20 А). Під час оцінювання тривалості життя використано критерій — максимальна тривалість життя (загибель останньої тварини), що припала на 1100 день (36,6 міс.).

Отже, вживання "Мікс-фактора" старими тваринами (22-місячного віку) сприяло достовірному зменшенню смертності на короткий період з 25 до 28 місяців (рис. 20 А). Цей ефект перевірено на пізніших етапах онтогенезу, наприклад, у 30-місячних тварин, тобто в той період, коли дослідна й контрольна групи не відрізнялися за смертністю.

З огляду на зазначене в 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. 20 Б, засвідчили наступне: 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-фактору" (так само на короткий період) у даній віковій групі сповільнювало процес "вимирання" з 34 до 38 місяців; 4) у дослідній групі, що щоденно приймала "Мікс-фактор", починаючи з віку 30,5 місяців, максимальна тривалість життя сягала 1220 днів, або 40,6 місяця (рис. 20 Б).

Отриманні результати значущі в кількох аспектах. По-перше, застосування "Мікс-фактору" на дуже пізніх етапах онтогенезу сприяє більш виражений ефект щодо зменшення смертності та збільшення максимальної тривалості життя, що є дещо несподіваним. По-друге, з огляду збільшення максимальної тривалості життя в окремих особин припущено, що екстраполювання кривої смертності для дослідної групи на всіх тварин від 36-ти до 40-місячного віку, тобто до досягнення максимальної тривалості життя, уможливило збільшення не тільки максимальної, як для деяких тварин, а й середньої тривалості життя для всієї групи (рис. 20 Б). І нарешті, можна припустити, що у більшості тварин спрацьовує "заборона" на збільшення тривалості життя, в той самий час у деяких тварин має місце збільшення тривалості життя, але тільки в тому разі, якщо прийом "Мікс-фактора" розпочинали з 30-місячного віку. Ці припущення, потребують додаткових досліджень, а натомість встановлено, що між показниками редокс-системи та тривалістю життя існує досить складний взаємозв'язок. Як відомо, однією з вікзалежних характеристик тварин є їхня здатність адаптуватися до дії різних екзогенних чинників, і в цьому відношенні особлива роль належить здатності молодих і старих тварин виконувати роботу (працездатність). Вплив "Мікс-фактора" на працездатність тварин на пізніх етапах онтогенезу інтерпретовано як його вплив на якість життя тварин.

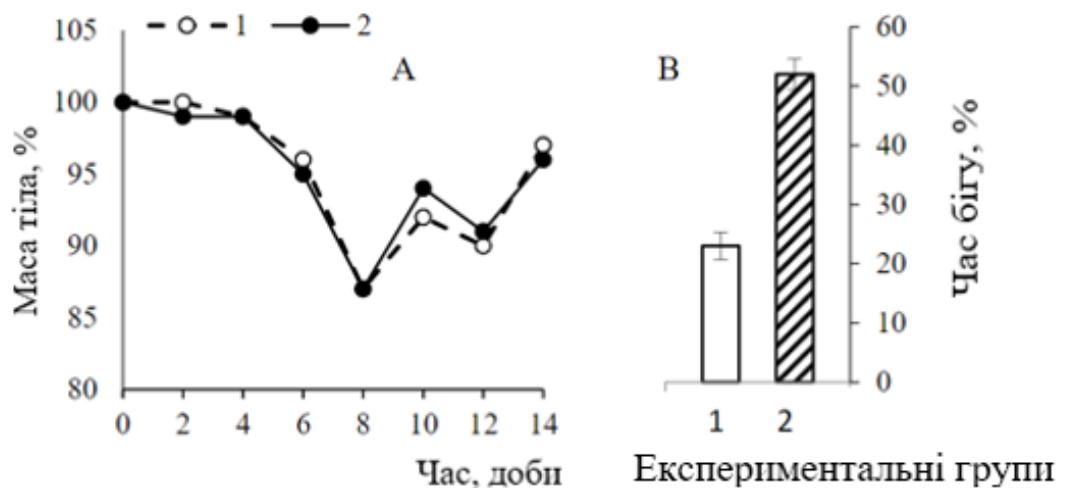


Рис. 21. Зміна маси тіла від вихідної (А) у тварин контрольної групи (1) і тварин, які отримували щоденно "Мікс-фактор" при тренуванні на біговій доріжці впродовж 14 днів (2), збільшення часу бігу на біговій доріжці через 14 днів навчання тварин контрольної групи (1) і групи, що отримала "Мікс-фактор" (2) від вихідного часу (В). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки для восьми тварин у кожній групі.

Результати показують, що тварини зазнають стресу (втрата маси тіла) і добре до нього адаптуються (рис. 21 А). У контрольній групі час бігу збільшився на 22 % порівняно з першим забігом, тоді як у групі тварин, які отримували "Мікс-фактор", час бігу збільшився на 55 % від вихідного (рис. 21 В). Збільшення працездатності старих тварин після прийому "Мікс-фактора" дає підстави вважати, що він системно впливає на організм і може покращувати якість життя.

У цьому розділі представлено результати щодо способу контролю якості фракцій молозива на основі визначення електропровідності компонентів молозива як інтегрального показника співвідношень компонентів молозива.

Однією з проблем розширення сфер використання такої багатокомпонентної біологічно активної субстанції, як молозиво та "Мікс-фактор", є складність в отриманні стандартних зразків або відсутність способів стандартизації.

Однак наявні сучасні аналітичні методи аналізу багатокомпонентних сумішей, наприклад, мас-спектрометрія, вискозоефективна хроматографія та інші, є трудомісткими і дорогими, що ускладнює їх практичне застосування у виробничих лабораторіях. У зв'язку з цим поряд із наявними методами визначення жирності, рН, загального вмісту білка та інших показників необхідно розробити та впровадити додаткові фізико-хімічні методи аналізу компонентів молозива. Ураховано те, що під час добирання 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 біофізичний показник

електропровідності різних біологічних субстанцій. Електропровідність залежить щонайменше від співвідношення заряджених молекул у розчині та нейтральних молекул (діелектриків), на цей показник впливає наявність електропровідних структур. Ми припускаємо, що електропровідність може залежати від характеристик редокс-системи досліджуваної біологічної субстанції, тобто рівень електропровідності може слугувати інтегративним показником якості молозива. Вимірювання електропровідності триває кілька хвилин, тобто може бути експресним, простим у виконанні та інтерпретації отриманих результатів і досить надійним.

У першій серії експериментів визначено електропровідність цільного молозива та знежиреного молозива. Виявлено, що видалення ліпідів із молозива спричиняло до збільшення електропровідності (рис. 22). Як відомо, ліпіди виявляють властивості діелектриків (Gramse et al., 2013). Це підтверджує те, що електропровідність визначається співвідношенням між зарядженими молекулами та діелектриками.

Температура, за якої вимірювали електропровідність, має відносно невеликий вплив на електропровідність молозива. Наприклад, у діапазоні від $+14^{\circ}\text{C}$ до $+19^{\circ}\text{C}$ мало місце відносно невелике лінійне збільшення електропровідності, що проявлялося однаковою мірою як для цільного, так і знежиреного молозива (рис. 22).

Надалі всі вимірювання електропровідності проведено за температури $+18^{\circ}\text{C}$.

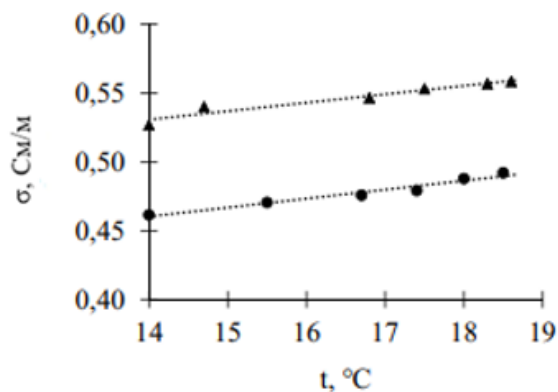


Рис. 22 Електропровідність незбираного молозива (●) і знежирене молозиво (▲), яку визначали за частотою електричного струму $0,49 \text{ МГц}$ у діапазоні температур від 14°C до 19°C , представлено типові криві провідності трьох незалежних визначень.

За результатами, які представлених на рис. 22, електропровідність незбираного молозива, отриманого у трьох корів, незначно варіювала в діапазоні від $0,46$ до $0,56 \text{ См/м}$ і не залежала від частот напруги в діапазоні $100 \text{ кГц} - 10 \text{ МГц}$. Видалення ліпідів із молозива супроводжувалося збільшенням електропровідності порівняно із 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. 23). Ці результати дають змогу 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).

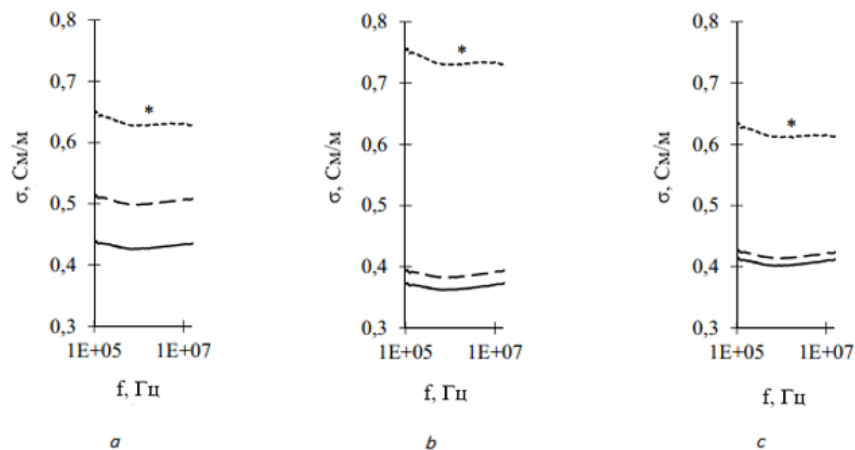


Рис.23. Електропровідність цільного молозива (—), знежиреного молозива (— —) і низькомолекулярних компонентів молозива (.....) у діапазоні частот 100 кГц-100 МГц: а – молозиво та його компоненти, отримані від корови "Аврора"; б – молозиво та продукти молозива, отримані від "Барині"; с – молозиво та продукти молозива, отримані від "Мухи". Показано типові криві електропровідності з трьох незалежних повторів; * – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно з цільним молозивом.

Видалення високомолекулярних білків із молозива теж збільшували електропровідність (рис. 23). Можна припустити, що видалення високомолекулярних білків збільшує відносний вміст заряджених молекул (іонного складу, вільних амінокислот, коротких пептидів і низькомолекулярних білків). Так, електропровідність низькомолекулярних компонентів молозива, отриманого у "Аврори", підвищилася на 40,5 % і 47,4 % порівняно зі знежиреним і цільним молозивом відповідно (рис. 23а). Ще більшою мірою збільшилася електропровідність для НКМ, отриманого у "Барині", відповідно на 96,1 і 101 % порівняно зі знежиреним і цілісним молозивом, а для НКМ "Мухи" – збільшення електропровідності становило – 50,1 і 52,3 % відповідно (рис. 23 б, с). Як відомо, склад молозива змінюється у процесі зберігання. Це пояснюється кількома причинами. По-перше, до складу молозива входять різні ферменти, зокрема й гідролітичні, які призводять до зміни його компонентів. По-друге, воно досить швидко інфікується, що так само супроводжується зміною його складу. Відповідно оцінка показників електропровідності компонентів молозива під час зберігання може слугувати підтвердженням висловлених суджень щодо чинників, які впливають на електропровідність, і бути використаною для оцінки термінів зберігання. Виявлено, що електропровідність незбираного молозива залишається незмінною від 1 до 10 діб зберігання за температури $+3 - 4^{\circ}\text{C}$, починаючи від 10 до 18 діб зберігання електропровідність незначно збільшується порівняно з

початковими зразками, що було характерно для всіх досліджуваних зразків (рис. 24). Схожі зміни електропровідності в процесі зберігання мав місце і для знежиреного молозива (рис. 24).

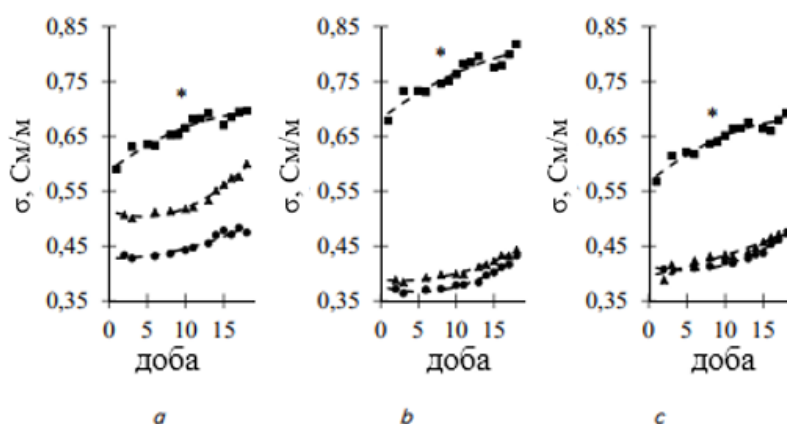


Рис. 24. Електропровідність цільного молозива (●), знежиреного молозива (▲) і низькомолекулярних компонентів молозива (■) на частоті 0,49 МГц за температури 18°C з 1 по 18 день зберігання зразків за +3°C: а – молозиво, отримане від корови "Аврори"; б – молозиво, отримане від "Барині"; с – молозиво, отримане від "Мухи". Представлено типові криві для кожного з виробників. * – варіанти, для яких $P \leq 0,05$ порівняно із 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" та "Мухи" відповідно (рис. 24).

Отримані результати дають змогу зробити кілька висновків. По-перше, метод визначення електропровідності молозива та його фракцій може бути використаний як інтегральна оцінка за якістю 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 зменшувалась більш ніж у три рази у фракції НКМ порівняно з незбираним молозивом) відбувається деградація компонентів, що супроводжується збільшенням електропровідності.

Отже, метод електропровідності може бути використаний не тільки під час стандартизації молозива та його фракцій, а й інших біологічних субстанцій.

Восьмий розділ присвячено дослідженню можливостей використання казеїну молозива як "носія" біологічно активних субстанцій на прикладі поліфенольних сполук, що збагачені хлорогеновою кислотою.

Вміст казеїну в молозиві першого доїння в 2-3 рази більший, ніж у зрілому молоці (McGrath et al., 2016). Крім того, співвідношення β -казеїну до κ -казеїну в молозиві 0,61, а в зрілому молоці це співвідношення становить 0,30 (Cuillière et al., 1999). У зв'язку з цими особливостями, казеїн молозива становить великий інтерес як потенційна фармацевтична субстанція. Особливу увагу привертає здатність ізоформ казеїну формувати нанокластери, тобто вони здатні до самозбирання міцеліальних наноструктур (Głąb et al, 2017; Thienel et al., 2018; Greenwood et al, 2019).

У процесі формування наноструктур можуть бути вбудовані різноманітні біологічно активні сполуки. Особливу увагу приділено біоактивним сполукам, зокрема поліфенольним сполукам – флавоноїдам. Вони утворюються в рослинах і забезпечують їм захист від окисного стресу, запобігають інфікуванню вірусами та бактеріями (Karak, 2019). Незважаючи на перспективність та актуальність розробки біоактивних сполук на основі хлорогенової кислоти, гідного практичного застосування вона поки що 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, було здійснено спробу розробки способу включення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у міцели казеїну молозива.

Із соняшникового шроту були отримані досить різноманітні поліфенольні сполуки (ПФ), які поглинали світло в діапазоні від 310-360 нм. І це залежить від їхньої концентрації (рис. 25).

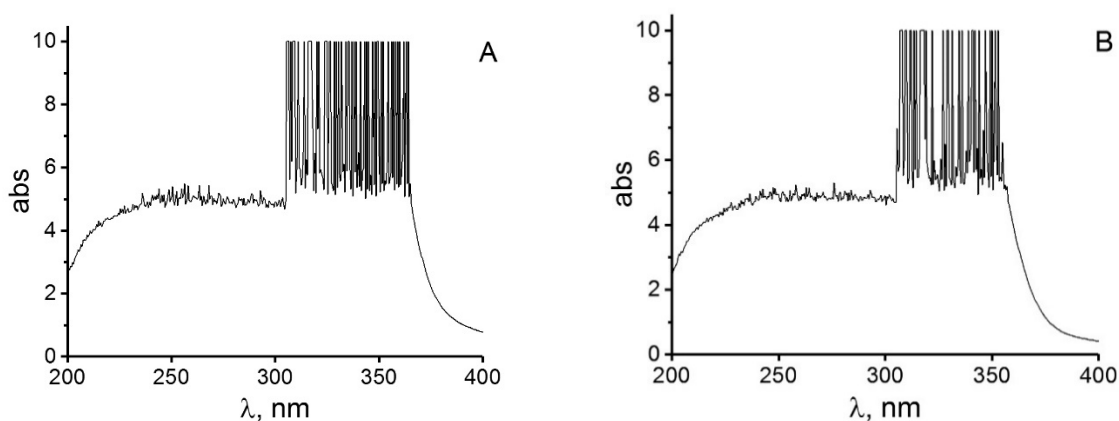


Рис. 25. Спектри поглинання поліфенольних сполук у водному розчині в ділянці від 310 до 360 нм у разі великої концентрації – 1,5 г у 10 мл розчину – (А) та в разі меншої концентрації – 0,75 г у 10 мл розчину (В). Представлено типові спектри поглинання поліфенольних сполук.

Виявлено, що в контрольному варіанті казеїну без внесення ПФ та його подальшої водної екстракції в середовищі було відстежено незначну кількість амінокислот і білків, що переходили у водну фазу та поглинали в ультрафіолетовій частині спектра (220 до 300 нм) (рис. 26 А). Якщо ПФ вносили в кількості 1,5 г на 30 г казеїну, до формування казеїнових міцел із подальшою індукцією міцелоутворення, то кількість ПФ сполук, не пов'язаних із міцелами казеїну, була зменшена на 20 % порівняно з вихідною кількістю ПФ (кількість ПФ визначали за площею піків поглинання) (рис. 26 В та 25 А). Водночас, якщо в зразки казеїну додавали у два рази менше ПФ сполук, то у водному розчині залишалося в три рази менше ПФ сполук порівняно з початковою кількістю внесених ПФ (рис. 26 С і 25 В).

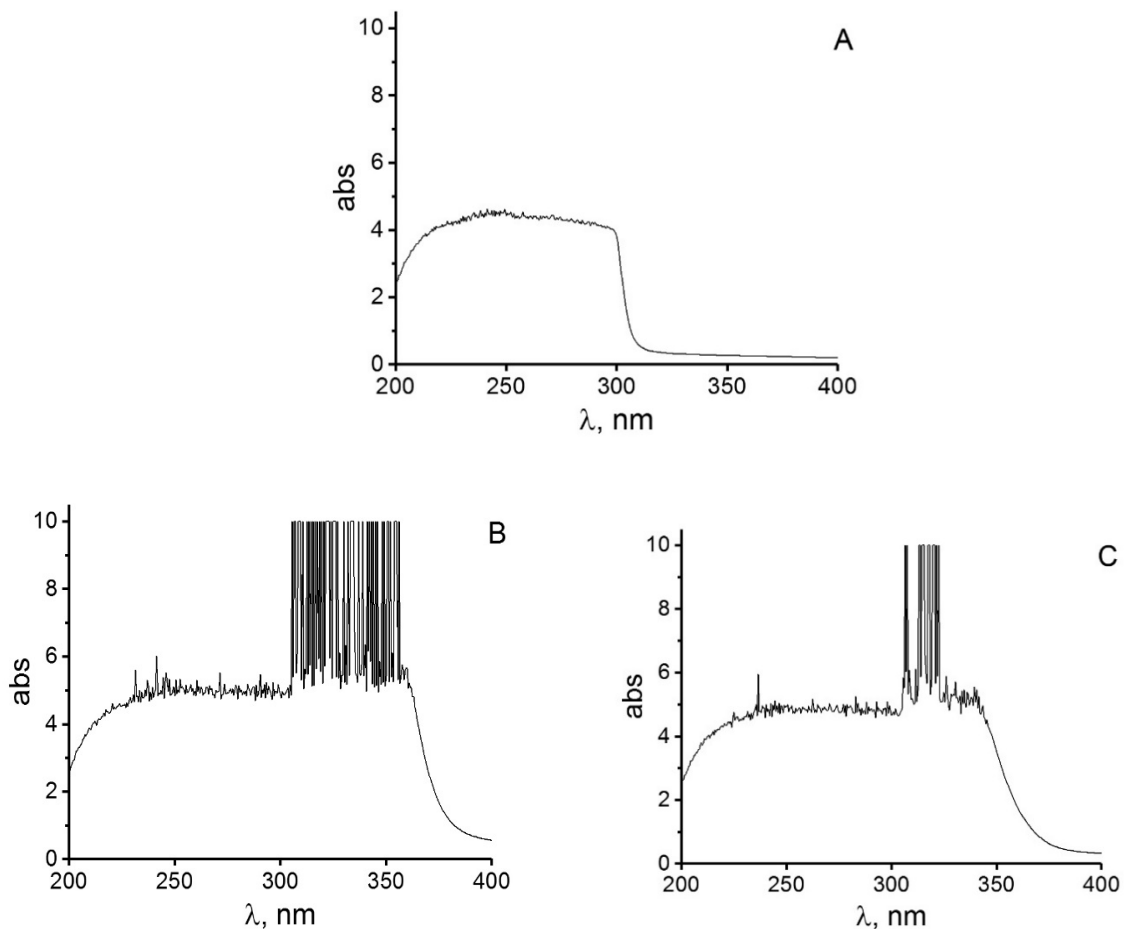


Рис. 26. Спектри поглинання постказеїнової фракції без внесення ПФ, у складі якої виявляються незначна кількість білків молозива (А), та спектри поглинання ПФ, що не включалися з казеїновими міцелами, в разі внесення великої кількості ПФ (1,5 г на 30 г казеїну) (В), а також після внесення ПФ у кількості 0,75 г на 30 г казеїну (С). Представлено типові спектри з трьох серій визначень.

Отже, внесення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, до розчину казеїну з подальшою індукцією міцелоутворення супроводжується 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 та 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, які не містили ПФ, у водну фазу переходила невелика кількість сполук, що поглинали в ділянці 220-240 (амінокислоти) і 260-280 (білки), водночас у водному розчині були відсутні сполуки, які поглинали за 250 нм (рис. 27 А).

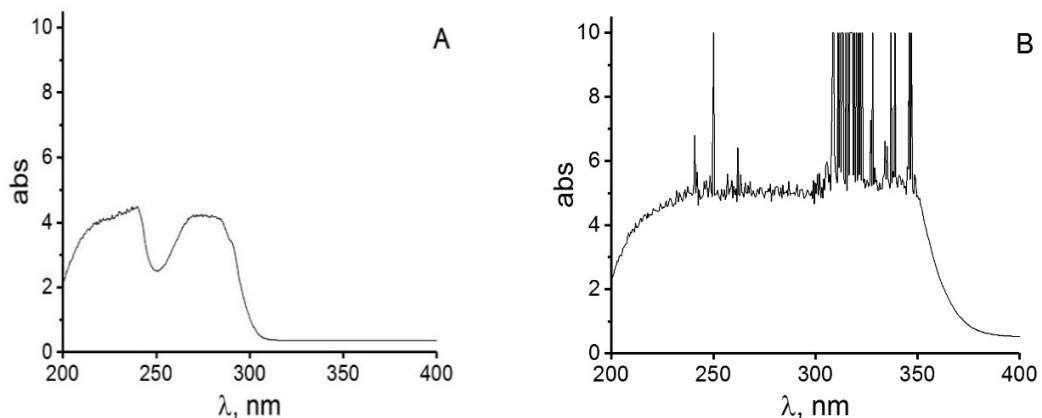


Рис. 27 Спектри поглинання речовин, що вивільнялися з казеїну, який не містив ПФ, після промивання 30 г казеїну 45 мл води та 15 хв інтенсивного перемішування з наступним осадженням казеїну центрифугуванням за 4 000 g упродовж 15 хв (А) а також спектри поглинання речовин, що вивільнялися за тих самих 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.

Установлено, що після водного промивання казеїну, до складу якого були включені ПФ сполуки, навпаки, значно збільшився перехід у водну фазу пептидів, які поглинають за 250 нм (рис. 27 В). Отже, включення ПФ до складу казеїнових міцел супроводжується такими перебудовами білкової частини міцел, що сприяли зменшенню ступеня їхнього "утримання" в складі цих комплексів. Це може слугувати непрямим доказом взаємодії поліфенольних сполук із міцелами казеїну. Ще одним доказом включення ПФ до складу міцел є зменшення кількості екстрагованих поліфенольних сполук із казеїнових міцел порівняно з кількістю ПФ, що залишилися в складі міцел (рис. 27 В). 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 ніж 0,75, але не більше ніж 1,5 г до 30 г казеїну (за сухим залишком). З'ясовано, що поліфенольні сполуки в складі міцел казеїну впливають на екстрактивність білків казеїну, що доводить їхню участь у зміні структурних характеристик білків у складі міцел.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дослідження розширюють наші знання про механізми дії багатокомпонентних субстанцій природного походження на біологічні системи, що перебувають у різних функціональних станах (вікові особливості, токсикози, фібрози). Запропоновано концепцію неспецифічної – горметичної дії низькомолекулярних компонентів на прикладі молозива та інших біологічно активних субстанцій ("Мікс-фактор"). Засвідчено відсутність токсичної дії низькомолекулярних компонентів молозива та можливість їх використання як продуктів функціонального харчування, що мають антитоксичну та гепатопротекторну дію. 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, що впливають на варіабельність складу молозива.

2. Розроблено "селективно-інтегративну" технологію одержання чотирьох субстанцій з молозива: ліпідну; казеїнову; фракцію низькомолекулярних білків та "ультрафільтрату", що дає змогу 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 рироботу, нормалізують змінені функції печінки.

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

5. Експериментально засвідчено відсутність токсичності у низькомолекулярних компонентів молозива, а також тільки за супервеликих доз (1-5 г/100г маси) факт індивідуальної непереносимості, що проявляється в порушенні функції травлення. У разі відсутності непереносимості, прийом таких великих доз низькомолекулярних компонентів молозива спричинює збільшення маси тіла тварин, тобто вони виконували трофічну функцію.

6. Розроблено нову експериментальну модель Су-індукованого фіброзу печінки та показано, що іони міді після багаторазових послідовних введень у дозі близько 33 % від летальної, як і відома модель тетрахлорметану, спричиняють прояв окислювального стресу, який і запускає формування фіброзу печінки.

7. Доведено, що залежно від дози низькомолекулярні компоненти молозива можуть проявляти властивості і прооксидантів, і антиоксидантів. У малих дозах

низькомолекулярні компоненти молозива (0,01 – 0,1 г/100 г маси тіла) є антиоксидантами, а у великих дозах (1 – 5 г/100 г) – 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-фактора" з питною водою в малих дозах (0,05 – 0,06 мл/100 г маси тіла) на пізніх етапах онтогенезу щурів (з 22 і навіть із 31-місячного віку) дещо підвищує тривалість життя, а у разі приймання "Мікс-фактора" з 31-місячного 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* як процедуру 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 перебудовою білкової частини міцел. Такі комплексні надмолекулярні сполуки можна використовувати як функціональні сполуки харчування.

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. 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).

8. Ohiienko 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. 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).

15. 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).

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 (Q3)**. (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. Ohienko 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)

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 °С та зберігалось не більше місяця. Розробили технологію яка дозволяла отримувати ліпідну фракцію, фракцію казеїну, яку висушували та зберігали за температури 4°С. 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 І 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 "ультрафільтрат"), що дає змогу зменшити природну варіабельність складу субстанцій молозива, що є важливим за їхнього практичного використання. Розроблена технологія дозволяє частково 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 маси тіла) низькомолекулярні компоненти молозива можуть виконувати функції антиоксидантів, а у великих дозах (1 – 5 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 тетрахлорметану, 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 cerevisiae* and *Pleurotus ostreatus* 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 cerevisiae*), 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.

Підписано до друку р. Папір офсетний.
Формат Умов. друк. арк. Тираж 100 прим. Зам.....
Друк
Тел./факс: e-mail:....