

**АНАЛИЗ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ РАЗВИТИЯ DATURA STRAMONIUM L. ПОД  
ДЕЙСТВИЕМ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ**

**Ю. Бено<sup>1</sup>, М. Дика<sup>2</sup>, К. Скварко<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр*

*при ГУМВД Украины во Львовской области*

*ул. Конюшинна, 24, Львов 79040, Украина*

*e-mail: urko.bn@gmail.com*

<sup>2</sup> *Львовский национальный университет имени Ивана Франко*

*ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

<sup>3</sup> *Биофизическая лаборатория, Ботанический сад ЛНУ имени Ивана Франко*

*ул. М. Черемшины, 44, Львов 79014, Украина*

*e-mail: k.skvarko@gmail.com*

Проведено біометричний аналіз проростання насіння, довжини корня і стебля дурмана звичайного під впливом постійного магнітного поля. Обнаружено стимулююче впливання досліджуваного фактора на всхожість насіння дурмана звичайного. Зміна динаміки проростання насіння, росту коренів і стебел в значительній ступені обумовлені різною тривалістю і напруженістю дії постійного магнітного поля. Це збігається з результатами поетапного множинного регресійного аналізу і побудованої регресійної моделі.

*Ключевые слова:* дурман звичайний, постійне магнітне поле.

УДК 577.24

**ВМІСТ ТРАНСТИРЕТИНУ ТА ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ  
ПРИ ПЕРІОДИЧНОМУ ГОЛОДУВАННІ**

**М. Гірич, Н. Кургузова, Ц. Данладі, А. Малишев, А. Божков**

*Науково-дослідний інститут біології*

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна*

*вул. Балакїрева, 45, Харків 61018, Україна*

*e-mail: girichms@gmail.com*

Проведено дослідження впливу періодичного голодування (ПГ) на концентрацію транстиретину (ТТР) і церулоплазміну (ЦП) в сироватці молодих (3 міс.) та старих (19 міс.) щурів лінії Вістар за допомогою SDS-PAGE. ПГ протягом 10 днів з 30% втратою ваги призводило до 2-кратного зниження вмісту ТТР у молодих щурів, а після 20 - добового

відгодовування *ad libitum* (AL) рівень цього білка залишався зниженим. Навпаки, застосування режимів ПГ і AL у випадку старих тварин супроводжувалось, відповідно, 1,3- та 1,15-кратним збільшенням вмісту ТТР порівняно з контрольною групою. Подібна ситуація спостерігалась і для ЦП: режими ПГ/AL у молодих щурів супроводжувалися стабільним падінням рівня цього білка на 10%, проте, хоча у старих тваринах ПГ не викликало змін, AL призводив до 1,2-кратного збільшення вмісту ЦП у крові.

*Ключові слова:* дієта, калорійне обмеження, періодичне голодування, транстиретин, церулоплазмін.

У наш час калорійне обмеження (КО), тобто зниження щоденного надходження енергії з їжею на 15–40%, є єдиним загально визнаним негенетичним шляхом збільшення середньої та максимальної тривалості життя практично усіх досі досліджених еукаріотичних організмів [11], а також потужним засобом профілактики і терапії раку, великої кількості залежних від віку та хронічних захворювань [8]. Останнім часом з'являється все більше даних, які вказують на те, що сприятливі ефекти КО є скоріше не наслідком простого обмеження у калоріях, а результатом активної відповіді організму на обмежування у кількості спожитої їжі, що веде до метаболічного репрограмування зі сприятливими ефектами [2]. Одним з головних доказів цього стало те, що інший тип дієтичних обмежень, так зване періодичне голодування (ПГ), при якому 24 год голодування чергується з 24 год періодом вільного доступу до їжі, дає ефекти, подібні до класичного КО [21]. Вважається, що механізми, які обумовлюють сприятливі ефекти в обох режимах дієт (КО та ПГ) подібні, але цікавим є те, що у низці робіт підкреслюється різниця у відповідях організму на них [2, 29]. Згідно з цим, інформація про відповідь організму на відносно слабо досліджену модель дієти ПГ та порівняння метаболічних змін, викликаних таким ПГ з ефектами класичного КО, допоможе ідентифікувати фактори, які беруть участь у збільшенні тривалості життя і покращенні здоров'я. Одним із найкращих джерел біомаркерів таких змін є протеом сироватки крові, тому що у ньому віддзеркалюються різноманітні процеси, які відбуваються у переважній більшості клітин організму. Серед безлічі білків крові транстиретин (ТТР) і церулоплазмін (ЦП) займають особливе місце завдяки їх здатності реагувати на малі зміни припливу поживних речовин, зокрема, відображати статус білкового живлення [15]. Більш того, є багато робіт, присвячених ефекту голодування та класичного КО на метаболізм ТТР та ЦП, де зазначається, що такі дієтичні обмеження впливають на пов'язані з цими білками сигнальні шляхи і змінюють активність їх експресії та катаболізму, проте майже нічого не відомо про ефекти ПГ [15, 35]. Таким чином, метою нашого дослідження було вивчення впливу ПГ на вміст ТТР і ЦП у сироватці крові, а також стійкості такого впливу після припинення дієтичного обмеження. Для цього як молоді (3 міс.), так і старі (20 міс.) щури лінії Вістар підлягали 10-денному режиму ПГ, де 24 год період голодування чергувався з 24 год

періодом надавання обмеженої кількості їжі. Друга частина нашої роботи була присвячена дослідженню тривалості дії ефектів такого ПГ. З цією метою, за періодом 10-добового ПГ йшов 20-добовий період годування *ad libitum* (відгодовування). Інформація про вплив такого ПГ на рівень цих білків допоможе зрозуміти механізми, за якими виникають сприятливі ефекти цього типу дієт, а також вона має важливе значення для розробки терапевтичних стратегій лікування низки залежних від віку та хронічних захворювань.

### Матеріали та методи

#### *Тварини та дизайн експерименту*

Усі експериментальні процедури відповідали постановам комітету з біоетики при Президії НАН України. У експериментах використовували самців щурів лінії Вістар. Тварин годували *ad libitum* розробленим у нашій лабораторії комбікормом такого складу: 33,5% пшениці, 28% ячменю, 11% кукурудзи, 7% сухого молока, 5,5% насіння соняшника, 5,5% висушеної риби, 5% сухих пивних дріжджів, 2% борошна люцерни, 1% крейди, 0,5% яєчного порошку, 0,5% сольової суміші, 0,5% желатину (3450 ккал/кг). Такий дієтичний режим підтримувався до віку 3 або 20 місяців для груп молодих і старих тварин, відповідно. При досягненні цього віку тварин обох вікових груп розсаджували в окремі клітки і випадково розподіляли у 3 групи: (i) режим *ad libitum* (контроль), (ii) дієта з наданням їжі кожен другий день протягом 10 днів (ПГ) (4г/100г і 2г/100г корму на вагу тіла для молодих і старих щурів, відповідно), (iii) відгодовування *ad libitum* протягом 20 днів після ПГ (AL).

#### *Приготування зразків крові*

Після 12-ти годинного періоду голодування щурів кожної групи умертвляли шляхом декапітації між 7:00 та 9:00 год ранку. Кров негайно збирали у поліпропіленові пробірки та залишали для згортання на 20 хв при 15°C. З цього моменту всі зразки утримували при 4°C. Після центрифугування при 3000g протягом 10 хв відокремлену сироватку вилучали і за допомогою методу Бредфорда [4] визначали концентрацію загального білка. Для вирівнювання різниці у концентрації білків сироватки зразки розводили відновлюючим буфером Laemmli [17] (62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (w/v) гліцерол, 5% β-меркаптоетанол, 2% SDS, 0,01% бромфеноловий синій) до концентрації 20 мг/мл та інкубували протягом 30 хв при 37°C для руйнування дисульфідних зв'язків у поліпептидних ланцюгах білків. Перед внесенням до гелю зразки протягом 2 хв прогрівали при 95°C.

#### *Поліакриламідний гелі електрофорез за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE)*

Білки сироватки розділяли за допомогою SDS-PAGE при використанні концентруючого та розділяючого гелів. Лінійний градієнт створювали змішуванням 7,5% і 15% розчинів акриламиду у двокамерному градієнтному міксері відповідно до протоколу Laemmli [17].

Після електрофорезу гелі забарвлювали Coomassie Brilliant Blue R-250 за Wang [32]. Зображення гелів були отримані за допомогою цифрової камери EOS 300D (Canon, USA) та аналізувались у середовищі GelAnalyzer (<http://www.gelalyzer.com/>) та OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). З метою корекції різниці в забарвленні визначали відносну оптичну щільність, де як стандарт порівняння обирали білки контрольних груп. Після такої нормалізації для порівняння використовували відсоткову величину оптичної щільності білка щодо контролю, прийнятого за 100% (відносний вміст білка). Ідентифікація білкових смуг базувалася на даних відносної міграції та відомих молекулярних масах білків (14 кДа, 120 кДа, для ТТР і ЦП, відповідно). Ці білки мігрують як поодинокі смуги без видимої контамінації іншими поліпептидами [12, 16]. Для білків кожної експериментальної групи розраховувались середні значення та стандартне відхилення, після чого здійснювали попарне множинне порівняння середніх за методом Шеффе у середовищі OriginPro. Різниця між групами вважалась статистично значущою при  $P < 0,05$ .

#### Результати і їхнє обговорення

Десять діб ПГ у цій моделі дієти призводять до ~ 30% втрати ваги в обох вікових групах. Нами було встановлено, що в цих умовах така втрата ваги є критичною принаймні для молодих щурів, тому що падіння ваги нижче цього рівня призводить до занадто високої смертності тварин. Однаковий ступінь втрати ваги для молодих і старих тварин досягався тим, що старі щури одержували тільки половину кількості калорій у день годування порівняно з молодими. Такий підхід, на нашу думку, дав змогу уникнути потенційних артефактів, пов'язаних з більшими запасами жиру у старих тварин. Після 20 діб AL вага тіла всіх тварин у досліджуваних вікових групах поверталася на рівень контрольної групи (К). Цей факт дає нам можливість вважати вплив дієт подібним у молодих і старих тварин.

Як видно з рис. 1, після ПГ рівень ТТР у сироватці молодих тварин знижувався приблизно удвічі, а після тривалого режиму AL залишався приблизно на тому ж зниженому рівні. Режим 10-добового ПГ у старих щурів, навпаки, призводив до 30% росту рівня ТТР сироватці, тоді як після відгодовування протягом 20 днів цей показник залишався вищим від контролю (приблизно на 15%) (рис. 1).

З 1972 р., після виходу в світ дослідження Інгенбліка et al., ТТР був рекомендований для застосування як тмаркера статусу недостатності надходження білків з їжею [15]. Цей білок виявився більш чутливим, аніж альбумін чи трансферин, завдяки дуже короткому періоду напівжиття (близько 2 діб) та високому вмісту незамінних амінокислот, причому лімітуючими факторами зниження вмісту цього білка є як обмеження в надходженні амінокислот, так і надходження енергії з їжею. Проте, незважаючи на надчутливість ТТР до найменших змін у харчовому надходженні енергії та білків, на сьогодні у клінічній практиці

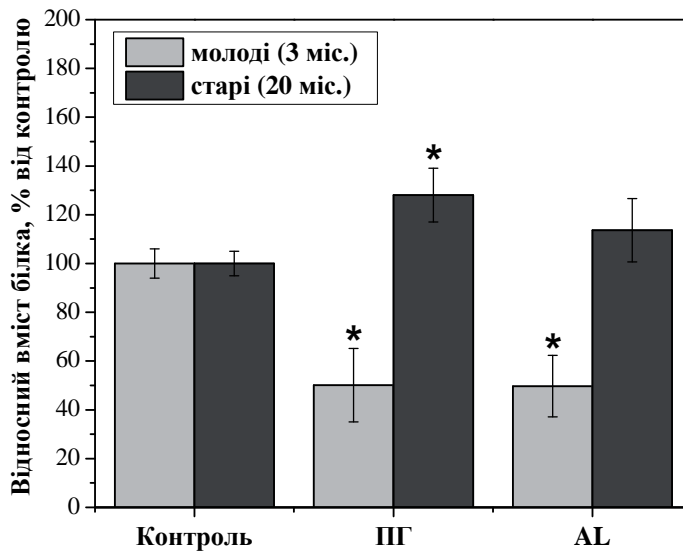


Рис. 1. Ефект періодичного голодування/відгодовування на рівень білка в ділянки 14 кДа (транстретин) у сироватці молодих і старих щурів. Величини відображають середні значення  $\pm$  стандартне відхилення в 10 щурів у кожній групі. Середні значення в контрольній групі прийнято за 100%. Контроль: контрольні щури на режимі *ad libitum*; ПГ: щури після періодичного голодування протягом 10 днів; AL: відгодовування *ad libitum* протягом 20 днів після періоду ПГ. Зірочкою позначені випадки, у яких різниця між досліджуваною групою і контролем є статистично значущою.

його не використовують через низьку селективність. Це обумовлено тим, що подібним чином відбувається зниження рівня ТТР у випадках розвитку запального процесу, онкології, травмах і хворобі Альцгеймера [35]. Проте у нашому дослідженні ці фактори виключаються, тому рівень ТТР у моделі періодичного голодування має правильно відображати статус годування щурів. У дослідженнях з повним обмеженням в їжі зниження ТТР сироватки у молодих щурів починається вже після 12 год голодування (приблизно на 10%), а на 24-ту год таке падіння становить 40% [9]. Цікаво, що в цьому випадку після 2-х діб режиму AL рівень білка залишається зниженим та виходить на рівень контролю тільки за 7 днів [31]. Подібно до цього, застосований в нашій роботі режим періодичного голодування в молодих тварин викликав ще більш чітке зниження рівня цього білка та воно закріплювалось протягом набагато більш тривалого періоду. Цікаво, що у разі 72 год голодування, яке викликає падіння концентрації ТТР у крові на 60%, повернення на рівень контролю при відгодовуванні *ad libitum* займає лише 72 год. Варто зазначити, що тільки при такому довготривалому голодуванні спостерігається зниження концентрації мРНК цього білка, що співвідноситься з падінням рівня ТТР, тобто при голодуванні терміном понад 2 доби вмикається регуляція на рівні транскрипції [25]. Напевно, таке перемикання механізму регуляції рівня ТТР і є причиною швидкого відновлення при відгодовуванні, чого не спостерігається при менш тривалих періодах повного харчового

обмеження, в тому числі й у разі застосування нашого режиму ПГ. Тобто, виходячи з цього, можна припустити, що в нашій моделі протягом ПГ у молодих щурів регуляція рівня ТТР здійснюється не на рівні транскрипції. Менш радикальна дієта, класичне КО, навіть при тривалому застосуванні викликає не таке значне зниження концентрації цього білка (до 20%) [1]. Але коли застосовується одночасне обмеження і в калоріях, і в надходженні білка з їжею, принаймні у молодих щурів, то спостерігається синергічна дія цих двох факторів на рівень ТТР: зменшення тим більше виражене, чим сильніше обмеження в кожному з них [31]. Одним із пояснень стійкого зниження концентрації ТТР у крові є зсув у балансі нітрогену (N). Зазвичай при поверненні до нормального доступу до їжі баланс N і, як наслідок, рівень ТТР, відновлюється вже через кілька днів. Але якщо таке обмеження відбувається у ростучому організмі, то втрати N можуть буди непоправними, і це призведе до субнормального рівня цього білка у крові [15]. Оскільки у нашому дослідженні ефект стійкого зниження ТТР був наслідком жорсткого калорійного і білкового обмеження, то, можливо, він був зумовлений саме таким зсувом у N-балансі.

Що стосується зростання рівня ТТР, яке ми спостерігали у старих щурів, наскільки нам відомо, існує лише одна робота, де при зниженні ваги тіла спостерігали підвищення вмісту ТТР [6]. Проте збільшення рівня ТТР у крові ссавців з віком є загальноновизнаним фактом. Із даних Ritchie et al. [28], які базуються на вивченні модельних організмів, а також із даних Foundation for Blood Research [3], які базуються на величезній кількості клінічних аналізів, випливає, що у діапазоні змін рівня ТТР від народження до смерті спостерігається стрімке зростання майже у 2 рази. Подібне збільшення вмісту ТТР спостерігається також при діабеті 2-го типу та може бути однією з причин збільшення частоти цього захворювання з віком [26]. І насправді, найбільш виражене підвищення рівня ТТР було виявлене у недостатніх за лептином мишах, які мають мутацію ob/ob, що призводить до стабілізації комплексу ТТР з ретинол-зв'язуючим білком (RBP4) сироватки і, як наслідок, до збільшенням резистентності до інсуліну та виникнення діабету 2-го типу. Більш того, високий рівень RBP4 є індикатором підвищеного ризику розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ) і маркером метаболічного синдрому [22]. З іншого боку, підвищення рівня ТТР крові є одною з головних передумов розвитку пов'язаних з цим білком амілоїдозів, зокрема, сенильного системного амілоїдозу і сімейної амілоїдної поліневропатії [7]. Через це, вікове порушення регуляції вмісту ТТР у крові призводить до того, що 25% людей віком за 80 років страждають від амілоїдозів [33], пов'язаних з ТТР, а у людей віком за 110 років цей процес є основною причиною смерті [18]. Молекулярні передумови залежного від віку збільшення вмісту ТТР залишаються нез'ясованими, але, незважаючи на вказані негативні наслідки цього процесу, можливо, він спрямований на перешкодження

сенильній деградації ЦНС. Насправді, відомо, що ТТР безпосередньо бере участь у підтримці когнітивних процесів і пам'яті під час старіння, шляхом впливу на сигнальні шляхи ретиноїдів і тиреоїдних гормонів [30]. Також ТТР здатний прямо взаємодіяти з амілоїдним бета-пептидом, перешкоджаючи його асоціації в амілоїдні фібрили, на основі чого припускають, що однією з причин розвитку хвороби Альцгеймера є знижена концентрація ТТР [20]. Подібні наслідки виникають і через вікове зниження ретинолу в ЦНС, яке виразніше за все виявляється у пацієнтів з хворобою Альцгеймера. Тут ретинол як бере участь у підтримці роботи білків, що перешкоджають утворенню амілоїдів, так і безпосередньо призводить до дисагрегації вже сформованих амілоїдних структур. Цікаво, що і в цьому випадку ТТР, будучи головним транспортером ретинолу в ЦНС, відіграє роль основного модулятора стабілізації концентрації ретинолу, забезпечуючи оптимальний захист від нейродегенерації [15]. Таким чином, стрибок вмісту ТТР крові внаслідок ПГ та підвищений рівень цього білка після тривалого періоду AL, хоча і пов'язаний з високим ризиком розвитку резистентності до інсуліну, серцево-судинних захворювань і амілоїдозів, проте може представляти інтерес у терапії нейродегенеративних захворювань. З іншого боку, якщо ефект різкого зниження рівня ТТР після режиму ПГ у молодих щурів буде аналогічним і у разі організму людини, то стане можливим створення ефективних терапій спадкових ТТР-амілоїдозів і хвороб, пов'язаних з резистентністю до інсуліну.

Після 10 днів ПГ у молодих щурів спостерігали зниження вмісту ЦП у сироватці на 10%, а після 20 днів *ad libitum* відгодовування він залишався приблизно на тому ж рівні. Що стосується старих тварин, то наша модель ПГ не викликала у них статистично значущих змін у рівні ЦП, а відгодовування *ad libitum* призводило до збільшення вмісту цього білка у крові на 20% (рис. 2).

Вважається, що зниження активності та вмісту ЦП у крові внаслідок недостатнього вживання їжі пов'язане зі зменшенням надходження міді з їжею [5]. Причому в цьому випадку доступність міді впливає не на експресію гена білка, а на ймовірність формування холоферменту. Апофермент без міді не є стабільним і підлягає інтенсивній деградації у гепатоцитах. Невелика кількість апоферменту, який секретується у кровотік, має час напівжиття лише 5,5 години, що набагато менше порівняно з 5 добами для холоферменту [27]. Проте у роботі на щурах, де досліджувався вплив КО на експресію та концентрацію ЦП крові, тобто де не мала місця недостатність у надходженні іонів міді, спостерігали удвічі менше посилення синтезу мРНК цього білка з віком порівняно з *ad libitum* контролем (у 3 і 6 разів, відповідно). Більш того, у рівні ЦП не спостерігали статистично значущої різниці між молодими та старими тваринами на КО, тоді як у групі на режимі *ad libitum* він

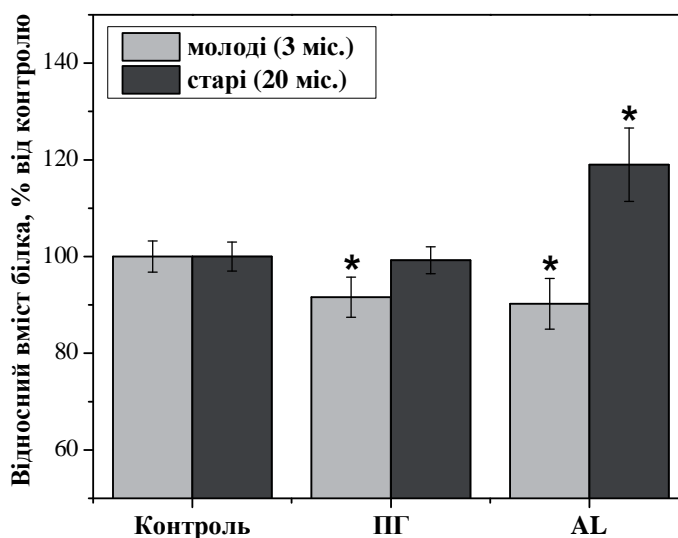


Рис. 2. Ефект періодичного голодування/відгодовування на рівень білка в ділянці 120 кДа (церулоплазмін) у сироватці молодих і старих щурів. Величини відображають середні значення  $\pm$  стандартне відхилення в 10 щурів у кожній групі. Середні значення в контрольній групі прийнято за 100%. Контроль: контрольні щури на режимі *ad libitum*; ПГ: щури після періодичного голодування протягом 10 днів; АЛ: відгодовування *ad libitum* протягом 20 днів після періоду ПГ. Зірочкою позначені випадки, у яких різниця між досліджуваною групою і контролем є статистично значущою.

збільшувався у 5 разів [34]. Одним із пояснень підвищення вмісту ЦП з віком є збільшення продукції реактивних форм кисню (РФК), оскільки цей фермент є одним із центральних антиоксидантів і каталізує перетворення вільних радикалів [34]. Цікаво, що зниження рівня цього білка відбувається також внаслідок передозування вітаміну С, який, як відомо, є дуже сильним антиоксидантом і повинен значно знижувати рівень вільнорадикальних ушкоджень [10]. Можна припустити, що зниження рівня ЦП після ПГ у молодих тваринах і збереження цього стану після тривалого періоду *ad libitum* відгодовування пов'язані з відомою властивістю цього роду дієт призводити до довготривалого зниження продукції РФК. Зниження самого ЦП внаслідок недостатнього надходження міді з їжею виключається як малоймовірне, оскільки відомо, що навіть після 4-тижневого режиму мідь-дефіцитної дієти рівень цього білка відновлюється максимум протягом 48 год, а період відгодовування в нашому випадку тривав 20 діб [14].

Підвищений рівень ЦП найчастіше є наслідком гормональної чи цитокінової стимуляції у випадку стресів, вагітності, гострих і хронічних запалень тощо [27]. З іншого боку, збільшення вмісту цього білка у крові виникає в умовах підвищеного оксидативного



пошкодження. Така ситуація спостерігається у разі нейродегенеративних розладів (хвороба Альцгеймера, шизофренія), лімфом, ССЗ та діабету [19]. Причому в останньому випадку інсулін спричиняє пряме інгібування експресії ЦП, вказуючи на можливу роль цього процесу у виникаючих при діабеті ускладненнях, а також на те, що однією з причин збільшення рівня ЦП з віком є резистентність до інсуліну, що залежить від віку [16]. Цікаво, що з віком також можна спостерігати посилення оксидативного ушкодження самого ЦП крові, що може бути наслідком як зсуву оксидативного балансу, так і ролі цього білка в антиоксидантній системі [24]. Схожа ситуація виникає також у разі стресу та гіпертиреозидизму, де також спостерігається зростання оксидативного ушкодження кровоносної системи та підвищення рівня ЦП [23]. Окрім цього, як і в вищеописаних випадках, стійке збільшення вмісту цього білка у старих тварин при переході на режим *ad libitum* ймовірніше за все пов'язане з посиленням оксидативного ушкодження, яке, як відомо, має місце при використанні дієт із підвищеним споживанням калорій [34]. Те, що подібна ситуація не спостерігається у молодих тварин на режимі *ad libitum*, можна пояснити, з іншого боку, тим, що прооксидантні процеси та ступінь оксидативного стресу зростають із віком, та, з другого боку, тим що процес старіння пов'язаний зі збільшенням резистентності до інсуліну, що, як наслідок, призводить до порушення регуляції синтезу ЦП у бік надекспресії. Виходячи з вищезгаданого, стійке зниження рівня ЦП після впливу ПГ у молодих тварин може мати сприятливий ефект у разі цілої низки патологій (ССЗ, діабету, хвороби Альцгеймера та ін.). Також великий інтерес становить подальше дослідження молекулярних основ різниці у відповідях на ПГ тварин різного віку.

Таким чином, у даній роботі було виявлено вплив тривалого ПГ на рівень ТТР та ЦП у крові щурів молодого та старого віку, а також досліджена стійкість ефектів цієї дієти. Встановлено, що: (i) у випадку з ТТР, у молодих і старих тварин ПГ призводить до протилежних ефектів: спостерігається дворазове падіння рівня цього білка у молодих щурів, тоді як у старих він підвищується на 30%; (ii) незалежно від віку, для всіх тварин такі зміни в рівні ТТР залишаються стійкими навіть після удвічі довшого ніж ПГ періоду відгодовування *ad libitum*; (iii) подібний до ТТР ефект спостерігається й у разі ЦП для молодих щурів, де падіння рівня білка також є стійким, але менш вираженим (зменшення лише на 10%); (iv) в моделі ПГ у старих тварин не спостерігається статистично значущих змін рівня ЦП, проте довготривале відгодовування призводить до підвищення рівня цього білка на 20%. Отримані дані можуть мати важливе значення для розуміння механізмів, які відповідають за сприятливі ефекти цієї моделі дієти, а також можуть бути використані для розробки методів профілактики і терапії низки хронічних та залежних від віку захворювань.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Afolabi P., Jahoor F., Jackson A.* et al. The effect of total starvation and very low energy diet in lean men on kinetics of whole body // *A. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 293. P. 1580–1589.
2. *Anson R., Jones B., Cabod R.* The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding // *AGE.* 2005. Vol. 27. No 1. P. 17–25.
3. *Bienvenu J., Jeppson J., Ingenbleek Y.* Transthyretin and retinol-binding protein // In: *Ritchie RF.* 1996. P. 9011–9018.
4. *Bradford M.* Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
5. *Broderius M., Prohaska J.* Differential impact of copper deficiency in rats on blood cuproproteins // *Nutr. Research.* 2009. Vol. 29. P. 494–502.
6. *Clark M., Hentzen B., Plank L.* et al. Sequential changes in insulin-like growth factor 1, plasma proteins, and total body protein // *J. Parenter Enteral Nutr.* 1996. Vol. 20. P. 363–370.
7. *Ding J., Kopchick J.* Plasma biomarkers of mouse aging // *AGE.* 2011. Vol. 33. P. 291–307.
8. *Everitt A., Rattan S., Couteur D.* Calorie restriction, aging and longevity // *Springer.* 2010. P. 323.
9. *Felding P., Fex G.* Factors responsible for the decreased plasma concentration of prealbumin during acute inflammation and fasting in the rat // *Acta Physiol. Scand.* 1983. Vol. 117. P. 377–383.
10. *Finley E., Cerklewski F.* Influence of ascorbic acid supplementation on copper status in young adult men // *Am. J. Clin Nutr.* 1983. Vol. 37. No. 4. P. 553–556.
11. *Guarente L., Picard F.* Calorie restriction – the SIR2 connection // *Cell.* 2005. Vol. 120. P. 473–482.
12. *Haynes P., Miller I., Aebersold R.* Proteins of rat serum: I. Establishing a reference two-dimensional electrophoresis map // *Electrophoresis.* 1998. Vol. 19. P. 1484–1492.
13. *Hellman N., Gitlin J.* Ceruloplasmin metabolism and function // *Annu. Rev. Nutr.* 2002. Vol. 22. P. 439–458.
14. *Holtzman N., Gaumnitz B.* Identification of an apoceruloplasmin-like substance in the plasma of copper-deficient rats // *J. Biol. Chem.* 1970. Vol. 245. P. 2350–2353.
15. *Ingenbleek Y., Young V.* Transthyretin in health and disease: nutritional implications // *Annu Rev. Nutr.* 1994. Vol. 14. P. 495–533.
16. *Kim S., Hwang H., Kim H.* et al. Effect of fungal polysaccharides on the modulation of plasma proteins in streptozotocin-induced diabetic rats // *Proteomics.* 2006. Vol. 6. P. 5291–5302.

17. *Laemmli U.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 1970. P. 680–685.
18. *Leslie M.* Searching for the secrets of the super old // *Sci*. 2008. Vol. 321. P. 1764–1765.
19. *Leyendecker M., Korsten P., Reinehr R.* Ceruloplasmin expression in rat liver cells is attenuated by insulin: role of FoxO transcription factors // *Horm Metab Res*. 2011. Vol. 43. P. 1–7.
20. *Liu L., Murphy R.* Kinetics of inhibition of beta-amyloid aggregation by transthyretin // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45. P. 15702–15709.
21. *Mattson M., Wan R.* Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems // *J. Nutr Biochem*. 2005. Vol. 16. N 3. P. 129–137.
22. *Mody N., Graham T., Tsuji Y.* et al. Decreased clearance of serum retinol-binding protein and levels of transthyretin in ob/ob mice // *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab*. 2008. Vol. 294. P. 785–793.
23. *Moulakakis K., Poulakou M., Paraskevas K.* et al. Hyperthyroidism is associated with increased aortic oxidative DNA damage in a rat model // *In vivo*. 2007. Vol. 21. P. 1021–1026.
24. *Musci G., Patti M., Fagiolo U.* et al. Age-related changes in human ceruloplasmin // *J. Biol. Chem*. 1993. Vol. 268. No. 18. P. 13388–13395.
25. *Ndiaye B., Prudhon C., Guillozo H.* Rat serum osteocalcin concentration is determined by food intake and not by inflammation // *J. Nutr*. 1992. Vol. 122. P. 1870–1874.
26. *Raila J., Henze A., Spranger J.* et al. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients // *Kidney International*. 2007. Vol. 72. P. 505–511.
27. *Ranganathan P., Lu Y., Jiang L.* Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats // *Blood*. 2011. Vol. 118. P. 3146–3153.
28. *Ritchie R., Palomaki G., Neveux L.* Reference distributions for the negative acute-phase proteins, albumin, transferrin, transthyretin // *J. Clin Lab Anal*. 1999. Vol. 13. P. 280–286.
29. *Varady K., Hellerstein M.* Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials // *Am. J. Clin Nutr*. 2007. Vol. 86. P. 7–13.
30. *Velayudhan L., Killick R., Hye A.* et al. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease // *J. Alzheimer's Disease*. Vol. 28. P. 369–375.
31. *Wade S., Bleiberg-Daniel F., Moullac B.* Rat transthyretin: effects of acute short-term food deprivation and refeeding on serum and cerebrospinal fluid // *J. Nutr*. 1988. Vol. 118. P. 199–205.

32. Wang X., Li X., Li Y. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis // *Biotechnol. Lett.* 2007. Vol. 29. P. 1599–1603.
33. Westermarck P., Sletten K., Johansson B. et al. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990. Vol. 87. P. 2843–2845.
34. Wiggins J., Goyal M., Wharram B. et al. Antioxidant ceruloplasmin is expressed by glomerular parietal epithelial cells and secreted into urine // *J. Am. Soc Nephrol.* 2006. Vol. 17. P. 1382–1387.
35. Zhang Z., Bast R., Yu J. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer // *Cancer Research.* 2004. Vol. 64. P. 5882–5890.

*Стаття: надійшла до редакції 12.05.14*

*доопрацьована 20.09.14*

*прийнята до друку 22.09.14*

#### **TRANSTHYRETIN AND CERULOPLASMIN LEVEL IN RAT BLOOD SERUM ON INTERMITTENT FASTING**

**M. Girych, N. Kurguzova, C. Danladi, A. Malyshev, A. Bozhkov**

*V.N.Karazin Kharkiv National University*

*45, Balakirev St., Kharkiv 61018, Ukraine*

*e-mail: girichms@gmail.com*

The influence of intermittent fasting (IF) on blood serum content of transthyretin (TTR) and ceruloplasmin (CP) in both young (3 month) and old (19 month) Wistar rats was investigated using reducing SDS-PAGE. IF for ten days with 30% weight loss resulted in 2-fold decrease in serum TTR content in young rats and after 20 days of *ad libitum* refeeding (AL) the level of this protein was on the same level. On the contrary, the regimens of IF and AL in old animals were followed by, respectively, 1.3- and 1.15-fold increase in TTR content in comparison with control. The similar situation was observed for CP: IF/AL regimens in young rats were coupled with the stable decrease of CP blood level (10%), but, remarkably, though IF in old animals did not cause any changes in the protein content, the AL brought about 1.2-fold increase in serum CP.

*Keywords:* diet, calorie restriction, intermittent fasting, transthyretin, ceruloplasmin.

## СОДЕРЖАНИЕ ТРАНСИРЕТИНА И ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОМ ГОЛОДАНИИ

М. Гирич, Н. Кургузова, Ц. Данлади, А. Малышев, А. Божков

*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина*

*ул. Балакирева, 45, Харьков 61018, Украина*

*e-mail: girichms@gmail.com*

Было исследовано воздействие периодического голодания (ПГ) на содержание транстиретина (ТТР) и церулоплазмينا (ЦП) в сыворотке крови молодых (3 мес.) и старых (19 мес.) крыс линии Вистар при помощи SDS-PAGE. ПГ в течение 10 дней с 30% потерей веса приводило к 2-кратному снижению содержания ТТР у молодых крыс, а после 20 дневного откорма *ad libitum* (AL) уровень этого белка оставался таким же сниженным. Напротив, применение режимов ПГ и AL в случае старых животных сопровождалось, соответственно, 1,3- и 1,15-кратным увеличением содержания ТТР по сравнению с контрольной группой. Подобную ситуацию наблюдали и для ЦП: режимы ПГ/AL у молодых крыс сопровождалось стабильным снижением уровня этого белка на 10%, но, хотя ПГ у старых животных не вызывало изменений, AL приводил к 1,2-кратному увеличению содержания ЦП в крови.

*Ключевые слова:* диета, калорийное ограничение, периодическое голодание, транстиретин, церулоплазмин.