

©Коллектив авторов

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ НУТРИЕНТНОМ ДИСБАЛАНСЕ

О.Н. Волощук, Ю.В. Стус, Г.П. Копыльчук*

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,
Институт биологии, химии и биоресурсов, кафедра биохимии и биотехнологии,
ул. М. Коцюбинского, 2, Черновцы, 580120, Украина; *эл. почта: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Исследовали активность свободнорадикальных процессов в митохондриях печени крыс, содержащихся на высокосахарозном и низкобелковом/высокосахарозном рационе. Установлено, что избыточное потребление сахарозы вызывает активацию свободнорадикальных процессов в митохондриях печени. Об этом свидетельствуют: усиление генерации гидроксильного радикала, накопление первичных (диеновых конъюгатов, кетодиенов) и вторичных продуктов (ТБК-реактивных продуктов) перекисного окисления липидов, увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды более чем в 2 раза, а также накопление продуктов окислительной модификации белков (карбонильных производных). При сопутствующем алиментарном дефиците белка наблюдается интенсификация свободнорадикальных процессов в митохондриях печени, что указывает на критическую роль нарушения обеспеченности рациона пищевым белком для окислительного повреждения митохондриальных липидов и белков и, соответственно, поддержания структурной целостности митохондрий. Выявленные различия в интенсивности свободнорадикальных процессов в митохондриях печени крыс, содержащихся на высокосахарозном и низкобелковом/высокосахарозном рационах, очевидно, могут рассматриваться как предпосылки для нарушения функциональной активности печени в условиях нутриентного дисбаланса.

Ключевые слова: печень; гидроксильный радикал; окислительная модификация липидов; окислительная модификация белков; высокосахарозный рацион; низкобелковая диета

DOI: 10.18097/PBMC20206605386

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным остаётся вопрос о механизмах нарушения метаболических процессов в условиях нутриентного дисбаланса [1, 2]. Известно, что алиментарная недостаточность белка, обусловленная различными причинами (потребление белковых продуктов с низкой биологической ценностью, использование научно необоснованных диет, различной доступностью населения к источникам полноценных белков), сопровождается нарушением целого ряда метаболических процессов, включая процессы энергообеспечения [3] и гемостаза [4]. В то же время диета с высоким содержанием сахарозы известна своими кариогенными эффектами, развитием ожирения, инсулинорезистентности, сахарного диабета 2 типа и рака [5, 6]. Чрезмерное потребление простых углеводов является причиной возникновения неалкогольной жировой болезни печени [7]. Интермедиаты, образующиеся в печени при метаболизме глюкозы и фруктозы, активируют фактор транскрипции ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein), необходимый для экспрессии мРНК липогенных генов, включая гены, кодирующие синтазу жирных кислот и стеароил-КоА-дегидрогеназу 1. В то же время показано, что высокосахарозные диеты не обязательно индуцируют ожирение, но провоцируют эндокринные и метаболические нарушения, в первую очередь непереносимость глюкозы, гиперинсулинемию, гиперлипидемию и интенсификацию синтеза маркеров воспаления [8, 9].

Печёночные и системные воспалительные цитокины, продуцируемые при ожирении, активируют внутриклеточные киназы, которые способны ингибировать ключевые элементы сигнального пути инсулина с последующим развитием резистентности к инсулину [10]. Избыточное потребление сахарозы сопровождается накоплением триглицеридов в гепатоцитах с последующей интенсификацией генерации активных форм кислорода (АФК) и формированием окислительного стресса, что также способствует воспалению в печени [11].

Хотя патогенез вышеуказанных нарушений, как правило, сложен и разнообразен, продемонстрировано, что избыточное производство АФК в ходе хронического потребления рациона с высоким содержанием сахарозы может быть одним из факторов, способствующих возникновению и прогрессированию указанных нарушений обмена веществ [12]. Имеются многочисленные сообщения об интенсификации окислительных повреждений в скелетных мышцах [13] и сердце [14] при употреблении диеты с высоким содержанием сахарозы. Показано, например, что при избыточном потреблении сахарозы в жировой ткани людей повышается генерация АФК с одновременным увеличением активности NADPH-оксидазы и подавлением экспрессии антиоксидантных ферментов [15]. В то же время особенности метаболических изменений в печени в условиях употребления избытка сахарозы на фоне алиментарного дефицита белка остаются неизученными.

Целью нашей работы было исследование интенсивности свободнорадикальных процессов в митохондриях печени крыс, содержащихся на высокосахарозном и низкобелковом/высокосахарозном рационе.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на 36 белых нелинейных крысах массой 130-140 г и возрастом 2-2,5 месяца. Крыс содержали в индивидуальных пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде *ad libitum*.

Животные были разделены на группы (по 12 особей в каждой группе): К — контроль; ВС — крысы, содержащиеся на высокосахарозном рационе 28 суток; НБР/ВС — крысы, содержащиеся на низкобелковом/высокосахарозном рационе 28 суток.

Животные контрольной группы получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 76% углеводов, сбалансированный по всем нутриентам [16]. Животные группы ВС получали рацион, содержащий 40% сахарозы при общем уровне белка 14%, жиров — 10%, углеводов — 76%. Животных группы НБР/ВС содержали на низкобелковом/высокосахарозном рационе: 4,7% белка, 40% сахарозы и необходимое количество других нутриентов.

Цервикальную дислокацию крыс под лёгким эфирным наркозом осуществляли на 29-е сутки эксперимента. Митохондриальную фракцию из гомогената печени выделяли методом дифференциального центрифугирования при 0-3°C [17].

Интенсивность генерации гидроксильного радикала определяли согласно методу [18]. Готовили инкубационную смесь, содержащую 20 мМ дезоксирибозу, 1 мМ H_2O_2 , 20 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,4) и исследуемый образец (200 мкг белка). Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, после чего добавляли 0,5 мл 1% раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 50 мМ NaOH и 0,5 мл 2,8% раствора трихлоруксусной кислоты. Полученную смесь выдерживали 20 мин на кипящей водяной бане, охлаждали и определяли величину экстинкции при 532 нм. Поскольку при определении ОН-радикала и ТБК-активных продуктов регистрируются одни и те же продукты, поглощающие при 532 нм, есть вероятность получить завышенный результат генерации ОН-радикала. Для предотвращения этого параллельно для каждого исследуемого образца проводили контрольный эксперимент, используя перехватчик ОН-радикала — тиомочевину (конечная концентрация 1,11 мМ) с добавлением ЭДТА (конечная концентрация 0,22 мМ). При расчёте результатов генерации ОН-радикала учитывали значения, полученные в таком эксперименте. Интенсивность генерации ОН-радикала выражали в условных единицах ($AE \cdot 10^2 / (\text{мин} \cdot \text{мг} \text{ белка})$).

Для определения содержания первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД)) использовали метод, основанный

на экстракции этих соединений смесью равных объёмов гептана и изопропанола [19]. Для исследования использовали изопропанольную фазу, в которую экстрагируются продукты перекисидации фосфолипидов. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ("Agilent Technologies", США) против соответствующего контроля, содержащего воду вместо биологического образца, при 232 нм (ДК), 273 нм (КД). Следует отметить, что зарегистрированный против воды УФ-спектр органического экстракта липидного материала в области поглощения диеновых конъюгатов (230-235 нм), представляет собой плечо на склоне более интенсивного пика с максимумом поглощения при 210-220 нм. В связи с этим результаты определения ДК представлены в относительных единицах $\Delta D_{233} / \text{мг} \text{ белка}$.

Содержание ТБК-реактивных продуктов определяли по реакции с ТБК, в результате которой образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 532 нм. Расчёт производили по молярному коэффициенту экстинкции $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$, с учётом концентрации белка выражали в нмоль МДА/мг белка [20].

Соотношение холестерина/фосфолипиды определяли как соотношение содержания общего холестерина к содержанию фосфолипидов и выражали в ммоль/ммоль. Для исследования использовали экстракт липидов, полученный по методу Фолча. Содержание холестерина оценивали, используя стандартный набор реактивов ("Филисит-Диагностика", Украина). Содержание фосфолипидов определяли по методу [21], учитывая количество фосфора в комплексе с молибдатом аммония.

Окислительную модификацию белков оценивали по уровню карбонильных производных белков с использованием 2,4-динитрофенилгидразина [22]. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что в митохондриях печени крыс, содержащихся на высокосахарозном рационе, наблюдается интенсификация генерации ОН-радикала в 2,3 раза по сравнению с показателями контроля (рис. 1). В то же время максимальное (более чем в 4 раза) увеличение генерации ОН-радикала обнаружено у животных, содержащихся на низкобелковом/высокосахарозном рационе. Известно, что гидроксильный радикал является наиболее агрессивным среди АФК; при этом чувствительной мишенью для его деструктивного влияния являются полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран [23]. Поэтому нами исследовано содержание первичных (ДК, КД) и вторичных (ТБК-активных соединений) продуктов окислительного повреждения липидов в митохондриях печени.

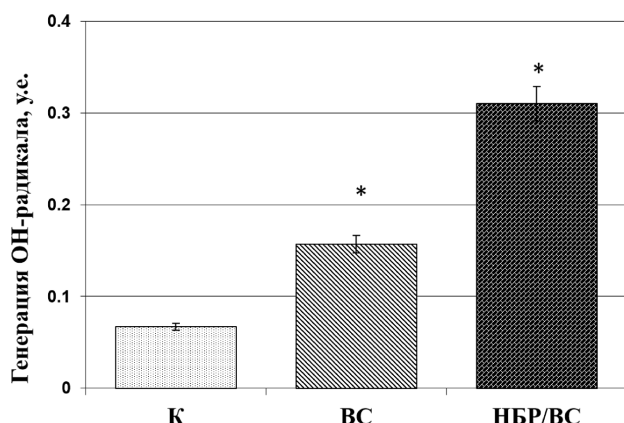


Рисунок 1. Интенсивность генерации гидроксильного радикала в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях нутриентного дисбаланса. Здесь и на других рисунках: К — контроль; ВС — крысы, содержащиеся на высокосахарозном рационе; НБР/ВС — крысы, содержащиеся на низкобелковом/высокосахарозном рационе. * — статистически достоверная разница по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Анализ результатов исследования показал, что у животных, содержащихся на высокосахарозном рационе, наблюдается как накопление первичных (рис. 2, 3), так и вторичных (рис. 4) продуктов ПОЛ. При этом максимальная интенсификация процессов ПОЛ обнаружена в печени крыс, содержащихся на низкобелковом/высокосахарозном рационе. Вероятно, усугубляющее влияние дефицита белка на интенсивность ПОЛ можно объяснить несколькими причинами. Известно, что при дефиците белка в организме наблюдается снижение концентрации в тканях антиоксидантов, следствием чего является нарушение антиоксидантного статуса [24]. Кроме того, показано [25], что у лиц с алиментарным дефицитом белка активация генерации АФК в печени сопровождается замедлением защитных и восстановительных процессов, опосредованных нарушением синтеза или окислительной модификацией регуляторных белков. С другой стороны, способность клеток к восстановлению зависит от адекватности энергообеспечения, а для животных, содержащихся на низкобелковом/высокосахарозном рационе, характерно как снижение активности NAD^+ -зависимых реакций цикла Кребса, так и ферментативной активности Комплекса I дыхательной цепи [3], что также может рассматриваться как одно из звеньев механизма интенсификации ПОЛ в исследуемых экспериментальных условиях. Кроме того, нарушение биоэнергетических функций митохондрий печени крыс, содержащихся в условиях белковой недостаточности и избыточного потребления сахарозы сопровождается нарушением функций пероксисом и развитием неалкогольного ожирения печени, что авторы рассматривают как причину метаболических нарушений в печени [26]. При этом сохраняется способность к окислению жирных кислот в гепатоцитах, что также способствует избыточной продукции АФК. Вероятно, именно перегрузка печени липидами, наблюдаемая при таком рационе, может рассматриваться как причина интенсификации

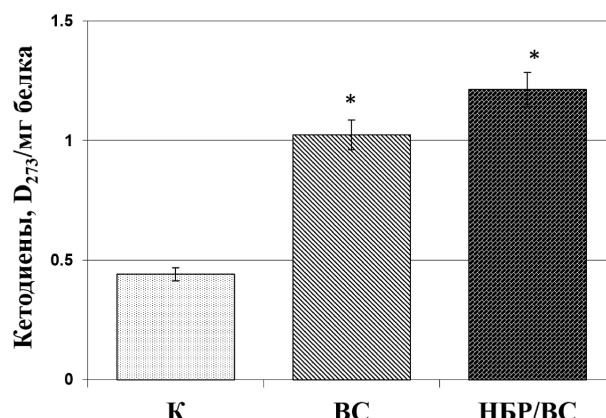


Рисунок 2. Содержание кетодиенов в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях нутриентного дисбаланса.

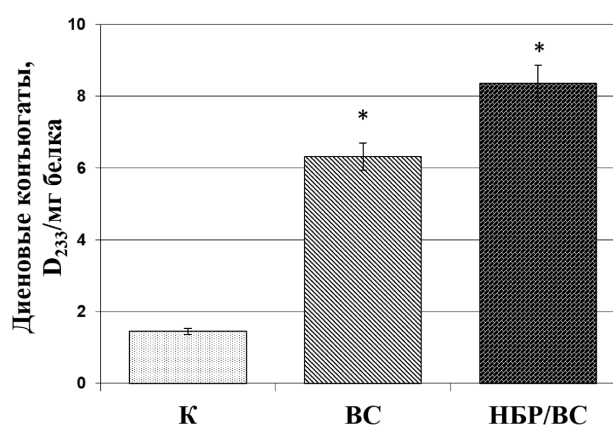


Рисунок 3. Содержание диеновых конъюгатов в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях нутриентного дисбаланса.

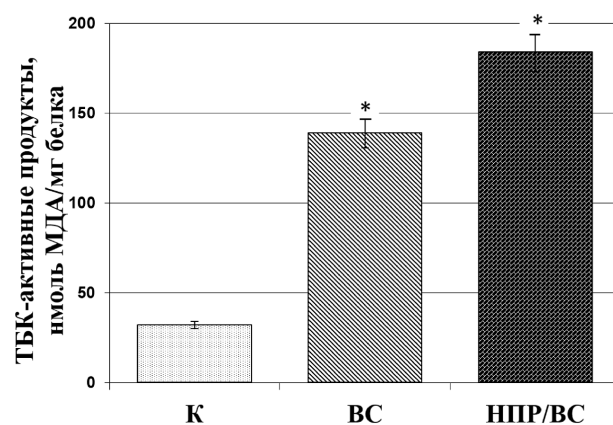


Рисунок 4. Содержание ТБК-активных продуктов в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях нутриентного дисбаланса.

генерации АФК с последующим прогрессированием неалкогольной жировой болезни печени, что может быть связано как с неизбирательным окислительным повреждением биомолекул, так и с нарушением регуляции окислительно-восстановительных процессов [27], хотя специфические молекулярные механизмы ещё не совсем понятны.

Поскольку содержание продуктов ПОЛ является показателем интенсивности свободнорадикального повреждения биомембран, то полученные результаты указывают на выраженные деструктивные изменения митохондриальных мембран в условиях нутриентного дисбаланса. Следствием указанных изменений, вероятно, будет нарушение функциональной активности митохондрий. Такие нарушения могут рассматриваться как предпосылка к повреждению гепатоцитов, что было нами показано в ранее опубликованных исследованиях [16]. Продукты ПОЛ, в первую очередь ТБК-активные соединения, способны взаимодействовать со свободными аминокетильными группами белков и компонентами фосфолипидов [28], следствием чего будет нарушение функционирования не только мембранных белковых комплексов, но и нарушение барьерной функции мембран в целом. Кроме того, следствием интенсификации ПОЛ является изменение электрического потенциала мембран, а также изменение их компонентного состава [29].

Нами показано, что в условиях нутриентного дисбаланса интенсификация ПОЛ в печени сопровождается изменением соотношения холестерина и фосфолипидов, основных липидных компонентов мембран. Максимальное увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды, в 3,2 раза, наблюдается у животных, употреблявших низкобелковый/высокосахарозный рацион (рис. 5). Указанные изменения свидетельствуют об увеличении содержания в мембранах холестерина при снижении содержания фосфолипидов. Вероятно, именно интенсификация ПОЛ в печени и изменение фосфолипидного состава мембран вследствие свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов в исследуемых экспериментальных условиях может рассматриваться как причина снижения содержания фосфолипидов в мембранах. Поскольку соотношение холестерина и фосфолипидов определяют текучесть и вязкость мембран [30], то, вероятно, установленные изменения будут определяющими для нарушения мембраносвязанных процессов.

Следует также отметить, что помимо интенсификации ПОЛ, у животных, употреблявших низкобелковый/высокосахарозный рацион, в митохондриях печени наблюдается резкое увеличение, более чем в 10 раз, содержания продуктов окислительной модификации белков (рис. 6). Накопление карбонильных производных митохондриальных белков указывает на их деструктивные изменения, что может сопровождаться их фрагментацией либо агрегацией с последующей потерей функциональной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, избыточное потребление сахарозы вызывает интенсификацию свободнорадикальных процессов в митохондриях печени: усиление

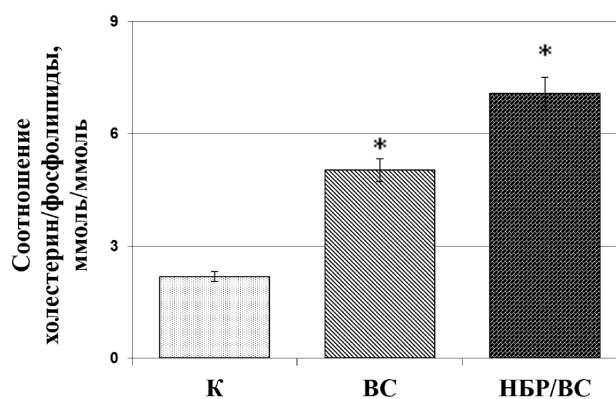


Рисунок 5. Соотношение содержания общего холестерина и фосфолипидов в печени крыс, содержащихся в условиях нутриентного дисбаланса.

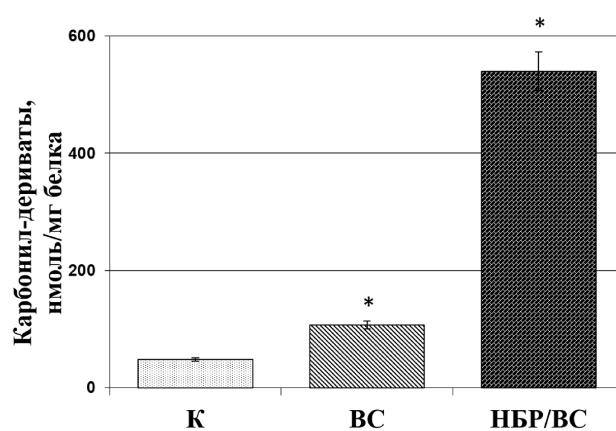


Рисунок 6. Содержание карбонильных производных белков митохондрий печени крыс, содержащихся в условиях нутриентного дисбаланса.

генерации гидроксильного радикала в 2,3 раза, накопление первичных и вторичных продуктов ПОЛ, увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды, а также накопление продуктов окислительной модификации белков. В то же время сопутствующий алиментарный дефицит белка значительно активизирует свободнорадикальные процессы в митохондриях печени, что указывает на критическую роль нарушения обеспеченности рациона пищевым белком для поддержания структурной целостности митохондрий. Выявленные отличия интенсивности свободнорадикальных процессов в митохондриях печени крыс, содержащихся на различных рационах, очевидно, могут рассматриваться как предпосылки для нарушения функциональной активности печени в условиях нутриентного дисбаланса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках НИР “Биохимические и лазерно-поляриметрические параметры комплексного прогнозирования метаболических нарушений”, № госрегистрации 0119U100717.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли с учётом положений “Общих этических принципов экспериментов на животных”, принятых Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wu G. (2016) Food Funct., **7**(3), 1251-1265.
2. Tikole R.V., Kulkarni R., Uppinakudru S. et al. (2013) Int. J. Res. Ayurveda Pharm., **4**(4), 605-607.
3. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P., Tazirova K.A. (2020) Biophysics, **65**, 268-271.
4. Khan A., Khan S., Jan A.A., Khan M. (2017) J. Food Sci. Nutr., **1**(1), 1-2.
5. Maciejczyk M., Matczuk J., Zendzian-Piotrowska M., Niklińska W., Fejfer K., Szarmach I., Ładny J.R., Zieniewska I., Zalewska A. (2018) Nutrients, **10**(10), E1530. DOI: 10.3390/nu10101530.
6. Ragab S.M., Abd Elghaffar S.Kh., El-Metwally T.H., Badr G., Mahmoud M.H., Omar H.M. (2015) Lipids Health Dis., **14**, 83. DOI: 10.1186/s12944-015-0087-1.
7. Lian J., Watts R., Quiroga A.D., Beggs M.R., Alexander R.T., Lehner R. (2019) J. Lipid Res., **60**(4), 880-891.
8. Cao L., Liu X., Cao H., Lv Q., Tong N. (2012) Oxid. Med. Cell Longev., **2012**, 374346. DOI: 10.1155/2012/374346.
9. Pacholko A.G., Beka L.K. (2019) BioRxiv, DOI: 10.1101/863670.
10. Morsy M.D., Abdel-Razek H.A., Eid R.A., El-Naby W.M.H. (2014) Med. J. Cairo Univ., **82**(1), 133-144.
11. Castellanos Jankiewicz A.K., Rodriguez Peredo S.M., Cardoso Saldaña G., Díaz Díaz E., Tejero Barrera M.E., del Bosque Plata L., Carbó Zabala R. (2015) Nutr. Hosp., **31**(6), 2546-2553.
12. Zhou X., Han D., Xu R., Wu H., Qu C., Wang F., Wang X., Zhao Y. (2016) Oncotarget., **7**(49), 80223-80237.
13. Bonnard C., Durand A., Peyrol S., Chanseume E., Chauvin M.A., Morio B., Vidal H., Rieusset J. (2008) J. Clin. Invest., **118**(2), 789-800.
14. Busserolles J., Zimowska W., Rock E., Rayssiguier Y., Mazur A. (2002) Life Sci., **71**, 1303-1312.
15. Yang Y., Du L., Hosokawa M., Miyashita K. (2020) Marine Drugs, **18**, 148. DOI:10.3390/md18030148.
16. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Голиней Т.Ю. (2019) Вopr. питания, **88**(6), 61-67. [Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P., Holinei T.Y. (2019) Voprosy Pitaniia, **88**(6), 61-67.]
17. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П. (2016) Биомедицинская химия, **62**(2), 169-172. [Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. (2016) Biomeditsinskaya Khimiya, **62**(2), 169-172.]
18. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюбура А.В., Поперека Г.М., Стефаненко Л.Г., Сенюк О.Ф. (2005) Фізіол. журн., **51**(3), 32-41. [Tkachenko M.M., Sahach V.F., Baziliuk O.V., Kotsiuruba A.V., Popereka H.M., Stepanenko L.H., Seniuk O.F. (2005) Fiziol. Zh., **51**(3), 32-41].
19. Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д. (2017) Биомедицинская химия, **63**(4), 289-295. [Kotovich I.L., Rutkovskaya Zh.A., Tahanovich A.D. (2017) Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(4), 289-295.]
20. Rodrigues T., de França L.P., Kawai C., de Faria P.A., Mugnol K.C., Braga F.M., Tersariol I.L., Smaili S.S., Nantes I.L. (2007) J. Biol. Chem., **282**(35), 25577-25587.
21. Северин С.Е., Соловьева Г.А. (ред.) (1989) Практикум по биохимии: Учеб. пособие. 2-е изд. перераб. и доп. Изд-во МГУ, Москва 509 с. [Severin S.E., Soloviev G.A. (1989) Workshop on Biochemistry: Textbook. Moscow State University Publishing, Moscow 509 pp.]
22. Parihar M.S., Pandit M.K. (2003) Gen Physiol Biophys., **22**(1), 29-39.
23. Bultel-Poncé V., Durand T., Guy A., Oger C., Galano J.M. (2016) Oilseeds & Fats Crops and Lipids, **23**, D118(1-10).
24. Khare M., Mohanty C., Das B.K., Jyoti A., Mukhopadhyay B., Mishra S.P. (2014) Int. J. Pediatrics, **2014**, 254396. DOI: 10.1155/2014/254396.
25. Sidhu P., Garg M.L., Dhawan D.K. (2004) Nutr. Hosp., **19**, 341-347.
26. Zutphen T., Ciapaite J., Bloks V.W., Ackereley C., Gerding A., Jurdzinski A., de Moraes R.A., Zhang L., Wolters J.C., Bischoff R., Wanders R.J., Houten S.M., Bronte-Tinkew D., Shatseva T., Lewis G.F., Groen A.K., Reijngoud D.-J., Bakke B.M., Jonker J.W., Kim P.K., Bandsma R.H.J. (2016) J. Hepatology, **65**, 1198-1208.
27. Chen Z., Tian R., Sh Z., Cai J., Li H. (2020) Free Rad. Biol. Med., **152**, 116-141.
28. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. (2014) Oxid. Med. Cell. Longev., **2014**, 360438. DOI: 10.1155/2014/360438.
29. Rems L., Viano M., Kasimova M.A., Miklavčič D., Tarek M. (2019) Bioelectrochemistry, **125**, 46-57.
30. Gundermann K., Kuenker A., Kuntz E., Drożdżik M. (2011) Pharmacol. Rep., **63**, 643-659.

Поступила в редакцию: 12. 05. 2020.
После доработки: 26. 08. 2020.
Принята к печати: 27. 08. 2020.

**FEATURES OF FREE RADICAL PROCESSES
IN THE LIVER OF RATS WITH A NUTRIENT IMBALANCE**

O.N. Voloshchuk, Yu.V. Stus, G.P. Kopylchuk*

Fedkovych Chernovtsi National University, Institute of Biology, Chemistry and Bioresources,
Department of Biochemistry and Biotechnology,
2 M. Cotsubinskogo str., Chernovtsi, 58000 Ukraine; *e-mail: o.voloshchuk@chnu.edu.ua

The activity of free radical processes in liver mitochondria was investigated in rats kept on high-sucrose and low protein/high-sucrose diets. Excess of dietary sucrose caused intensification of free radical processes in liver mitochondria as evidenced by increased hydroxyl radical generation, accumulation of primary (conjugated dienes, ketodienes) and secondary products (TBA-reactive products) of lipid peroxidation, increased cholesterol/phospholipids ratio and also accumulation of oxidative modification products of proteins (carbonyl derivatives). Additional nutritional protein deficiency (low protein/high-sucrose diet) enhanced destructive changes in liver mitochondria. This suggests a critical role of nutrient protein supplementation for maintaining the functional activity of mitochondria. The established changes can be considered as one of possible mechanisms of functional liver activity violation in conditions of nutrient imbalance.

Key words: liver; hydroxyl radical; lipid peroxidation; protein oxidation; high-sucrose ration; low protein ration

Funding. The work was done within framework of the “Biochemical and Laser-Polarimetric Parameters of Complex Prediction of Metabolic Disturbances” Program, Ukrainian State Register No. 0119U100717.

Received: 12.05.2020; revised: 26.08.2020; accepted 27.08.2020.