

УДК: 57.022 + 57.15

Циклический режим кормления и прооксидантно-антиоксидантный баланс в ядрах гепатоцитов крыс молодого и старого возраста

М.С.Гирич, Н.И.Кургузова, Ю.В.Никитченко

*НИИ биологии Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
girichms@gmail.com*

Проведено исследование действия циклического режима кормления на динамику окислительного стресса в ядрах гепатоцитов крыс 3- и 19-месячного возраста. В качестве показателей состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса были использованы содержание ТБК-активных продуктов и активность глутатионпероксидазы. Обнаружено, что выраженное нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса возникает только по завершению первого цикла периодического голодания/восстановления массы тела и наиболее сильно проявляется у молодых особей. Выявлено наличие корреляции между уровнем ТБК-активных продуктов и активностью глутатионпероксидазы ядер. Уменьшение интенсивности окислительных процессов, наблюдаемое в ходе второго цикла диетического ограничения, было интерпретировано как проявление адаптивных механизмов.

Ключевые слова: *циклический режим кормления, оксидативный стресс, ядро, глутатионпероксидаза.*

Циклічний режим годування та прооксидантно-антиоксидантний баланс у ядрах гепатоцитів щурів молодого та старого віку

М.С.Гірич, Н.І.Кургузова, Ю.В.Нікитченко

Проведено дослідження дії циклічного режиму годування на динаміку оксидативного стресу у ядрах гепатоцитів щурів 3- та 19-місячного віку. В якості показників стану прооксидантно-антиоксидантного балансу були використані вміст ТБК-активних продуктів та активність глутатионпероксидази. Виявлено, що виражене порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу виникає тільки після завершення першого циклу періодичного голодування/відновлення маси тіла та є найбільш сильним у молодих тварин. Встановлена кореляція між рівнем ТБК-активних продуктів та активністю глутатионпероксидази ядер. Зменшення інтенсивності оксидативних процесів, яке спостерігається протягом другого циклу дієтичного обмеження, інтерпретовано як прояв адаптивних механізмів.

Ключові слова: *циклічний режим годування, оксидативний стрес, ядро, глутатионпероксидаза.*

Cyclic feeding regimen and balance between pro-oxidative and anti-oxidative processes in hepatocytes nuclei of young and old rats

M.S.Giryach, N.I.Kurguzova, Yu.V.Nikitchenko

The effect of cyclic feeding regimen on the dynamics of oxidative stress in hepatocytes nuclei of 3- and 19-month rats has been investigated. The intensity of pro-oxidative and anti-oxidative processes was evaluated by measuring of TBARs content and glutathioneperoxidase activity. The most pronounced oxidative stress was found to occur in young animals only after first cycle of periodic starvation/body weight recovery. The correlation between oxidative stress level and the activity of nuclear antioxidant system has been established. The decrease in the intensity of oxidative processes observed in the course of the second cycle of dietary restriction was interpreted as arising from adaptive mechanisms.

Key words: *cyclic feeding regimen, oxidative stress, nucleus, glutathioneperoxidase.*

Введение

В настоящее время калорийное ограничение (КО), снижение ежедневного поступления энергии с пищей на 30–60 %, является единственным общепризнанным негенетическим путем увеличения средней и максимальной продолжительности жизни практически всех исследованных эукариотических организмов, а также мощнейшим средством профилактики и терапии множества возраст-зависимых и хронических заболеваний (Masoro, 2005). Однако применение КО у млекопитающих сопряжено с рядом проблем. Во-первых, применение этой модели наиболее эффективно только в случае перевода на режим КО особей молодого возраста. Во-вторых, такой

перевод всегда сопровождается гибелью части экспериментальных животных, вследствие чего, как считают, и происходит селекция особей по средней и максимальной продолжительности жизни (Koubova, Guarente, 2003). Недавно было показано, что другой способ ограничения питания, т.н. циклический режим кормления (ЦРК), при котором животные подвергаются нескольким циклам периодического голодания (кормления через день) и откорма *ad libitum*, приводит к эффектам, сходным с КО. Наблюдалось, что кинетика выживания крыс, подверженных ЦРК в 19-месячном возрасте, была сходна с таковой у животных, находившихся на калорийно ограниченной диете с одномесечного возраста (Божков и др., 2014). Было высказано предположение, что в основе таких благоприятных эффектов ЦРК может лежать индукция неспецифических защитных реакций организма, однако какие-либо сведения на этот счет отсутствуют. Как полагают, одной из основных причин сокращения продолжительности жизни и развития возраст-зависимых патологий является нарушение работы генетического аппарата клетки, главным образом, в результате смещения прооксидантно-антиоксидантного баланса (Halliwell, 2005). Таким образом, целью нашего исследования было изучение влияния ЦРК на состояние показателей свободнорадикального окисления и эффективность ферментативной антиоксидантной системы ядер гепатоцитов крыс молодого и старого возраста.

Материалы и методы

Животные и схема эксперимента. Все экспериментальные процедуры соответствовали постановлениям комитета по биоэтике Кабинета Министров Украины и рекомендациям использования животных в экспериментах Академии наук Украины. В экспериментах использовались самцы крыс линии Вистар из колонии, поддерживаемой в виварии Научно-исследовательского института биологии (Харьков, Украина). Для эксперимента было отобрано по 56 животных 3- и 19-месячного возраста, которые были разделены на 5 групп (по 8–12 особей в каждой): **К** – контрольные животные на стандартном рационе питания; **1ПГ** – животные, подверженные режиму периодического голодания, т.е. предоставления ограниченного количества пищи (4 г и 2 г комбикорма на 100 г веса тела для молодых и старых крыс соответственно) каждый второй день, в течение 10 дней; **1О** – восстановление массы тела после **1ПГ** путем откорма *ad libitum* в течение 10 дней (25 г комбикорма в сутки) с последующим периодом реабилитации на стандартном рационе питания в течение 10 дней; **2ПГ** – то же, что и **1ПГ**, но после **1О**; **2О** – животные, после периода откорма *ad libitum* в течение 10 дней вслед за **2ПГ**. Состав комбикорма был следующим: 33,5% пшеница, 28% ячмень, 11% кукуруза, 7% сухое молоко, 5,5% семена подсолнечника, 5,5% сухая рыба, 5% сухие пивные дрожжи, 2% мука люцерны, 1% мел, 0,5% яичный порошок, 0,5% солевая смесь, 0,5% желатин (3450 ккал/кг). Животные рассаживались по клеткам индивидуально, имели свободный доступ к воде и ежедневно взвешивались в одно и то же время до кормления.

Выделение ядер. Ядра печени крыс были выделены в соответствии с методом, предложенным Graham (2004). Все процедуры выделения проводились в условиях 0–4°C. После голодания на протяжении ночи крыс декапитировали. Печень перфузировалась физиологическим раствором (pH=7,4) и переносилась в 30 мл буфера А (250 мМ сахароза, 25 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ Hepes-NaOH, 1 мМ PMSF, pH=7,4). 5 грамм печени пропускали через пресс и гомогенизировали из расчета в 25 мл буфера Б (2,2 М сахароза с показателем преломления 1,276, 25 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ Hepes-NaOH, 1 мМ PMSF, pH=7,4). Образцы гомогенизировались 7–8 тракциями при 700 об/мин в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема (клиренс ~ 0,09 мм). Верификация эффективности гомогенизации проводилась с помощью фазово-контрастной микроскопии (поляризационно-интерференционный микроскоп BIOLAR PI, Biolar, Poland). Гомогенат фильтровали через один слой нейлона (величина пор ~ 75 мкм) и центрифугировали 25000 g в течении 30 мин в угловом роторе. Осадок ресуспендировали в буфере Б и центрифугировали при тех же условиях. После этого ядра два раза отмывали в буфере А (1500 g 10 мин). Полученный осадок растворяли в буфере А, содержащем 10% глицерол, и замораживали в жидком азоте до использования. Чистоту ядер определяли, используя фазово-контрастную микроскопию.

Определение ТБК-активных продуктов. ТБК-активные продукты в ядрах гепатоцитов крыс определяли по методу Uchiyama et al. (Mihara, Uchiyama, 1978) в модификации Aguilar-Delfin (Aguilar-Delfin et al., 1996). Образцы ядер инкубировались 30 мин при 37°C в 0,15 М Трис-HCl (pH=7,4) из расчета 3 мг белка на 1 мл. Вслед за этим вносили 1,5 мл 20% уксусной кислоты (доведенной до pH=2,5 с помощью KOH) и 1,5 мл 0,8% тиобарбитуровой кислоты. Образцы помещались на водяную

баню на 45 мин, после чего их охлаждали и добавляли 1 мл 2% KCl. Окрашенные образцы экстрагировали бутанолом, центрифугировали 1500 г 10 мин и определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия). Коэффициент экстинкции ТБК-активных продуктов принимался за $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$ при 532 нм. Содержание белка в ядрах определяли по методу Lowry (Lowry et al., 1951).

Определение активности глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9). Активность фермента определяли в ядрах гепатоцитов экспериментальных животных с помощью метода Lawrence et al. (Lawrence, Burk, 1976) с изменениями. Образцы вносили в 50 мМ K^+, Na^+ -фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,15 мМ NADPH, 1 ед. глутатионредуктазы дрожжей и 3 мМ азида Na для ингибирования каталазы. В качестве субстрата использовали перекись водорода в концентрации 0,4 мМ. Измерение проводили при постоянном перемешивании магнитной мешалкой и температуре 37°C. Активность выражали в единицах активности Е на мг ДНК в образце. Скорость неферментативного и ферментативного окисления NADPH определяли флуориметрически на спектрофлуориметре CM 2203 (SOLAR, Belorussia) при максимуме возбуждения 350 нм и максимуме испускания 460 нм. Содержание ДНК определяли по методу Darzynkiewicz (1994).

Статистика. Для каждого параметра в экспериментальных группах рассчитывались средние значения и стандартное отклонение, а затем производилось попарное множественное сравнение с использованием критерия Уилкоксона (Манна-Уитни). Корреляционный анализ проводился с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия между группами считались статистически значимыми при $P < 0,05$. Результаты анализа на всех рисунках представлены как средние \pm стандартное отклонение.

Реактивы. NADPH, сахароза производства фирмы «AppliChem» (Германия); HEPES, Трис, глицерол производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США); NaN_3 , KH_2PO_4 производства фирмы «Merck» (Германия); бутилированный гидрокситолуол (ионол), ЭДТА, PMSF – производства фирмы «Sigma» (США); Hoeschs 33342 производства фирмы «Molecular Probes» (США).

Результаты и обсуждение

Как указано на рис. 1, десять дней **1ПГ** приводили к примерно 25% потере веса в обеих возрастных группах (25% и 23% для молодых и старых крыс соответственно). Было установлено, что в данных условиях такая потеря веса является предельной, по крайней мере для молодых крыс, так как падение веса ниже этого уровня приводило к высокой смертности. Одинаковая степень потери веса для молодых и старых животных достигалась тем, что старые крысы получали только половину количества калорий в день кормления по сравнению с молодыми. Такой подход, по нашему мнению, позволил избежать артефактов, связанных с различием в запасах питательных веществ и уровне метаболизма животных разных возрастов. Исходя из этого, мы рассматриваем жесткость диеты как равную для молодых и старых крыс, если потери веса сходны в обеих возрастных группах. После 20 дней откорма и реабилитации (**1O**) в динамике изменения массы тела крыс наблюдались существенные возраст-зависимые различия: в то время как масса старых крыс восстанавливалась в точности до исходного значения, масса молодых крыс была на 36% выше контроля. Второй цикл периодического голодания/восстановления массы тела приводил к сходным изменениям в случае старых крыс: происходило снижение на 24% после **2ПГ** и восстановление до контрольного уровня после **O2**. Однако в случае молодых животных, после **2ПГ** наблюдалось снижение массы тела до уровня контрольных крыс (на 32%), а после **O2** вес крыс был больше контроля на 40%. Тот факт, что масса тела молодых крыс после периодов восстановления (**O1** и **O2**) была существенно выше контрольных (36% и 40%), вероятнее всего, является результатом роста молодых животных. Это согласуется с данными о динамике изменения массы тела контрольных крыс, находящихся на стандартном рационе вивария (Bozhkov et al., 2014).

Было показано, что ЦРК сопровождается значительными изменениями в массе печени экспериментальных животных (Божков et al., 2014). В связи с этим для нас представляло интерес изучение динамики изменения этого параметра и, в частности, изменение массового коэффициента печени (МКП) – отношения массы печени к массе тела. Поскольку печень является центральным органом белкового, жирового и углеводного метаболизма и играет главную роль в антиоксидантной защите организма, можно полагать, что величина МКП отражает общую степень метаболической и оксидативной нагрузки на этот орган. Как изображено на рис. 2, во время первого цикла периодического голодания/откорма у молодых крыс наблюдалось стремительное падение МКП (32%)

после 1ПГ и восстановление этого показателя до уровня контроля после 1О. В случае старых животных 1ПГ не приводил к таким существенным изменениям, хотя и наблюдалось снижение медианы на 23% по сравнению с уровнем контроля. 1О в случае старых животных приводил к резкому увеличению МКП (на 23% больше контроля). Характер изменения МКП и у молодых и у старых животных во втором цикле ЦРК был сходен с первым. Стоит отметить, что по завершению двух циклов периодического голодания/восстановления веса МКП старых крыс был достоверно выше контроля на 30% и равнялся значению, характерному для молодых крыс. Т.е. ЦРК приводил к нивелированию возрастных различий в этом показателе, что представляет большой интерес для будущих исследований. Возможно, что сходный эффект не наблюдался в группе молодых крыс из-за характерного для их онтогенеза запаздывания роста печени относительно темпов роста тела.

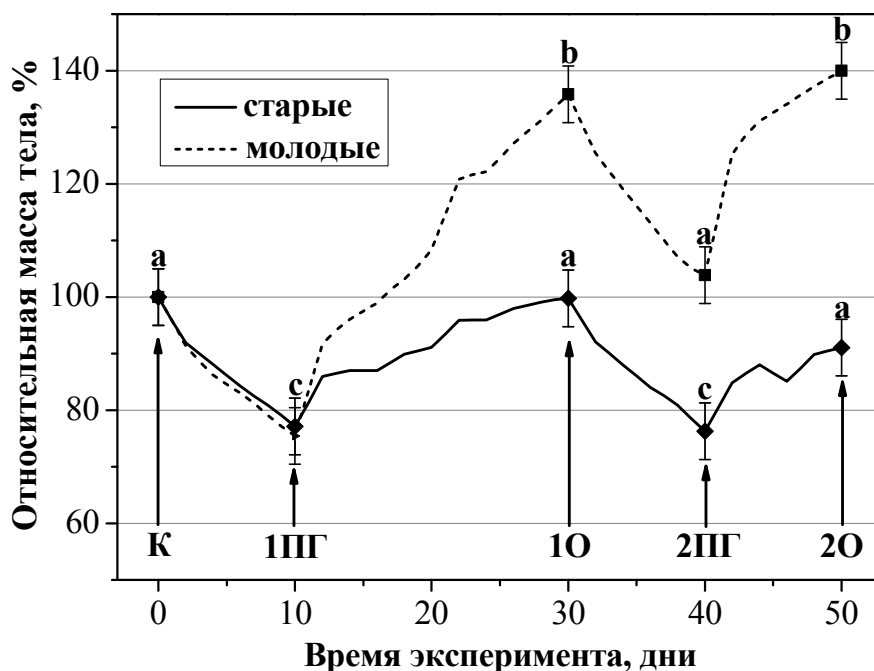


Рис. 1. Динамика изменения массы тела крыс 3- (молодые) и 19-месячного (старые) возраста при циклическом режиме кормления

Примечания: обозначение групп – см. раздел *Материалы и методы*. Стрелки указывают на дни забоя для разных экспериментальных групп. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n=8-12$ для каждой экспериментальной группы). Столбцы, обозначенные разными латинскими буквами (a, b, c, d), статистически значимо различаются ($P<0,05$).

Было показано, что резкое ограничение в поступлении питательных веществ приводит к повышению продукции реактивных форм кислорода, главным образом H_2O_2 , в печени крыс (Magczuk-Krupnicka et al., 2003). Причиной этого, как полагают, является интенсификация работы H_2O_2 -продуцирующих оксидаз в пероксисомах вследствие усиления притока жирных кислот (Orellana et al., 1992). Одним из наиболее достоверных показателей окислительного стресса является содержание ТБК-активных продуктов, которое отражает степень перекисного окисления липидов. При этом главной мишенью такого окисления являются биологические мембраны. С другой стороны, такие модификации мембранных липидов занимают центральное место в процессе старения (Rikans, Hornbrook, 1997). В связи с этим представляло интерес изучение степени окислительного повреждения мембран ядер гепатоцитов у животных, подверженных ЦРК.

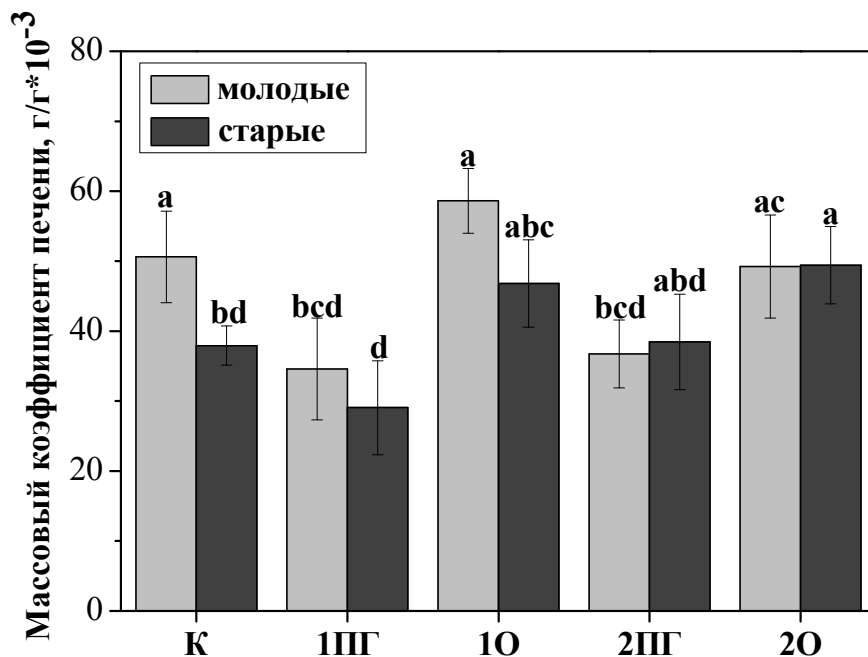


Рис. 2. Изменение массового коэффициента печени крыс 3-х (молодые) и 19-месячного (старые) возраста при циклическом режиме кормления

Примечания: обозначение групп – см. раздел Материалы и методы. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n=8-12$ для каждой экспериментальной группы). Столбцы, обозначенные разными латинскими буквами (a, b, c, d), статистически значимо различаются ($P<0,05$).

Как видно из рис. 3, исходный уровень ТБК-активных продуктов не отличался между контрольными молодыми и старыми крысами. Эти наблюдения согласуются с данными, полученными для гомогенатов печени крыс линии Wistar сходных возрастов (Perez et al., 1991). После 1ПГ увеличение по этому показателю наблюдалось только в случае молодых животных (38%). Wilhelm наблюдал увеличение содержания ТБК-активных продуктов уже на 2–3 сутки в печени голодающих крыс, однако, насколько нам известно, нет данных, касающихся изменений у старых животных (Wilhelm, 1990). По завершении восстановления массы тела (1О) наблюдалось резкое увеличение уровня ТБК-реактивных продуктов у животных обоих возрастов, наиболее ярко выраженное у молодых крыс – повышение на 168% относительно контрольной группы, тогда как у старых оно составляло 78%. Такой эффект согласуется с данными о том, что набор веса у крыс сопровождается увеличением ТБК-активных продуктов более чем в 4 раза, но строгая интерпретация этого явления отсутствует (Noeman et al., 2011). Повторное периодическое голодание (2ПГ) приводило к значительному снижению содержания ТБК-активных продуктов у молодых крыс и составляло 113% выше уровня контроля. У старых животных не наблюдалось достоверного различия в этом показателе по сравнению с крысами после 1О. Второе восстановление веса (2О) приводило к значительному различию в этом показателе между молодыми и старыми животными. В то время как у молодых особей этот показатель незначительно уменьшался по сравнению с 2ПГ, у старых он снижался до уровня контроля. Стоит отметить, что характер изменения в содержании ТБК-активных продуктов на протяжении ЦРК для молодых и старых животных был сходным (коэффициент корреляции Спирмена $Rho=0,9$, $P<0,05$), но окислительный стресс в случае старых крыс был выражен слабее.

Основным барьером против свободно-радикального повреждения ядра является глутатион-зависимая антиоксидантная система, где главное место занимает ряд ферментов с глутатионпероксидазной активностью (ГП), обладающих широкой специфичностью к окислительному субстрату (перекиси водорода, почти всем алифатическим и циклическим органическим кислотам,

полиненасыщенным жирным кислотам, ряду стероидов и др.) (Кулинский, Колесниченко, 2009). Как следует из рис. 4, контрольный уровень активности ГП в ядрах гепатоцитов крыс был значительно выше у старых животных, что согласуется с данными, полученными в ряде работ, где с возрастом наблюдается увеличение активности ГП в печени крыс линии Wistar (Sastrea et al., 1992). В ответ на первое периодическое голодание (1ПГ) наблюдалось увеличение ГП активности у молодых крыс на 62%, тогда как у старых этот показатель снижался на 33%. Первый откорм (1О) приводил к дальнейшему увеличению активности ГП у молодых животных (на 175% по отношению к контролю), в то время как старые особи характеризовались восстановлением этого показателя до уровня контроля. Т.е. у молодых крыс наблюдалась четкая корреляция между активностью ГП и уровнем ТБК-активных продуктов в первом цикле ЦРК (коэффициент корреляции Спирмена составляет 0,99, $P < 0,05$), тогда как у старых она гораздо менее выражена (коэффициент корреляции Спирмена 0,485). Во втором цикле наблюдалось снижение активности ГП у молодых животных на 27% после 2ПГ с последующим возвратом до уровня контроля после 2О. В случае старых крыс статистически достоверных различий по этому показателю не наблюдалось.

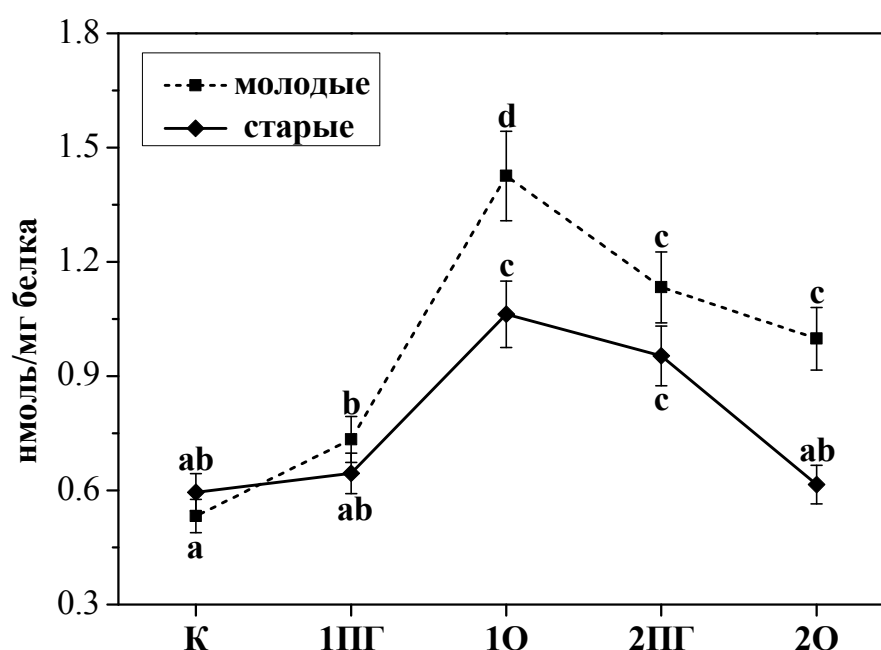


Рис. 3. Содержание ТБК+-реактивных продуктов в ядрах гепатоцитов крыс 3- (молодые) и 19-месячного (старые) возраста при циклическом режиме кормления

Примечания: обозначение групп – см. раздел Материалы и методы. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n=8-12$ для каждой экспериментальной группы). Столбцы, обозначенные разными латинскими буквами (a, b, c, d), статистически значимо различаются ($P < 0,05$).

В ряде экспериментальных исследований было показано, что одной из характерных особенностей диет, продлевающих жизнь, является повышение устойчивости к окислительному стрессу (Qiu et al., 2010). Сходный эффект наблюдается и в случае многих мутаций, благоприятно влияющих на продолжительность жизни (Holzenberger et al., 2003). Причем наиболее ярко этот эффект проявляется в случае периодического голодания (Anson et al., 2005). Одним из общепринятых объяснений данного явления является то, что окислительный стресс при таких воздействиях активирует специфические сигнальные пути, приводящие к усилению защитных механизмов (т.н. гормезисный эффект) и к прямому или опосредованному влиянию на продолжительность жизни и развитие возраст-зависимых заболеваний (Ristow, Schmeisser, 2011). Наблюдаемое нами ослабление окислительного стресса во время второго цикла периодического

голодания/восстановления веса, особенно ярко выраженное в случае старых животных, согласуется с изложенной выше концепцией. Таким образом, полученные данные могут рассматриваться как дополнительные аргументы в пользу наличия взаимосвязи между благоприятными эффектами ЦРК и повышением устойчивости к окислительному стрессу.

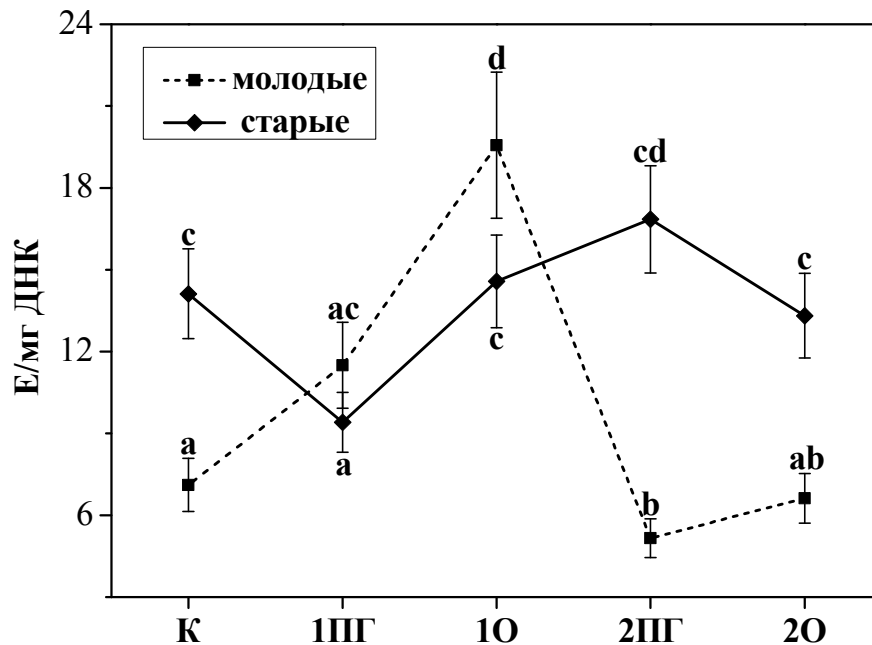


Рис. 4. Активность глутатионпероксидазы в ядрах гепатоцитов крыс 3- (молодые) и 19-месячного (старые) возраста при циклическом режиме кормления

Примечания: обозначение групп – см. раздел *Материалы и методы*. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n=8-12$ для каждой экспериментальной группы). Столбцы, обозначенные разными латинскими буквами (a, b, c, d), статистически значимо различаются ($P<0,05$).

Выводы

1. По завершению ЦРК не наблюдается статистически достоверного различия в массе тела старых животных по сравнению с контрольной группой.
2. ЦРК приводит к нивелированию возрастных различий в массовом коэффициенте печени, в частности, наблюдается увеличение этого показателя на 30% в группе старых животных, что может говорить о повышении устойчивости этих животных по отношению к окислительным нагрузкам.
3. Первый цикл ЦРК приводит к резкому повышению содержания ТБК-активных продуктов в ядрах гепатоцитов крыс обеих возрастных групп, однако во время второго цикла наблюдается резкое снижение этого показателя, что может говорить о возникновении адаптивных изменений к повторным применениям такого диетического ограничения.
4. На протяжении ЦРК в ядрах гепатоцитов наблюдается корреляция между степенью окислительного стресса и активностью глутатионпероксидазы, что наиболее выражено в случае молодых животных.

Список литературы

- Божков А.И., Кургузова Н.И., Криворучко Т.В. и др. Циклический режим кормления – новая модель экспериментальной геронтологии // *Успехи геронтологии*. – 2014. – №2. – С. 328–335. /Bozhkov A.I., Kurguzova N.I., Kryvoruchko T.V. et al. Tsyklicheskiy rezhim kormleniya – novaya model eksperimentalnoy gerontologii // *Uspexhi gerontologii* – 2014. – Vol.2. – S. 328–335./
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // *Биомедицинская химия*. – 2009. – №3. – С. 255–277. /Kulinskiy V.I., Kolesnichenko

- L.S. Sistema glutationa. I. Sintez, transport, glutationtransferazy, glutationperoksidazy // Biomeditsinskaya khimiya. – 2009. – Vol.3. – S. 255–277./
- Aguilar-Delfín I., Lopez-Barrera F., Hernandez-Munoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC14 administration // *Hepatology*. – 1996. – Vol.24 (3). – P. 657–662.
- Anson R.M., Jones B., Cabod R. The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding // *AGE*. – 2005. – Vol.1. – P. 17–25.
- Bozhkov A.I., Kurguzova N.I., Krivoruchko T.V. et al. A cyclic feeding regime: a new model in experimental gerontology // *Advances in Gerontology*. – 2014. – Vol.27. – P. 251–257.
- Darzynkiewicz Z. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content // *Methods in Cell Biology*. – 1994. – Vol.41. – P. 401–420.
- Graham J.M. Preparation of nuclei from rat liver using sucrose // *eLS*. – 2004. – Published online. (DOI: 10.1038/npg.els.0003804)
- Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease // *eLS*. – 2005. – Published online. (DOI: 10.1038/npg.els.0002269)
- Holzenberger M., Dupont J., Ducos B. et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice // *Nature*. – 2003. – Vol.421. – P. 182–187.
- Koubova J., Guarente L. How does calorie restriction work? // *Genes & Dev*. – 2003. – Vol.17. – P. 313–321.
- Lawrence R.A., Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1976. – Vol.4. – P. 952–958.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.1. – P. 265–275.
- Marczuk-Krynicka D., Hryniewiecki T., Piatek J. et al. The effect of brief food withdrawal on the level of free radicals and other parameters of oxidative status in the liver // *Med. Sci. Monit.* – 2003. – Vol.3. – P. 131–135.
- Masoro E.J. Overview of caloric restriction and ageing // *Mech. Ageing Dev.* – 2005. – Vol.9. – P. 913–922.
- Mihara M., Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal Biochem.* – 1978. – Vol.1. – P. 271–278.
- Noeman S.A., Hamooda H.E., Baalash A.A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats // *Diabetol. Metab. Syndr.* – 2011. – Vol.1. – P. 3–17.
- Orellana M., Fuentes O., Rosenbluth H. et al. Modulation of rat liver peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation by starvation // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol.2. – P. 193–196.
- Pérez R., López M., Quiroga G.B. Aging and lung antioxidant enzymes, glutathione, and the lipid peroxidation in the rat // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1991. – Vol.1. – P. 35–39.
- Qiu X., Brown K., Hirschey M.D. et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation // *Cell Metab.* – 2010. – Vol.6. – P. 662–667.
- Rikans L.E., Hornbrook K.R. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol.31. – P. 116–127.
- Ristow M., Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2011. – Vol.2. – P. 327–336.
- Sastrea J., Rodriguez J.V., Pallardó F.V. et al. Effect of aging on metabolic zonation in rat liver: Acinar distribution of GSH metabolism // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 1992. – Vol.2. – P. 181–190.
- Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol.86 (1). – P. 271–278.
- Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation // *Acta Univ. Carol. Med. Monogr.* – 1990. – Vol.137. – P. 1–53.

Представлено: Н.С.Кавок / Presented by: N.S.Kavok

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 15.05.2014