

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол №_____засідання кафедри

від “_____” _____2022 р.

**ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД
ТКАНИН МІОКАРДУ ТА СТАН ПРО/АНТИОКСИДАНТНОЇ
СИСТЕМИ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ СТАРІННІ**

Випускна кваліфікаційна робота

бакалавра денної форми

навчання за спеціальністю

091 «Біологія»

Алексейчук Лідії Миколаївни

Науковий керівник від кафедри

д.б.н. Данилович Ю. В.

Робота виконана у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії
ім. О. В. Палладіна під керівництвом ст. н. с. відділу біохімії ліпідів,
к.б.н. Горідько Т. М.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2021 р

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	–	активні форми кисню;
ГП	–	глутатіонпероксидаза;
ЖК	–	жирні кислоти;
ЗХ	–	загальний холестерол;
КАТ	–	каталаза;
ЛПВЩ	–	ліпопротеїни високої щільності;
ЛПНЩ	–	ліпопротеїни низької щільності;
ПНЖК	–	поліненасичені жирні кислоти;
ПОЛ	–	пероксидне окиснення ліпідів;
СОД	–	супероксиддисмутаза;
ФЛ	–	фосфоліпіди;
СВ	–	канабіноїдні рецептори;
DPG	–	дифосфатидилгліцерол;
ФААН	–	амідогідролаза жирних кислот;
LPC	–	лізофосфатидилхолін;
LPE	–	лізофосфатидилетаноламін;
NAE	–	N-ацилетаноламіни;
NO	–	оксид азоту;
NSE	–	N-стеароїлетаноламін;
PC	–	фосфатидилхолін;
PE	–	фосфатидилетаноламін;
PI	–	фосфатидилінозитол;
PPAR (α , β/δ , γ)	–	рецептори, що активуються проліфератором пероксисом;
PS	–	фосфатидилсерин;
SM	–	сфінгомієлін.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота викладена на 53 сторінках, ілюстрована 5 рисунками. Список використаних джерел включає 131 роботу.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, старіння, фосфоліпиди, холестерол, пероксидне окиснення ліпідів, окисна модифікація протеїнів, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, прозапальні цитокіни.

Об'єкт дослідження: специфічна дія N-стеароїлетаноламіну.

Методи дослідження: експериментальні моделі на тваринах, біохімічні, спектрофотометричні, тонкошарова хроматографія, імуноензимний аналіз, статистичні.

Дослідження проводились на білих безпородних щурах віком 9 місяців (молоді щури, контроль, n=10) та 24 місяця (старі щури, n=18). Групу старих щурів було розділено на дві групи, одній з яких (n=9) щоденно протягом 10 днів вводили *per os* водну суспензію NSE в дозі 50 мг/кг маси тіла, інша група (n=10) слугувала контролем за віком.

Спостерігали, що у старих щурів відбувається зниження активності основних антиоксидантних ензимів (СОД, КАТ, ГП), підвищення вмісту продуктів пероксидної модифікації ліпідів та протеїнів в плазмі крові тварин у порівнянні з молодими щурами. Також у старих щурів виявлено підвищення рівня ЛПНЩ та зниження рівня ЛПВЩ в плазмі крові на тлі збільшеного рівня триацилгліцеролів, а також вірогідне зростання вмісту прозапального цитокіну IL1-beta в сироватці крові. При цьому спостерігалось зниження рівнів основних фосфоліпідів у складі кардіоміоцитів.

Застосування NSE старим щурам сприяло відновленню активності основних антиоксидантних ензимів (СОД, КАТ, ГП), нормалізації вмісту нітрит-аніону та продуктів пероксидної модифікації ліпідів та протеїнів в плазмі крові тварин, вірогідне зниження вмісту IL1-beta та TNF α в крові тварин, нормалізацію ліпопротеїнового профілю (ЛПВЩ/ЛПНЩ) та

зниження вмісту триацилгліцеролів в крові щурів. Також відбувалось відновлення ФЛ складу кардіоміоцитів до рівня їх значення у молодих тварин.

Отримані результати розширюють наше уявлення про механізми біологічної дії N-стеароїлетаноламіну за старіння у ссавців та створюють підґрунтя для створення на його основі лікарського засобу для профілактики та лікування захворювань, що супроводжують процес старіння.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Теоретичні основи старіння	9
1.1.1. Проблеми старіння.....	9
1.1.2. Концепція успішного старіння	10
1.1.3. Вільно-радикальна теорія старіння	12
1.2 Стан ліпідів та протеїнів за старіння.....	13
1.2.1 Класифікація та функції ліпідів.....	14
1.2.2. Пероксидне окиснення ліпідів та окисна модифікація протеїнів	14
1.2.3. Антиоксидантна система захисту організму.....	18
1.3 Запальні процеси при старінні	19
1.4 Функціональна активність N-ацилетаноламінів	20
1.4.1. Біологічна роль N-стеароїлетаноламіну	23
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
2.1 Процедури з лабораторними тваринами.....	24
2.2 Екстракція ліпідів.....	24
2.3 Визначення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів..	25
2.3.1. Оцінка активності супероксиддисмутази	26
2.3.2. Визначення активності каталази	27
2.3.3. Дослідження активності глутатіонпероксидази	28
2.4 Визначення інтенсивності процесів окиснення протеїнів	29
2.5 Оцінка вмісту цитокінів IL1-beta та TNF α	29
2.6 Визначення вмісту триацилгліцеролів, ліпопротеїнів високої/низької щільності	29
2.7 Кількісне визначення індивідуальних фосфоліпідів	30
2.8 Статистичний аналіз	30

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	31
3.1 Дослідження про/антиоксидантного балансу в плазмі крові щурів різних вікових груп	31
3.2 Вивчення вмісту ТБК-реагуючих продуктів та продуктів окиснення протеїнів в плазмі крові щурів.....	31
3.3 Оцінка рівня ІЛ1-beta та TNF α в сироватці крові щурів	34
3.4 Дослідження вмісту ліпопротеїнів високої/низької щільності та триацилгліцеролів в крові щурів	36
3.5 Зміни фосfolіпідного складу міокарду щурів при старінні.....	37
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ВСТУП

Старіння є найбільш актуальною медичною та соціальною проблемою сьогодення. З віком погіршується фізичний та психічний стан людини, збільшується ризик розвитку хронічних захворювань [1]. Встановлено, що за старіння окислювальний стрес призводить до накопичення продуктів пероксидного окиснення ліпідів та підвищених уражень ядерної ДНК [2]. Також спостерігається зниження експресії сиртуїну 1 (SIRT1), рецептора гамма-коактиватора 1- α (PGC-1 α) та рівнів нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD⁺), що призводить до порушення регуляції гліколізу, синтезу триацилгліцеролів та ліпідного обміну [3].

Старіння є незворотнім біологічним процесом, але існують численні фактори та хронічні захворювання, що прискорюють процеси старіння, такі як кардіоваскулярні захворювання, рак, цукровий діабет, хронічний стрес, хронічні запальні процеси, деменція, нейродегенерація, які погіршують якість життя осіб похилого віку.

Тому постає питання, як продовжити життя людей і мінімізувати або навіть усунути вікові патологічні процеси в організмі.

Хоча дуже складно розгадати складність цього процесу, що включає генетичні та екологічні причини, все більша кількість даних вказує на ключову роль імунної системи. Більше того, дані свідчать про те, що контроль запального стану може дати більше шансів на «здорове» старіння.

Інтенсивне дослідження ендоканабіноїдної системи (ЕС) організму за останнє десятиліття надало велику кількість даних щодо важливої ролі ЕС за багатьох патологічних станів, включаючи діабет 2 типу, метаболічний синдром, рак, травми мозку, постратравматичні стани [4, 5]. З цієї причини одним з актуальних напрямків у фармакології є розробка синтетичних сполук, які здатні модулювати стан ЕС.

Відомо, що до ендоканабіноїдів належить клас мінорних ліпідів - N-ацилетаноламіни (NAEs), які володіють широким спектром біологічної активності та значним адаптогенним потенціалом.

Дослідженнями останніх десятирічч встановлено протекторну дію NAEs за ряду патологічних станів: ішемічно-реперфузійні пошкодження органів, інтоксикації різного генезу, цукровий діабет I типу та інсулінорезистентність, алергічні реакції, запальні процеси тощо. Причому насичені NAE (наприклад, N-пальмітоїл-, N-стеароїлетаноламін) підсилюють дію таких ненасичених NAE, як анандамід, олеамід та ін., здійснюючи комплексний протекторний вплив на ушкоджені тканини.

Отже, **метою досліджень** було з'ясувати можливі механізми геропротекторної дії N-стеароїлетаноламіну за старіння у ссавців.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Дослідити вплив NSE на інтенсивність оксидативного стресу та антиоксидантний потенціал плазми крові щурів при старінні.
2. Оцінити вплив NSE на ліпопротеїновий профіль та рівень маркерів запалення в плазмі крові щурів при старінні.
3. Вивчити дію NSE на фосfolіпідний склад міокарду старих щурів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Теоретичні основи старіння

Всі багатоклітинні організми з часом змінюються – старіють. Старіння – постійний поступовий фізіологічний розпад клітин [6], що характеризується прогресивними змінами тканин або органів, які призводять до зниження їх функцій та смерті.

Старіння можна розглядати по-різному відповідно до соціальних, поведінкових, фізіологічних, морфологічних, клітинних та молекулярних змін. Його загальними ознаками є: втрата еластичності шкіри, зниження м'язової сили, втрата волосся, зниження імунітету, розвиток атеросклерозу та формування катаракти.

Старіння в біології – безперервний процес, який починається із зачаття і триває до смерті. По біологічному віку організму можна визначити наявність або відсутність патологічних процесів. У 1948 р. Sheldon визначив захворювання, які відносяться до старіння [7]. Сюди належать серцево-судинні захворювання, рак, інсульт та деменція. Вважається, що їх розвиток є частиною «нормального» старіння.

1.1.1. Проблеми старіння

Кількість людей віком від 65 років невпинно збільшується. За прогнозами, вона зросте з 524 мільйонів в 2010 році до майже 1,5 мільярда в 2050 році [8]. Однак з віком погіршується фізичний та психічний стан людини, збільшується ризик розвитку хронічних захворювань.

Щодня від вікових причин помирає 100 000 людей [9]. За оцінками, в 2016 році від серцево-судинних захворювань померло 17,9 мільйонів чоловік, що складає 31% усіх випадків смертей в світі. З них 85% пов'язані з серцевим нападом та інсультом, і одна третина цих смертей відбувається передчасно у людей у віці до 70 років [10].

В Україні особливо спостерігається ця тенденція. За статистикою, основною причиною смерті в Україні протягом останніх років є серцево-судинні захворювання (67%). Щорічно від цих хвороб помирає понад 400 тисяч українців (у середньому щодня помирає більше 1 тисячі осіб) [11].

Тому збільшення тривалості життя може бути як ознакою успіху, так і навпаки. Як наслідок, люди можуть довше жити, але мати вікові хронічні захворювання і страждати від них.

Тому постає питання, як продовжити життя людей і мінімізувати або навіть усунути вікові патологічні процеси в організмі.

1.1.2. Концепція успішного старіння

Ця концепція вперше була запропонована Цицероном: «Похилий вік не є фазою занепаду та втрат, а натомість, якщо підійти належним чином, створює можливість позитивних змін та продуктивного функціонування» [12].

Хоча сучасні теорії старіння зосереджені на втратах та занепаді, існують докази, які підтверджують теорії Цицерона. Як показують довготривалі геронтологічні дослідження, існує велика мінливість старіння. Вони припускають існування індивідуальної пластичності та прихованих резервів для навчання у людей похилого віку [13].

Традиційні визначення успішного старіння підкреслюють відсутність фізичних та когнітивних вад [14].

Медична модель успішного старіння покладається на динамічну взаємодію між тривалістю життя та віком виникнення хронічних захворювань чи інвалідності. Якщо вік виникнення хвороби стане більшим за тривалість життя, природний біологічний термін життя закінчиться до початку хвороби. Люди зможуть довше жити здоровими [1].

У своїй статті 1987 року Rowe, Kahn характеризували успішне старіння, як те, що включає три компоненти:

- свободу від хвороб та інвалідності;
- високе когнітивне та фізичне функціонування;
- соціальну та продуктивну діяльність [15].

Цілком ймовірно, що старіння виникає внаслідок безлічі причин, як екологічних (зовнішніх), так і генетичних (внутрішніх), які взаємодіють між собою.

Rowe, Kahn припустили, що існує динамічна взаємодія між внутрішніми і зовнішніми факторами. Запропоновано, що при успішному процесі старіння зовнішні фактори відіграють нейтральну або позитивну роль [16].

Тож вважається, що старіння може бути не лише етапом занепаду, а й продуктивним етапом розвитку, коли організми мають гарні показники психічного та фізичного стану.

Існує багато теорій, які намагаються пояснити процес старіння. В цій роботі ми зупинимось на одній із них, яка має пряме відношення до нашого дослідження.

1.1.3. Вільно-радикальна теорія старіння

Вільні радикали, реактивні форми кисню або оксидативний стрес викликають пошкодження, симптоми яких ми розпізнаємо як старіння [17, 18].

Вільні радикали – токсичний побічний продукт нормального клітинного обміну. Антиоксиданти нейтралізують вільні радикали. Але частина, яка уникає нейтралізації, може пошкодити ДНК, білки та мітохондрії. Це окислювальне пошкодження накопичується з часом. Оксидативні пошкодження сприяють багатьом віковим захворюванням: раку, захворюванням серця, діабету та хворобі Альцгеймера.

Багато вчених акцентують увагу на специфічному впливі вільних радикалів на мітохондрії. Понад 90% вільних радикалів клітини виробляється в мітохондріях, тому вони знаходяться під вищим ризиком пошкодження. Окислювальні вільні радикали, якщо швидко їх не нейтралізувати антиоксидантами, можуть завдати значної шкоди мембранам мітохондрій та мітохондріальній ДНК.

Докази свідчать, що здатність мітохондрій відновлювати пошкодження ДНК з віком знижується. З часом уражені мітохондрії стають настільки неефективними, що вони не здатні генерувати достатню кількість енергії для задоволення потреб клітин.

Також від оксидативного стресу страждають клітинні мембрани, перш за все через пероксидне окиснення ліпідів, які входять до їх складу [19].

1.2 Стан ліпідів та протеїнів за старіння

1.2.1 Класифікація та функції ліпідів

Ліпіди – це нерозчинні у воді біомолекули, але розчинні в органічних розчинниках [20]. Їх класично поділяють на дві групи: неполярні та полярні [21].

До неполярних ліпідів належать вільні жирні кислоти та їх ефіри, моно-, ди- і триацилгліцерини, стерини та воски. Тригліцериди накопичуються у різних клітинах, але особливо в жировій тканині і, як правило, є основною формою зберігання енергії у ссавців [22, 23]. Полярні ліпіди є структурними компонентами клітинних мембран. Вони беруть участь у формуванні бар'єру клітин і субклітинних органел. До них належать фосфо- та гліколіпіди. Для більшості мембран характерним є фосфоліпід на основі гліцерину [24].

Прикладами гліцерофосфоліпідів, виявлених в біологічних мембранах, є фосфатидилхолін (PC), фосфатидилетаноламін (PE), фосфатидилсерин (PS), фосфатидна кислота (PA), фосфатидилінозитол (PI), фосфатидилгліцерин (PG). Деякі гліцерофосфоліпіди, такі як фосфатидилінозитол і фосфатидні кислоти, є або попередниками або вторинними месенджерами, що походять з мембран [25].

До фосфоліпідів також належить свінгомієлін, що входить до складу тваринних мембран, особливо його багато в мієліновій оболонці аксонів нервових клітин.

Стерини, такі як холестерол і його похідні, також є важливим компонентом мембран [26].

Оскільки ліпіди нерозчинні у воді, вони транспортуються разом із протеїнами. Ліпопротеїни – це складні молекули, які мають гідрофобне ядро із неполярних ліпідів, насамперед ефірів холестеролу та тригліцеридів. Ліпопротеїни відіграють ключову роль у всмоктуванні та транспортуванні харчових ліпідів тонким кишечником, у транспорті ліпідів з печінки до

периферичних тканин та з периферичних тканин до печінки та кишечника [27]. Виділяють два типи ліпопротеїнів, що переносять холестерол по всьому організму:

- ЛПНЩ (ліпопротеїни низької щільності) – основні переносники холестеролу в крові. Рівень ЛПНЩ корелює з високим ризиком розвитку атеросклерозу.
- ЛПВЩ (ліпопротеїни високої щільності). Поглинають холестерол і переносять його назад у печінку [28].

Ліпіди контролюють фізіологічний стан мембранних органел, змінюючи їх біофізичні аспекти, такі як полярність та проникність. Ліпіди також відіграють ключову роль у біології як сигнальні молекули. Тому сталість їх складу є показником нормального функціонування організму.

Під час старіння відбуваються зміни вмісту ліпідів і ліпід-білкових взаємодій в деяких тканинах і органах, включаючи серце [29, 30, 31, 32].

При старінні відбувається прискорене утворення супероксидних радикалів в мітохондріях серця, що є причиною зниження активності ензимів і, відповідно, зниження дихальної функції мітохондрій [33, 34]. Накопичення вільних радикалів в клітинах літніх тварин вважається центральним механізмом процесу старіння і залежить від підвищеного пероксидного окиснення ненасичених мембранних ліпідів [35, 36].

1.2.2. Пероксидне окиснення ліпідів та окисна модифікація протеїнів

Одним із наслідків неконтрольованого оксидативного стресу (дисбалансу між рівнем прооксидантів та антиоксидантів на користь прооксидантів) є пошкодження клітин, тканин та органів.

Високий вміст вільних радикалів або активних форм кисню (АФК) може завдати прямої шкоди ліпідам.

Двома найбільш поширеними АФК, які можуть ефективно взаємодіяти з ліпідами, є гідроксильний ($\text{HO}\cdot$) і гідропероксильний ($\text{HO}_2\cdot$) радикали. Гідроксильний радикал ($\text{HO}\cdot$) являє собою невеликий, нестабільний, хімічно найактивніший вид активованого кисню. Він може утворюватись з O_2 в клітинному метаболізмі і при різних стресових умовах. Клітина виробляє близько 50 гідроксильних радикалів кожену секунду. За повний день кожна клітина генерує 4 мільйони гідроксильних радикалів, які можуть бути нейтралізовані або атакувати біомолекули.

Пероксидне окиснення ліпідів можна загалом описати як процес, при якому оксиданти атакують ліпіди, що містять подвійний зв'язок вуглець-вуглець, особливо поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), в яких відбувається відщеплення водню від атому вуглецю з приєднанням до нього кисню, що призводить до утворення пероксидних радикалів ліпідів і гідропероксидів.

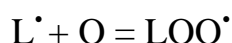
Гліколіпіди, фосфоліпіди та холестерол також піддаються ушкодженню та потенційно летальній перикисній модифікації.

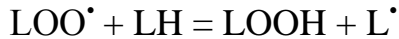
Загальний процес пероксидного окиснення ліпідів складається з трьох етапів: ініціації, розвитку ланцюга і термінації (обриву ланцюга) [37].

На стадії ініціації прооксидант, такий як гідроксильний радикал, відбирає водень від CH_2 - груп ненасиченої жирної кислоти L, що призводить до утворення ліпідного радикала $\text{L}\cdot$:



У фазі розвитку ланцюга ліпідний радикал ($\text{L}\cdot$) швидко реагує з киснем з утворенням пероксидного радикала ліпіда ($\text{LOO}\cdot$), який відбирає водень з іншої молекули ліпіду, утворюючи новий $\text{L}\cdot$ (який продовжує ланцюгову реакцію) і гідропероксид ліпіду (LOOH):





На етапі термінації антиоксиданти, такі як вітамін Е, віддають атом водню LOO^\bullet і утворюють відповідний радикал вітаміну Е, який реагує з іншими LOO^\bullet , утворюючи нерадикальні продукти:



Отже, при ланцюговій реакції окиснення, кількість радикалів підтримується на сталому рівні, а кількість гідропероксидів зростає.

Продукти ПОЛ проявляють негативний вплив на структуру і функцію клітинних мембран, впливають на фізико-хімічні властивості ліпідних рафтів [38]. Це пояснюється взаємодією їх з NH_2 -групами протеїнів і фосфоліпідами, що призводить до утворення міжбілкових, міжліпідних і ліпідбілкових зв'язків та порушення конформації клітинних мембран, зниження в них активності ліпідзалежних ензимів. Зміна щільності клітинних мембран внаслідок ПОЛ сприяє контакту білкових компонентів із протеїназами, що спонукає їх до руйнування. Одночасно з цим продукти ПОЛ окиснюють SH-групи до S-S-груп, що призводить до зниження активності ензимів клітинних мембран [39, 40].

АФК викликають і окислювальну модифікацію протеїнів [41, 42, 43]. Посилення окисної деструкції протеїнів, як і пероксидації ліпідів, відіграє важливу роль в структурно-функціональних змінах мембран різних органів і тканин [44], що завжди тягне за собою порушення клітинного гомеостазу [45]. Окислювальна модифікація протеїнів - один з ранніх індикаторів ураження тканин при патології [46].

Найбільш вразливою мішенню дії вільних радикалів при старінні є мембранні протеїни. При старінні модифікація процесів ПОЛ в ядерному хроматині призводить також до пероксидної деструкції його протеїнів, зокрема, пов'язаних з ним ДНК- і РНК-полімераз, активність яких в хроматині в процесі старіння істотно змінюється, що спотворює процес зчитування генетичної інформації в клітині [47, 48].

Продукти вільнорадикального пероксидного окиснення також можуть виступати своєрідними біомаркерами ушкодження тканин, оскільки за їх вмістом можна судити про інтенсивність перебігу вільнорадикальних процесів у різних системах організму [49]. Найбільш важливими біомаркерами є продукти окиснення поліненасичених жирних кислот, зокрема такі, як малоновий діальдегід, гідропероксили ліпідів та ряд інших продуктів ПОЛ [50].

Малоновий діальдегід широко застосовується як біомаркер пероксидного окиснення ліпідів через легку реакцію з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [51, 52].

В процесі окислювальної модифікації протеїну утворюються різні стабільні метаболіти амінокислот. Метод визначення продуктів пероксидного окиснення протеїнів заснований на тому, що кінцеві продукти вільнорадикального окиснення протеїнів можуть кількісно реагувати з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів.

За фізіологічних або низьких показників пероксидного окиснення (субтоксичні умови) клітини стимулюють свій захист та виживання за допомогою активної системи антиоксидантів або активації сигнальних шляхів, що призводить до адаптивного реагування на стрес.

При середній або високій інтенсивності пероксидного окиснення (токсичні умови) ступінь окислювальної шкоди перевищує репараційну здатність, а клітини піддаються апоптозу; обидва процеси врешті-решт призводять до молекулярних пошкоджень клітин, що сприяє розвитку різних патологічних станів та прискореному старінню [53, 54, 55, 56].

1.2.3. Антиоксидантна система захисту організму

Пероксидне окиснення відіграє важливу роль у метаболізмі всіх живих організмів. Воно ініціюється активними формами кисню (АФК) [57, 58].

Під впливом негативних факторів посилюються процеси пероксидного окиснення внаслідок накопичення АФК, в результаті чого у клітинах виникає оксидативний стрес. В свою чергу надлишок АФК у клітинах спричиняє руйнування ліпідів, протеїнів та нуклеїнових кислот, призводячи до накопичення продуктів пероксидного окиснення [57].

Аеробні організми мають інтегровані антиоксидантні системи. Ряд авторів умовно розподіляють систему антиоксидантного захисту на ферментативну і неферментативну [59, 60, 61].

До ферментативної системи належать: каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза, та інші ензими.

До неферментативної системи належать: жиророзчинні вітаміни А, Е і К, водорозчинні вітаміни С і РР, біогенні аміни, глутатіон, каротиноїди, убіхінон, стерини. Як ферментативна, так і неферментативна системи антиоксидантного захисту наявні у кров'яному руслі.

Глутатіон є центральним компонентом антиоксидантних систем майже всіх клітин і органів [62].

Глутатіонпероксидаза – є одним з ключових ензимів антиоксидантної системи організму тварин, основною функцією якого є руйнування і інактивація перекису водню і гідропероксидів – токсичних сполук кисню. Глутатіонпероксидаза забезпечує захист мембран клітин від руйнівної дії пероксидних радикалів. До того ж вона каталізує розпад перекису водню і окислює глутатіон [63].

Супероксиддисмутаза з каталазою та іншими антиоксидантними ензимами захищає організм від високотоксичних кисневих радикалів.

Супероксиддисмутази – металовмісні ензими, які каталізують реакцію інактивації супероксидних радикалів з утворенням перекису водню і кисню, і таким чином беруть участь у регуляції вільнорадикальних процесів у живих клітинах на початковій стадії. СОД знаходиться в усіх клітинах, що поглинають кисень [64].

Важливо відзначити, що як зниження, так і підвищення активності СОД є причиною розвитку патологічних процесів. У першому випадку внаслідок недостатнього захисту від активних форм кисню, у другому – в результаті посилення цитотоксичної дії перекису водню, що утворюється в результаті дисмутації супероксиду.

Каталаза – ензим класу оксиредуктаз, що бере участь у дезінтоксикації нерадикальної активної форми кисню – H_2O_2 [65]. В найбільшій кількості каталаза знаходиться в клітинах печінки, нирок, еритроцитах.

Отже, антиоксидантна система захисту клітини від вільнорадикального пероксидного окиснення зберігає оптимальний метаболічний баланс клітини.

1.3 Запальний процес при старінні

Існують обґрунтовані докази того, що старіння є низькоградієнтним системним запальним станом [66, 67, 68], про що свідчить підвищена продукція запальних цитокінів.

У відповідь на пошкодження тканин, спричинених травмою або інфекцією, цитокіни ініціюють та регулюють гостру фазу відповіді. Цей складний каскад призначений для ізоляції та знищення мікробних збудників, активізації процесів відновлення тканин і повернення до фізіологічного гомеостазу.

Інтерлейкін IL1-beta та фактор некрозу пухлини TNF α є найбільш ранніми медіаторами гострої фази відповіді. Обидва цитокіни індукують другу хвилю цитокінів.

Порушення процесу вироблення прозапальних цитокінів відіграє важливу роль у процесі старіння. Однак збільшення циркулюючих запальних показників не дуже помітне у здорових людей похилого віку та далеко від рівнів, що спостерігаються під час гострих інфекцій. Відповідно, старіння пов'язане з хронічною слабо вираженою запальною діяльністю [69].

В даний час вважається, що хронічне запалення є фактором ризику для широкого спектру вікових захворювань, таких як гіпертонія, діабет, атеросклероз і рак. Багато тканин у літніх людей хронічно запалені і відомо, що прозапальні цитокіни, такі як IL-6, IL1-beta і TNF α , послаблюють анаболічні процеси, змінюючи передачу сигналів інсуліну і еритропоєтину, що призводить до розвитку саркопенії [70].

Отже, при старінні хронічні запальні процеси можуть спричиняти несприятливі патологічні стани.

1.4 Функціональна активність N-ацилетаноламінів

Дослідження останніх років показали, що ендоканабіноїди та їхні рецептори регулюють багато фізіологічних процесів, а саме: функціонування кардіоваскулярної системи, нейротрансмісію, імунну відповідь, пам'ять, апетит тощо [71]. На сьогодні доведена їхня роль у регуляції як вуглеводного, так і ліпідного обміну [72]. До ендоканабіноїдної системи відносять й N-ацилетаноламіни – клас ендогенних сигнальних ліпідів, що є частиною великої групи ендоканабіноїдів [73], і впливають на широкий спектр біологічних процесів в організмі.

N-ацилетаноламін (NAE) - амід жирних кислот, що утворюється, коли ацильна група зв'язується з атомом азоту етаноламіну [74]. N-ацилетаноламінові фосфоліпіди зустрічаються у природі у багатьох рослинних тканинах, деяких мікроорганізмах та центральній нервовій системі риб, а також в епідермісі та еритроцитах ссавців [75]. NAEs відносять до мінорних ліпідів, оскільки в нормі в організмі вони знаходяться в пікомолярних кількостях [76].

У тварин NAE спочатку виділяли з яєчних жовтків [77], а згодом із тканин щурів та морських свинок, таких як мозок, печінка та скелетні м'язи [78]. Шмідт та його група ретельно дослідили біосинтетичні та деградаційні шляхи NAEs у ссавців та показали, що NAEs утворюються в основному з гліцерофосфоліпідів через N-ацильовані фосфоліпіди етаноламіну [79].

До NAEs належать:

1. Анандамід (N-арахідоноїлетаноламін) - амід арахідонової кислоти та етаноламіну. Є лігандом для канабіноїдних і ванілоїдних рецепторів, послаблює больові відчуття [80, 81, 82, 83].
2. N-пальмітоїлетаноламін - це амід пальмітинової кислоти та етаноламіну. Є лігандом для CB2 рецепторів [84, 85]. Має протизапальну активність, а також послаблює больові відчуття у ссавців [86, 87].
3. N-олеоїлетаноламін є амідом олеїнової кислоти та етаноламіну. Він має анорексичну дію і забезпечує розщеплення жиру [88]. У людей рівень N-олеоїлетаноламіну в плазмі крові також позитивно корелює з позитивним настроєм та емоціями [89]. Він діє переважно на ядерні рецептори, що активуються проліфератором пероксисом (PPAR- α), і певною мірою на канали TRPV1 [90].
4. N-стеароїлетаноламін є амідом стеаринової кислоти та етаноламіну. Він має проапоптотичну активність. Діє незалежно від відомих канабіноїдних та ванілоїдних рецепторів, націлених на анандамід

[91]. Він є інгібітором сигнального шляху сфінголіпідів за рахунок специфічного інгібування керамідази, і блокує вплив TNF- та арахідонової кислоти на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} [92, 93, 94].

Всі вони входять до складу складної ліпідної сигнальної системи, що складається з більш ніж 100 медіаторів та їх рецепторів, анаболічних та катаболічних ферментів, понад 50 протеїнів, які контролюють енергетичний обмін та його патологічні відхилення [95]. NAEs також беруть участь у модуляції різних фізіологічних процесів, таких як біль, стрес, апетит, серцево-судинна функція та запалення.

Особливістю сполук, об'єднаних у клас NAEs, є те, що в нормі вони присутні в тканинах організму в дуже незначній кількості, проте в умовах патології їх вміст зростає на декілька порядків [96]. Сьогодні доведено, що синтез цих ліпідів відбувається «on demand» – тобто за потребою організму [97].

NAEs демонструють різноманітну біологічну активність [98, 99, 100]. Вони відновлюють ліпідний склад мембран [101], впливають на роботу каналних протеїнів, а отже і на процеси трансмембранного транспорту [102], мають антиоксидантний вплив, що реалізується на рівні модифікації ліпідного бішару мембран. А також проявляють протизапальну, антианафілактичну та антисеротонінову активність [98].

Показано, що NAEs інгібують пероксидне окиснення ліпідів [103, 104]. N-Олеоїлетаноламін пригнічує вироблення речовин, які реагують на тіобарбітурову кислоту, в ізольованих мітохондріях серця щурів, оброблених системою, яка генерує вільні радикали [98].

Мембранно стабілізуючий ефект NAE: при інфаркті міокарда знижується відносна кількість фосfolіпідів етаноламіну та утворюються довголанцюгові N-ацилетаноламіни. Відновлення клітин міокарда від ішемічної травми залежить від виживання функцій мітохондрій [105, 106].

Відповідно ці функції залежать від цілісності внутрішньої мембрани та N-ацилетаноламінів, які її стабілізують.

1.4.1. Біологічна роль N-стеароїлетаноламіну

N-стеароїлетаноламін (NSE) - насичений N-ацилетаноламін (NAE).

NSE представляє значний інтерес для фармакологів через його численні терапевтичні ефекти: здатність модулювати імунні функції [107], викликати протизапальний [108], мембранопротекторний та анксиолітичний ефекти [109].

NSE пригнічує продукцію цитокінів IL1-beta, IL-6 та TNF [110], стабілізує вміст ненасичених жирних кислот, підвищує рівень фосфатидилінозитулу, гальмує накопичення лізофосфоліпідів у клітинах уражених органів [111].

Було виявлено, що насичені NAE модулюють активність ензимів антиоксидантної системи, продукцію NO, а також пригнічують процеси утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів за різних патологічних станів [109].

Отже, NAEs, зокрема NSE, демонструють різноманітну біологічну активність та представляють інтерес як лікарський засіб для профілактики та лікування захворювань, що супроводжують процес старіння.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Процедури з лабораторними тваринами

Дослідження проводились на білих безпородних щурах віком 9 міс (молоді щури, контроль, n=10) та 24 міс (старі щури, n=18). Тварин вводили в стан наркозу шляхом витримування у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. Усі маніпуляції з тваринами були проведені відповідно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986).

Старим щурам (n=9) щоденно протягом 10 днів вводили *per os* водну суспензію NSE в дозі 50 мг/кг маси тіла. Воду та збалансований гранульований раціон тварини отримували *ad libitum*. Експерименти проводили у відповідності до правил етичної комісії Інституту біохімії НАН України.

2.2 Екстракція ліпідів

Екстракцію ліпідів серця щурів проводили за методом Bligh і Dyer [112]. Для зменшення адсорбції аніонних фосфоліпідів на протеїни та для більш повного виділення цих сполук використовували водну фазу з іонами кальцію згідно рекомендації Palmer [113]. Заморожені серця зважували та розтирали у порцеляновій ступці. Потім розтерту до порошку тканину пересипали до скляного гомогенізатора і додавали екстрагуючу суміш – хлороформ : метанол (1:2) до кінцевого співвідношення розчинників хлороформ : метанол

: вода (1:2:0,8), враховуючи при цьому, що 1 г сирової тканини містить близько 0,8 г води. Отриману суміш гомогенізували протягом 30 хвилин. Для розшарування системи на водну та збагачену ліпідами хлороформну фазу додавали ще один об'єм хлороформу та 0,9 % розчин хлористого кальцію до одержання кінцевого співвідношення розчинників – водна фаза: хлороформ: метанол – 0,9 :1 :1.

Для прискорення розділення фаз гомогенат центрифугували протягом 10 хвилин при $(2,0-3,0) \times 10^3$ об/хв на центрифугі К-23 (Росія). Нижню хлороформну фазу забирали, а до водно-метанольної фази додавали такий самий об'єм хлороформу для повторного екстрагування. Після центрифугування знову відбирали хлороформний шар. Екстрагування повторювали тричі. Хлороформні фази об'єднували та випарювали. До обробки ліпідні екстракти (у певному об'ємі бензолу) зберігали у холодильній камері при -18°C .

2.3 Визначення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів

Визначення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) проводили за накопиченням ТБК-активних продуктів (МДА), як описано в роботах [114, 115]. При цьому використовували 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,35), 0,75% водний розчин тіобарбітурової кислоти та 35% розчин трихлороцтової кислоти. Фотометрію проводили при довжині хвилі 532 нм на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) по відношенню до контрольних розчинів реактивів. Кількість речовин, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (S), розраховували за формулою:

$$E \cdot V / K \cdot a,$$

де E – екстинкція розчину вимірюваного зразка, V – об'єм реакційної суміші, K – коефіцієнт молярної екстинкції для малонового діальдегіду ($0,156 \text{ нмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); a – кількість білка у зразку, мг; або a – вага тканини у пробі, 20 мг.

2.3.1. Оцінка активності супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] в плазмі крові та міокарді щурів визначали за ступенем зниження відновлення нітросинього тетразолію в присутності NADH та феназинметасульфату за методом [116].

Принцип визначення ґрунтується на відновленні нітросинього тетразолію супероксидними радикалами, які утворюються в реакції між феназинметасульфатом і NADH. Утворення нітроформазау, продукту відновлення нітротетразолію, блокується СОД. Отже, за кількістю нітроформазау в пробі можна оцінити активність СОД.

До 1 мл плазми крові чи 1 мл 10 % гомогенату тканини додавали 0,75 мл 96 % етанолу, 0,375 мл хлороформу і для прискорення розділу фаз додавали 300 мг KH_2PO_4 . Після ретельного струшування та центрифугування протягом 40 хв при 1500 g у супернатанті визначали активність СОД.

До інкубаційної суміші (1,5 мл 0,15 М фосфатного буферу, 0,49 мкМ EDTA- Na_2 , 2 мкМ нітросинього тетразолію, 90 мкМ феназинметасульфату, рН 7,8) вносили 0,1 мл супернатанту. Холоста проба містила 0,1 мл води. Реакцію запускали додаванням 0,05 мл 3 мМ розчину NAD·H у 1 М TRIS-EDTA буфері, рН 8,0. Після інкубації (10 хв при 20 — 22 °С у темряві) вимірювали величину оптичної густини досліджуваних проб на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 540 нм проти контролю, який містив всі компоненти, окрім NAD·H.

Відсоток блокування утворення нітроформазау розраховували за формулою:

$$\frac{E_{хол} - E_{досл}}{E_{хол}} \times 100, \% \text{ де}$$

$E_{хол}$ — екстинкція холостої проби;

$E_{досл}$ — екстинкція дослідної проби

Активність СОД визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартного розчину СОД (10000 МО/мл, виробництво Mites, США).

2.3.2. Визначення активності каталази

Активність каталази [КФ 1.11.1.6] в міокарді і плазмі крові щурів визначали за швидкістю розпаду пероксиду водню за методом Королюк [117].

До 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 (готували *ex tempore*) вносили 0,05-0,1 мл 10 % гомогенату тканин чи плазми крові, а в холосту пробу вносили відповідну кількість H_2O . Реакцію зупиняли через 0,5-1,5 хв додаванням 1 мл 4 % розчину молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення комплексу, що утворився за реакції молібдату амонію і перекис водню, що не розклався каталазою, вимірювали на спектрофотометрі при 410 нм проти контрольної проби, в яку замість H_2O_2 вносили 2 мл H_2O . Холоста проба містила 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 , 1 мл 4 % розчину молібдату амонію та відповідний пробі об'єм води. Кількість проби і час інкубації кожного разу підбирали експериментально, враховуючи те, що активність каталази у різних тканинах відрізняється і за певний час перекис водню у середовищі інкубації може розкластися повністю, тож забарвлення не отримаємо. Так, для визначення активності каталази у тканинах серця і легень відбирали 0,05 мл 10 %

гомогенату, час інкубації становив 1,5 хв. В печінці — відбирали 0,03 мл 10% гомогенату, час інкубації становив 30 с; в плазмі крові — відбирали 0,02 мл плазми, час інкубації становив 1 хв. Активність ензиму виражали у мкмоль пероксиду водню, що був розкладений у ензиматичній реакції і розраховували за формулою:

$$\frac{(E_0 - E_1) \cdot V_0}{V_1 \cdot 0,034 \cdot t \cdot P}, \text{ мкмоль} \cdot (\text{хв} \cdot \text{мг білку})^{-1}, \text{ де}$$

E_1 — екстинкція дослідної проби;

E_0 — екстинкція холостої проби;

V_0 — загальний об'єм інкубаційної суміші, мл;

V_1 — об'єм дослідної проби, мл;

0,034 — коефіцієнт перерахунку вмісту H_2O_2 на мкмоль;

t — час реакції, хв;

P — вміст білку у пробі, мг/мл.

2.3.3. Дослідження активності глутатіонпероксидази

Активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.1.9] визначали за накопиченням у середовищі інкубації окисленого глутатіону [118]. До інкубаційної суміші, що містила 1 мл фосфатного буферу (0,3 М, рН 7,4), 12 мМ азида натрію, 6 мМ EDTA та 0,5 мл 2,5 мМ відновленого глутатіону додавали 0,1 мл 10 % гомогенату тканини чи плазми крові. Реакцію запускали додаванням 0,5 мл 1,8 мМ H_2O_2 . Через 2 хв інкубації при 37 °С реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10 % розчину ТХО. Після центрифугування при 1500 g протягом 15 хв визначали екстинкцію окисленого глутатіону на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 260

нм. Активність ензиму виражали у нмоль окисленого глутатіону, що утворився за 1 хв і розраховували на 1 мг білку.

2.4 Визначення інтенсивності процесів окиснення протеїнів

Інтенсивність процесів окиснення протеїнів в міокарді оцінювали за вмістом 2,4-динітрофенілгідразонів (2,4-ДНФГ) — стабільних продуктів, що утворюються в результаті реакції взаємодії карбонільних груп окиснених амінокислотних залишків протеїнів з 2,4-динітрофенілгіdraзином [119, 120]. Вміст 2,4-дифенілгідразонів розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $21,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.5 Оцінка вмісту цитокінів IL1-beta та TNF α

Визначення вмісту цитокінів IL1-beta та TNF α в крові щурів проводили імуноензимним методом за допомогою комерційних наборів “Invitrogen Rat IL1-beta ELISA Kit” та “Invitrogen Rat TNF alpha ELISA Kit” (Thermo Fisher Scientific, Австрія).

2.6 Визначення вмісту триацилгліцеролів, ліпопротеїнів високої/низької щільності

Вміст триацилгліцеролів, ЛПНЩ та ЛПВЩ в крові щурів визначали за допомогою комерційних наборів («Філісіт-діагностика», Україна).

2.7 Кількісне визначення індивідуальних фосфоліпідів

Фосфоліпіди розділяли методом двовимірної тонкошарової хроматографії. У першому напрямку використовували систему для розділення : хлороформ (65) : метанол (30) : аміак (6) : бензол (10), а у другому напрямку – хлороформ (5) : метанол (1) : оцтова кислота (1) : вода (0,5) : ацетон (2) [121, 122]. Вміст фосфоліпідів оцінювали за кількістю неорганічного фосфору у ліпідних екстрактах, який визначали методом Васьковського і Костецького [123].

2.8 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили з використанням t-критерію Стьюдента; вірогідними вважали зміни при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження про/антиоксидантного балансу в плазмі крові щурів різних вікових груп

На рис. 3.1 показано активність антиоксидантних ензимів в плазмі крові щурів – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази (відповідно СОД, КАТ та ГП).

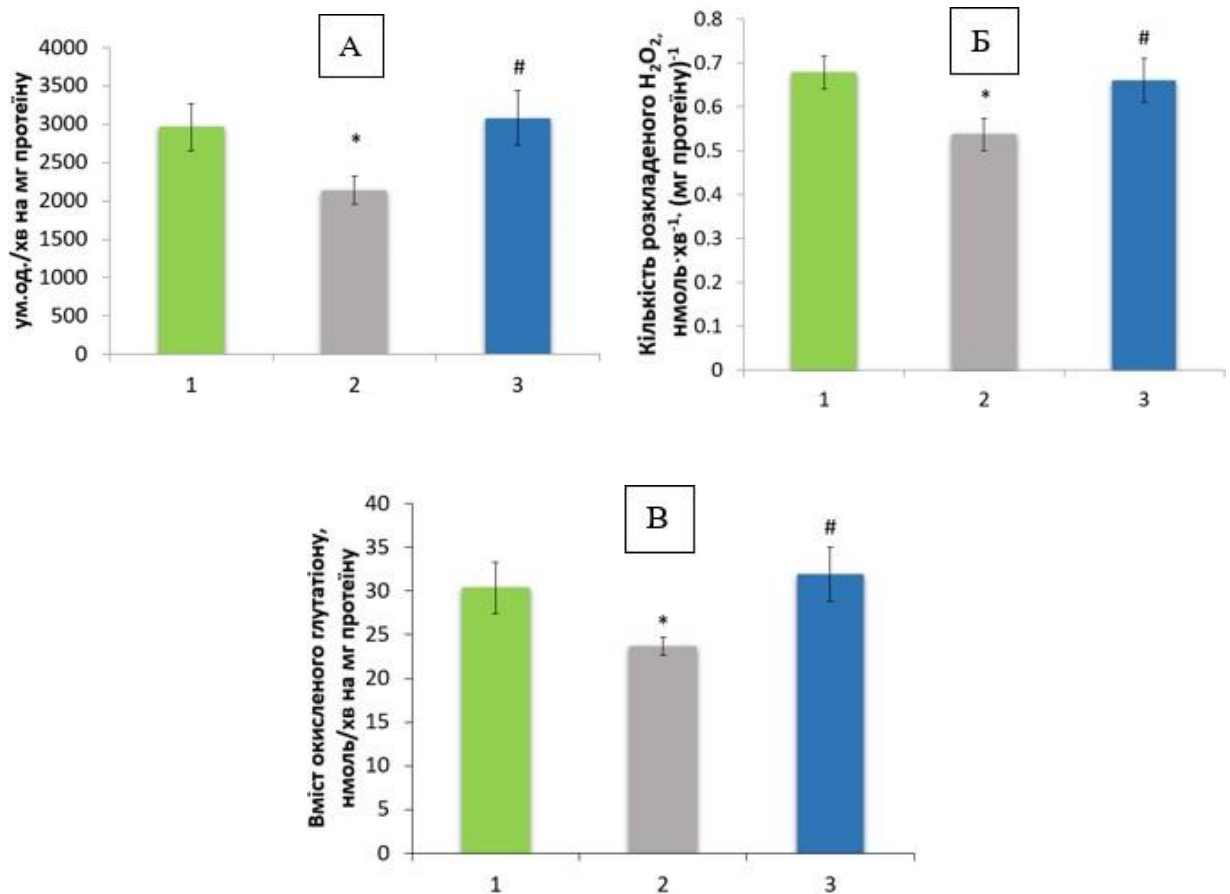


Рис. 3.1. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б) та глутатіонпероксидази (В) в плазмі крові щурів; $M \pm m$, $n=9-10$, $p \leq 0,05$.

Примітка 1. 1 – Молоді щури;

Примітка 2. 2 – Старі щури;

Примітка 3. 3 – Старі щури + NSE;

Примітка 4. * – $p < 0,05$ відносно групи «Молоді щури».

З рис. 3.1 видно, що старіння супроводжується зменшенням активності антиоксидантних ензимів – СОД, КАТ, ГП.

Згідно поширеній вільнорадикальній теорії старіння посилення утворення вільнорадикальних сполук на тлі зниження активності антиоксидантних ензимів є маркером процесу старіння [124].

Застосування NSE старим щурам протягом 10 днів нормалізує активність всіх досліджуваних антиоксидантних ензимів.

Раніше на моделях низки патологічних станів було показано, що насичені NAE, як і інші ендоканабіноїди, проявляють антиоксидантні властивості, впливаючи як на активність основних антиоксидантних ензимів (СОД, КАТ, ГП), так і на процесі генерації АФК [125, 126].

3.2 Вивчення вмісту ТБК-реагуючих продуктів та продуктів окиснення протеїнів в плазмі крові щурів

На рис. 3.2 наведено результати визначення вмісту ТБК-реагуючих продуктів та продуктів пероксидного окиснення протеїнів (динітрофенілгідразонів – ДНФГ) в плазмі крові щурів.

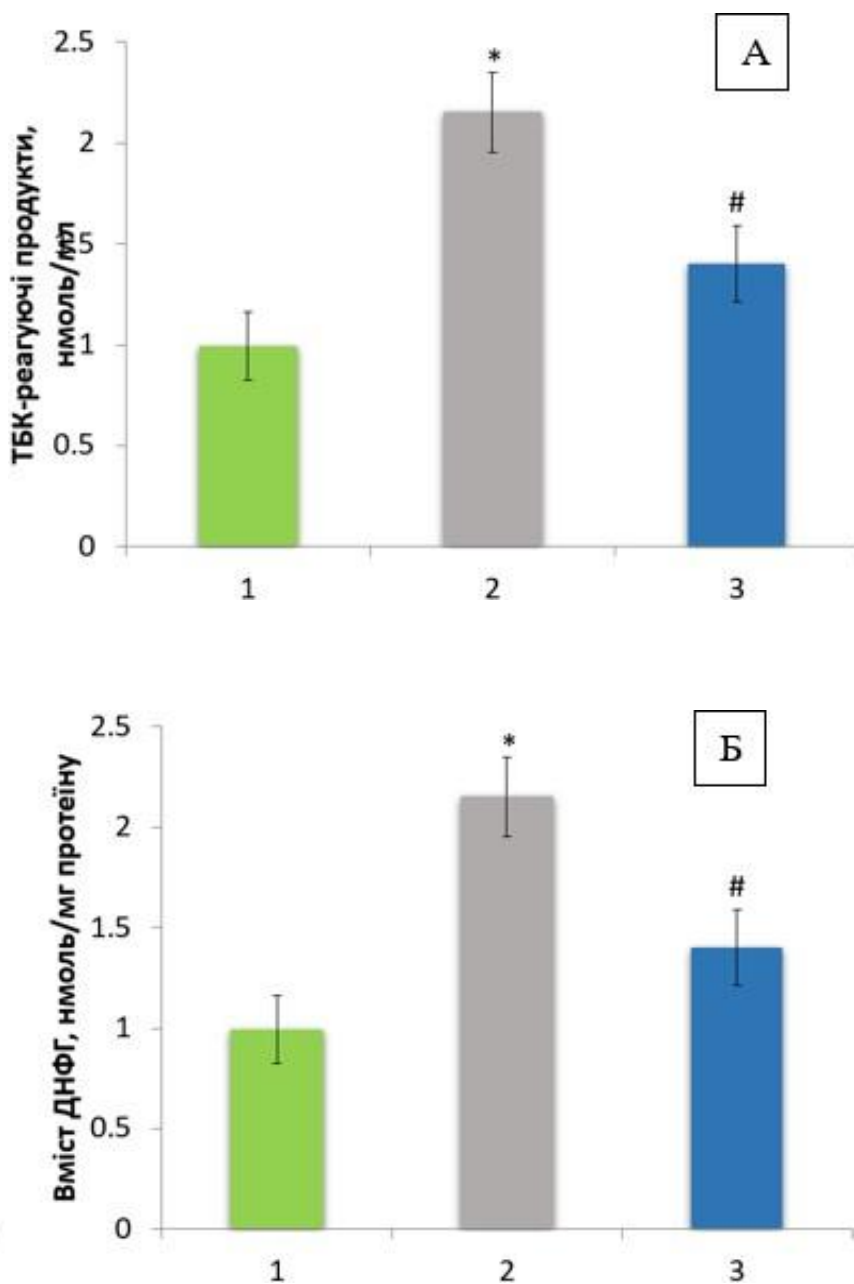


Рис. 3.2. Вміст ТБК-реагуючих продуктів (А) та ДНФГ (Б) у плазмі крові щурів; $M \pm t$, $n=9-10$, $p \leq 0,05$.

Примітка 1. Позначки див. на рис. 3.1.

З рис. 3.2 видно, що у старих щурів зниження активності антиоксидантних ензимів спричиняє вірогідне зростання в плазмі крові як вмісту ТБК-реагуючих продуктів (А), так і продуктів окисної модифікації протеїнів (Б).

Відновлення активності ензимів антиоксидантного захисту (рис. 3.2) за дії NSE сприяє нормалізації вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів і протеїнів.

3.3 Оцінка рівня IL1-beta та TNF α в сироватці крові щурів

На рис. 3.3 показано вміст IL1-beta та TNF α в сироватці крові щурів.

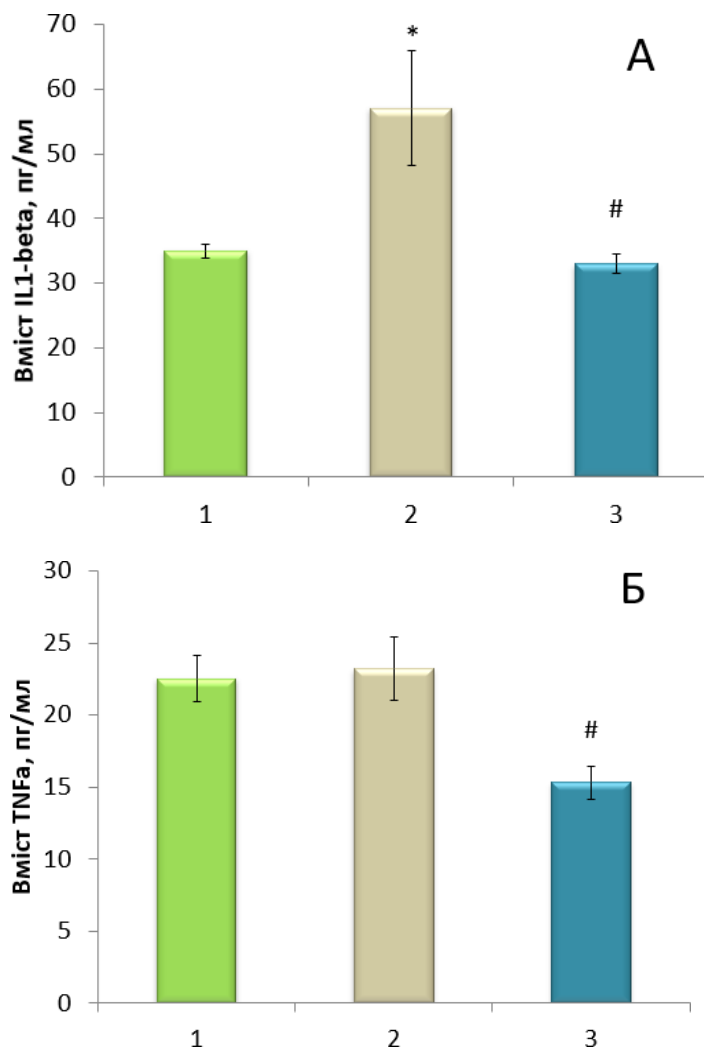


Рис. 3.3. Вміст IL1-beta (A) та TNF α (Б) в сироватці крові щурів; $M \pm m$, $n=9-10$, $p \leq 0,05$.

Примітка 1. Позначки див. на рис. 3.1.

З рис. 3.3 видно, що при старінні виявлено вірогідне зростання вмісту прозапального цитокіну IL1-beta, тоді як вміст іншого прозапального цитокіну TNF α залишався без змін. Сьогодні все більше уваги приділяється ролі хронічного низькоградієнтного запалення у процесі старіння та патогенезі пов'язаних із старінням захворювань (вікова деменція, хвороба Альцгеймера, метаболічний синдром, діабет 2 типу тощо). Це хронічне запалення має мультифакторне походження і може бути обумовлене старінням імунної системи [127], кишечника, жирової тканини тощо [128]. В той же час, хронічне запалення, що супроводжується типовими феноменами клітинного старіння, такими, як зменшення теломераз, оксидативний стресс, дефекти ДНК, вражає зрештою всі органи і призводить до розвитку пов'язаних з віком захворювань, таких як остеопорози, остеоартрити, атеросклерози, нейродегенеративні захворювання та рак [129].

З рис. 3.3 видно, що застосування NSE старим щурам нормалізує вміст IL1-beta та зменшує вміст TNF α в сироватці крові.

3.4 Дослідження вмісту ліпопротеїнів високої/низької щільності та триацилгліцеролів в крові щурів

На рис. 3.4 показано вміст ЛПНЩ, ЛПВЩ та триацилгліцеролів в крові щурів.

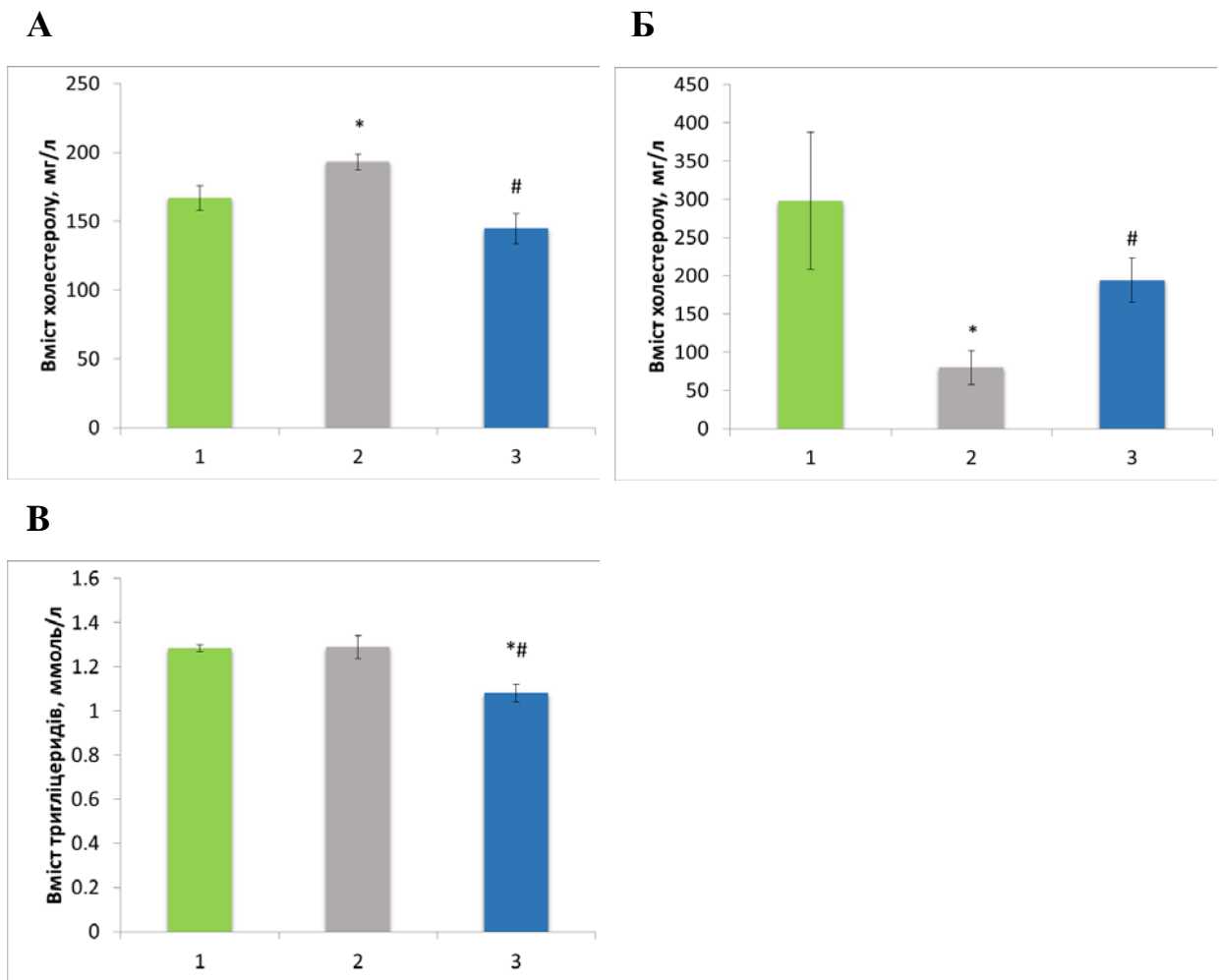


Рис. 3.4. Вміст ЛПНЩ (А), ЛПВЩ (Б) в плазмі та триацилгліцеролів (В) в сироватці крові щурів; $M \pm m$, $n=9-10$, $p \leq 0,05$.

Примітка 1. Позначки див. на рис. 3.1.

З рис. 3.4 видно, що у старих щурів вміст ЛПНЩ вірогідно вищий, а вміст ЛПВЩ істотно нижчий за їх відповідні значення у молодих щурів.

Вміст триацилгліцеролів в сироватці крові старих щурів при цьому не змінюється (рис. 3.4, В).

Ліпопротеїновий профіль є інтегральним показником ліпідного обміну і його зміни свідчать про наявність метаболічних порушень. В умовах експерименту виражене зростання вмісту ЛПНЩ на тлі значного зниження рівня ЛПВЩ в крові щурів вказує на порушення обміну ліпідів, передусім в тканині печінки, і свідчить про збільшення атерогенного потенціалу в крові старих щурів. А зниження вмісту холестеролу у складі ЛПВЩ свідчить про уповільнення виведення холестеролу з організму [130].

За введення NSE спостерігається нормалізація вмісту як ЛПНЩ, так і ЛПВЩ в крові старих щурів, а також вірогідне зниження вмісту триацилгліцеролів, що свідчить про його протиатерогенну дію.

3.5 Зміни фосfolіпідного складу міокарду щурів при старінні

Вплив NSE на фосfolіпідний склад міокарду показано на рис. 3.5.

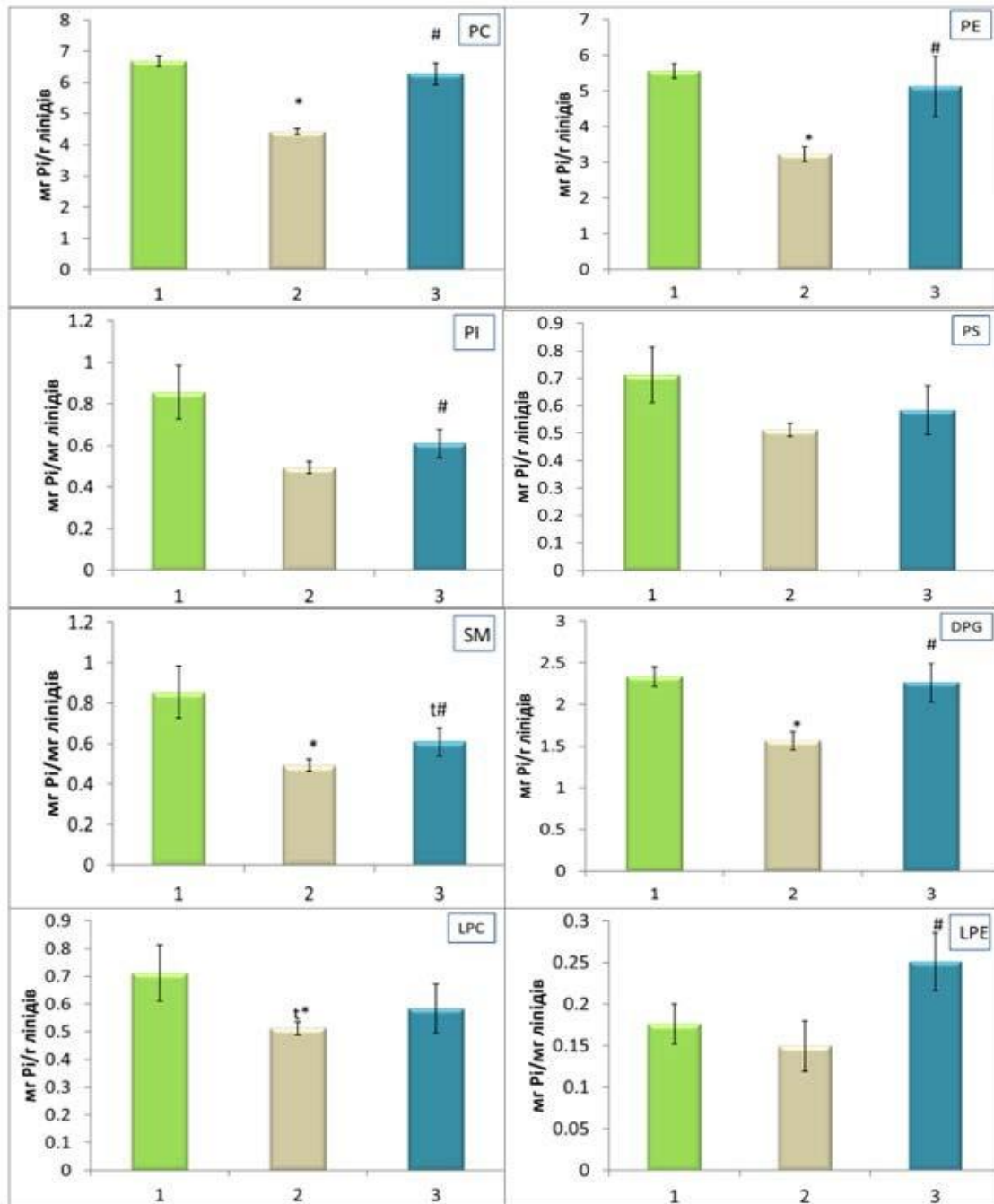


Рис. 3.5. Вміст фосфоліпідів різних класів у міокарді щурів; $M \pm m$, $n=9-10$, $p \leq 0,05$.

Примітка 1. 1 – Молоді щури;
 Примітка 2. 2 – Старі щури;
 Примітка 3. 3 – Старі щури + NSE;
 Примітка 4. PC – фосфатидилхолін;
 Примітка 5. SM – сфінгомієлін;
 Примітка 6. PS – фосфатидилсерин;
 Примітка 7. DPG –
 дифосфатидилгліцерол;

Примітка 8. PI – дифосфатидилінозитол;
 Примітка 9. LPC – лізофосфатидилхолін;
 Примітка 10. PE – фосфатидилетаноламін;
 Примітка 11. LPE –
 лізофосфатидилетаноламін;
 Примітка 12. * – $p < 0,05$ відносно групи
 «Молоді»;
 Примітка 13. # – $p < 0,05$ відносно групи
 «Старі».

З рис. 3.5 видно, що в серці старих щурів вірогідно знижується вміст всіх основних ФЛ. Вочевидь, такі зміни зумовлені уповільненням процесів метаболізму, особливо *de novo* синтезу ліпідів. Привертає увагу зниження вмісту маркерного ФЛ мітохондріальних мембран DPG, що може опосередковано вказувати на наявність мітохондрійної дисфункції, що описано в літературі за умов старіння [131]. Зміни таких «розріджувальних» ФЛ, як PC, PE та їх лізоформ в бік зменшення їх вмісту може свідчити про зростання жорсткості клітинних мембран, а зменшення вмісту аніонних ФЛ – PI, PS, – про деякі порушення в проведенні клітинного сигналювання та трансмембранного транспортування.

Застосування NSE спричиняє збільшення вмісту всіх досліджуваних ФЛ, що вказує на активування їх синтезу *de novo*. Беручи до уваги, що NSE може виступати агоністом PPAR-гамма рецепторів, які регулюють експресію генів, що регулюють ліпогенез, такий ефект NSE є вірогідним і потребує подальших детальних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. NSE сприяє відновленню активності основних антиоксидантних ензимів (СОД, КАТ, ГП), нормалізує вміст продуктів пероксидної модифікації ліпідів та окислених протеїнів в плазмі крові старих щурів.

2. Виявлено зростання вмісту прозапального цитокіну IL1-beta в сироватці крові старих щурів. NSE спричиняло вірогідне зниження вмісту IL1-beta та TNF α в крові цих тварин.

3. NSE спричиняло нормалізацію ліпопротеїнового профілю (ЛПВЩ/ЛПНЩ) та зниження вмісту триацилгліцеролів в крові старих щурів.

4. Виявлено зниження вмісту основних фосфоліпідів в тканинах серця щурів за умов старіння. Застосування NSE сприяло відновленню фосфоліпідного складу кардіоміоцитів та наближало їх значення до таких у молодих тварин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bowling, A., Dieppe, P. (2005). What is successful ageing and who should define it? *BMJ*, Vol. 331(7531), P. 1548 – 1551.
2. Lebel, M., de Souza-Pinto, N., Bohr, V. (2011). Metabolism, genomics, and DNA repair in the mouse aging liver. *Curr Gerontol Geriatr Res*.
- 3 . Ghiraldini, F., Silva, I., Mello, M. (2012). Polyploidy and chromatin remodeling in hepato-cytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice, P. 755 – 764.
- 4 . Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L. (2004). *Nat. Rev. Drug Discov.*, Vol. 3(9), P. 771 – 784.
- 5 . Arner, E., Hughes, C., Decicco, C., Caterson, B. and Tortorella, M. (1998). Osteoarthritis. *Cartilage.*, Vol. 6 (3), P. 214 – 228.
6. Yashin, A., Jazwinski, S. (2014). "Development and Aging: Two Opposite but Complementary Phenomena", *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, S. KARGER AG, Vol. 40, P. 74 – 84.
7. Sheldon, JH. (1948). *The Social Medicine of Old Age*. London: Oxford University Press.
8. Abegunde, D., Mathers, C., Adam, T., Ortegon, M., Strong, K. (2007). The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, Vol. 370, P. 1929 – 1938.
- 9 . Das, U. (2018). Ageing: Is there a role for arachidonic acid and other bioactive lipids? A review. *Journal of Advanced Research*, Vol. 11, P. 67 – 79.
10. World Health Organization (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). [online] Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Accessed 17 May 2017].
11. Інформаційне управління Апарату Верховної Ради України (2019). *Перемогти смерть: ключові чинники, що впливають на тривалість життя*

- українців. [online] Available at: <https://rada.gov.ua/print/172805.html> [Accessed 10 June 2019].
12. Logan, J. (1744). *Cato major: or, His Discourse Old Age*. Philadelphia: Benjamin Franklin.
 13. Busse, W., Maddox, G. (1985). *The Duke Longitudinal Studies of Normal Ageing*. New York: Springer, P. 1955 — 1980.
 14. Baltes, P., Baltes, M. (1990). Psychological perspectives on successful aging: The model of selective optimization with compensation. *Successful Aging*, P. 1 – 34.
 15. Rowe, J., Kahn, R. (1987). Human aging: Usual and successful. *Science*, Vol. 237 (4811), P. 143 – 49.
 16. Rowe, J., Kahn, R. (1991). *Successful aging*. New York: Pantheon Books.
 17. Bernstein, C., Bernstein, H. (1991). *Aging, Sex, and DNA Repair*. Academic Press, San Diego, P. 314, 320, 326.
 18. Harman, D. (1981). "The aging process". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 78 (11), P. 24 – 28.
 19. Wickens, A. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, Vol. 128(3), P. 379 – 391.
 20. Smith, A. (2000). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Rev. ed. Oxford University Press, Oxford.
 21. Ayala, A., Muñoz, M., Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*.
 22. Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, F. Muruzabal, J., Burrell, M. (2001). "The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation," *The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, Vol. 280, P. E827 – E847.

23. Frayn, K. (1998). Regulation of fatty acid delivery in vivo. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 441, P. 171 – 179.
24. Vance, E. Vance, J. (2002). *Biochemistry: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition.
25. Berridge, M., Irvine, R. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, Vol. 341 (6239), P. 197 – 205.
26. Bach, D., Wachtel, E. (2003). "Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1610 (2), P. 87 – 97.
27. Wilson, D., Feingold, K., Anawalt, B., Boyce, A. (2000-2020). *Is Atherosclerosis a Pediatric Disease?*
28. Biggerstaff, K., Wooten, S. (2004). Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids.
29. Danon, D., Laver-Rudich, Z., Skutelsky, E. (1980). Surface charge and flow properties of endothelial membranes in aging rats. *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 14, P. 145 – 153.
30. Grinna, L., Barber, A. (1972). Age-related changes in membrane lipid content and enzyme activities. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 288, P. 347 – 353.
31. Hegner, D. (1980). Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 14, P. 101 – 118.
32. Nohl, H., Kramer, R. (1980). Molecular basis of age-dependent changes in the activity of adenine nucleotide translocase. *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 14, P. 137 – 144.
33. Hegner, D. (1980). Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 14, P. 101 – 118.
34. Nohl, H., Kramer, R. (1980). Molecular basis of age-dependent changes in the activity of adenine nucleotide translocase. *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 14, P. 137 – 144.

35. Harman, D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 78, P. 7124 – 7128.
36. Tappel, L. (1980). Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 355, P. 18 – 31.
37. Yin, H., Xu, L., Porter, N. (2011). “Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis,” *Chemical Reviews*, Vol. 111, P. 5944 – 5972.
38. Мамедгасанов, Р., Рахмани, С. (1989). Пробл. эндокринологии. P. 19 – 21.
39. Попова, Е., Сокирко, Т. (1997). Вільнорадикальні процеси: біологічна та патогенетична роль. *Вет. медицина України*, В. №2, С. 16 –18.
40. Сімонов, М. (2005). Стан перекисного окиснення ліпідів у молодняку курей яєчного напрямку продуктивності різного віку. *Наук.- техн. бюл. Ін-ту біол. тварин. Львів*, В. 6, С. 149 –153.
41. Packer, L., Prilipko, L., Christen, Y. (1992). *Free Radicals in the Brain. Aging. Neurological and Mental Disorders*. Springer-Verlag, P. 21 – 41.
42. Crune, T., Michel, P., Sitte, N. et al. (1997). *Free Radic. Biol. Med*, V. 23, P. 357 – 360.
43. Ciolino, H., Levine, R. (1997). *Free Rad. Biol*, V. 22, P. 1277 – 1282.
44. Татьянаенко, Л., Богданов, Г., Варфоломеев, В. и др. (1998). *Вопр. мед. химии*. С. 551 – 558.
45. Лисицина, Т., Васильева, И., Дурнев, А. (1999). *Докл. АН*. Т. 365, С. 263 – 266.
46. Дубинина, Е., Шугалей, И. (1993). *Успехи современной биологии*. Т. 113, С. 71 – 81.
47. Губский, Ю., Левицкий, Е., Гольдштейн, Н., Литошенко, А. (1989). Перекисное окисление липидов и эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций изолированного хроматина печени крыс. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, Т. 57, С. 296 – 298.

48. Левицкий, Е., Губский, Ю., Гольдштейн, Н., Литошенко, А. (1989). Перекисное окисление липидов и полимеразные активности фракций хроматина печени крыс при старении. Бюл. эксперим. биологии и медицины, Т. 57, С. 693 – 695.
49. Trenzado, C., Hidalgo, M., Garsia-Gallego, M., Morales, A., et al. (2005). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*.
50. Владимиров, Ю., Арчаков, А. (1972). Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука., С. 252.
51. Esterbauer, H., Cheeseman, K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, Vol. 186, P. 407 – 421.
52. Pryor, W. (1989). “On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples,” *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 7, P. 177 – 178.
53. Volinsky, R., Kinnunen P. (2013). Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS Journal*, Vol. 280, P. 2806 – 2816.
54. Kinnunen, P., Kaarniranta, K., Mahalka, A. (2012). “Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1818, P. 2446 – 2455.
55. Reis A., Spickett, C. (2012). Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1818, P. 2374 – 2387.
56. Fruhwirth, G., Loidl, A., Hermetter, A. (2007). “Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease,” *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, Vol. 1772, P. 718 – 736.

57. Величковский, Б. (2001). Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды. Вестник РАМН, С. 45 – 52.
58. Parihar, A., Parihar, M., Milner, S., Bhat, S. (2008). Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. Burns, Vol. 34, P. 6 – 17.
59. Беленічев, І., Левицький, Є., Губський, Ю., Коваленко, С., Марченко, О. (2002). Антиоксидантна система захисту організму (огляд). Совр. пробл. токсикол., В. 3, С. 24-31.
60. Стояновський, В., Гуфрій, А. (2003). Біохімічні зміни антиоксидантної системи в слизовій оболонці тонких кишок після розвитку транспортного стресу. Наук. вісн. Львів. держ. акад. вет. мед. ім. С.З. Гжицького. Львів, Т.5, Ч.2, С. 19 – 23.
61. Шах, А., Данчук, В., Снітинський, В. (2000). Активність антиоксидантних ферментів у різновікових популяціях еритроцитів поросят раннього віку під впливом цинку та селену. Наук.-техн. бюл. ІБТ, В. 2, С.103 – 107.
62. Понкало, Л. (2012). Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту у тільних корів та їх телят за дії нових імунотропних засобів у вигляді ліпосомальної емульсії. Біологія тварин, Т. 14, С. 551 – 556.
63. Кулинский, В. (1993). Структура, свойство, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы. Успехи соврем, биологии, Т. 113, С. 351 – 365.
64. Нетюхайло, Л., Харченко, С. (2014). Активні форми кисню (огляд літератури). Young Scientist, P. 131 – 135.
65. Лавришин, Ю. Вархоляк, І. Мартишин, Т. (2016). Біологічне значення антиоксидантного захисту організму тварин Науковий вісник ЛНУВ БТ імені С.З. Гжицького, С. 39 – 42.

66. Vasto, S., Carruba, G., Lio, D., Colonna-Romano, G., Di Bona, D., Candore, G. (2009). Inflammation, ageing and cancer. *Mech Ageing Dev.*
67. Adams, A., Katepalli, M., Kohler, K., Reedy, S., Stolz, J., Vick, M. (2009). Effect of body condition, body weight and adiposity on inflammatory cytokine responses in old horses. *Vet Immunol Immunopathol.*
68. Guarner, V., Rubio-Ruiz, M. (2015). Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Interdiscip Top Gerontol.*
69. Bruunsgaard, H., Pedersen, M., Pedersen, B. (2001). Aging and proinflammatory cytokines. *Current Opinion in Hematology*, Vol. 8(3), P. 131–136.
70. Sanada, F., Taniyama, Y., Muratsu, J., Otsu, R., Shimizu, H., Rakugi, H., & Morishita, R. (2018). Source of Chronic Inflammation in Aging. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, P. 5.
71. Di Marzo, V. (2008). *Nat. Rev. Drug Discov.* P. 438 – 455.
72. Matias, I., Gonthier, M-P., Petrosino, S. et al. (2007). *Br. J. Pharmacol.*, P. 676 – 690.
73. Онопченко, О., Косякова, Г., Горідько, Т., Бердишев, А., Мегедь, О., Гула, Н. (2013). Вплив N-стеароїлетаноламіну на активність ензимів антиоксидантного захисту, вміст продуктів пол і нітрит-аніона в плазмі крові та печінці щурів з індукованою інсулінорезистентністю. *Укр. біохім. журн.*, Т. 85, С. 88-95.
74. Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279 (7), P. 5298 – 305.
75. Schmid, H., Schmid, P., Natarajan, V. (1990). N-Acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Progress in Lipid Research*, Vol. 29(1), P. 1 – 43.
76. Гула, Н. та ін. (2014). Протигрипозний ефект N-стеароїлетаноламіну. *Журнал Національної Академії Медичних Наук України*. Т. 20, С. 393 – 401.

77. Kuehl, J., Jacob, T., Ganley, O., Ormond, R., Meisinger, M. (1957). The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J Am Chem Soc*, Vol. 79, P. 5577 – 8.
78. Bachur, N., Masek, K., Melmon, K., Udenfriend, S. (1965). Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem*, Vol. 240, P. 1019 – 24.
79. Schmid, H., Schmid, P., Natarajan, V. (1990). N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res*, Vol. 29, P. 1 – 43.
80. Devane, W., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R., Stevenson, L., Griffin, G., et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. Vol. 258, P. 1946 – 9.
81. Di Marzo, V. (1998). 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. Vol. 1392 (2–3), P. 153 – 75.
82. Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A., Bisogno, T. (2002). "Anandamide receptors". *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. Vol. 66 (2–3), P. 377 – 91.
83. Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, Vol. 394 (6690), P. 277–81.
84. Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Moller, T., Stella, N. (2002). Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277 (23), P. 20869–76.
85. Kamlekar, R., Swamy, M. (2006). Molecular packing and intermolecular interactions in two structural polymorphs of N-palmitoylethanolamine, a type 2 cannabinoid receptor agonist. *Journal of Lipid Research*, Vol. 47 (7), P. 1424–33.

86. Lambert, D., Vandevorde, S., Jonsson, K., Fowler, C. (2002). The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents?. *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 9 (6), P. 663 – 74.
87. Rahman, A., Tsuboi, K., Uyama, T., Ueda, N. (2014). New players in the fatty acyl ethanolamide metabolism. *Pharmacological Research. Lipid amide signaling: regulation, physiological roles and pathological implications*, Vol. 86, P. 1–10.
88. Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gómez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., et al. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, Vol. 414 (6860), P. 209 – 12.
89. Stone, N., Millar, S., Herrod, P., Barrett, D., Ortori, C., Mellon, V., O'Sullivan, S. (2018). An Analysis of Endocannabinoid Concentrations and Mood Following Singing and Exercise in Healthy Volunteers. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, Vol. 12, P. 269.
90. Marzo, V., Piscitelli, F. (2011). Gut feelings about the endocannabinoid system. *Neurogastroenterology & Motility*, Vol. 23 (5), P. 391–398.
91. Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gómez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., et al. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, Vol. 414 (6860), P. 209–12.
92. Tripathy, S., Kleppinger-Sparace, K., Dixon, R., Chapman, K. (2003). N-acylethanolamine signaling in tobacco is mediated by a membrane-associated, high-affinity binding protein. *Plant Physiology*, Vol. 131 (4), P. 1781–91.
93. Hofmann, U., Domeier, E., Frantz, S., Laser, M., Weckler, B., Kuhlencordt, P., et al. (2003). Increased myocardial oxygen consumption by TNF-alpha is mediated by a sphingosine signaling pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 284 (6), P. H2100-5.
94. Amadou, A., Nawrocki, A., Best-Belpomme, M., Pavoine, C., Pecker, F. (2002). Arachidonic acid mediates dual effect of TNF-alpha on Ca²⁺ transients and

contraction of adult rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, Vol. 282 (6), P. C1339-47.

95. Di Marzo, V., Silvestri, C. (2019). Lifestyle and Metabolic Syndrome: Contribution of the Endocannabinoidome. *Nutrients*, Vol. 11 (8), P. 1956.

96. Epps, D., Schmid, P., Natarajan, V., et al. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 90, P. 628 – 633.

97. Rimmerman, N., Bradshaw, H., Kozela, E., et al. (2012). *Br. J. Pharmacol.*, Vol. 165, P. 2436 – 2449.

98. Schmid, H., Schmid, P., Natarajan, V. (1990). *Prog. Lipid Res*, Vol. 29, P. 1.

99. Lambert, D., Di Marzo, V. (1999). *Curr. Med. Chem.*, Vol. 6, P. 757.

100. Lambert, D., Vandevoorde, S., Jonsson, K., Fowler, C. (2002). *Curr. Med. Chem.*, Vol. 9, P. 663.

101. Гула Н., Маргітич, В., Артамонов, М., та ін. (2004). *Укр. біохім. журн.*, В. 76, С. 123 – 131.

102. Voitychuk, O., Asmolikova, V., Gula, N., Shuba, Y. (2008). Збірник тез міжнародного симпозіуму «Кальцієві канали Т-типу: від відкриття до каналопатій, 25 років дослідження», С. 53.

103. Parinandi, N., Schmid, H. (1987). Effects of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria. *FEBS Lett*, Vol. 237, P. 49 – 52.

104. Gulaya, N., Kusmenko, A., Margitich, V., Govseeva, N., Melnichuk, S., Goridko, T., Zhukov, A. (1998). Long-chain N-acylethanolamines inhibit lipid peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia. *Chem Phys Lipids*, Vol. 97, P. 49 – 54.

105. Kloner, R., Fishbein, M., Braunwal, E., Maroko, P. (1978). *Am. J. Curdiol.*, Vol. 41, P. 880 – 886.

106. Mitnacht, S., Farber, J. (1981). *Biol. Chem.*, Vol. 256, P. 3199 – 3206.

107. Hula, N., Chumak, A., Mehed, O., Horid'ko, T., Kindruk, N., Berdyshev, A. (2008). Immunosuppressive characteristics of N-stearoylethanolamine a stable compound with cannabimimetic activity. *Ukr. Biokhim. Zh.*, Vol. 80 (1), P. 57 – 67.
108. Lo Verme, J., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., et al. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol. Pharmacol.*, Vol. 67 (1), P. 15 – 19.
109. Gulaya, N., Kuzmenko, A., Margitich, V., Govseeva, N., Melnichuk, S., Goridko, T., et al. (1998). Long-chain N-acylethanolamines inhibit peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia. *Chem. Phys. Lipids*, Vol. 97, P. 49–54.
110. Zhukov, A., Berdyshev, A., Kosiakova, G., Klimashevskiy, V., Gorid'ko, T., Mehed, O., Hula, N. (2014). N-stearoylethanolamine effect on the level of 11-hydroxycorticosteroids, cytokines IL-1, IL-6 and TNF in rats with nonspecific inflammation caused by thermal burn of skin. *Ukr Biochem J.*, Vol. 86, P. 88 – 97.
111. Горідько, Т., Гула, Н., Маргітич, В., та ін. (2001). Укр. біохім. журн., В. 73, С. 82 – 87.
112. Bligh, E., Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, Vol. 37 (8), P. 911– 917.
113. Palmer, F. (1971). The extraction of acidic phospholipids in organic solvent mixtures containing water. *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 231 (1), P. 134 – 144.
114. Владимиров, Ю., Арчаков, А. (1972). Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Наука, С. 252.
115. Мельничук, С., Кузьменко, А., Маргітич, В., Говсеєва, Н., Горидько, Т., Гулая, Н. (1998). Влияние углекислоты на свободнорадикальные процессы в условиях искусственного гипобииоза у крыс. Укр. біохім. журн. Т. 70, С. 87 – 94.

116. Чевари, С., Андял, Т., Штрэнгер, Я. (1991) Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лабораторное дело, В. 10, С. 9 – 13.
117. Королюк, М., Иванова, Л., Майорова, И. (1988). Метод определения активности каталазы. Лаб. Дело., С.16 – 18.
118. Переслегина, И. (1989) Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей. Лаб. Дело, В. 11, С. 20 – 23.
119. Oliver, C., Ahn, B., Morhan, E. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem*, V. 262, P. 5488 – 5491.
120. Dubinina, E., Burmistrov, S., Khudov, D., Porotov, I. (1995). Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it. *Vopr. Med. Chim. Vol. 41. P. 24 – 26.*
121. Vaskovsky, V., Terekhova, T. (1979). HPTLC of phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol. *J. High. Resol. Chromatogr. & C.C.*, Vol. 2 (11), P. 671 – 672.
122. Svetashev, V., Vaskovsky, V. (1972) A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids. *J. Chromatogr*, Vol. 67, P. 376 – 378.
123. Vaskovsky, V., Kostetsky, E., Vasendin, I. (1975). A universal reagent for phospholipid analysis. *J. Chromatogr.*, P. 129 – 141.
124. Baranov, V., Baranova, E. (2017). Aging and Ambiguous ROS. *System Genetics Analysis. Curr Aging Sci*, V.10 (1), P. 6 – 11.
125. Berdyshev, A., Kosiakova, H., Hula, N. (2017). Modulation of LPS-induced ROS production and NF- κ B nuclear translocation by N-stearoyl ethanolamine in macrophages. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 89, P. 62 – 69.
126. Онопченко, О., Косякова, Г., Горідько, Т., Бердишев, А., Мегедь, О., Гула, Н. (2013). Вплив N-стеароїлетаноламіну на активність ензимів антиоксидантного захисту, вміст продуктів ПОЛ і нітрит-аніона в плазмі крові

та печінці щурів з індукованою інсулінорезистентністю. Укр. біохім. журн., Т. 85, С. 88-96.

127. Hagen, M., Derudder, E. (2019). Inflammation and the Alteration of B-Cell Physiology in Aging. *Gerontology*, P. 1 – 9.

128. Gonçalves de Carvalho, C., Ribeiro, S. (2017). Aging, low-grade systemic inflammation and vitamin D: a mini-review. *Eur J Clin Nutr*, Vol. 71(4), P. 434 – 440.

129. Paradisi, A., Oddi, S., Maccarrone, M. (2006). The endocannabinoid system in ageing: a new target for drug development. *Curr Drug Targets.*, Vol. 7(11), P. 39 – 52.

130. Goff, W., Guerin, M., Chapman, M. (2004). Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 101, P. 17 – 38.

131. Kudryavtseva, A., Krasnov, G., Dmitriev, A., Alekseev, B., Kardymon, O., Sadritdinova, A., Fedorova, M., Pokrovsky, A., Melnikova, N., Kaprin, A, Moskalev A., Snezhkina, A. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.*, Vol. 7(29), P. 44879 – 44905.