

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА**

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

БАТАЩУК МИРОСЛАВА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577:599.32:591.1/.4

**ДИСЕРТАЦІЯ
ЕНЕРГЕТИЧНІ ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У МИШЕЙ ЗА
СПОЖИВАННЯ ВИСОКОКАЛОРІЙНОЇ ЇЖИ ТА АЛЬФА-
КЕТОГЛЮТАРАТУ**

Спеціальність 091 Біологія
Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М.В. Батащук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор
Лушак Володимир Іванович

Івано-Франківськ – 2025

АНОТАЦІЯ

Ваташук М.В. Енергетичні та вільнорадикальні процеси у мишей за споживання висококалорійної їжі та альфа-кетоглутарату. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія. – Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, МОН України, Івано-Франківськ, 2025.

Дисертація присвячена дослідженню впливу альфа-кетоглутарату (АКГ) на фоні базової та висококалорійної їжі (ВКЇ) з високим вмістом жирів та фруктози на морфометричні та гематологічні показники, параметри енергетичного обміну, маркери оксидативного стресу, параметри антиоксидантного захисту та запальні процеси у тканинах мишей середнього віку лінії *C57BL/6J*.

У сучасному світі споживання ВКЇ є одним із основних чинників розвитку метаболічного синдрому, який значно підвищує ризик виникнення діабету 2 типу та серцево-судинних захворювань. Одним із перспективних підходів до зменшення негативного впливу ВКЇ, багатой на жири та фруктозу, є застосування харчових втручань. Особливий інтерес викликають препарати на основі природних компонентів, зокрема АКГ, що є проміжним продуктом циклу трикарбонових кислот (ЦТК), володіє антиоксидантними властивостями, які сприяють попередженню метаболічних порушень і уповільненню процесів старіння організму. Крім того, АКГ виконує роль регулятора фізіологічних процесів. Дослідження показали, що добавки АКГ зменшують ризик розвитку ожиріння у мишей, які отримували їжу із високим вмістом жирів. Цей ефект пов'язаний зі змінами експресії генів, що регулюють ліпідний обмін. Таким чином, АКГ може бути ефективним харчовим додатком для корекції метаболічних порушень.

Вивчення впливу АКГ на організм на тлі ВКЇ є важливим для розуміння механізмів, які можуть запобігати розвитку метаболічних порушень. Тому

метою цієї роботи було оцінити вплив альфа-кетоглутарату на морфометричні, метаболічні та запальні показники у мишей лінії *C57BL/6J* за споживання базової їжі та висококалорійної їжі з високим вмістом жирів та фруктози.

Лінія *C57BL/6J* була обрана для нашого дослідження, оскільки добре відомо, що висококалорійна їжа викликає у неї метаболічні порушення, а саме швидкий набір маси тіла, інсулінорезистентність, гіперглікемію, дисліпідемію, ожиріння (особливо абдомінальне), оксидативний стрес та хронічний запальний стан.

Для дослідження було використано самців мишей п'ятимісячного віку. Експеримент тривав вісім тижнів і включав чотири групи тварин, яких утримували на різних режимах харчування: базовій їжі, базовій їжі з додаванням 1% АКГ замість питної води, ВКІ та ВКІ з додаванням 1% АКГ замість питної води. Базова їжа (10% ккал отримані від жиру) містила 21,8% білку, 4,8% жиру, 69,1% вуглеводів і 3,9% клітковини, її калорійність становила 329,5 ккал/100г. Їжу з високим вмістом жиру та фруктози готували шляхом змішування стандартної їжі, смальцю, фруктози та жовчі як емульгатору. Висококалорійна їжа містила 45% ккал отримані від жиру, 15% ккал отримані від фруктози і 10% білку, її калорійність становила 486 ккал/100г. Цю їжу оновлювали мишам щодня. У дослідженні АКГ додавали в формі натрієвої солі. Альфа-кетоглутарову кислоту у формі порошку (Protista AB, Швеція, 99%) змішували з водою для приготування розчину, який нейтралізували NaOH до pH розчину 7,3. Готували 10% розчин АКГ, який перед використанням розводили до 1%. ЛД₅₀ альфа-кетоглутарату для щурів (самців і самок) становить >5 г/кг.

Впродовж експерименту визначали кількість випитої води та масу тіла мишей. По завершенню експерименту проводили забір крові у мишей та забір органів – печінки, жирової тканини, серця та скелетних м'язів. Мишей піддавали анестезії вуглекислим газом. Після взяття зразків крові, здійснювали забій мишей методом цервікальної дислокації.

З гематологічних показників визначали загальну кількість еритроцитів та лейкоцитів у крові, диференційну формулу лейкоцитів, гематокрит та вміст

гемоглобіну. У плазмі крові також визначали деякі клінічні біохімічні показники, серед них – вміст глюкози, триацилгліцеридів, загального холестерину, IL-1 β та активності параоксонази і мієлопероксидази. Енергетичний обмін досліджували, оцінюючи вміст енергетичних субстратів, активностей ключових ферментів гліколізу, фруктолізу та пентозофосфатного шляху. Для оцінки оксидативного стресу визначали вміст пероксидів ліпідів, карбонільних груп білків, окисленого та відновленого глутатіону. Активності антиоксидантних та асоційованих з ними ферментів визначали для дослідження потужності антиоксидантного захисту в тканинах мишей.

Восьмитижневе годування ВКІ не викликало значних змін у морфометричних показниках мишей (динаміка маси тіла, довжина тіла, індекси маси тіла, індекс ожиріння, індекс Лі) середнього віку і лише незначно вплинуло на гематологічні показники (нижча кількість еритроцитів, нижчі відносні рівні юних форм та лімфоцитів, вищі рівні моноцитів). Додавання АКГ до ВКІ спричинило незначне зниження загальної кількості лейкоцитів із змінами у їх диференційному складі (нижче співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів та вищі відносні рівні паличкоядерних нейтрофілів). Водночас, при споживанні АКГ на фоні стандартної їжі, спостерігалось збільшення загальної кількості лейкоцитів та зміни у відсотковому співвідношенні різних форм цих клітин (нижчі рівні лімфоцитів та вищі відносні рівні паличкоядерних нейтрофілів).

Щодо біохімічних показників плазми крові, то споживання ВКІ призводило до вищого вмісту ТАГ. Додавання АКГ до ВКІ сприяло вищому вмісту глюкози в плазмі крові. При цьому, коли АКГ додавали до базової їжі, спостерігалась вища активність мієлопероксидази у плазмі крові мишей.

Висококалорійна їжа сприяла розвитку чітких метаболічних змін у печінці, зокрема активації фруктолізу (вища активність фруктокінази), розвитку оксидативного стресу (вищий вміст пероксидів ліпідів, вищі активності антиоксидантних та асоційованих з ними ферментів) та запалення (вища активність мієлопероксидази та зміни, виявлені під час гістологічного дослідження печінки). Додавання АКГ до ВКІ не запобігало розвитку

оксидативного стресу в печінці мишей, окрім нижчих активностей глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Крім того, АКГ на тлі висококалорійної їжі, виконує регуляторну роль, підвищуючи активність гліколітичних (гексокінази, фосфофруктокінази та піруваткінази) і деяких антиоксидантних та асоційованих з ними ферментів (каталази, глутатіонредуктази та НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1), водночас спостерігалось пригнічення фруктолізу. Це вказує на те, що АКГ частково запобігає негативним ефектам споживання фруктози у великих кількостях. Додавання до основної їжі АКГ суттєво не впливало на гліколіз, але, сприяло стимуляції антиоксидантного захисту та вищому біосинтезу GSH.

Вживання ВКІ призводило до розвитку оксидативного стресу різної інтенсивності у вісцеральній жировій тканині, серці та скелетних м'язах мишей. Додавання АКГ до ВКІ зменшувало інтенсивність оксидативного стресу в цих тканинах, завдяки антиоксидантній дії АКГ. Найбільш виражені захисні ефекти АКГ спостерігали в серці мишей, які отримували ВКІ. Крім того, АКГ, застосований разом зі стандартною їжею, підвищував активність антиоксидантних ферментів у серці, але знижував їх активність у жировій тканині та м'язах. При споживанні мишами ВКІ та ВКІ в поєднанні з АКГ спостерігалось збільшення розмірів адипоцитів жирової тканини мишей. Однак під час гістологічного дослідження жирової тканини ознак запалення не було виявлено.

Восьмитижневе годування ВКІ призвело до значних метаболічних змін у скелетних м'язах самців мишей. Зокрема, спостерігалось накопичення триацилгліцеридів, зниження рівня глікогену та загального білку, а також підвищення активності гліколітичних ферментів (гексокінази, фосфофруктокінази та піруваткінази). Ці зміни є характерними симптомами розвитку інсулінорезистентності. Додавання АКГ до ВКІ послаблювало всі ці метаболічні зміни, що виникли у м'язах мишей, які споживали ВКІ.

Це дослідження вперше показало здатність АКГ покращувати метаболічний стан мишей з порушеннями, які викликались споживанням ВКІ,

що багата на тваринні жири та фруктозу. Захисний ефект АКГ проявлявся у зниженні інтенсивності оксидативного стресу, посиленні антиоксидантного захисту та нормалізації енергетичного обміну в тканинах мишей. Виявилось, що за умов харчування базовою їжею АКГ активував певні компоненти антиоксидантного захисту в тканинах мишей. Ці результати вказують на те, що ефекти АКГ на організм тварин можуть суттєво відрізнятися залежно від того, чи застосовується він з базовою чи висококалорійною їжею. Це дослідження поглиблює розуміння механізмів розвитку метаболічного синдрому, який спричинюється ВКІ, та пояснює роль АКГ як регулятора метаболізму.

Дослідження виявило тканиноспецифічні ефекти АКГ, які можуть бути зумовлені різними механізмами його дії. Зокрема, стимуляція антиоксидантного захисту може відображати прооксидантну дію АКГ, тоді як зниження інтенсивності оксидативного стресу в тканинах мишей, які отримували ВКІ, можливо, відбувається через антиоксидантну дію АКГ. Модуляція гематологічних показників може бути результатом імуномодуючої дії АКГ.

Результати підкреслюють потенціал АКГ як харчового додатку для пом'якшення негативних наслідків висококалорійного харчування та відкривають перспективи для подальших досліджень його механізмів дії за різних фізіологічних умов.

Ключові слова: альфа-кетоглутарат, їжа з високим вмістом жиру та фруктози, метаболічний синдром, ожиріння, запалення, оксидативний стрес, активні форми кисню, антиоксидантна система, антиоксидантні ферменти, антиоксиданти, метаболізм, миші, кров, тканини.

ANNOTATION

Vatashchuk M.V. Energy and free radical processes in mice consuming high-calorie food and alpha-ketoglutarate. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 Biology, specialty 091 Biology. – Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2025.

The dissertation is devoted to studying the effects of alpha-ketoglutarate (AKG) in the context of basic and high-fat high-fructose food (HFHF) on the morphometric and hematological parameters, energy metabolism indicators, oxidative stress markers, antioxidant defense parameters, and inflammatory processes in middle-aged *C57BL/6J* mice.

In the modern world, high-calorie food consumption is one of the main factors contributing to the development of metabolic syndrome, significantly increasing the risk of type 2 diabetes and cardiovascular diseases. One promising approach to mitigating the negative effects of high-calorie food, particularly those high in fats and fructose, is through dietary interventions. Natural compound-based supplements, such as AKG, are of particular interest. This compound, an intermediate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, exhibits antioxidant properties that help prevent metabolic disorders and slow the aging process. Additionally, AKG acts as a regulator of physiological processes. Studies have shown that AKG supplementation reduces the risk of obesity in mice fed a high-fat food. This effect is associated with changes in the expression of genes regulating lipid metabolism. Thus, AKG may serve as an effective dietary supplement for correcting metabolic disorders and promoting health.

Studying the effects of AKG on the body in the context of high-calorie food is crucial for understanding mechanisms that can prevent metabolic disorders. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of alpha-ketoglutarate on the morphometric, metabolic, and inflammatory parameters in *C57BL/6J* mice consuming a basic food and a high-calorie food rich in fats and fructose.

The *C57BL/6J* line was chosen for our study due to its well-documented susceptibility to metabolic disturbances induced by HFHF. These disturbances include rapid weight gain, insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, obesity (especially abdominal obesity), oxidative stress, and a chronic inflammatory state.

Male mice aged five months were used for the study. The experiment lasted eight weeks and included four groups of animals maintained on different dietary regimens: basic food, basic food supplemented with 1% AKG instead of drinking water, HFHF, and HFHF supplemented with 1% AKG instead of drinking water. The basic food (10% kcal derived from fat) contained 21.8% protein, 4.8% fat, 69.1% carbohydrates, and 3.9% fiber, with an energy value of 329.5 kcal/100 g. High-fat, high-fructose food was prepared by mixing standard food, lard, fructose, and bile as an emulsifier. The high-calorie food contained 45% kcal derived from fat, 15% kcal derived from fructose, and 10% protein, with an energy value of 486 kcal/100 g. This food was provided to the mice daily. In the study, AKG was added in the form of a sodium salt. Alpha-ketoglutaric acid in powder form (Protista AB, Sweden, 99%) was mixed with water to prepare a solution, which was then neutralized with NaOH to a pH of 7.3. A 10% AKG solution was prepared and diluted to 1% before use. The LD₅₀ of alpha-ketoglutarate for rats (both males and females) is >5 g/kg.

During the experiment, the amount of water consumed and the body weight of the mice were measured. At the end of the experiment, blood samples and organs – including the liver, adipose tissue, heart, and skeletal muscles – were collected. The mice were anesthetized with carbon dioxide. After blood sample collection, euthanasia was performed using the cervical dislocation method.

Hematological parameters assessed included total red blood cell and white blood cell counts, the differential leukocyte formula, hematocrit, and hemoglobin levels. Clinical biochemical parameters were also determined in the plasma.

Energy metabolism was studied by assessing the levels of energy substrates and the activities of key enzymes involved in glycolysis, fructolysis, and the pentose phosphate pathway. Oxidative stress was evaluated by measuring the levels of lipid peroxides, protein carbonyl groups, and oxidized and reduced glutathione. The activities of antioxidant and related enzymes were measured to evaluate the antioxidant defense capacity in mouse tissues.

Eight weeks of feeding with a HFHF food did not cause significant changes in the morphometric parameters of middle-aged mice (body weight dynamics, body

length, body mass index, obesity index, or Lee index) and only slightly affected hematological indicators (lower erythrocyte count, reduced relative levels of immature forms and lymphocytes, and higher monocyte levels). The addition of AKG to the HFHF food caused a slight reduction in the total leukocyte count and changes in their differential composition (lower neutrophil-to-lymphocyte ratio and higher relative levels of band neutrophils).

At the same time, AKG consumption with a standard food resulted in an increase in total leukocyte count and changes in the percentage distribution of different leukocyte types (lower lymphocyte levels and higher relative levels of band neutrophils).

Regarding plasma biochemical parameters, HFHF food consumption led to higher triglyceride (TAG) levels. The addition of AKG to the HFHF food contributed to an increase in blood plasma glucose levels. At the same time, when AKG was added to the basic food, higher myeloperoxidase activity was observed in the blood plasma of mice.

The HFHF food contributed to pronounced metabolic changes in the liver, including activation of fructolysis (higher fructokinase activity), development of oxidative stress (elevated lipid peroxide levels and higher activities of antioxidant and related enzymes), and inflammation (increased myeloperoxidase activity and changes observed during liver histological examination). The addition of AKG to the HFHF food did not prevent oxidative stress in the liver, except for reducing glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activities.

Additionally, AKG in the context of HFHF food likely played a regulatory role by increasing the activities of glycolytic enzymes (hexokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase) and some antioxidant and associated enzymes (catalase, glutathione reductase, and NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase 1) while suppressing fructolysis. This suggests that AKG partially mitigates the negative effects of excessive fructose consumption. The addition of AKG to the basic food did not significantly affect glycolysis but promoted the stimulation of antioxidant defense and increased GSH biosynthesis.

Consumption of a HFHF food induced oxidative stress of varying intensity in the visceral adipose tissue, heart, and skeletal muscles of mice. The addition of AKG to the HFHF food reduced the intensity of oxidative stress in these tissues, likely due to the antioxidant properties of AKG. The most pronounced protective effects of AKG were observed in the hearts of mice on the HFHF food. Moreover, AKG, when administered with a standard food, increased the activity of antioxidant enzymes in the heart but reduced their activity in adipose tissue and muscles.

In mice consuming HFHF food and HFHF food combined with AKG, an increase in the size of adipocytes in adipose tissue was observed. However, histological examination of adipose tissue did not reveal signs of inflammation.

Eight weeks of HFHF feeding led to significant metabolic changes in the skeletal muscles of male mice, including triglyceride accumulation, reduced glycogen and total protein levels, and increased activities of glycolytic enzymes (hexokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase). These changes are characteristic symptoms of insulin resistance development. The addition of AKG to the HFHF food mitigated these metabolic alterations in the muscles of mice consuming HFHF food.

This study demonstrated for the first time the ability of AKG to improve the metabolic state of mice with disturbances caused by high-calorie food rich in animal fats and fructose. The protective effect of AKG manifested in reducing oxidative stress, enhancing antioxidant defense, and normalizing energy metabolism in the tissues of mice. Under standard food conditions, AKG was found to activate certain components of the antioxidant defense system in mouse tissues. These results indicate that the effects of AKG on animals may vary significantly depending on whether it is administered with a standard or HFHF food. This study provides deeper insights into the mechanisms of metabolic syndrome development induced by or high-calorie food and highlights the role of AKG as a metabolism regulator.

The study revealed tissue-specific effects of AKG, which may be driven by different mechanisms of its action. In particular, the stimulation of antioxidant defense may reflect the pro-oxidant effect of AKG, while the reduction in oxidative stress intensity in the tissues of mice receiving HFHF may be due to the antioxidant properties

of AKG. The modulation of hematological parameters may result from the immunomodulatory effects of AKG.

The findings highlight the potential of AKG as a dietary supplement to mitigate the adverse effects of high-calorie food and open new perspectives for further research into its mechanisms of action under various physiological conditions.

Keywords: alpha-ketoglutarate, high-fat and high-fructose food, metabolic syndrome, obesity, inflammation, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidant system, antioxidant enzymes, antioxidants, metabolism, mice, blood, tissues.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Видання, що входять до наукометричної бази даних Scopus:

1. **Vatashchuk M. V.**, Bayliak M. M., Hurza V. V., Storey K. B., & Lushchak V. I. Metabolic syndrome: lessons from rodent and *Drosophila* models. *BioMed research international*. 2022. № 2022. 5850507. ISSN: 23146133.

DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5850507>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85133257893&origin=resultslist>

2. Bayliak M. M., **Vatashchuk M. V.**, Gospodaryov D. V., Hurza V. V., Demianchuk O. I., Ivanochko M. V., Burdyliuk N. I., Storey K. B., Lushchak O., & Lushchak V. I. High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: alpha-ketoglutarate effects. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. 2022. № 1866(12). 130226. ISSN: 03044165.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130226>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85136514964&origin=resultslist>

3. **Vatashchuk, M. V.**, Bayliak, M. M., Hurza, V. V., Demianchuk, O. I., Gospodaryov, D. V., & Lushchak, V. I. Alpha-ketoglutarate partially alleviates effects of high-fat high-fructose diet in mouse muscle. *EXCLI journal*. 2023. № 22. P. 1264–1277. ISSN: 16112156.

DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2023-6608>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85179361428&origin=resultslist>

Фахові видання України (категорія Б):

4. **Vatashchuk M.**, Hurza V., & Bayliak M. Adapting of spectrophotometric assay of paraoxonase activity with 4-nitrophenylacetate for murine plasma and liver. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*. 2023. № 9(4). P. 6–14. ISSN: 2413-2349.

DOI: <https://doi.org/10.15330/jpnu.9.4.6-14>

URL: <https://journals.pnu.edu.ua/index.php/jpnu/article/view/6610>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Ватащук М.**, Гурза В., Сорочинська О., Байляк М., Лушак В. Вплив альфа-кетоглютарату на антропометричні параметри мишей // *XIX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»* (м. Львів, 3–4 грудня 2020р.). – С. 40.

URL:

https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2020/4/AB_2020_22_4_6_conf.pdf

2. **Ватащук М.**, Гурза В., Дем'янчук О., Байляк М., Лушак В. Вплив дієти з високим вмістом жирів та альфа-кетоглютарату на антропометричні показники та активність мітохондріальних комплексів у печінці мишей // *XVII Міжнародна наукова конференція для студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 19–21 квітня 2021р.). – С.32.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2021/04/MIP_2021.pdf

3. О.І. Дем'янчук, Д.В. Господарьов, **М.В. Ватащук**, М.П. Лирик, М.М. Байляк. Вплив дієти з високим вмістом жирів і фруктози на гліколіз і фруктоліз та коригувальний ефект альфа-кетоглютарату // *XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених* (м. Львів, 19 травня 2022р.). – С. 37.

URL:

https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2022/2/AB_2022_24_2_conference.pdf

4. **Vatashchuk M.**, Hurza V., Bayliak M. Effects of high-calorie diet and alpha-ketoglutarate on the content of lipid peroxides in mouse tissues // *All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the russian invader* (Kyiv, from 15 th to 17 th of June 2022). – P. 101.

URL: [https://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20the%20All-Ukrainian%20Conference%20on%20Molecular%20and%20Cell%20Biology%20with%20international%20participation%20\(Apdated\).pdf](https://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20the%20All-Ukrainian%20Conference%20on%20Molecular%20and%20Cell%20Biology%20with%20international%20participation%20(Apdated).pdf)

5. **Ватащук М.**, Гурза В, Байляк М., Лушак В. Ефекти дієти з високим вмістом жиру та фруктози і альфа-кетоглутарату на вміст метаболітів у печінці та плазмі молодих мишей // VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (м. Дніпро, 6–7 жовтня 2022р.). – С.143-144.

URL: <https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2022/10/Abstract-book-Dnipro-2022.pdf>

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Миша <i>Mus musculus</i> як модельний організм для вивчення метаболічного синдрому	25
1.2. Індукція метаболічного синдрому у модельних тварин	27
1.3. Метаболічний синдром.....	32
1.4. Стратегії запобігання розвитку та профілактики метаболічного синдрому	36
1.5. Характеристики альфа-кетоглютарату	38
1.6. Вплив АКГ на тривалість життя.....	41
1.7. Антиоксидантна функція АКГ	43
1.8. Прооксидантні властивості АКГ	46
1.9. Роль альфа-кетоглютарату в метаболічному синдромі.....	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
2.1. Реактиви	51
2.2. Дизайн експерименту.....	51
2.3. Забір крові для гематологічного аналізу та отримання плазми крові мишей	53
2.4. Гематологічний аналіз крові	53
2.5. Гомогенізація тканин та визначення активності ферментів.....	54
2.5.1. Активність каталази.....	55
2.5.2. Активність глутатіонпероксидази	55
2.5.3. Активність глутатіонредуктази	56
2.5.4. Активність глутатіон-S-трансферази	56
2.5.5. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази	57
2.5.6. Активність НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1	57
2.5.7. Активність гексокінази.....	57
2.5.8. Активність фосфофруктокінази.....	58
2.5.9. Активність фруктокінази.....	58
2.5.10. Активність піруваткінази	59

2.5.11. Активність пароксонази	59
2.5.12. Активність мієлопероксидази	59
2.6. Гомогенізація тканин та визначення маркерів оксидативного стресу	60
2.6.1. Вміст пероксидів ліпідів	61
2.6.2. Вміст загального глутатіону	61
2.6.3. Вміст карбонільних груп білків	62
2.7. Гомогенізація тканин та визначення вмісту метаболітів	62
2.7.1. Визначення концентрацій глюкози і глікогену	63
2.7.2. Визначення вмісту загального холестерину	64
2.7.3. Визначення вмісту триацилгліцеридів	64
2.7.4. Визначення концентрації білку методом Бредфорда	65
2.8. Визначення рівня вільного альфа-кетоглутарату	65
2.9. Визначення рівня IL-1 β у плазмі крові мишей непрямим методом ІФА .	66
2.10. Гістологічний аналіз зразків тканин	67
2.11. Статистична обробка даних	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	68
3.1. Їжа з високим вмістом жиру і фруктози та альфа-кетоглутарат незначно впливають на морфометричні та гематологічні показники мишей	70
3.2. Їжа з високим вмістом жиру та фруктози викликає слабкий оксидативний стрес і впливає на метаболізм у печінці мишей: ефекти альфа-кетоглутарату	79
3.3. Додавання альфа-кетоглутарату по-різному модифікує оксидативний стрес у тканинах мишей, які споживали стандартну та висококалорійну їжу	91
3.4. У м'язах мишей альфа-кетоглутарат частково послаблює негативний вплив їжі з високим вмістом жиру та фруктози	103
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	114
ВИСНОВКИ	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	127
ДОДАТКИ	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

GSH – відновлений глутатіон

GSH/GSSG – співвідношення концентрацій відновленого до окисленого глутатіону

GSSG – окислений глутатіон

IL-1 β – інтерлейкін 1-бета

NHO1 – НАД(Ф)Н-залежна хінооксидоредуктаза 1

ПОН – пароксоназа

АКГ – альфа-кетоглутарат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

ВКЇ – їжа з високим вмістом жиру та фруктози

ВКЇАКГ – їжа з високим вмістом жиру та фруктози з додаванням 1% розчину АКГ

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

GST – глутатіон-S-трансфераза

ГК – гексокіназа

ГП – глутатіонпероксидаза

ГР – глутатіонредуктаза

ЕДТА – натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти

КБ – карбонільні групи білків

МПО – мієлопероксидаза

МС – метаболічний синдром

НАД/Н – нікотинамідаденіндинуклеотид окислений/відновлений

НАДФ/Н – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат окислений/відновлений

ПК – піруваткіназа

ПЛ – пероксиди ліпідів

ТАГ – триацилгліцериди

ТЕМЕД – тетраметилетилендіамін

ФК – фруктокіназа

ФФК – фосфогфруктокіназа

ЦТК – цикл трикарбонових кислот

ВСТУП

Актуальність теми. Споживання їжі з високим вмістом жирів і вуглеводів є поширеним явищем у сучасному суспільстві. Часто це пов'язують з так званими "фаст-фудом (швидкою їжею)" або "західною їжею", які можуть призводити до розвитку ожиріння з низкою ускладнень таких як метаболічний синдром. Багато питань, які стосуються здоров'я людини, вирішуються за допомогою модельних організмів. Популярним та ефективним підходом для індукції ожиріння та пов'язаних з ним ускладнень у модельних гризунів є годування висококалорійною їжею, яка багата на жири [1-3], або жири з фруктозою [4-7].

Фруктоза використовується в комерційних цілях як підсолоджувач у приготуванні десертів, приправ та газованих напоїв [7, 8]. Добре відомо, що тривале споживання великої кількості фруктози викликає шкідливі побічні ефекти в різних експериментальних моделях [4, 7-9]. Зокрема, споживання великої кількості фруктози викликає метаболічний синдром (комплексне порушення обміну речовин, що зазвичай характеризується абдомінальним ожирінням, високим рівнем глюкози в крові, підвищеним артеріальним тиском та дисліпідемією) у мишей, і було встановлено, що печінкова ізоформа фруктокінази C відіграє важливу роль у цьому [10]. До того ж, хронічне надмірне споживання фруктози збільшує фруктацію – неферментативну взаємодію фруктози з різними біомолекулами, в результаті якої утворюються активні карбонільні сполуки та кінцеві продукти глікації, що призводить до розвитку карбонільного стресу [9].

Вживання їжі з надмірною кількістю фруктози або жирів підвищує активність циклу трикарбонових кислот. Це спричинює підвищене споживання кисню, що супроводжується посиленням утворенням активних форм кисню (АФК) як побічних продуктів окислювального метаболізму, і зрештою призводить до розвитку оксидативного стресу та мітохондріальної дисфункції [6, 11-13]. Вважається, що оксидативний та карбонільний стреси викликають розвиток ожиріння та підвищують ризик метаболічних ускладнень [6, 9, 12].

Висококалорійне харчування не лише впливає на рівень оксидативного стресу, але й чинить негативний вплив через надмірне утворення вільних радикалів. Дисбаланс у системах окисно-відновної регуляції спричинює підвищення рівня оксидативного стресу та активацію запальних процесів. Це, натомість, збільшує ризик розвитку хронічних захворювань, виснажливих патологій та їхніх ускладнень [14].

Антиоксиданти здатні нейтралізувати АФК та відіграють ключову роль у захисті клітин від окисного пошкодження [15]. Таким чином, поєднання терапевтичних підходів і змін способу життя формує важливий зв'язок між їжею та загальним станом здоров'я, створюючи перспективи для профілактики та управління метаболічними порушеннями.

Одним із перспективних підходів до зменшення негативного впливу їжі із високим вмістом жирів та фруктози є харчові втручання. Зокрема, препарати на основі природних компонентів демонструють значний потенціал. Альфа-кетоглютарат (АКГ), який є проміжним продуктом циклу трикарбонових кислот (ЦТК), може діяти як антиоксидант. Його антиоксидантні властивості сприяють запобіганню метаболічних порушень і уповільненню процесів старіння організму [16]. Водночас було виявлено, що АКГ функціонує як регулятор певних процесів. Зокрема, у кількох дослідженнях повідомлялося, що добавки з АКГ запобігали ожирінню мишей, або ожирінню та стеатозу печінки мишей, які отримували їжу з високим вмістом жирів (60% жиру) впродовж восьми тижнів, і ці ефекти були пов'язані зі змінами експресії генів, які беруть участь у ліпідному обміні [3, 17]. Тому вважається, що він може бути використаний як харчовий додаток для корекції певних фізіологічних відхилень.

Цікаво, що у жінок з патологічним ожирінням рівень АКГ в крові був вищим, а у худих жінок він був нижчим, ніж в нормі [18]. Протилежні ефекти АКГ були виявлені у *Drosophila melanogaster*, де АКГ сприяв зниженню рівня триацилгліцеридів (ТАГ), що накопичуються, та зменшенню інтенсивності оксидативного стресу у молодих мух, тоді як у мух середнього віку, які отримували АКГ, були виявлені вищі рівні ТАГ та інтенсивність оксидативного

стресу, ніж мухи, яких годували стандартною їжею [19]. Попри те, що вплив додатків АКГ вже досліджувався раніше, деякі аспекти залишаються недостатньо вивченими, зокрема вплив АКГ на метаболізм у мишей, яким індукувався метаболічний синдром споживанням висококалорійної їжі з високим вмістом жирів та фруктози. Це й стало підставою для проведення цих досліджень.

Зв'язок цієї роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу проводили з 2020 до 2024 р. на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, і вона є частиною наукової тематики кафедри «Інтермедіати фенілпропаноїдного шляху як речовини для продовження тривалості і якості життя» (№ держреєстрації – 0120U104755). Дисертантка була співвиконавцем та проводила частину досліджень.

Мета і завдання дослідження. *Метою* роботи було оцінити вплив альфа-кетоглютарату на морфометричні, метаболічні та запальні показники у мишей лінії *C57BL/6J* за споживання базової їжі та висококалорійної їжі з високим вмістом жирів та фруктози.

Для досягнення мети бути поставлені наступні завдання:

Завдання роботи:

1) Визначити динаміку маси тіла та споживання питної води, вміст вісцерального жиру та індекси маси тіла у синхронізованої за віком популяції мишей (5-тимісячні самці) лінії *C57BL/6J* за утримування на чотирьох експериментальних режимах: базовій їжі (контрольна група), базовій їжі з додаванням альфа-кетоглютарату до питної води (група АКГ), висококалорійній їжі з високим вмістом жирів (смазьцю) та фруктози окремо (група ВКІ) та з додавання альфа-кетоглютарату до питної води (група ВКІАКГ) протягом 8 тижнів.

2) Здійснити забір крові у дослідних мишей та провести її біохімічний та гематологічний аналіз з визначенням лейкоцитарної формули.

3) Відібрати зразки тканин – печінку, жирову тканину, серце та скелетні м'язи для біохімічного та гістологічного аналізів та визначити в них вміст

метаболітів, показники ліпідного обміну, активність ключових ферментів шляхів катаболізму глюкози та фруктози;

4) Визначити маркери оксидативного стресу та активність антиоксидантних та асоційованих з ними ферментів у тканинах мишей;

5) Провести гістологічний аналіз зрізів печінки та жирової тканини мишей.

Об'єкт дослідження – вільнорадикальні та енергетичні процеси у лабораторних мишей.

Предмет дослідження – вплив АКГ на фоні споживання базових та висококалорійних продуктів на показники ліпідного обміну, оксидативного стресу, імунної відповіді та енергетичного метаболізму .

Методи дослідження включали *морфометричні* (визначення довжини та маси тіла тварин), *фізіологічні* (визначення споживання їжі та води), *біохімічні* (визначення вмісту метаболітів (глюкози, глікогену і загального білку), показників ліпідного обміну (загальний холестерин, триацилгліцериди), активностей антиоксидантних та асоційованих з ними ферментів (каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1, мієлопероксидази), активностей ключових ферментів шляхів катаболізму глюкози та фруктози (гексокінази, фосфоглюкокінази, піруваткінази, фруктокінази), маркерів оксидативного стресу (рівні пероксидів ліпідів, окисленого та відновленого глутатіону, карбонільних груп білків)), *гематологічні* (визначення кількості лейкоцитів та еритроцитів, вміст гемоглобіну, гематокрит, підрахунок лейкоцитарної формули), *гістологічні* (фарбування гематоксиліном-еозином) та методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. В цій роботі оцінили здатність доданого в їжу АКГ відігравати захисну роль при споживанні висококалорійної їжі з високим вмістом жиру (смаляцю) та фруктози, враховуючи його широкий спектр біологічної активності включно з антиоксидантними, прооксидантними та імуномодуючими властивостями.

Вперше показано, що АКГ запобігає метаболічним змінам, які спричинені короткотривалим споживанням висококалорійної їжі з високим вмістом тваринних жирів та фруктози, у лабораторних мишей середнього віку. Захисний вплив АКГ проявлявся у зниженні інтенсивності оксидативного стресу зі зростанням потужності антиоксидантного захисту та нормалізацією енергетичного обміну у тканинах мишей. Встановлено, що на тлі стандартної їжі у тканинах мишей АКГ активує окремі ланки антиоксидантного захисту.

Досліджено тканиноспецифічні ефекти АКГ, які можуть бути зумовлені різними механізмами його дії, включаючи антиоксидантні, прооксидантні та імуномодуючі ефекти. Наше дослідження розширює розуміння про індукування їжею метаболічного синдрому та з'ясовує потенційну роль АКГ як метаболічного регулятора.

Практичне значення отриманих результатів. Дослідження наслідків споживання їжі з високим вмістом жирів і вуглеводів допомагає краще зрозуміти причини поширення метаболічного синдрому та пов'язаних з ним захворювань у сучасному суспільстві. Використання модельних тварин, які споживають висококалорійну їжу, дозволяє вивчати механізми розвитку метаболічного синдрому в контрольованих умовах. Вивчення властивостей АКГ як харчового додатку на фоні висококалорійної їжі відкриває перспективи для створення нових підходів у профілактиці метаболічного синдрому.

Отримані результати впроваджені у наукову діяльність кафедри біохімії та біотехнології та використовуються при плануванні експериментів на модельних організмах.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційне дослідження виконано під керівництвом професора кафедри біохімії та біотехнології доктора біологічних наук Володимира Луцака. Ідея роботи належить науковому керівникові. Дисертантка самостійно здійснила пошук та аналіз наукової літератури за тематикою дисертаційного дослідження, виконала експериментальну роботу, здійснила статистичний аналіз даних, сформулювала головні положення і написала всі розділи дисертації.

Планування експериментів, аналіз даних та обговорення отриманих результатів, приготування рукописів статей до публікації проводилось з науковим керівником Володимиром Луцаком за консультативної допомоги докторки біологічних наук, професорки Марії Байляк.

Допомогу у виконанні експериментальної частини роботи надавали студенти та працівники кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Участь закордонних колег, студентів та співробітників кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника у виконанні цієї роботи відображена в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи були представлені на: XIX та XX Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2020 та 2022); XVII Міжнародній науковій конференції для студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2021); All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the russian invader (Київ, 2022); VI Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 2022); звітно-наукових конференціях і засіданнях кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника (Івано-Франківськ, 2020–2024).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковані 9 публікацій, з них три статті у міжнародних наукових виданнях, які індексуються наукометричними базами даних SCOPUS та Web of Science та віднесені до квартилю Q1-Q2 за рейтингом Scimago, одна стаття опублікована у науковому фаховому виданні категорії “Б” та п’ять тез доповідей наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел. Робота викладена на 166 сторінках, та містить 22 рисунки і 2 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Миша *Mus musculus* як модельний організм для вивчення метаболічного синдрому

Останнім часом збільшується кількість досліджень метаболічного синдрому (МС), оскільки його поширеність зростає у всьому світі через збільшення кількості людей з ожирінням та нездоровим способом життя. Цей синдром характеризується одночасним виникненням принаймні трьох із зазначених захворювань: ожиріння, гіперглікемії, гіпертензії і дисліпідемії. Ці захворювання підвищують ризик серцево-судинних і нейрологічних захворювань, інсульту та діабету 2 типу [20, 21].

Лабораторних мишей виду миша хатня *Mus musculus* L. часто використовують для моделювання захворювань людини, зокрема МС щоб покращити розуміння причин та симптомів захворювання, методів запобігання розвитку захворювань та перевірки потенційних терапевтичних заходів [20, 22]. Є різні підходи, які використовуються для індукції МС у гризунів. Вони включають харчові маніпуляції, генетичну модифікацію та використання лікарських препаратів [20, 21]. В огляді [22] повідомлялось, що модель гризунів, яка має найбільш близькі критерії до людського МС, може викликатися їжею з високим вмістом вуглеводів і жирів. Перевагами використання тваринних моделей для вивчення МС є можливості моніторингу гістологічних, функціональних, біохімічних та морфологічних змін, що важко провести у людей [20].

Для того щоб організм міг слугувати дослідницькою моделлю, він повинен не лише мати патофізіологічну подібність із МС людини, але й він також має бути наділений певними характеристиками:

- відносно невеликими розмірами;
- коротким репродуктивним циклом;
- легкістю утримання та розмноження в лабораторних умовах;

- низькою вартістю роботи з ним.

Лабораторні миші є поширеними тваринними моделями, оскільки вони досить подібні до людини з точки зору анатомії та фізіології [23]. Окрім того, миші невеликі за розміром, їх утримання та розведення у лабораторії відносно просте та недороге порівняно з іншими моделями ссавців, вони швидко розмножуються, і, що ще важливіше, можливість точного маніпулювання геномом миші призвели до широкого використання мишей як модельних організмів [24]. Миші генетично подібні до людини, і їхній геном можна легко модифікувати. Геном мишей лінії *C57BL/6* повністю секвенований у 2002 році і це другий секвенований геном серед ссавців після людини [25, 26].

Геном миші на 10% менший за геном людини, що пояснюється меншим вмістом повторюваних послідовностей ДНК [24]. Миші та люди близькі за кількістю генів, які кодують білки ~23000 генів, що кодують білки, у мишей, порівняно з 20000 у людини, причому 16430 з цих генів мають точну відповідність між обома видами. Близько 99% генів миші мають гомологів у геномі людини, і для 80% цих генів знайдений найкращий збіг у геномі людини [27].

У мишей вагітність триває 19–21 день, нащадки досягають повної статевої зрілості у віці 7-8 тижнів, кількість приплоду – від 6 до 12 штук. Один мишачий рік дорівнює приблизно 30 людським рокам [28]. Середня тривалість життя лабораторних мишей становить близько двох років, що дозволяє досить швидко вивчати їх протягом усього життєвого циклу [23].

Інбредна лінія *C57BL/6J* найширше використовується у дослідженнях. Оскільки в природних умовах неможливо знайти двох особин з ідентичним геномом, багато ліній лабораторних мишей отримані в результаті інбридингу – схрещування близькоспоріднених особин. Після 18-20 поколінь інбридингу отримуються лінії, в яких практично всі особини генетично однорідні і подібні між собою. Вони мають майже ідентичну ДНК з дуже незначними варіаціями. Переваги інбредних ліній включають покращену

експериментальну відтворюваність і потребу в меншій кількості тварин для перевірки конкретних гіпотез [22].



Рис. 1.1.1. Миша лінії *C57BL/6J*.

Миші *C57BL/6J* використовуються в широкому спектрі досліджень, включаючи ожиріння, діабет і гіпертонію, ці захворювання разом відомі, зазвичай, як МС. Ці миші мають темне, майже чорне хутро, дуже чутливі до шуму та запахів, і добре розмножуються у лабораторних умовах. Висококалорійна їжа викликає в них розвиток ожиріння та метаболічні порушення [29, 30]. Всі ці особливості зумовили те, що саме лінія *C57BL/6J* була обрана для нашого дослідження.

1.2. Індукція метаболічного синдрому у модельних тварин

На сьогодні розроблені різні підходи для вивчення патогенезу та характеристики МС, включаючи спричинені їжею, індуковані хімічно та генетичні моделі МС (Рис. 1.2.1). Так, годування тварин висококалорійною їжею, яка багата жирами або вуглеводами, або й обома разом, досить популярне і ефективно для викликання метаболічних порушень у лабораторних тварин [31]. Щоб індукувати ожиріння, тварин годують різними типами висококалорійної їжі, і серед них їжа з високим вмістом жиру (зазвичай 40–60% жиру) є найпопулярнішою.

Розвиток клінічних параметрів, які спостерігаються у людей з МС, таких як аномальна концентрація ліпідів у плазмі в поєднанні з високим тиском крові і резистентністю до інсуліну, були виявлені в багатьох дослідженнях з вивчення впливу їжі з високим вмістом жиру (ВКЇ) на мишах [32-37]. Зокрема, Avtanski et al. [37] виявили, що годування ВКЇ впродовж 9 тижнів (60% жиру), призвело до хронічного прозапального стану та резистентності до інсуліну у самців мишей лінії *C57BL/6J*. Дослідження Rahmouni et al. [33] виявили, що миші *C57BL/6J* на ВКЇ (45% жиру) продемонстрували вищий артеріальний тиск, ніж миші, що споживали базовий раціон (13% жиру). Окрім того, у мишей, яких годували ВКЇ (60%), значно збільшувалася маса тіла, рівні ТАГ, ЛПВГ (ліпопротеїни високої густини) і ЛПНГ (ліпопротеїни низької густини) холестерину в плазмі порівняно з контрольними тваринами [20, 38].

Порушення метаболізму, які пов'язані з МС, також були зареєстровані в дослідженнях, де мишей годували їжею з високим вмістом фруктози або сахарози [20, 39]. Однак слід зазначити, що більш виражений ефект спостерігався, коли вуглеводи поєднували з їжею з високим вмістом жиру. Миші, яких годували фруктозою, набирали більшу вагу та проявляли серйозні ознаки МС порівняно з тими, яких годували крохмалем з такою ж калорійністю [40, 41]. Годування їжею на основі сахарози, глюкози або крохмалю не було таким ефективним, як годування фруктозою для індукції МС [42-45]. Доведено, що тривале споживання фруктози спричиняє карбонільний/оксидативний стрес [43, 46].

Розробка генетичних моделей ссавців зі скороченою тривалістю життя та швидким розвитком ожиріння стала зручним підходом для дослідження МС. Миші з дефіцитом лептину ($Lep^{ob/ob}$), дефіцитом рецептору лептину ($LepR^{db/db}$) і летальні жовті миші агуті ($A^{y/a}$) найчастіше використовуються як мутантні моделі мишей з ожирінням.

Лептин – це пептидний гормон, який виділяється адипоцитами і сигналізує про відчуття насичення. Він і його рецептор є ключовими факторами у патогенезі розвитку ожиріння. Стійкість до лептину характеризується зниженням відчуття

насичення, надмірним споживанням поживних речовин і збільшенням маси тіла [47]. Миші $Lep^{ob/ob}$ проявляють ожиріння, гіперфагію, гіперглікемію, непереносимість глюкози та підвищений рівень інсуліну в плазмі крові [48, 49]. Миші $LepR^{db/db}$ проявляють патологічне ожиріння, хронічну гіперглікемію, атрофію бета-клітин підшлункової залози та гіпоінсулінемією [49, 50]. $A^{y/a}$ миші демонструють розвиток діабету 2 типу та мають відкладений початок ожиріння, що можна прискорити годуванням їжею з високим вмістом жиру [49, 51].

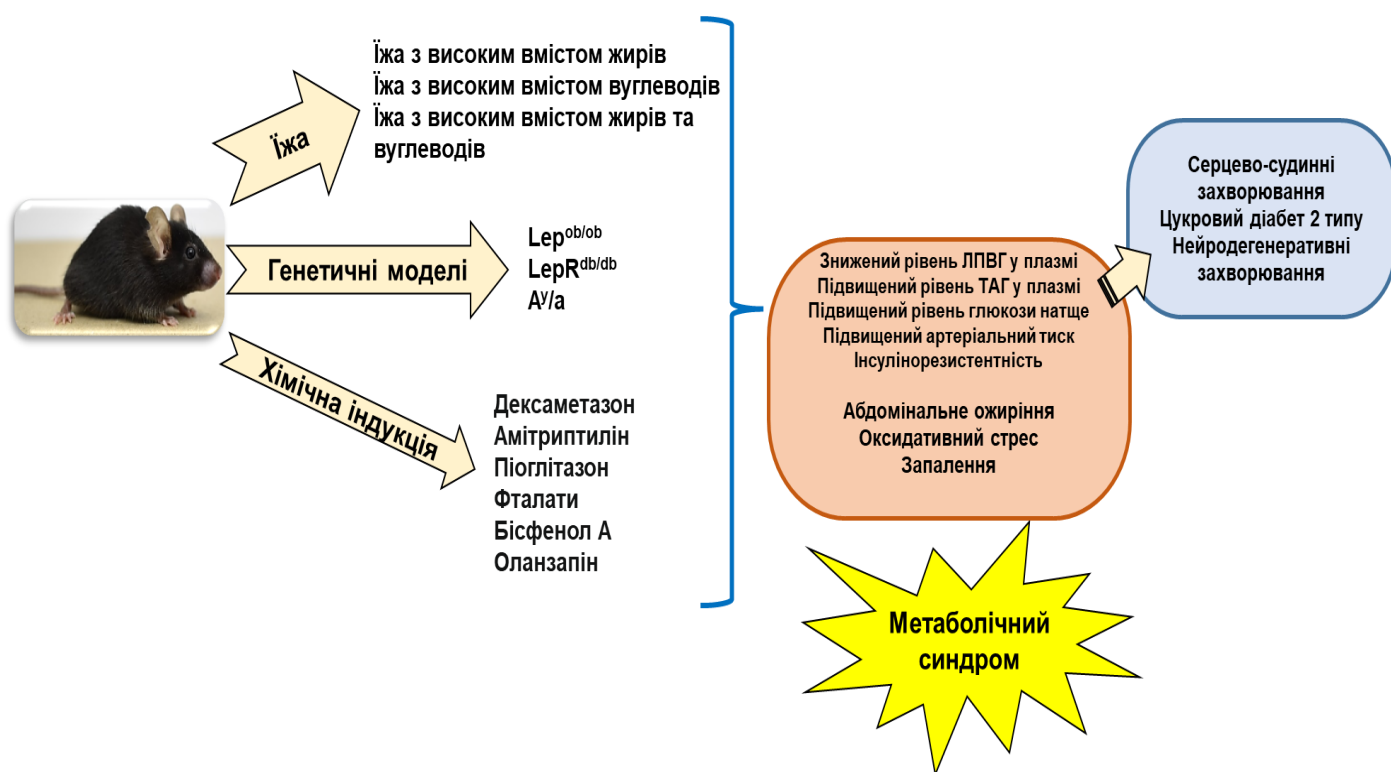


Рис. 1.2.1. Схематичне представлення підходів, використаних для індукції метаболічного синдрому в модельних тварин, та наслідків цих втручань. Товщина стрілок позначає переважаючий фактор у спричиненні ключових ознак метаболічного синдрому. Скорочення: ТАГ – триацилгліцериди, ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини, $Lep^{ob/ob}$ – миші з дефіцитом лептину, $LepR^{db/db}$ – миші з дефіцитом рецептору лептину, $A^{y/a}$ – летальні жовті миші агути (модифіковано за [21]).

Збільшення ваги є поширеним побічним ефектом дії багатьох ліків, а спричинене ліками збільшення маси тіла робить людей сприйнятливішими до ускладнень, які пов'язані з МС. Антипсихотичні препарати (оланзапін) [52], антидепресанти (амітриптилін, нортриптилін) [53], антигіперглікемічні (піоглітазон, розиглітазон, інсулін) та кортикостероїди (дексаметазон) – це ліки, які пов'язані зі значним збільшенням ваги та ризиком розвитку МС [20, 53], що було підтверджено дослідженнями на тваринах [20, 54-56]. Наприклад, оланзапін викликав збільшення маси тіла та збільшення вмісту вільних жирних кислот у плазмі крові, відкладення вісцерального жиру у щурів та мишей [20].

Літературні дані свідчать про те, що гризуни є придатною моделлю для вивчення хімічно індукованого МС [57, 58]. Зокрема, виявлено, що вплив хімічних речовин, які часто використовуються у пластикових виробках, таких як бісфенол А чи фталати, посилює біосинтез ліпідів і накопичення триацилгліцеридів у мишей [21, 59, 60].

1.2.1. Обмеження та недоліки тваринних моделей

Як вже було описано вище, основними моделями гризунів, що використовуються для вивчення ожиріння та МС, є моделі ожиріння, викликаного висококалорійною їжею, та генетично модифіковані моделі, переважно представлені моногенними тваринами, що демонструють метаболічні порушення в результаті мутації одного гена. Обидва типи тваринних моделей мають багато переваг для вивчення МС та ожиріння, але існують деякі обмеження, які слід враховувати при плануванні досліджень.

Моногенні моделі мають переваги в метаболічних дослідженнях, оскільки у них розвиваються симптоми МС швидше, ніж у моделей, що індуковані висококалорійним харчуванням [61]. Наприклад, миші $LepR^{db/db}$ демонструють ожиріння вже у віці одного місяця та гіперглікемію до восьмого тижня життя. Натомість для розвитку ожиріння у моделей індукованих їжею необхідно 8-12 тижнів висококалорійного харчування, причому експеримент починається лише

після досягнення твариною місячного віку [62]. Однак вони мають деякі обмеження. Результати можуть відрізнятися від тих, що спостерігаються в гетерогенній популяції, зокрема людській, оскільки ожиріння, як відомо, є багатофакторним захворюванням. Також недоліком є висока вартість цих тварин [63].

Моделі МС, індуковані ВКІ, на гризунах є пріоритетними для дослідження патогенезу МС завдяки їх доступності та низькій собівартості [31]. Характерною особливістю цих моделей є прискорений розвиток метаболічних порушень протягом кількох тижнів, на відміну від багаторічного патогенезу у людини. Однак при інтерпретації експериментальних даних необхідно враховувати відмінності фізіологічних процесів між модельними тваринами та людиною. Зокрема, окрім прискореного розвитку МС, гризуни характеризуються вищою швидкістю метаболізму та особливостями функціонування імунної системи, що може обумовлювати відмінності у клінічних проявах захворювання [31].

Для отримання моделей МС, індукованих висококалорійною їжею на тваринах використовують різні типи їжі, такі як їжа з високим вмістом вуглеводів, їжа з високим вмістом жирів та їжа з високим вмістом жирів та високим вмістом вуглеводів [21, 39]. Нещодавній аналіз досліджень [31] показав, що їжа з високим вмістом вуглеводів можна рекомендувати для вивчення ранніх стадій МС, до розвитку діабету 2 типу, тоді як їжа з високим вмістом жирів і їжа з високим вмістом жирів і високим вмістом вуглеводів швидше індукують тяжкі ознаки МС.

Склад раціону для контрольних тварин також дуже важливий. Відмінності у використовуваному стандартному кормі можуть додати варіабельності та ускладнити відтворюваність результатів, отриманих різними авторами [64]. Тому дослідники повинні бути обережними при виборі базового або стандартного корму в дослідженнях МС.

Стандартний корм (базова їжа) зазвичай виготовляється із різних продуктів сільського господарства, через що складно встановити точну кількість кожного компонента в ньому. Їжа з високим вмістом жирів часто готуються

шляхом додавання жирів до базової їжі. Це призводить до зниження вмісту білку в загальному складі корму. Зниження його рівня у висококалорійній їжі є небажаним, оскільки низьке споживання білку може призвести до втрати маси тіла і жирової тканини [65, 66]. Тому рекомендується, щоб вміст білку залишався якомога стабільнішим, щоб уникнути таких змін.

Іншими недоліками, які можуть вплинути на порівняння результатів різних досліджень, є висока варіабельність тривалості дієтичного лікування (від 2 до 20 тижнів) та різний вік тварин на початку споживання висококалорійної їжі (від 3 до 60 тижнів) [31].

Деякі лінії мишей не розвивають певні компоненти МС або є резистентними до ожиріння [21, 67]. Наприклад, миші *AKR/J* і *DBA/2J* дуже сприйнятливі до їжі з високим вмістом жиру, тоді як миші *A/J* і *Balb/cJ* більш стійкі. Миші *C57BL/6J* мають кращі характеристики, ніж деякі інші моделі [67]. Миші *Lep^{ob/ob}* і *LepR^{db/db}* є резистентними до утворення атеросклеротичних уражень [68]. У багатьох випадках миші *ApoE^{-/-}* зберігають стабільну масу тіла навіть при споживанні висококалорійної їжі [69]. У щурів спостерігається статевий диморфізм щодо інсулінорезистентності та порушення толерантності до глюкози, викликаних ВКІ, причому самці зазнають більшого впливу [70]. Різні висококалорійна їжа викликають різноманітні метаболічні порушення через певні періоди часу, що впливає на відтворюваність досліджень [21]. Також багато ліній (наприклад, *Lep^{ob/ob}* і *LepR^{db/db}*) схильні до утворення пухлин [71].

1.3. Метаболічний синдром

Метаболічний синдром (МС) – це сукупність метаболічних порушень, які підвищують ризик розвитку серцево-судинних захворювань, діабету 2 типу, інсульту та інших патологій [72]. Ці порушення включають центральне ожиріння, підвищення рівня глюкози в крові, гіпертензію та дисліпідемію (гіпертригліцеридемія, підвищений рівень неестерифікованих (вільних) жирних

кислот і зниження рівня ліпопротеїдів високої густини), присутні у різних комбінаціях [21].

Хоча патогенез МС дуже складний і ще не повністю з'ясований, було припущено, що прооксидантний/антиоксидантний дисбаланс може відігравати важливу роль у його розвитку [73, 74]. Надмірна генерація АФК і активних форм азоту (АФА), які можуть реагувати практично з усіма біомолекулами, призводить до окисної модифікації [75, 76]. Клітини містять як ферментативні, так і неферментативні антиоксиданти, які разом регулюють стаціонарну концентрацію АФК та АФА [73, 77].

Основними джерелами АФК є дихальний ланцюг мітохондрій та фермент НАДФН-оксидаза (NOX) [78], хоча існують і інші джерела, такі як ксантинооксидаза, ліпоксигеназа, циклооксигенази та мієлопероксидаза [73]. Ферменти NOX – це родина ферментів, які розташовані у клітинній мембрані, а NOX2 та NOX3 важливі у більшості патологічних станів [78]. У мітохондріях АФК утворюються в результаті витікання електронів з електронно-транспортного ланцюга [79].

Ожиріння може бути як результатом, так і причиною оксидативного стресу [12, 80]. Дослідження на тваринах і культурах клітин показали, що оксидативний стрес може відігравати причинну роль в ожирінні, стимулюючи проліферацію та диференціацію преадипоцитів, а також сприяти збільшенню розмірів адипоцитів [81, 82].

Надмірне споживання їжі, яка багата на вуглеводи та жири, призводить до надмірного надходження енергетичних субстратів у метаболічні шляхи жирової та інших тканин. Окислення вільних жирних кислот та моносахаридів підвищує рівень ацетил-КоА, який входить в ЦТК. Інтенсифікація ЦТК призводить до посиленої генерації відновлювальних еквівалентів з НАДН та ФАДН₂, які можуть перевантажити мітохондріальний електронно-транспортний ланцюг [12, 80, 83]. Це призводить до посиленого утворення АФК мітохондріями та мітохондріальної дисфункції [84]. Окрім того, НАДФН-оксидаза плазматичної мембрани, яка перетворює молекулярний кисень на супероксид-аніон радикал,

відповідальна за генерацію АФК, яка збільшується при надмірному надходженні поживних речовин [85, 86].

При тривалому споживанні їжі з високим вмістом жирів та вуглеводів перевантаження циклу ЦТК сприяє перенаправленню ацетил-КоА на біосинтез жирних кислот, які у жировій тканині накопичуються у формі запасних ліпідів (ТАГ) [87]. При ожирінні патологічними ознаками виступають збільшення розмірів та/або кількості жирових клітин [88].

Підвищення рівня АФК індукує активацію жирового транскрипційного фактору AP-1 (білок-активатор 1), регулятора проліферації та диференціювання жирових клітин, і транскрипційного фактору NF-κB (ядерний фактор карра В), які викликають гостру реакцію запалення з подальшим вивільненням прозапальних медіаторів, включаючи інтерлейкіни (IL-1β, IL-6), TNF-α (фактор некрозу пухлин альфа) та моноцитарний білок хемоатрактант-1 (MCP-1). Останній опосередковує інфільтрацію макрофагами жирової тканини. Рекрутовані макрофаги генерують багато АФК як частина реалізації своєї захисної функції, що призводить до інтенсифікації оксидативного стресу, який додатково стимулює процеси запалення, утворюючи замкнене коло [12, 80, 87].

Підвищені рівні АФК, водночас, збільшують оксидативну модифікацію і запускають хронічну активацію чутливих до стресу транскрипційних факторів, що врешті-решт призводить до виснаження захисних механізмів (Рис.1.3.1). Чутливі до АФК і АФА регулятори, такі як Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) та FoxO1 (Forkhead box O1), також залучені в диференціацію адипоцитів. Можливо, активація цих білків на початку ожиріння може пригнічувати диференціацію адипоцитів, тоді як підвищена або постійна активація також може сприяти збільшенню маси жирової тканини [12, 89, 90].

У деяких наукових працях також описані інші механізми залучення оксидативного стресу до розвитку метаболічного синдрому [80, 83, 91]. Зокрема, активація поліолового шляху, який включає відновлення глюкози до сорбітолу

за допомогою альдозоредуктази, що використовує НАДФН, призводить до виснаження пулу цитозольного НАДФН та до підвищення рівня АФК [92].

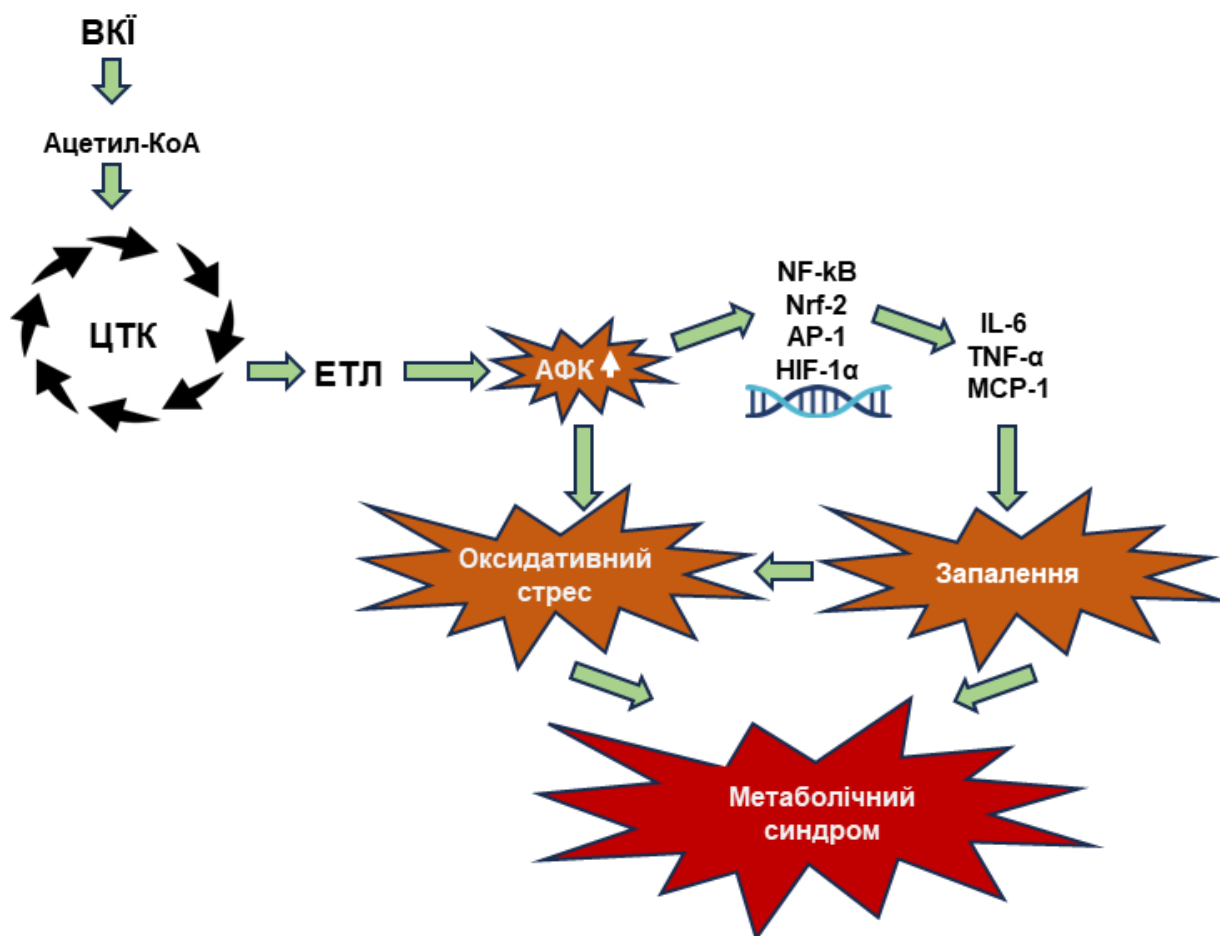


Рис. 1.3.1. Замкнене коло з залученням оксидативного стресу і запалення, які задіяні у патофізіологію метаболічного синдрому. Скорочення: ВКЇ – їжа з високим вмістом жиру та фруктози, ЦТК – цикл трикарбонових кислот, ЕТЛ – електронно-транспортний ланцюг мітохондрій, АФК – активні форми кисню, NF-kB, Nrf-2, AP-1, HIF-1α – транскрипційні фактори, IL-6 – прозапальний медіатор, TNF-α – фактор некрозу пухлин альфа, MCP-1 – моноцитарний білок хемоатрактант-1.

Фруктозо-6-фосфат перетворюється на глюкозамін-6-фосфат, який інгібує дію тіоредоксину і викликає оксидативний стрес [81]. З тріозофосфатів утворюється метилгліоксаль – основний попередник кінцевих продуктів глікації

(AGEs) [9, 93]. Останні активують NOX, які збільшують генерацію АФК/АФА, тоді як NF-κB підвищує експресію генів, які кодують прозапальні цитокіни (включаючи TNF-α та IL-6), синтазу оксиду азоту (iNOS), які задіяні в адипогенезі, запаленні та оксидативному стресі [94].

1.4. Стратегії запобігання розвитку та профілактики метаболічного синдрому

Модельні тварини широко використовуються не лише для дослідження патогенезу МС, але й для вивчення профілактичних підходів [21]. Для людей пропонуються чотири терапевтичні стратегії для зниження надлишкової маси тіла: обмеження споживання калорій (до 30% зменшення калорій від стандартного раціону), підвищення фізичної активності, зміни способу життя та, у деяких пацієнтів, фармакологічно схвалені препарати для зниження ваги [95, 96].

Існують різні підходи до моделювання дієтичних втручань серед яких чільне місце займають обмеження калорійності та періодичне голодування [87]. Популярними підходами для продовження тривалості життя та покращення стану здоров'я є різні варіанти періодичного голодування, включаючи обмежене в часі харчування, а також голодування через день [97-99].

Було показано, що різні біологічно активні природні сполуки є ефективними в профілактиці та лікуванні МС та ожиріння через вплив на процеси травлення, проліферацію та диференціацію адипоцитів, а також молекулярні шляхи, які пов'язані з розвитком ожиріння та запалення [96, 100]. Рослини, багаті фенольними сполуками та поліфенолами (катехіни, кверцетин, куркумін, лютеолін, апігенін, резвератрол тощо), також забезпечують захисну дію проти МС та ожиріння [87, 100, 101], і їх ефекти проти ожиріння були підтверджені в ряді досліджень на гризунах [102-104].

В дослідженні Li et al. (2015c) виявили, що заміна споживання енергії з насичених жирних кислот еквівалентним споживанням енергії з

поліненасичених і мононенасичених жирних кислот або високоякісних вуглеводів, таких як цільнозернові крупи, може знизити ризик розвитку серцево-судинних захворювань [105].

Споживання середземноморської дієти, яка складається з фруктів, овочів, оливкової олії, червоного вина, горіхів та інших харчових компонентів та містить багато природних антиоксидантів та біологічно активних сполук, таких як поліфеноли, може знижувати ризик розвитку МС та серцево-судинних захворювань [80, 106].

Мікробіота кишківника відіграє важливу роль у розвитку ожиріння та МС. Метаболічний синдром часто супроводжується дисбалансом кишкової мікробіоти, що призводить до запальної реакції низького ступеня, руйнування кишкового бар'єру та розвиток інсулінорезистентності [107, 108]. Споживання їжі з високим вмістом жирів змінює мікробіоту кишківника [109]. Надмірне споживання підсолоджувачів теж викликає дисбактеріоз [110]. Дисбактеріоз, викликаний споживанням високої кількості фруктози, відповідає за індукцію МС [111]. Споживання певних фітохімічних речовин (що містяться в цитрусових і винограді) і вітаміну D пов'язують з різноманітною та здоровою кишковою мікробіотою, яка запобігає розвитку МС [112].

Якщо зміни способу життя і харчових підходів недостатньо, то рекомендується фармакологічне лікування [21]. Для лікування ожиріння були схвалені багато препаратів, але більшість з них були вилучені через їхні побічні ефекти або недостатню ефективність. Одним з успішних фармакологічних підходів, є використання глюкагоноподібного рецептора пептиду-1 (GLP1R) для покращення метаболізму та зниження маси тіла [113]. У мишей з ожирінням лікування агоністом GLP1R семаглутидом призвело до зниження ваги, зменшення запалення печінки, резистентності до інсуліну та стресу ендоплазматичного ретикулуму [114, 115].

Оскільки у пацієнтів з МС спостерігається дисбаланс між оксидантами та антиоксидантами, антиоксиданти можуть бути ефективними засобами для коригування цього балансу та захисту цих пацієнтів від ускладнень МС [83].

Останніми роками повідомлялося, що рівень АКГ в організмі тісно пов'язаний з МС. Додавання екзогенного АКГ запобігало розвитку ожиріння, знижувало рівень глюкози в крові та ризик розвитку серцево-судинних захворювань, які пов'язані з МС [116]. Тому ми обрали АКГ для дослідження МС.

1.5. Характеристики альфа-кетоглютарату

Альфа-кетоглютарат (2-кетоглютарова кислота, альфа-кетоглютарова кислота, 2-оксоглютарова кислота, оксо-глютарат, 2-оксопентандіова кислота) є аніоном альфа-кетоглютарової кислоти [16, 117]. Вона є клітинним низькомолекулярним інтермедіатом, який містить дві карбоксильні групи та одну кетоніву групу. Важливо, що АКГ є нетоксичною водорозчинною сполукою і стабільною у водних розчинах [118, 119]. Екзогенний АКГ використовують у формі різних солей (орнітину, натрію, кальцію), що засвоюються організмом і можуть метаболізуватися до глютаміну та глютамату, а також до інших амінокислот (пролін, аргінін) [120]. Він є ключовим проміжним продуктом у циклі Кребса і в організмі головно міститься в клітинах (у мітохондріях і цитоплазмі), але його також можна виявити в невеликих кількостях у крові.

Альфа-кетоглютарат їжі всмоктується у верхній частині тонкої кишки, а потім метаболізується в ентероцитах. Під час проходження через слизову оболонку кишківника до 40% АКГ катаболізується до CO_2 . Частина АКГ, яка залишилася, може бути використана в різних анаболічних шляхах, як в ентероцитах, так і в периферійних тканинах, оскільки до 20% АКГ з їжі потрапляє в кров [121], де він швидко видаляється з кровотоку, і його період напівіснування в крові становить менше п'яти хвилин. В печінку та нирки АКГ потрапляє з залученням натрій-калієвої помпи [120, 122]. Дослідження з натрієвою сіллю ^{14}C -міченого АКГ виявили наявність АКГ у кількох тканинах (печінка, мозок, шкіра, м'язи, кісткова тканина) вже через 3 години після введення сполуки [121].

У клітинах ссавців АКГ піддається різним метаболічним перетворенням (Рис. 1.5.1). Зокрема, АКГ утворюється в процесі окисного декарбоксилювання ізоцитрату у ЦТК, що каталізується ізоцитратдегідрогеназою, та при окисному дезамінуванні глютамінової кислоти (глютамату). Реакцію каталізує фермент глютаматдегідрогеназа. В ході реакції утворюється альфа-кетоглютарат та аміак [119]. Коферментом для двох вищезгаданих реакцій слугує НАД⁺. Остання реакція є основним джерелом аміаку в організмі людини, і вона є зворотною, глютаматдегідрогеназа може каталізувати також перетворення АКГ до глютамату [16, 123].

У ЦТК відбувається також перетворення АКГ під дією альфа-кетоглютаратдегідрогеназного комплексу, що продукує сукциніл-КоА та CO₂. Альфа-кетоглютаратдегідрогеназний комплекс має у своєму складі ферменти альфакетоглютаратдегідрогеназу, дигідроліпоїлсукцинілтрансферазу, дигідроліпоїлдегідрогеназу та коферменти тіаміндіфосфат, ліпоєву кислоту, КоА, НАД та ФАД [124].

Альфа-кетоглютарат використовується у біосинтезі амінокислот, зокрема глютаміну, проліну, аспартату, лейцину, аргініну та лізину [122, 124]. Він може реагувати з аміаком і перетворюватися на глютамат, а далі глютамат реагує з аміаком з утворенням глютаміну. Глютамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2) каталізує конденсацію глютамату і аміаку з утворенням глютаміну [117].

Альфа-кетоглютарат може зворотно амінуватися глютаматдегідрогеназою до глютамату, який натомість використовується для біосинтезу низькомолекулярного антиоксиданту глютатіону та амінокислот, таких як глютамін, пролін і орнітин, які необхідні для біосинтезу білку [16]. Окрім того, АКГ також може утворюватися у кількох інших метаболічних шляхах з залученням амінокислот (Рис. 1.5.1), головним чином аргініну, проліну, гістидину, гліцину та серину [124].

Альфа-кетоглютарат є субстратом для АКГ-залежних діоксигеназ, до яких належать пролінгідроксилази, що гідроксильють залишки проліну в білках та деметилази, які каталізують деметилювання ДНК та гістонів [16]. Під час реакції,

що каталізується діоксигеназою, АКГ перетворюється на сукцинат і вуглекислий газ, а Fe^{2+} окислюється до Fe^{3+} .

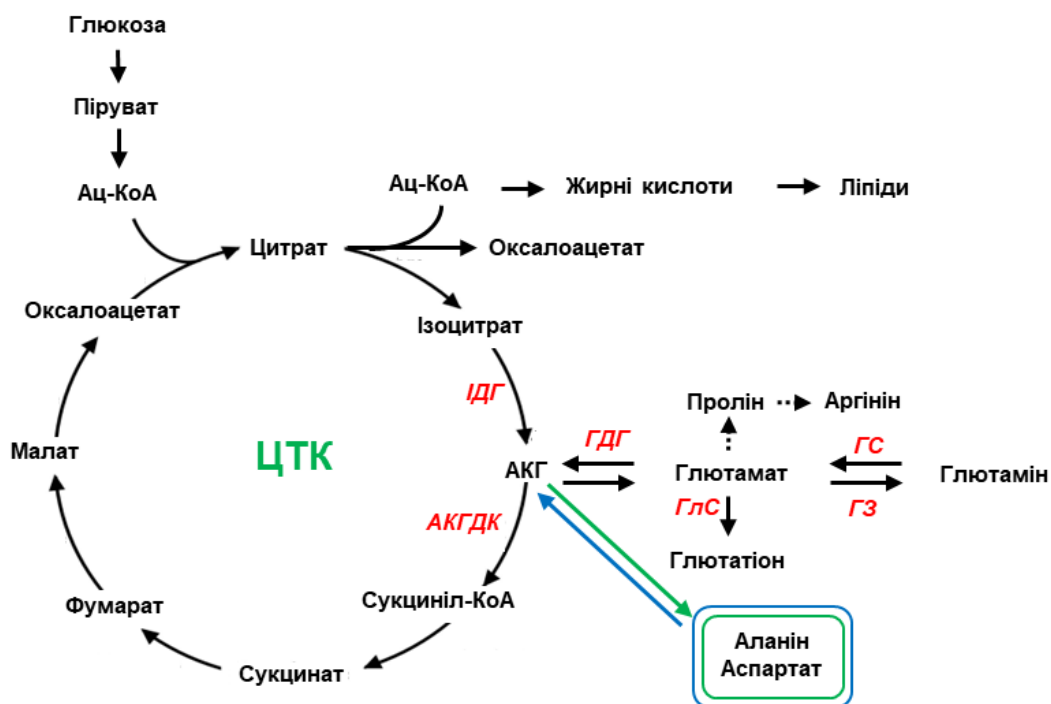


Рис. 1.5.1. Основні метаболічні шляхи в яких генерується і використовується АКГ. Скорочення: АКГ – альфа-кетоглутарат, Ац-КоА – ацетил-КоА, ІДГ – ізоцитратдегідрогеназа, АКГДК – альфа-кетоглутаратдегідрогеназний комплекс, ГДГ – глютаміатдегідрогеназа, ГС – глютамінсинтетаза, ГЗ – глютамініаза, ГлС – глютаміонсинтетаза (модифіковано за [124]).

У тварин і людини, АКГ-залежні діоксигенази беруть участь у біосинтезі колагену, посттрансляційних модифікаціях білків та нуклеїнових кислот [125].

Пролінові гідроксилази перетворюють пролін на гідроксипролін, який натомість відіграє важливу роль у формуванні нативної структури колагену, основного білку сполучної тканини. Гідроксилування багатьох білків

проліновими гідроксилазами робить їх мішенями для убіквітин-протеасомальної системи деградації білків [16, 120, 126].

Окрім вищезазначеного, АКГ бере участь у підтримці мітохондріального метаболізму [127], антиоксидантному захисті [128], має протизапальну дію [129], сприяє проліферації клітин [130], бере участь в епігенетичній модифікації [131], супресії пухлин [132] та сприяє здоровому довголіттю у моделі старіючих мишей [129].

Альфа-кетоглютарат розподіляється в більшості тканин, тоді як переважно виробляється або поглинається через нирки, кишківник/шлунково-кишковий тракт. У нирках АКГ головне залучений у підтримку кислотно-лужного балансу, тоді як у шлунково-кишковому тракті АКГ переважно функціонує як джерело енергії [124]. М'язи – це ще одна тканина, де АКГ використовується для біосинтезу амінокислот і білків [133]. Окрім того, АКГ пригнічує глюконеогенез у печінці [134].

1.6. Вплив АКГ на тривалість життя

Старіння – це поступовий і незворотний фізіологічний процес, який призводить до поступового погіршення функцій тканин і клітин, підвищення сприйнятливості до вікових захворювань, включаючи метаболічні порушення [135]. У 1956 році Денхем Харман запропонував вільнорадикальну теорію старіння, постулюючи, що дегенеративні зміни під час старіння опосередковані шкідливим впливом вільних радикалів, які утворюються під час нормального клітинного метаболізму [136]. Процес старіння викликається рядом складних і важливих шляхів багато з яких пов'язані з хронічним оксидативним стресом [137]. Були запропоновані різні стратегії для здорового старіння організмів та уповільнення старіння. У багатьох дослідженнях було виявлено, що антиоксиданти, поліфеноли, фітостероли, вітаміни та мінерали можуть знижувати ризик розвитку вікових захворювань [138].

У ссавців вміст АКГ в крові знижується з віком. Дослідження Tian і колегів (2020) показало, що молоді миші (2-місячні) мають вищий рівень АКГ порівняно з мишами середнього віку (10-місячні) [3]. Введення АКГ старим мишам з годуванням їжею з високим вмістом жиру, призводило до зниження маси тіла і кількості жирової маси. Такі метаболічні зміни супроводжувалися підвищеною експресією генів і білків бурого жиру в жировій тканині [119].

Проміжний продукт ЦТК АКГ (але не ізоцитрат або цитрат) затримував старіння та подовжував тривалість життя дорослих особин *Caenorhabditis elegans* на ~50% [118]. АТФ-синтаза, також відома як комплекс V мітохондріального транспортного ланцюга електронів, є основним клітинним механізмом генерації енергії. Альфа-кетоглутарат пригнічує активність АТФ-синтази, і, таке інгибування АКГ призводить до зниження вмісту АТФ, зменшення споживання кисню та зростання рівня аутофагії як у *C. elegans*, так і в клітинах ссавців. Для збільшення тривалості життя АКГ необхідна β -субодиниця АТФ-синтази і залучена мішень рапаміцину (регуляторний шлях TOR). Рівні ендогенного АКГ підвищуються під час голодування, і АКГ не продовжує життя тварин з обмеженим раціоном [118].

Ряд досліджень з різними модельними організмами вказує на антивікові властивості АКГ, тобто сприяння уповільненню процесів старіння, що допомагає довше зберегти функціональність організму. Зокрема, серед найбільш вивчених антивікових ефектів АКГ варто назвати попередження вікової втрати кісткової маси та розвитку остеопорозу [126, 139, 140], а також вікових змін шкіри, особливо втрати її еластичності [141]. Ці ефекти АКГ пов'язані з його здатністю пригнічувати катаболізм білків та стимулювати біосинтез амінокислот і білків, зокрема біосинтез колагену, який є основним структурним білком сполучної тканини в шкірі та кістках [16, 125, 126].

Альфа-кетоглутарат також сприяє апоптозу та пригнічує поділ клітин остеосаркоми через різні механізми [142]. Альфа-кетоглутарат збільшує фосфорилування мітоген-активованих протеїнкіназ (МАРК), сприяє внутрішньому сигнальному шляху апоптозу та знижує рівень

індукованого гіпоксією фактору 1- α (HIF-1 α), бета-трансформуючого фактору росту (TGF- β), фактору росту ендотелію судин (VEGF), що призводить до зменшення проліферації клітин, міграції та метастазування [119, 143].

Зовсім недавно Asadi Shahmirzadi (2020) з колегами виявили, що кальцієва сіль АКГ (Ca-AKG) збільшує тривалість життя у мишей (18 місяців) за рахунок зниження рівня запальних цитокінів та індукції протизапального цитокіну IL-10 Т-клітинами [129]. Вони показали, що Ca-AKG збільшує тривалість життя на 10% і 5% у самок і самців відповідно. Важливо зазначити, що миші з нокаутом протизапального IL-10 мають знижену м'язову силу, вищі показники смертності та високі рівні різних прозапальних цитокінів (IL-6, IL-1b, TNF-a, CXCL-1 та IL-12) [129], що свідчить про те, що АКГ збільшує тривалість життя за рахунок посилення виробництва IL-10 Т-клітинами.

Нещодавно було показано, що АКГ сприяє диференціації келихоподібних клітин, підтримує захист від пошкоджень кишкового епітелію та слизової оболонки, а також зменшує спричинену декстрансульфатом натрію втрату маси тіла, значну кровотечу та інтенсивність коліту [119, 144, 145].

1.7. Антиоксидантна функція АКГ

В організмі безперервно продукуються та елімінуються АФК. За нормальних фізіологічних умов стаціонарні концентрації АФК підтримуються в певному діапазоні, однак, підвищення стаціонарного рівня АФК або активних карбонільних сполук (АКС) може призводити до оксидативного або карбонільного стресу відповідно [146]. Порушення рівноваги між утворенням та елімінацією АФК з підвищенням його стаціонарного рівня, порушенням клітинного метаболізму і його регуляції, також пошкодженням клітинних компонентів, називається оксидативним стресом [147, 148].

Багато досліджень демонструють, що застосування антиоксидантів може бути як доброю профілактикою, так і певною мірою лікуванням патологій, які спричинені оксидативним стресом [149]. Антиоксиданти працюють як захисний

бар'єр від вільних радикалів та нерадикальних окислювачів і запобігають пошкодженню оксидантами ДНК, білків, ліпідів та інших молекул [15, 150].

Внаслідок неферментативного окисного декарбоксилювання АКГ реагує з перекисом водню (H_2O_2) і перетворюється до сукцинату, води та вуглекислого газу, тобто може діяти як антиоксидант [117]. В умовах культури клітин він може видаляти H_2O_2 [151].

Sokolowska з командою (1999) вивчали антиоксидантні властивості АКГ (0,3-2 мМ) та його вплив на гемоліз еритроцитів людини, який індукували перексидом водню (10 мМ). Інтенсивність індукованого перексидом водню гемолізу еритроцитів оцінювали за утворенням малонового діальдегіду (МДА), АФК і вивільненням гемоглобіну. Виявилось, що 2 мМ АКГ запобігав індукованому H_2O_2 гемолізу еритроцитів людини. Це підтверджує участь неферментативного окисного декарбоксилювання альфа-кетокислот у процесі нейтралізації перексиду водню [152, 153].

Щурам перорально вводили ціанід калію (KCN) (7,0 мг/кг) та/або АКГ (1,0 г/кг) щодня і протягом 14 днів визначали різні біохімічні показники у мозку, печінці та нирках після 7 та 14 днів такого втручання та 7-денного періоду відновлення [154]. Ціанід значно знижував активність глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР), супероксиддисмутази (СОД) і каталази у всіх органах через 7 днів. Підвищені рівні МДА спостерігалися в мозку та нирках через 7 і 14 днів після введення ціаніду. Було встановлено, що АКГ запобігав всім біохімічним змінам, які викликалися ціанідом [154].

Група Niemiec et al. (2011) досліджувала вплив АКГ на еластичність артерій у 12-місячних мишей. Альфа-кетоглутарат у формі кальцієвої солі стабілізував окисно-відновний стан (зниження рівня активних продуктів тіобарбітурової кислоти (TBARS) у тварин, які отримували АКГ) та підвищував еластичність кровоносних судин. Додавання АКГ (у формі натрієвої солі) значно підвищувало активність ГП та знижувало активність СОД [155]. Альфа-кетоглутарат зменшував перекисне окислення ліпідів та модулював вищий рівень загального антиоксидантного статусу і стабілізував окисно-відновний

гомеостаз у старих 12-місячних мишей до рівня, який був у молодих 2-місячних тварин [155].

Greilberger et al. (2021) вперше показали, що АКГ у різних концентраціях демонструє високий потенціал до відновлення пероксинітриту до сукцинату і нітриту, що було виявлено за допомогою ядерного магнітного резонансу, але необхідні подальші дослідження. Експоненційне зменшення хемілюмінесцентного сигналу вказує на високу спорідненість АКГ до пероксинітриту. При використанні ферментативного колориметричного аналізу АКГ було виявлено, що пероксинітрит ефективно реагує з АКГ, не впливаючи на активність ферментів, задіяних у реакції. Окрім того, при нейтральному рН АКГ може захищати від нітрування мітохондріальних і цитозольних білків у клітинах і крові [156].

У дослідженні Liu et al. (2023) вперше кількісно визначили рівні АКГ у хрящовій тканині людини та остеоартритичних хондроцитах, яких індукували IL-1 β . Окрім того, IL-1 β -індуковані остеоартритичні хондроцити обробляли АКГ за різних концентрацій. Вміст АКГ зменшився у пошкоджені хрящі, порівняно з нормальним хрящем, та у IL-1 β -індукованих остеоартритичних хондроцитах людини порівняно з контролем. Альфа-кетоглютарат сприяв мітофагії та пригнічував генерацію АФК. Загалом вміст АКГ зменшився в хрящовій тканині людини при остеоартриті та у IL-1 β -індукованих остеоартритичних хондроцитах. До того ж, добавки АКГ можуть полегшити прояви остеоартриту шляхом регулювання мітофагії та оксидативного стресу [157].

Дослідження Si et al. (2022) у самців мишей *C57BL/6* (6 тижнів) індукували коліт 2,5% декстраном сульфату натрію [158]. Також цим мишам додавали 0,5% АКГ (у формі натрієвої солі). Індукування коліту декстрансульфатом натрію збільшувало рівні МДА і пероксиду водню, а також знижувало рівень GSH та підвищувало секрецію прозапальних цитокінів у мишей. Альфа-кетоглютарат послаблював ці зміни та захищав від оксидативного стресу, який викликали введенням мишам декстрансульфату натрію [158].

1.8. Проксидантні властивості АКГ

Проксидантами називають хімічні речовини, які індукують оксидативний стрес шляхом утворення АФК або шляхом інгибування антиоксидантних систем [159]. Незважаючи на те, що АКГ є визнаним антиоксидантом, він може сприяти утворенню АФК через кілька передбачуваних механізмів, які, ймовірно, залежать від типу клітини та її метаболічного профілю [160].

Вирощування *Saccharomyces cerevisiae* на АКГ підвищувало стійкість дріжджових клітин до стресів, але ефекти залежали від концентрації АКГ та типу стресора. Ріст за дії АКГ призводив до підвищення загальної метаболічної активності, рівня низькомолекулярних тіолів, активності каталази та ГР в клітинах дикого типу порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про те, що екзогенний АКГ може посилювати клітинний метаболізм, що призводить до індукції легкого оксидативного стресу. Це, в свою чергу, призводить до активації антиоксидантної системи, що підвищує стійкість клітин *S. cerevisiae* до H_2O_2 та інших стресів [153].

Показано, що 8 мМ АКГ інгибує АТФ-синтазу, причому інгибування АКГ призводить до зниження вмісту АТФ з супутнім збільшенням утворення АФК, зменшення споживання кисню та посилення автофагії у клітинах нематоди *Caenorhabditis elegans* [118].

Двадцятип'ятиденні самки мух *Drosophila melanogaster*, які отримували дієту з 5% дріжджів і 5% сахарози (5Y:5S) не демонстрували відмінностей в рівнях маркерів оксидативного стресу між контрольними мухами та мухами, яких годували 10 мМ АКГ. Однак мухи, яких годували АКГ, мали нижчу активність каталази та глутатіон-S-трансферази (GST) порівняно з контрольними мухами [161].

У самців мишей лінії *C57BL/6J* віком 9 місяців додавання 1%-го розчину АКГ до базової їжі призвели до зниження активностей ферментів, які здійснюють глутатіонзалежну детоксикацію ксенобіотиків і продуктів

перекисного окислення ліпідів, а саме ГП і GST у корі головного мозку мишей порівняно з контрольними значеннями [162].

Загалом експериментальні дані, вказують на те, що АКГ можуть проявляти як антиоксидантні, так і прооксидантні властивості залежно від концентрації АКГ та умов. Баланс між цими властивостями (антиоксидантними та прооксидантними) може впливати на стаціонарні рівні АФК [160]. Якщо рівень АФК буде в межах оптимального діапазону, то проявляться позитивні ефекти АКГ. Наприклад, невелике підвищення рівня АФК може бути корисним для організму через індукцію помірного оксидативного стресу, що призводить до стимуляції захисних систем із підвищенням адаптаційної здатності [146, 163]. Перевищення оптимальних рівнів АФК може призвести до токсичних ефектів, що призводять до скорочення тривалості життя [160].

1.9. Роль альфа-кетоглутарату в метаболічному синдромі

Метаболічний синдром в основному виникає через споживання їжі з високим вмістом жирів і вуглеводів та малорухливий спосіб життя, що призводить до того, що споживання енергії перевищує витрати енергії [21]. Виникнення та розвиток багатьох компонентів МС пов'язують зі зниженням рівня АКГ в організмі. Вміст АКГ можна розглядати як маркер, що корелює з рівнем глюкози та ліпідів в крові, зі ступенем розвитку ожиріння, артеріальним тиском [116].

Встановлено, що рівні циркулюючого АКГ у людини поступово знижуються з віком [129]. Оскільки АКГ практично не надходить в організм з харчуванням, харчовий додаток АКГ розглядається як потенційний спосіб компенсації його дефіциту в організмі. Недавні дослідження підтверджують, що АКГ має потенційний терапевтичний вплив для корекції метаболічних порушень, покращення вуглеводного обміну та зниження ризику серцево-судинних захворювань.

Дослідження Yuan et al. (2020) виявило, що в результаті клінічних випробувань, яке включало 45 учасників (чоловіки та жінки), рівні АКГ негативно корелювали з різними метаболічними показниками, які включали індекс маси тіла, окружність талії та стегон, вміст жиру та масу тіла [164].

Метою дослідження Radzki et al. (2009) було визначити вплив АКГ на ліпідний профіль крові самців та самок щурів Wistar з гіперхолестеринемією. Самки та самці щурів впродовж експерименту споживали їжу, що містила холестерин (1%), жир (10%) та були розділені на три групи: перша отримувала питну воду (контроль), дві інші (експериментальні групи) отримували розчин 0,01 М і 0,1 М АКГ. Рівні загального холестерину, ліпопротеїнів низької густини, триацилгліцеридів у сироватці крові в обох експериментальних групах, які отримували АКГ, були нижчими, тоді як рівні ліпопротеїнів високої густини демонстрували тенденцію до зростання. Маса тіла у групах, які отримували АКГ, була значно нижчою, ніж у контрольній групі [165].

Дослідження Yuan et al. (2022) складалося з двох експериментів. Перший експеримент: самців мишей *C57BL/6* годували базовою їжею або висококалорійною їжею з додаванням 2% АКГ до питної води. Хоч додаток АКГ не впливав на рівень глюкози в крові мишей, яких годували базовою їжею, він значно знизив рівень глюкози та глікованого гемоглобіну (HbA1c, біомаркеру для діагностики цукрового діабету) в крові мишей, яких годували ВКІ [134].

Другий експеримент: самцям мишей *C57BL6/J* індукували діабет введенням стрептозоцину. Мишам внутрішньочеревно вводили АКГ (10 мг/кг), контрольні миші отримували ін'єкцію фізіологічного розчину. Рівень глюкози у мишей з діабетом був значно нижчим, ніж у контрольних мишей та спостерігалось зниження активності ферментів глюконеогенезу в печінці у експериментальних мишей [134].

Самців щурів Sprague-Dawley, годували їжею з низьким або високим вмістом жиру впродовж 15 тижнів. Наступні 12 тижнів щурів продовжували годувати відповідною їжею та отримували питну воду, що містила 0 або 1% АКГ. Пероральне введення АКГ (250 мг/кг маси тіла на день) знижувало чутливість до

інсуліну (показав пероральний тест на толерантність до глюкози) у щурів які отримували їжу як з низьким, так і з високим вмістом жиру [166].

Дослідження Liu et al. (2020) було спрямоване на вивчення впливу АКГ при гострому респіраторному дистрес-синдромі, викликаному ліпополісахаридом в культурі альвеолярних макрофагів мишей. Результати показали, що 2 мМ АКГ пригнічує формування прозапальних M1-макрофагів і посилює протизапальну M2-поляризацію, індуковану IL-4 в культурі альвеолярних макрофагів мишей. Додаткові дослідження виявили, що АКГ знижує експресію генів, характерних для M1-макрофагів, та пригнічує сигнальний шлях mTORC1/p70S6K у M1-поляризованих клітинах. Більше того, АКГ підсилює M2-поляризацію клітин, стимульовану IL-4, через посилення переміщення PPAR γ (рецептор, що активується пероксисомним проліфератором гамма) в ядро та підвищення експресії генів, задіяних у метаболізмі жирних кислот [167].

Основною ідеєю нашої роботи є дослідження впливу АКГ на вільнорадикальні та метаболічні процеси у мишей, які споживали базову їжу та їжу з високим вмістом жиру та фруктози. Робота спрямована на вивчення механізмів дії АКГ в тканинах мишей лінії *C57BL/6J*; впливу АКГ на інтенсивність вільнорадикальних, запальних процесів та метаболізму за умов споживання різних типів їжі; потенціалу АКГ як харчового додатку для запобігання або зменшення негативних наслідків споживання висококалорійної їжі, багатої на жири та фруктозу.

Отже, миші лінії *C57BL/6J* є однією з найкращих моделей для дослідження МС. Вони легко набирають вагу при вживанні висококалорійної їжі з високим вмістом жирів, або жирів та вуглеводів, добре адаптуються до лабораторних умов і підходять для різних наукових експериментів. Завдяки великій кількості попередніх досліджень на цій лінії, їх зручно використовувати для вивчення причин МС та розробки нових методів лікування.

Попередні дослідження свідчать про здатність додатку АКГ запобігати розвитку ожиріння та запалення у модельних організмів, а також покращувати

вуглеводний обмін (вміст глюкози в крові) та ліпідний профіль (загальний холестерин, ліпопротеїни високої та низької густини, триацилгліцериди) в крові мишей при споживанні висококалорійної їжі.

Проте, вплив АКГ на метаболізм тканин мишей, які споживали висококалорійну їжу з високим вмістом жирів та фруктози, досі залишається недостатньо вивченим. Це підкреслює перспективність використання АКГ як харчового додатку для профілактики метаболічного синдрому, індукованого висококалорійною їжею з високим вмістом жирів і фруктози.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви

У цій роботі використовували реактиви виробництва «Sigma-Aldrich» (США), «Carl Roth» (Німеччина), «Fluka» (Німеччина), «Merck» (США). Реактиви вітчизняного виробництва були не нижче класу ч.д.а.

2.2. Дизайн експерименту

У роботі використовували лабораторних мишей лінії *C57BL/6J*. Тварин утримували в умовах 12-годинного циклу світло/темрява (6:00 ранку/ 18:00 вечора) при температурі $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ і вологості повітря 50-60%. Одномісячних тварин розділяли за статтю і для цього дослідження використовували тільки самців. Тварин розміщували по 2-3 в клітці. Усі миші отримували стандартну їжу для гризунів (10% ккал отримані від жиру), який містив 21,8% білку, 4,8% жиру, 69,1% вуглеводів і 3,9% клітковини ("Резон-1", Київ, Україна). Калорійність базової їжі становила 329,5 ккал/100г. Усі тварини мали вільний доступ до води.

У віці п'яти місяців тварин випадковим чином розділяли на чотири групи: контрольну та три дослідні по 12-14 мишей у кожній групі (загалом 52 миші). Для визначення морфометричних та гематологічних показників було використано 12–14 мишей у групі, а для оцінки біохімічних параметрів – 6–7 мишей у групі. Решту тварин було використано у іншому експерименті для аналізу функціонування мітохондрій.

Контрольних мишей продовжували годувати стандартною їжею, як зазначено вище. Експериментальні групи мали різні режими годування (Рис. 2.2.1). Мишей першої експериментальної групи годували їжею з високим вмістом жиру та фруктози (ВКІ), що містила (45% ккал отримані від жиру, 15% ккал отримані від фруктози і 10% білку). Калорійність висококалорійної їжі

становила 486 ккал/100г. Їжу з високим вмістом жиру та фруктози готували шляхом змішування (на 1 кг) 550 г стандартної їжі, 250 г смальцю, 200 г фруктози та 10 мл жовчі як емульгатору [307], а потім розділяли на порції вагою приблизно 10 г кожна. Цю їжу (ВКЇ) оновлювали мишам щодня. Друга група мишей отримувала стандартну їжу, але вони замість води пили 1% альфа-кетоглутарату натрію (АКГ), а третя група – споживала ВКЇ з 1% розчином АКГ замість питної води (ВКЇАКГ).

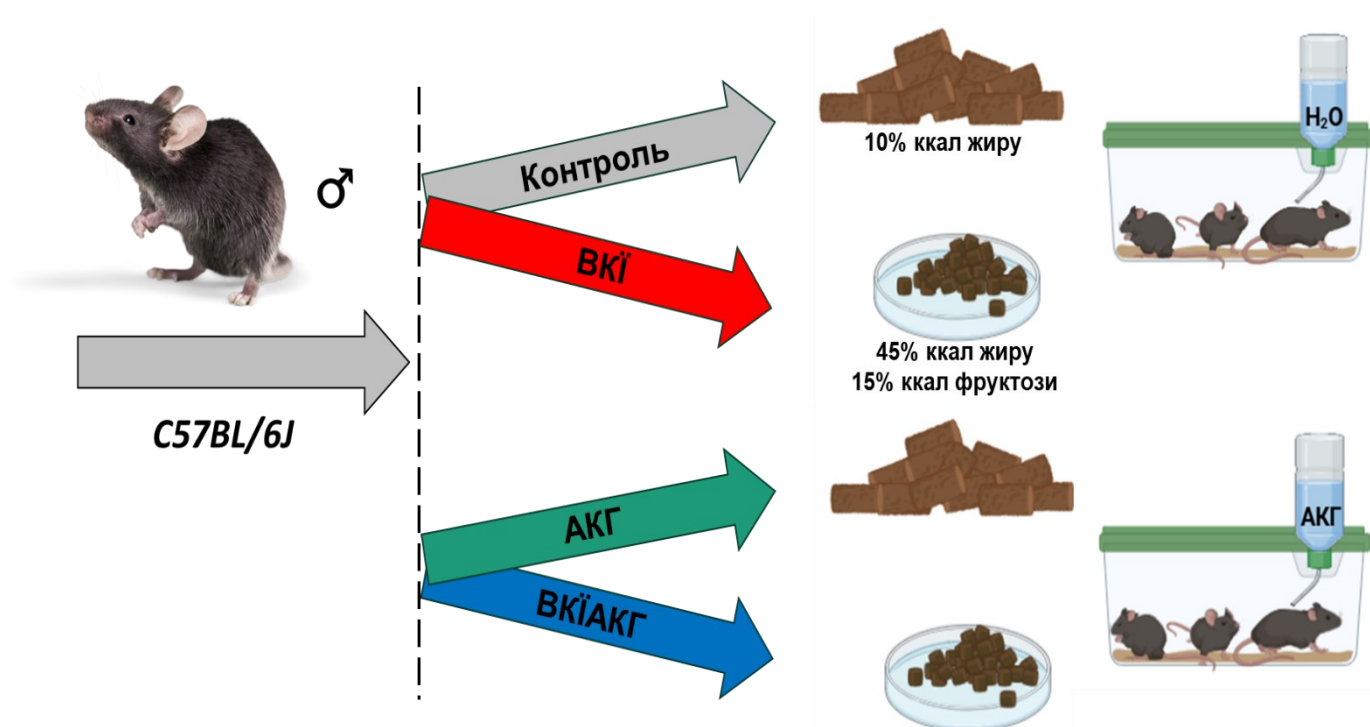


Рис. 2.2.1. Дизайн експерименту. Скорочення: ВКЇ – їжа з високим вмістом жиру та фруктози, АКГ – альфа-кетоглутарат, ВКЇАКГ – їжа з високим вмістом жиру та фруктози у комбінації з розчином альфа-кетоглутарату.

Альфа-кетоглутарову кислоту у формі порошку (АКГ, Protista АВ, Швеція) із чистотою 99% змішували з дистильованою водою для приготування розчину. Розчин альфа-кетоглутарової кислоти нейтралізували шляхом додавання NaOH до кінцевого значення рН розчину 7,3 [168]. Готували вихідний 10% розчин АКГ, який зберігали в холодильнику та перед використанням розводили його водою до 1% розчину. За літературними даними ЛД₅₀ для альфа-

кетоглютарату становить > 5 г/кг для щурів (самців та самок) [169]. Тривалість експерименту та обрана концентрація АКГ була використана в попередніх дослідженнях ожиріння та старіння на мишах [3].

Мишей утримували на відповідних режимах харчування упродовж наступних восьми тижнів. За цей час споживання води або розчину АКГ фіксували через день, а масу тіла реєстрували кожні 14 днів.

Всі експериментальні протоколи були схвалені Комісією з питань етики Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника і проведені відповідно до Директиви Європейського Парламенту і Ради 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються для наукових досліджень.

2.3. Забір крові для гематологічного аналізу та отримання плазми крові мишей

По завершенню експерименту проводили забір крові та органів у мишей. Перед відбором зразків миші голодували 15-16 годин. Мишей піддавали анестезії вуглекислим газом. Кров забирали з ретроорбітального синусу в пробірки, що містили гепарин, використовуючи промиті гепарином скляні капіляри. Для отримання плазми частину крові центрифугували (1500 g, 15 хв, 4°C). Пробірки крові з антикоагулянтом центрифугували і надосадову рідину (плазму крові) відбирали та заморожували у рідкому азоті для подальшого зберігання при -80°C. Іншу порцію відібраної крові використовували для гематологічного аналізу [170]. Після взяття зразків крові, мишей піддавали забою методом цервікальної дислокації.

2.4. Гематологічний аналіз крові

Концентрацію загального гемоглобіну (Hb) визначали в крові спектрофотометричним методом з реактивом Драбкіна з використанням

комерційного набору (ТОВ "Генезис", Україна). Реактив Драбкіна викликає гемоліз еритроцитів і вивільнений гемоглобін реагує з ціанідом калію та фериціанідом калію з утворенням забарвленої сполуки, яка поглинає світло з максимумом при довжині хвилі 540 нм. Кров змішували з реактивом Драбкіна у співвідношенні 1:250, інкубували 20 хв при кімнатній температурі, а потім визначали поглинання світла утвореним ціанметгемоглобіном при довжині хвилі 540 нм [170, 171].

Для визначення гематокриту 10 мкл крові відразу після забору переносили в мікрокапілярні пробірки, які потім закривали з обох боків і центрифугували (2000 g 10 хв, кімнатна температура) на центрифугі ОПН-8 (СРСР). Інші порції крові розводили у 200 разів у 3% NaCl для підрахунку еритроцитів або у 40 разів у 5% оцтовій кислоті та фарбували метиленовим синім для підрахунку кількості лейкоцитів. Кількість еритроцитів (червоних кров'яних тілець) і лейкоцитів (білих кров'яних тілець) підраховували в камері Горяєва під світловим мікроскопом Leitz (Німеччина) при збільшенні $\times 1000$ [170].

У забарвлених мазках крові підраховували лейкоцитарну формулу. Для цього краплю крові наносили на предметне скло і висушували на повітрі. Потім мазки фіксували і фарбували методом Романовського (водний розчин азуро-еозину) з подальшим забарвленням за Май-Грюнвальдом-Гімзою [172, 173].

2.5. Гомогенізація тканин та визначення активності ферментів

Заморожені зразки тканин гомогенізували за допомогою скляного гомогенізатора Поттера-Ельвегейма у співвідношенні 1:10 (міліграм тканини: мікролітр середовища гомогенізації) у середовищі, яке містило 50 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) для визначення активності антиоксидантних (каталаза, глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіон-S-трансфераза (GST) та пов'язаних з ними ферментів (глутатіонредуктаза (ГР),

глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) і НАДФН-хіноноксидоредуктаза (НХО1)).

Для визначення активності гліколітичних ферментів заморожені зразки тканин гомогенізували в десятикратному об'ємі середовища, яке містило 50 мМ імідазольний буфер (рН 7,5), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ дитіотрейтол, 20 мМ NaF і 150 мМ KCl. Отримані гомогенати центрифугували на центрифугу Eppendorf 5415 R (Німеччина) з охолодженням протягом 15 хв при 16100 g та 4°C. Після центрифугування осад відкидали, а супернатанти зберігали на льоді кілька годин протягом визначення у них біохімічних параметрів.

2.5.1. Активність каталази

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за розкладанням пероксиду водню під дією каталази, реєструючи зміну поглинання світла при 240 нм на спектрофотометрі ULAB 102UV у пробі об'ємом 2 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ H_2O_2 і 1 мкл супернатанту [174]. Коефіцієнт молярного поглинання H_2O_2 при досліджуваній довжині хвилі становить $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [175].

2.5.2. Активність глутатіонпероксидази

Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали, використовуючи спряжену реакцію з глутатіонредуктазою (ГР). Окислений глутатіон (GSSG), який утворюється в результаті детоксикації гідропероксидів ГП, відновлюється до GSH ГР з використанням НАДФН. Швидкість реакції реєстрували за зниженням оптичної густини при 340 нм внаслідок окислення НАДФН до НАДФ^+ , у пробі об'ємом 1 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 4 мМ NaN_3 , 15 мМ GSH, 0,25 мМ НАДФН, 1 Од/мл ГР, 0,2 мМ H_2O_2 та 10-25 мкл супернатанту. Азид натрію додається в суміш для інгибування каталази, яка

дисмутує пероксид водню. Оскільки реакція може протікати спонтанно, тобто без участі ферменту, паралельно визначали зміни оптичної густини у бланку, що містив середовище гомогенізації замість супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при досліджуваній довжині хвилі становить $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [175].

2.5.3. Активність глутатіонредуктази

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.8.1.7) визначали за швидкістю реакції окислення НАДФН до НАДФ^+ на спектрофотометрі Specol 211 (Carl Zeiss, Німеччина) при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, що містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ГSSГ, 0,25 мМ НАДФН та 20-50 мкл супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при вказаній довжині хвилі становить $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [175].

2.5.4. Активність глутатіон-S-трансферази

Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення комплексу динітрофенілтіоестеру в результаті кон'югації 1-хлоро-2,4-динітробензолу (ХДНБ), субстрату GST, з відновленим глутатіоном (GSH) на спектрофотометрі Specol 211 при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, що містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ GSH, 1 мМ ХДНБ та 5 мкл супернатанту. Реакцію починали послідовним додаванням супернатанту та ХДНБ. Оскільки реакція може протікати і без участі ферменту, то паралельно проводили визначення зміни оптичної густини у бланку, який містив середовище гомогенізації замість супернатанту в середовищі. Коефіцієнт молярного поглинання ХДНБ $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [175].

2.5.5. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49) визначали як швидкість реакції відновлення НАДФ⁺ до НАДФН на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, що містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), 0,2 мМ НАДФ та 50-80 мкл супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при вказаній довжині хвилі становить 6220 М⁻¹см⁻¹ [175, 176].

2.5.6. Активність НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1

Активність НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1 (КФ 1.6.99.2) визначали, реєструючи швидкість реакції окислення НАДН до НАД⁺, використовуючи 2,6-дихлорфеноліндофенол (ДХФІФ) як субстрат, на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 600 нм у пробі об'ємом 1 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 25мМ Трис буфер (рН 7,5), 0,023% бичачий сироватковий альбумін (BSA), 0,01% твін-20, 5 мкМ ФАД, 0,2 мМ НАДН, 10 мМ дикумарол, 40 мкМ ДХФІФ та 5-20 мкл супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання ДХФІФ при вказаній довжині хвилі становить 21 мМ⁻¹см⁻¹ [177].

2.5.7. Активність гексокінази

Активність гексокінази (КФ 2.7.1.1) визначали, використовуючи спряжену реакцію з Г6ФДГ та її косубстрат НАДФ⁺. Гексокіназа каталізує перетворення глюкози до Г-6-Ф, який є субстратом глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Цей фермент окислює Г-6-Ф з одночасним відновленням НАДФ⁺ до НАДФН. Швидкість відновлення НАДФ⁺ реєстрували на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, яка містила (вказані кінцеві

концентрації): 50 мМ імідазольний буфер (рН 7,5), 10 мМ глюкози, 5 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТФ, 0,2 мМ НАДФ^+ , 0,5 Од Г6ФДГ та 30 мкл супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при вказаній довжині хвилі становить $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [176, 178].

2.5.8. Активність фосфогруктокінази

Активність фосфогруктокінази (КФ 2.7.1.11) визначали методом спряжених реакцій по непрямому визначенню вмісту груктозо-1,6-дисфату, який послідовно розщеплюється альдолазою до гліцеральдегідтрифсату (ГАЗФ) та діоксиацетонфсату (ДОАФ). Тризофсатізомераза перетворює ГАЗФ до ДОАФ і навпаки. Відновлення ДОАФ до гліцерол-3-фсату здійснюється гліцерол-3-фсатдегідрогеназою (ГЗФДГ) з одночасним окисленням НАДН . Швидкість окислення НАДН реєстрували на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ імідазольний буфер (рН 7,5), 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН , 50 мМ KCl , 0,5 Од альдолази, 0,5 Од тризофсатізомерази, 2 Од ГЗФДГ, 5 мМ груктозо-6-фсату та 5-30 мкл супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання НАДН при вказаній довжині хвилі становить $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [176, 178].

2.5.9. Активність груктокінази

Активність груктокінази (КФ 2.7.1.4) визначали, використовуючи спряжену реакцію з піруваткіназою (ПК) та лактатдегідрогеназою (ЛДГ): ФК фосфорилує груктозу з утворенням АДФ, який натомість конвертується піруваткіназою до АТФ з утворенням пірувату, що відновлюється лактатдегідрогеназою до лактату з одночасним окисленням НАДН до НАД^+ . Швидкість окислення НАДН до НАД^+ реєстрували на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, яка містила (вказані кінцеві

концентрації): 50 мМ імідазольний буфер (рН 7,5), 1 мМ фосфоенолпіруват, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl , 5 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН, 2,5 Од ЛДГ, 2,5 Од піруваткінази, 1 мМ фруктози та 2 мкл супернатанту [179].

2.5.10. Активність піруваткінази

Активність піруваткінази (КФ 2.7.1.40) визначали, використовуючи спряжену лактатдегідрогеназну реакцію. Швидкість окислення НАДН до НАД^+ реєстрували на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ імідазольний буфер (рН 7,5), 1 мМ фосфоенолпіруват, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl , 0,16 мМ НАДН, 2,5 Од ЛДГ та 2-20 мкл супернатанту [176, 178].

2.5.11. Активність пароксонази

Активність пароксонази (ПОН) (КФ 3.1.1.2) визначали, використовуючи *p*-нітрофенілацетат як субстрат, а утворення *p*-нітрофенолу реєстрували на спектрофотометрі Spekol 211 при довжині хвилі 405 нм у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ трис- HCl (рН 7,0), 1 мМ CaCl_2 , дистильована вода та 5 мкл супернатанту. Реакцію ініціювали додаванням 25 мкл 160 мМ 4-нітрофенілацетату (до кінцевої концентрації 3,2 мМ) як субстрату ПОН. Оскільки реакція може відбуватися повільно неферментативно, паралельно визначали протікання реакції в холостій пробі, використовуючи дистильовану воду замість супернатанту. Коефіцієнт молярного поглинання *p*-нітрофенолу при вказаній довжині хвилі становить $14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [180, 181].

2.5.12. Активність мієлопероксидази

Активність мієлопероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали за зміною інтенсивності забарвлення розчину на мікропланшетному фотометрі (Labsystem

Multiscan MCC/340, Фінляндія) при довжині хвилі 450 нм у пробі об'ємом 0,3 мл, яка містила (вказані кінцеві концентрації): 2,3 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин гідрохлорид, 0,4 М H_2O_2 , 0,46 М H_2SO_4 та 2 мкл супернатанту. Реакція базується на здатності мієлопероксидази окислювати 3,3',5,5'-тетраметилбензидин у присутності пероксиду водню до оксибензидину коричневого кольору. До кожної проби готували бланк (без зразку крові) – розчин Хенкса. Коефіцієнт молярної екстинкції 3,3',5,5'-тетраметилбензидину – $59\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [182].

2.6. Гомогенізація тканин та визначення маркерів оксидативного стресу

Для визначення вмісту відновленого та окисленого глутатіону тканини гомогенізували в охолоджену буфері, який містив 0,1% Тритон Х-100; 0,6% сульфосаліцилову кислоту в буфері КФЕ (Potassium phosphate-EDTA, що містив 0,1 М KH_2PO_4 + 0,1 М K_2HPO_4 + 11,2 мМ ЕДТА і потім центрифугували при 15800 g, 10 хв, 4°C.

Для визначення вмісту пероксидів ліпідів (ПЛ) тканини гомогенізували в охолоджену 96% етанолі у співвідношенні 1:10 (міліграм тканини: мікролітр середовища гомогенізації) для екстракції ліпідів. Гомогенати центрифугували при 10000 g протягом 10 хвилин при 4°C.

Для визначення вмісту карбонільних груп білків зразки тканин гомогенізували в середовищі гомогенізації у співвідношенні 1:10 (міліграм тканини: мікролітр середовища гомогенізації). Гомогенати центрифугували при 15800 g протягом 15 хв при 4°C. Аліквоти цього гомогенату об'ємом 250 мкл потім змішували з 250 мкл 20% (кінцева концентрація) трихлороцтової кислоти (ТХО) і центрифугували 5000 g протягом 5 хв при 21°C в центрифугі ОПН-8 (СРСР). В отриманому осаді визначали вміст карбонільних груп білків.

2.6.1. Вміст пероксидів ліпідів

Метод визначення вмісту пероксидів ліпідів (ПЛ) з ксиленолом оранжевим ґрунтується на тому, що іони Fe^{2+} окислюються ПЛ до іонів Fe^{3+} . Іони Fe^{3+} утворюють комплекс з ксиленолом оранжевим, який поглинає світло з максимумом в області 580 нм при низьких значеннях рН. Гідропероксид кумену також здатний окислювати залізо в кислому середовищі і тому його використали як внутрішній стандарт. Суміш у якій проводили реакцію містила (вказані кінцеві концентрації): 0,1 мМ ксиленол оранжевий, 25 мМ H_2SO_4 , 0,25 мМ FeSO_4 , та 20 мкл супернатанту у пробі об'ємом 1,5 мл. Одночасно з дослідними пробами готували бланк, який містив аналогічний об'єм спирту замість супернатанту, щоб визначити похибку, зумовлену поглинанням інкубаційної суміші. Визначали поглинання пробами світла при 580 нм після 30 хв інкубації при кімнатній температурі. Після визначення поглинання світла у проби (окрім бланків) вносили 1 мМ кумен та інкубували 60 хв при кімнатній температурі, після чого визначали поглинання пробами світла при 580 нм. Кумен, який доокислює залізо, необхідний для перерахунку вмісту пероксидів ліпідів у куменових одиницях [175, 183].

2.6.2. Вміст загального глутатіону

Вміст загального глутатіону визначали на зчитувачі мікропланшетів у реакції відновлення 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБ) глутатіоном з утворенням аніону 2-тіонітробензойної кислоти (жовтого кольору), що максимально поглинає світло при довжині хвилі 412 нм. Рівень GSH підтримується на сталому рівні завдяки відновленню утвореного дисульфіду глутатіону (GSSG) за допомогою глутатіонредуктази (ГР) з використанням НАДФН. Суміш для визначення активності містила (вказані кінцеві концентрації): 100 мМ Крі (рН 7,0), 1 мМ ЕДТА, 0,6 мМ ДТНБ, 0,25 мМ НАДФН, ГР, H_2O та 10 мкл супернатанту. Для визначення рівнів окисленого глутатіону

зразки інкубували протягом 1 години в присутності 2-вінілпіридину, який зв'язує відновлений глутатіон. Вміст відновленого глутатіону визначали за різницею між вмістом загального та окисленого глутатіону [184, 185].

2.6.3. Вміст карбонільних груп білків

Вміст карбонільних груп білків визначали за допомогою їх реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ). Вміст утворених динітрофенілгідразонів визначали при довжині хвилі 370 нм на спектрофотометрі Spekol 211. Для цього осад з ТХО екстрактів змішували з 1 мл 10 мМ ДНФГ у 2 М НСІ. Контрольні зразки містили 1 мл 2 М НСІ замість розчину ДНФГ. Зразки інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі, потім центрифугували 5000 g протягом 5 хв при 21°C. Надосадову рідину відкидали, а осад промивали тричі етанол-бутилацетатом (1:1), щоб видалити ДНФГ, який не прореагував. Потім осад розчиняли в 6 М гуанідин-НСІ і центрифугували як описано вище, щоб осадити нерозчинні частинки. Кількість КБ в отриманих супернатантах оцінювали при 370 нм з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [175] і в них же визначали концентрацію білку методом Бредфорда [186].

2.7. Гомогенізація тканин та визначення вмісту метаболітів

Для вимірювання рівнів вільного холестерину, глюкози та глікогену заморожені тканин гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері у співвідношенні 1:10 (міліграм тканини: мікролітр середовища гомогенізації). Для визначення рівня триацилгліцеридів (ТАГ) зразки гомогенізували у PBST (Phosphate Buffered Saline) буфері, що містив 10 мМ Na_2HPO_4 , 2 мМ KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl з 1% Тритоном X-100 у співвідношенні 1:10. Гомогенати нагрівали при +70°C для інактивації клітинних ліпаз і глікозидаз і після охолодження центрифугували (16100 g, 10 хв, 21°C).

2.7.1. Визначення концентрацій глюкози і глікогену

Визначення концентрацій глюкози і глікогену проводили з використанням діагностичного набору «Реагент» згідно з рекомендаціями виробника. Принцип визначення вільної глюкози полягає в окисненні глюкози глюкозооксидазою з утворенням еквівалентної кількості пероксиду водню. Останній є субстратом пероксидази, яка відновлює його з одночасним окисненням інших субстратів з утворенням сполуки рожевого кольору. Інтенсивність забарвлення окисленого субстрату колориметрували при довжині хвилі 500 нм і вона була пропорційна концентрації глюкози у пробі.

Для визначення вмісту глюкози 10 мкл супернатанту змішували із 90 мкл дистильованої води та додавали 500 мкл робочого розчину. Паралельно з дослідними пробими готували проби калібрувального графіку, для побудови якого використовували робочий розчин глюкози з концентрацією 0,2 мг/мл. Всі проби перемішували на струшувачі вортекс та інкубували в термостаті протягом 15 хв при +37°C. Після інкубації у кожную пробу додавали по 500 мкл води та ретельно перемішували на струшувачі вортекс.

Для визначення рівня глікогену в пробірки додавали 10 мкл супернатанту, 10 мкл розчину амілоглюкозидази (0,056 Од/мл), 1 мкл 0,09% NaN_3 і дистильовану воду до загального об'єму 100 мкл. Пробими інкубували протягом двох годин при 37°C. Після інкубації у всі проби додали по 500 мкл робочого розчину, після чого визначали вміст глюкози. Вміст глікогену розраховували як різницю між вмістом глюкози до і після інкубації з амілоглюкозидазою. Вимірювання поглинання світла пробими здійснювали при довжині хвилі 500 нм. Спектрофотометр обнулювали відносно першої пробими калібрувального графіку (яка не містила глюкози). Обраховували вміст глюкози з використанням коефіцієнту лінійної регресії, отриманого від поглинання зразків калібрувального графіку. Рівень глікогену розраховували як різницю між рівнями глюкози до (вільна глюкоза) і після інкубації з амілоглюкозидазою

(вільна глюкоза плюс глюкоза, яка утворилася в результаті розщеплення глікогену).

2.7.2. Визначення вмісту загального холестерину

Визначення вмісту загального холестерину проводили з використанням діагностичного набору «Реагент» згідно з рекомендаціями виробника. Етерифікований холестерин, під впливом холестеролестерази, розщеплюється до вільного холестерину та жирних кислот. Холестерин, під впливом холестеролоксидази, в присутності кисню, окислюється до 4-холестенону з утворенням перекису водню. Останній вступає в реакцію з 4-амінофеназоном та фенолом з утворенням забарвленого хіноніміну. Для визначення вмісту загального холестерину брали 10 мкл супернатанту. Паралельно з дослідними пробами готували проби калібрувального графіку, для побудови якого використовували робочий розчин холестерину з концентрацією 5,2 ммоль/л. До проб калібрувального графіку та досліджуваних проб додавали 250 мкл робочого розчину холестерину. Проби акуратно перемішували та інкубували 10 хв при +37°C. Оптичну густину проб визначали при довжині хвилі 540 нм на мікропланшетному фотометрі (Labsystem Multiscan MCC/340, Фінляндія).

2.7.3. Визначення вмісту триацилгліцеридів

Для визначення вмісту триацилгліцеридів (ТАГ) використовували діагностичний набір «Реагент» згідно з рекомендаціями виробника. Метод непрямий, ґрунтується на ферментативному розщепленні ТАГ до вільних жирних кислот та гліцеролу з наступним фосфорилуванням гліцеролу та його окисленням. Як побічний продукт цих реакцій утворюється пероксид водню, який окислює безбарвний 4-аміноантипірін до хіноніміну малиново-червоного кольору з максимумом поглинання при $\lambda=540$ нм. Інтенсивність забарвлення прямопропорційна концентрації ТАГ.

Для визначення вмісту ТАГ до 50 мкл супернатанту додавали дистильовану воду до загального об'єму 100 мкл. Паралельно з дослідними пробами готували проби калібрувального графіку, для побудови якого використовували робочий розчин ТАГ з концентрацією 0,2 мг/мл. До цього додавали по 300 мкл робочого розчину у калібрувальні і дослідні проби та перемішували вміст проб на струшувачі вортекс. Всі проби інкубували в термостаті 15 хв при +37°C після чого додали у всі проби по 600 мкл дистильованої води. Перемішували вміст проб на струшувачі вортекс. Проводили визначення вмісту ТАГ при довжині хвилі 540 нм.

2.7.4. Визначення концентрації білку методом Бредфорда

Метод Бредфорда ґрунтується на здатності білку зв'язуватись з барвником Кумасі G-250 (діамантово-блакитний) і утворювати забарвлені у блакитний колір сполуки. До 1 мкл супернатанту додавали дистильовану воду до загального об'єму проби 1 мл та 1 мл розчину барвника Кумасі G-250. Паралельно з дослідними пробами готували проби калібрувального графіку, для побудови якого використовували розчин білку BSA (0,5 мг/мл). Інкубували проби з барвником впродовж 10 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину досліджуваних проб визначали при довжині хвилі 595 нм на спектрофотометрі Spekol 211. Концентрацію білку в досліджуваних пробах розраховували за допомогою калібрувального графіку [186].

2.8. Визначення рівня вільного альфа-кетоглютарату

Визначення рівня вільного альфа-кетоглютарату проводили за допомогою набору для аналізу альфа-кетоглютарату (#ab83431, Abcam (США)) відповідно до інструкцій виробника. Для цього заморожену тканину печінки гомогенізували у співвідношенні 1:25 (міліграм тканини : мікролітр буферу для аналізу АКГ). Центрифугували 5 хв 16100 g при 4°C. Супернатант відбирали і тримали на льоді.

Для депротеїнізації до супернатанту додавали 1М перхлоратну кислоту. Інкубували 5 хв на льоді. Далі зразки центрифугували 2 хв, 16100 g при 4°C. Для нейтралізації та осадження надлишку перхлоратної кислоти додавали охолоджений 2 М КОН. Після чого перевіряли рН лакмусовим папірцем (рН має дорівнювати 6,5-8). Зразки центрифугували 15 хв, 16100 g при 4°C. Далі перенесли супернатанти у чисті пробірки та зберігали на льоді.

У пластикові пробірки об'ємом 2 мл послідовно додавали буфер для визначення АКГ, перетворюючий фермент, суміш ферментів та дослідні проби або стандартний розчин АКГ. Одночасно готували дослідні проби та проби калібрувального графіку. Зразки для калібрувального графіку мали концентрацію АКГ від 0 до 10 нмоль/пробу. Після чого зразки інкубували 30 хв при 37°C в термостаті. Флуоресценцію зразку визначали на спектрофлуориметрі RF-5301PC (Shimadzu Corporation, Кіото, Японія) при довжині хвилі збудження 535 нм та емісії 587 нм з шириною смуги пропускання 3 нм.

2.9. Визначення рівня ІЛ-1 β у плазмі крові мишей непрямим методом ІФА

У комірки мікропланшету додавали 100 мкл плазми крові, розведеної у п'ять разів у PBS-буфері (10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl) та інкубували протягом 2 год при кімнатній температурі. Після цього комірки тричі промивали PBS-буфером і далі в них вносили по 200 мкл 5% розчину BSA у PBS (буфер для блокування) і інкубували 1 год. Після інкубації комірки тричі промивали PBS та вносили первинні антитіла проти ІЛ-1 β (Abscam, № ab9722), які розводилися в буферному розчині для блокування. Зразки інкубували з антитілами протягом 2 год при кімнатній температурі, після чого їх тричі промивали PBS. Далі до комірок додавали розведені у блокувальному буфері (1:2500) вторинні антитіла (Cell Signaling, № 7074S) та інкубували 2 год при кімнатній температурі. Після триразового промивання PBS до комірок додавали по 80 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидину дигідрохлориду, який є

субстратом пероксидази хрому, яка зв'язана з вторинними антитілами. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2 М H_2SO_4 та визначали поглинання світла при 450 нм.

2.10. Гістологічний аналіз зразків тканин

Після евтаназії мишей зразки печінки та жирової тканини (1 см x 1 см) забирали та фіксували в 10% формаліні протягом 24 годин. Дегідратацію тканин проводили, пропускаючи їх через розчини спиртів 70%, 80%, 90%, 96% та 99%. Ксилол використовувався для видалення етанолу зі зразків тканин. Після зневоднення зразки заливали в парафін. Зрізи нарізали на автоматичному мікротомі RM100A товщиною 5 мкм, потім зразки депарафінізували, гідратували 96% етанолом і дистильованою водою та фарбували гематоксилін-еозином за стандартною методикою [187]. Далі зрізи тканин просвітлювали ксилолом і для тривалого зберігання покривали гістокітом (ROTI®Histokitt). Зображення були отримані за допомогою мікроскопа MICROmed Evolution LUM LS-8530 (640× для печінки та 160× для жирової тканини). Було проаналізовано щонайменше п'ять зрізів жирової тканини трьох різних тварин у кожній групі.

2.11. Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних здійснювали у програмах GraphPad Prism (версія 8.02) та R (версія 3.2.4), використовуючи однофакторний аналіз ANOVA з подальшими множинними порівняннями за тестом Дункана (для порівняння багатьох груп між собою). Дані представлені як середні значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $p \leq 0,05$ вважали за статистично достовірну різницю між досліджуваними групами.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Поширеність МС і ожиріння зростає у всьому світі, що пов'язують з групою факторів ризику, які включають надлишкову вагу та ожиріння, інсулінорезистентність, гіпертензію та гіперглікемію, неправильне харчування та низьку фізичну активність, хронічний стрес та недостатній сон, генетичну схильність, гормональні зміни, шкідливі звички, зокрема паління та вік [188]. Комбінація цих факторів збільшує ризик розвитку МС, а також таких ускладнень, як серцево-судинні захворювання, цукровий діабет 2 типу та неалкогольна жирова хвороба печінки [21]. За прогнозами дослідників, до 2025 року ожиріння спостерігатиметься у 16% чоловіків та 21% жінок у світі, а до 2035 року ця проблема охопить понад 2 мільярди осіб [189]. Оскільки ожиріння суттєво підвищує ризик розвитку різних захворювань та може призвести до інвалідності чи передчасної смерті, особи з надмірною вагою стикаються з більш комплексними проблемами зі здоров'ям. Крім негативного впливу на здоров'я населення, ожиріння та МС також створюють значне економічне навантаження на суспільство [189].

Ключову роль у зростанні поширеності ожиріння відіграють збільшення доступності та надмірне споживання висококалорійних продуктів харчування, а також тенденція до малорухливого способу життя та недостатня фізична активність [83, 190]. Надмірне споживання калорій, яке суттєво перевищує енергетичні витрати організму, призводить до несприятливих змін метаболізму в організмі. У відповідь на надлишок поживних речовин посилюється синтез та накопичення запасних ліпідів у адипоцитах жирової тканини, що супроводжується збільшенням маси тіла. Окрім того, накопичення жирової тканини супроводжується розвитком оксидативного стресу та хронічного запалення як у жировій тканині, так і в інших органах та тканинах організму [191]. Ці патофізіологічні зміни створюють підґрунтя для розвитку численних супутніх захворювань та ускладнень, пов'язаних з ожирінням.

Для ефективного лікування метаболічних розладів вкрай важливо використовувати терапію, яка спеціально спрямована та модулює ключові молекулярні шляхи, що мають відношення до патологій [192]. При метаболічних розладах існує тісний взаємозв'язок між оксидативним стресом і запаленням: оксидативний стрес активує запальні шляхи через NF- κ B-залежні механізми та продукцію прозапальних цитокінів, які, в свою чергу, посилюють оксидативний стрес через активацію НАДФН-оксидаз та інших джерел активних форм кисню, створюючи патологічне замкнене коло [193, 194]. Було показано, що природні біологічно активні сполуки, такі як поліфеноли, флавоноїди, вітаміни, каротиноїди і антиоксиданти можуть ефективно зменшувати інтенсивність оксидативного стресу при метаболічних розладах. Механізми їх дії включають пряме знешкодження вільних радикалів, зміцнення природного антиоксидантного захисту організму через активацію Nrf2-залежних механізмів, зменшення генерації АФК мітохондріями та іншими клітинними джерелами, а також пригнічення прозапальних сигнальних шляхів [83, 195, 196]. Такий комплексний вплив робить ці природні сполуки перспективними терапевтичними агентами для лікування та профілактики метаболічних порушень.

Альфа-кетоглутарат є важливим інтермедіатом циклу Кребса, який бере участь у метаболічних та регуляторних шляхах у клітині, включаючи генерацію енергії, біосинтезі певних амінокислот та колагену, епігенетичній регуляції експресії генів, регуляції окисно-відновного гомеостазу та детоксикації небезпечних речовин [16, 160]. Дослідження показують, що АКГ зменшує інтенсивність оксидативного стресу, проявляючи антиоксидантні властивості, зокрема у клітинах ссавців [117]. Альфа-кетоглутарат реалізовує свої антиоксидантні ефекти через кілька механізмів. Зокрема, пряме знешкодження активних форм кисню, активацію антиоксидантних ферментів, стабілізацію HIF-1 α та регуляцію мітохондріальної функції. Крім того, АКГ може впливати на сигнальні шляхи mTOR та NF- κ B, які беруть участь у регуляції клітинного метаболізму, запалення та старіння [16].

Таким чином, множинність механізмів дії АКГ обумовлює його важливу роль у підтримці клітинного гомеостазу та визначає перспективність його застосування як терапевтичного агента.

3.1. Їжа з високим вмістом жиру і фруктози та альфа-кетоглютарат незначно впливають на морфометричні та гематологічні показники мишей

Споживання їжі з високим вмістом жирів та фруктози є одним із ключових факторів розвитку ожиріння та метаболічних порушень. Такий тип харчування призводить не лише до збільшення маси тіла, але й до порушення метаболічного гомеостазу, розвитку інсулінорезистентності та оксидативного стресу. Альфа-кетоглютарат, діючи як міметик калорійного обмеження, потенційно може запобігати надлишковому набору маси тіла при надмірному споживанні їжі чи при споживанні висококалорійної їжі [16, 160].

Тому на першому етапі дослідження ми оцінили вплив їжі з високим вмістом жиру і фруктози без або зі споживанням розчину 1% АКГ замість питної води на морфометричні показники у самців мишей лінії *C57BL6/J*. Ця лінія мишей широко використовується як модель для вивчення ожиріння та МС, оскільки миші демонструють схильність до розвитку ожиріння та метаболічних порушень при споживанні висококалорійної їжі.

Восьмитижневе годування їжею ВКІ або в поєднанні з додаванням АКГ у питну воду мало впливало на масу тіла мишей (Рис. 3.1.1А) та довжину тіла мишей (Рис. 3.1.1Б). Ми використали різні індекси для оцінки розвитку ожиріння у мишей. Індекс маси тіла розраховується як відношення маси тіла до квадрату довжини тіла. Індекс ожиріння відображає відношення маси жирової тканини до загальної маси тіла. А індекс Лі розраховується як кубічний корінь з маси тіла, поділений на довжину тіла. Після проведених розрахунків індексу маси тіла (Рис. 3.1.1В), індексу ожиріння (Рис. 3.1.1Г) та індексу Лі (Рис. 3.1.1Д) ми не виявили відмінностей у мишей, які споживали ВКІ, АКГ чи їх комбінацію, порівняно з

контролем. У всіх чотирьох групах середня маса тіла тварин наприкінці експерименту була практично однаковою (Рис. 3.1.1А).

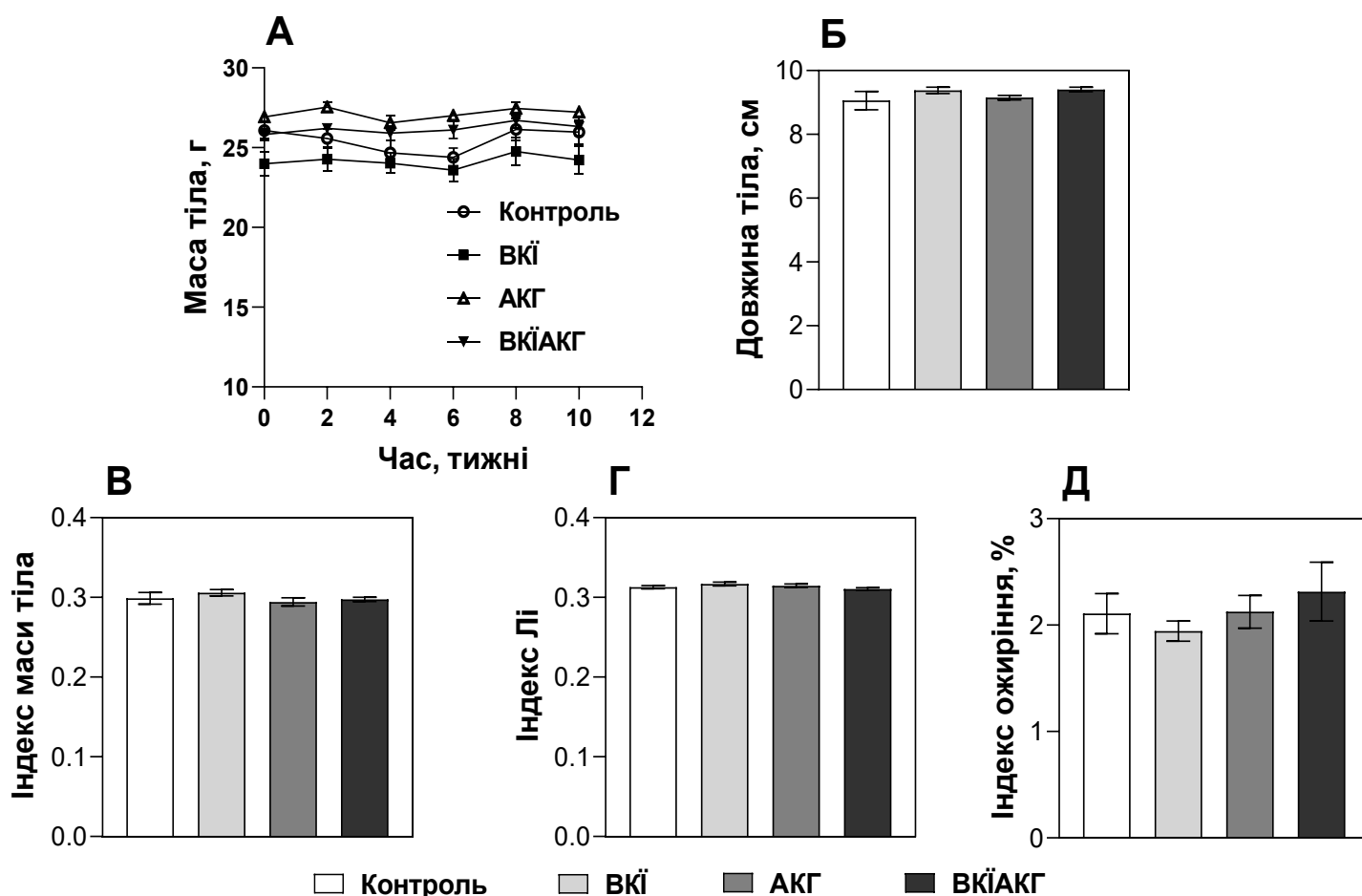


Рис. 3.1.1. Морфометричні показники мишей лінії *C57BL/6J*, які отримували стандартну їжу (контрольна група), їжу з високим вмістом жиру та фруктози (група ВКІ), стандартну їжу з додаванням 1% АКГ до питної води (група АКГ) або їжу з високим вмістом жиру та фруктози з додаванням 1% АКГ до питної води (група ВКІАКГ) впродовж 8 тижнів. (А) динаміка маси тіла, яку визначали кожні два тижні, (Б) довжина тіла, (В) індекс маси тіла (ІМТ), (Г) індекс Лі, (Д) індекс ожиріння на кінець експерименту. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 12-14$ мишей у кожній групі, односторонній тест ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Подібні результати незначного впливу ВКІ на приріст маси тіла були отримані в деяких інших дослідженнях [5, 6, 197], тоді як в інших випадках була знайдена більша маса тіла у тварин, які отримували ВКІ [4, 198]. Такі розбіжності можна пояснити або різним вмістом жиру в їжі [198], або впливом великої кількості фруктози [197], або різним вмістом білку в раціоні. Зокрема, нижчий вміст білку (як у нашому експерименті) не сприяв ожирінню мишей при споживанні їжі з високим вмістом жирів [199, 200].

Годування ВКІ не впливало на кількість спожитої води, але миші, які пили замість води 1% розчин АКГ, демонстрували на 15% менше споживання рідини, ніж миші з контрольної групи (Рис. 3.1.2А). Тип їжі не впливав на споживання АКГ мишами (Рис. 3.1.2Б). Коли тварини вживали розчин АКГ, кількість спожитої рідини була меншою, ніж у контрольній групі та групі ВКІ (Рис. 3.1.2А).

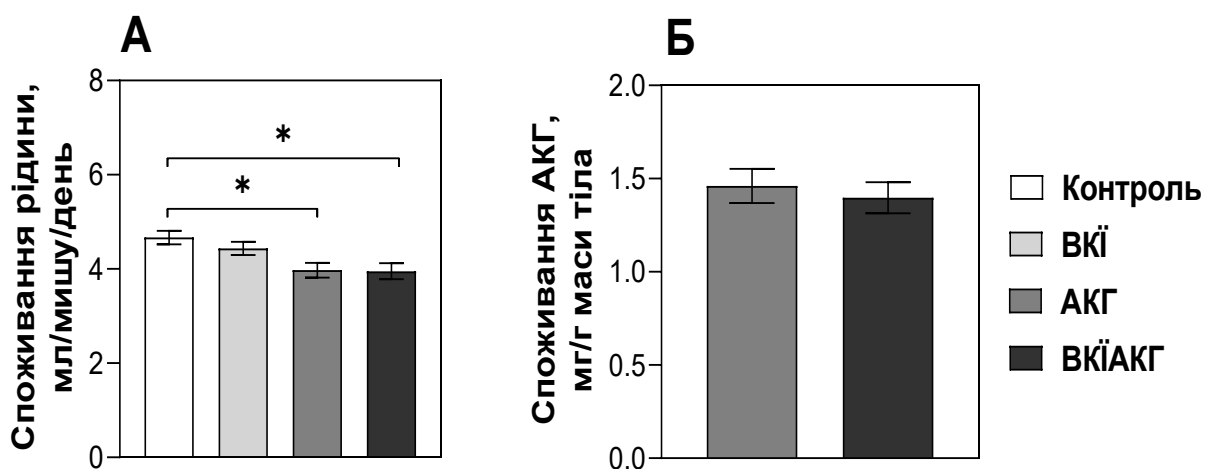


Рис. 3.1.2. Споживання рідини та 1% розчину АКГ мишами. (А) споживання рідини. Рідину змінювали кожних 3-4 дні, (Б) споживання АКГ. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 12-14$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Ми припускаємо, що або мишам не сподобався смак води з АКГ, або розчин АКГ краще задовільняв спрагу, що, відповідно, зменшувало споживання рідини.

Кількість еритроцитів (Рис. 3.1.3А) та лейкоцитів (Рис. 3.1.3Б), гематокрит (Рис. 3.1.3В) і вміст гемоглобіну (Рис. 3.1.3Г) у мишей, які отримували ВКЇ окремо або в комбінації з АКГ упродовж восьми тижнів представлені на рисунку 3.1.3.

Кількість еритроцитів була на 14% нижчою у мишей, які отримували ВКЇ або АКГ окремо, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.1.3А). Споживання комбінації ВКЇАКГ не впливало на кількість еритроцитів. На загальну кількість лейкоцитів вплинув лише АКГ (Рис. 3.1.3Б), і миші, які отримували АКГ зі стандартною їжею, показали на 14% вищу загальну кількість лейкоцитів порівняно з контрольною групою. При цьому миші, які отримували ВКЇ, показали тенденцію до нижчої загальної кількості лейкоцитів порівняно з їхніми контрольними аналогами. Гематокрит, показник, що демонструє відсоткове співвідношення об'єму еритроцитів до загального об'єму крові, не зазнав впливу ВКЇ, АКГ або їх комбінації (Рис. 3.1.3В). Рівні гемоглобіну (Рис. 3.1.3Г) не зазнали впливу ВКЇ або ВКЇАКГ. Водночас, миші, які отримували АКГ зі стандартною їжею, показали на 21% вищі рівні гемоглобіну в крові порівняно з контрольною групою (Рис. 3.1.3Г).

Для визначення відсоткового співвідношення різних типів лейкоцитів у крові мишей було проведено диференційний підрахунок лейкоцитів шляхом аналізу мазків крові. Хоча зміни у лейкоцитарній формулі не є специфічними для конкретного захворювання, вони мають важливе діагностичне значення, оскільки дозволяють оцінити загальний стан. Відхилення будь-якого показника від референтних значень свідчить про наявність патологічного чи запального процесу в організмі.

Диференційний підрахунок лейкоцитів показав, що відносні рівні юних форм нейтрофілів та лімфоцитів були нижчими на 32% та 7% відповідно у крові мишей середнього віку, які споживали ВКЇ, порівняно з контролем.

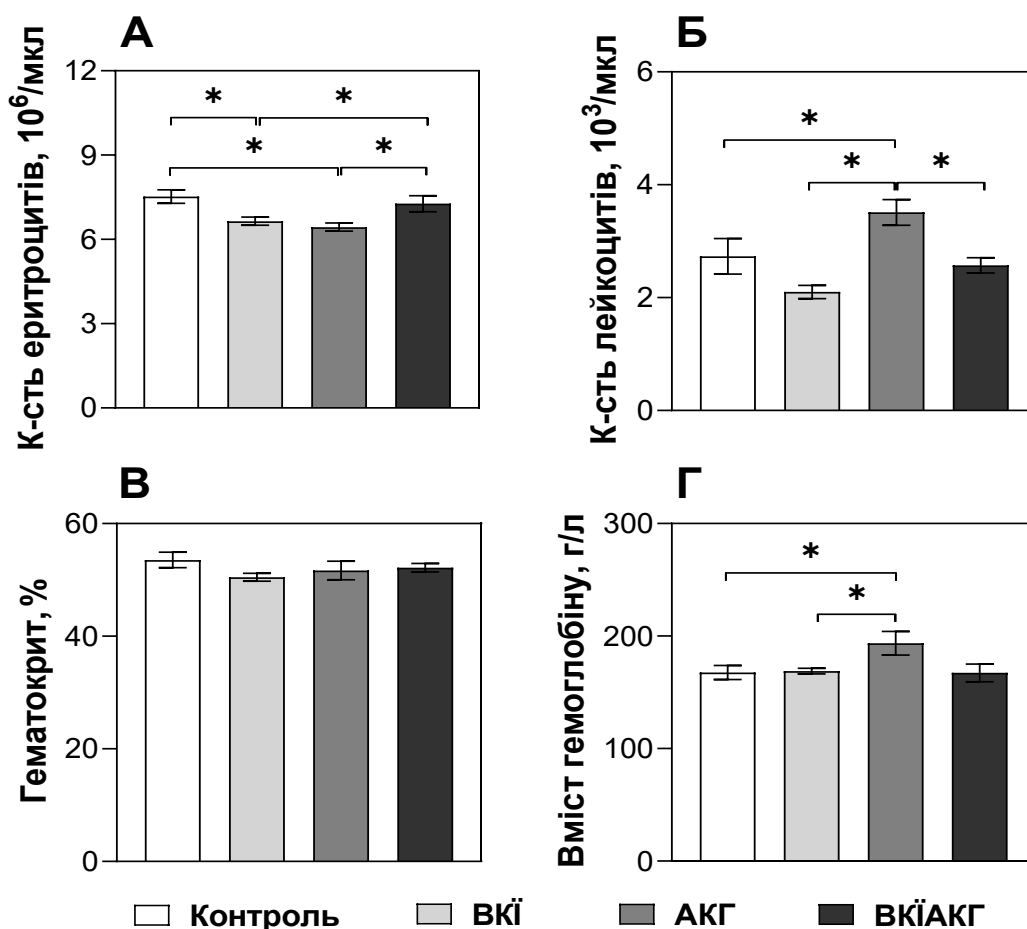


Рис. 3.1.3. Гематологічні показники крові мишей. (А) кількість еритроцитів, (Б) кількість лейкоцитів, (В) гематокрит, (Г) вміст гемоглобіну. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n=7-10$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Відносні рівні моноцитів у мишей, які отримували ВКІ, були приблизно в 1,6 рази вищими, ніж у контрольних аналогів (Табл. 3.1.1). Натомість самці, які отримували АКГ, мали в 1,5 рази вищі рівні паличкоядерних нейтрофілів та на 10% менше лімфоцитів порівняно з контролем. У групі ВКІАКГ відносні рівні паличкоядерних нейтрофілів та лімфоцитів були подібними до значень у контрольних групах, тоді як рівні юних форм були на 40% нижчими, а рівні моноцитів були значно (приблизно в два рази) вищими, ніж у контрольній групі.

Таблиця 3.1.1.

Лейкоцитарна формула крові мишей

Тип клітин, %	Контроль	ВКЇ	АКГ	ВКЇАКГ
Юні форми	2,13±0,13	0,88±0,09*	1,58±0,39	1,27±0,30*
Паличкоядерні нейтрофіли	6,13±1,03	8,60±1,04	9,29±1,31*	4,78±0,61**, #
Сегментоядерні нейтрофіли	3,02±0,85	3,73±0,76	4,40±0,97	3,92±0,55
Еозинофіли	0,53±0,31	1,02±0,14	0,50±0,27	0,36±0,17
Лімфоцити	85,9±1,6	80,3±1,4*	77,8±2,1*	83,6±1,2 [#]
Моноцити	2,92±0,35	4,66±0,30*	4,04±0,18	5,72±0,73*, [#]
Нейтрофіли/лімфоцити, (ІНЛ)	0,12±0,02	0,18±0,02	0,18±0,04	0,10±0,01**, [#]

Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього, n = 5-7 мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) від значень у контрольній групі, **від значень у групі ВКЇ, [#]від значень у групі АКГ, згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів мало тенденцію до підвищення у мишей, які отримували ВКЇ та АКГ, порівняно з контролем, і не відрізнялося від контрольних значень у групі ВКЇАКГ (Табл. 3.1.1).

Споживання окремо ВКЇ і АКГ не впливало на рівень глюкози в крові, тоді як споживання ВКЇАКГ підвищувало рівень глюкози в крові на 38% порівняно з контрольною їжею (Рис. 3.1.4А). Миші, які отримували ВКЇ, мали у два рази вищий рівень ТАГ і спостерігалася тенденція до підвищення загального

холестерину в плазмі крові порівняно з контрольною групою. Миші, які отримували лише АКГ або ВКІАКГ, не відрізнялися за рівнем ТАГ та холестерину в плазмі крові від контрольних аналогів (Рис. 3.1.4Б та В). У плазмі крові мишей ані ВКІ, ані АКГ, ані ВКІАКГ суттєво не вплинули на активність параоксонази (ПОН) та МПО (Рис. 3.1.4Г, Д), а відносні рівні IL-1 β (Рис. 3.1.4Е) також не відрізнялися.

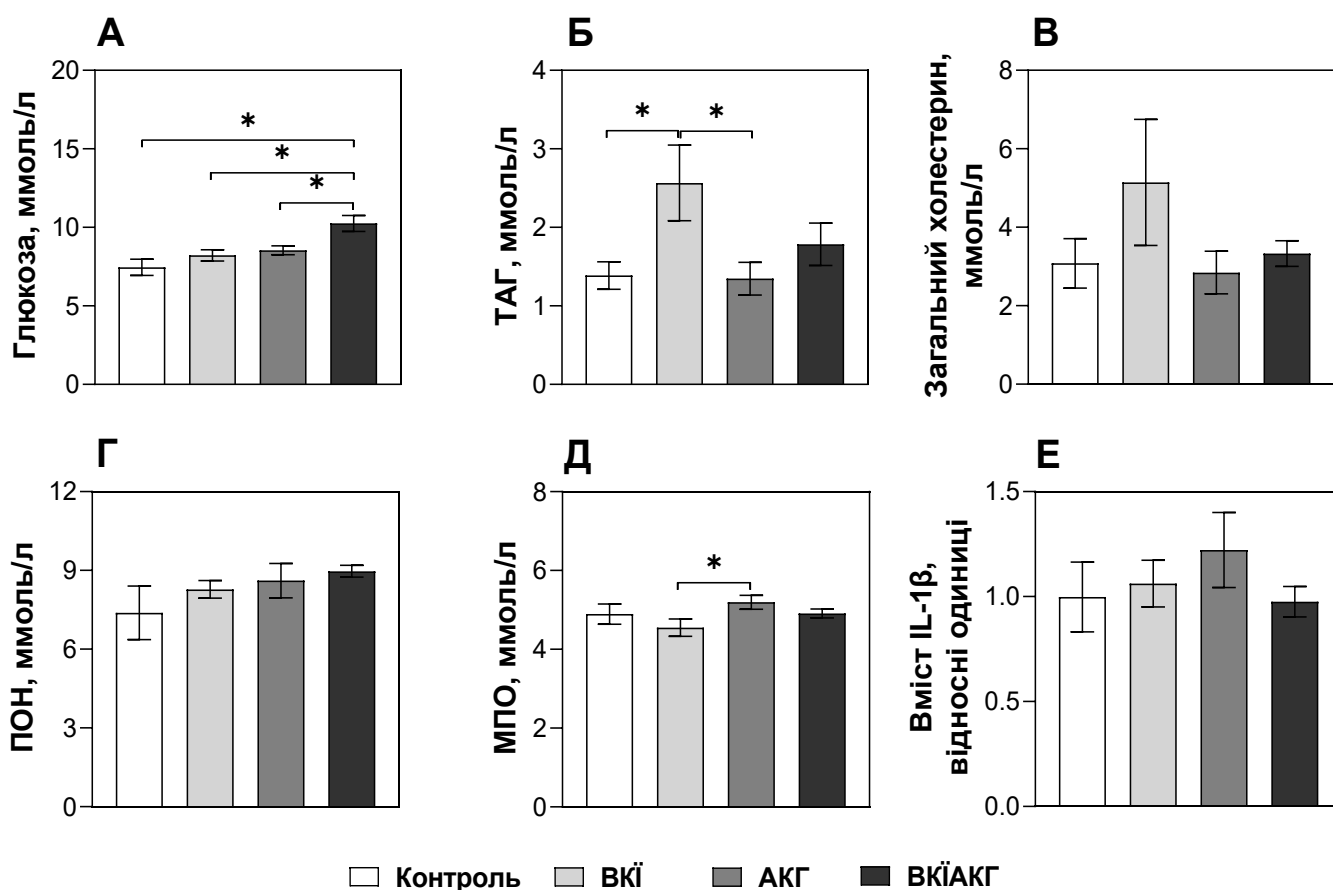


Рис. 3.1.4. Вміст метаболітів та активність маркерів оксидативного стресу у плазмі крові мишей. Вміст: (А) глюкози, (Б) триацилгліцеридів (ТАГ), (В) загального холестерину, (Г) активність параоксонази (ПОН), (Д) мієлопероксидази (МПО) та (Е) відносний вміст IL-1 β . Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Ці результати показують, що ВКІ не спричинила значних змін у окисно-відновних параметрах крові, але модулювала гематологічні параметри у самців мишей *C57BL/6J* (Рис. 3.1.3А, табл. 3.1.1). Незважаючи на те, що загальна кількість білих кров'яних тілець не змінилася (Рис. 3.1.3Б), спостерігався перерозподіл рівнів певних типів лейкоцитів у крові групи ВКІ (Табл. 3.1.1).

Раніше показано, що їжа з високим вмістом жиру та їжа з високим вмістом жиру і фруктози збільшують популяцію запальних моноцитів у крові мишей [201, 202]. Ці типи їжі також збільшували загальну кількість моноцитів у крові [203]. Дослідження на мишах і людях показали, що збільшення кількості нейтрофілів і моноцитів (моноцитоз) може бути індикатором запальних захворювань [204]. Щодо нижчої кількості лімфоцитів при споживанні ВКІ та АКГ окремо, механізми, що обумовлюють ці ефекти, залишаються невизначеними. Можливо, цей показник пов'язаний з міграцією клітин у тканини. Було також показано, що ВКІ зменшували кількість лімфоцитів у крові мишей [205-207]. Ми не спостерігали жодних ознак запалення в жировій тканині мишей (Рис. 3.3.1Г, та Рис. 3.3.2Б), але в нашому попередньому дослідженні ми показали, що ВКІ викликала інфільтрацію імунних клітин у печінці мишей [208].

Отже, ВКІ може сприяти розвитку запальних процесів у певних органах, викликаючи збільшення кількості моноцитів, але зменшення кількості лімфоцитів для боротьби з пошкодженням тканин внаслідок запальних процесів. Не можна виключити, що ВКІ може пригнічувати здатність кісткового мозку виробляти нові лейкоцити (юні форми) та лімфоцити, можливо, через виснаження імунітету або зміну імунної стратегії в боротьбі з загрозами. Зменшення кількості еритроцитів у мишей, які харчувалися ВКІ, також може бути пов'язане з розвитком запалення та оксидативного стресу, які можуть впливати на еритропоез. Рівні гемоглобіну не змінилися, тоді як рівні еритроцитів знизилися у мишей, що харчувалися ВКІ (Рис. 3.1.3), що може свідчити про дисфункцію еритроцитів, спричинену їжею [209].

Миші, які споживали основну їжу з АКГ, мали більше гемоглобіну (Рис. 3.1.3Г), хоча виявлена різниця була в межах фізіологічного діапазону рівнів

гемоглобіну у мишей, про які повідомляється в літературі [210]. Водночас, миші, які отримували АКГ, мали менше еритроцитів порівняно з контрольною групою (Рис. 3.1.3А). Життєздатність і проліферація попередників еритроцитів залежать від ниркового гормону еритропоєтину. Синтез еритропоєтину контролюється факторами транскрипції, індукованими гіпоксією (HIF), зокрема HIF1 і HIF2. Ці фактори є білковими гетеродимерами, і їхні α -субодиниці можуть гідроксильоватися АКГ-залежними пролілгідроксилазами. Гідроксильовання спрямовує HIF до убіквітин-протеасомної системи деградації білків [16, 211]. При цьому ми можемо припустити, що екзогенний АКГ може стимулювати гідроксильовання та деградацію HIF1-2 α , що призводить до зниження синтезу еритропоєтину. Можливо, що АКГ також міг впливати на рівні еритропоєтину через епігенетичні механізми як субстрат ряду ДНК- та РНК-деметиляз [16, 212, 213]. Відповідно, АКГ-залежні деметилази, FTO та ALKBH5, деметилують N6-метиладенозин (m6A) РНК, що є найпоширенішим внутрішнім метилуванням мРНК-транскриптів і необхідне для процесингу, стабілізації мРНК та різних її біологічних функцій [213, 214].

Останні дослідження припускають, що ці РНК-деметилази відіграють певну роль у гемопоезі [213, 215]. Зокрема, активація FTO та ALKBH5 може пригнічувати еритропоез та модулювати диференціацію лейкоцитів, впливаючи на статус m6A-метилування ключових транскриптів, які задіяні в гемопоезі [213, 215, 216]. Таким чином, менша кількість еритроцитів і більша загальних лейкоцитів, а також їх підтипів паличкоядерних нейтрофілів і моноцитів у мишей, які отримували АКГ, можуть бути результатом цих посттранскрипційних змін у лімфоїдній та мієлоїдній лініях. Дещо підвищена активність МПО в крові мишей, які отримували АКГ, може бути пов'язана зі збільшенням кількості нейтрофілів [217]. Нещодавно кілька досліджень повідомили, що АКГ їжі збільшував продукцію протизапального цитокіну IL-10 [129, 218]. Пригнічення фактору транскрипції NF- κ B, який регулює експресію прозапальних цитокінів, може бути ще одним потенційним механізмом

імуномодуючих ефектів АКГ, як це було показано на моделі епітеліальних клітин кишківника свиней [219].

Варто зазначити, що метаболіти, які утворюються з АКГ, а саме сукцинат і глютамат, є сильними стимуляторами імунної відповіді [157, 220]. Загалом, можна припустити, що додавання АКГ може або стимулювати імунну відповідь, або викликати запалення у мишей, або одночасно викликати обидва ці процеси. Проте причина відмінностей може бути у різній динаміці показників, які визначаються як фактори запалення.

Цікаво, що в групі ВКЇАКГ гематологічні параметри були близькі до таких у групі контрольних тварин, але відрізнялися від відповідних значень у мишей, які отримували ВКЇ (Рис. 3.1.3, табл. 3.1.1) та тих, що споживали АКГ (Рис. 3.1.3, табл. 3.1.1). Це може свідчити про те, що ефекти АКГ різняться, коли він використовується в комбінації з основною їжею та в комбінації з висококалорійною їжею. Це припущення підтверджується результатами досліджень жирової тканини, серця та м'язів. У цих органах, коли ВКЇ та АКГ діяли окремо, вони впливали на декілька параметрів оксидативного стресу однаково (див. далі Рис. 3.3.1, Рис. 3.3.3 та Рис. 3.3.5), але коли миші споживали суміш ВКЇ та АКГ, ефекти були значною мірою протилежними до ефектів окремих типів харчування.

3.2. Їжа з високим вмістом жиру та фруктози викликає слабкий оксидативний стрес і впливає на метаболізм у печінці мишей: ефекти альфа-кетоглутарату

Печінка є центральним метаболічним органом ссавців, який відіграє ключову роль у підтримці гомеостазу організму та першим реагує на зовнішні виклики, які спричинені їжею, такою як ВКЇ у нашому випадку. Печінка відіграє важливу роль у катаболізмі фруктози, будучи одним з небагатьох органів, які експресують фруктокіназу, і вважається ліпогенним органом [7, 8]. Фруктокіназа фосфорилує фруктозу до фруктозо-1-фосфату, який далі метаболізується до

тріозофосфатів, що можуть бути використані для синтезу глюкози, глікогену або жирних кислот [221]. Надмірне споживання фруктози може призвести до накопичення ліпідів у печінці, розвитку оксидативного стресу та запалення, що в подальшому може спричинити розвиток неалкогольної жирової хвороби печінки та інших метаболічних порушень.

Наступний етап нашого дослідження був спрямований на вивчення метаболічних реакцій печінки мишей середнього віку, які отримували їжу ВКІ, та оцінити здатність додатку АКГ зменшувати метаболічні порушення, що розвиваються.

У печінці мишей ані ВКІ, ані АКГ окремо, ані їх комбінація не впливали на рівень ТАГ, вільного холестерину і глюкози, за винятком того, що у мишей, які отримували АКГ, рівень холестерину був на 37% нижчим, ніж у контролі (Табл. 3.2.1).

Таблиця 3.2.1.

Вміст метаболітів у печінці мишей

Показник	Контроль	ВКІ	АКГ	ВКІАКГ
ТАГ, мг/г.с.м.	2,48 ± 0,47	2,28 ± 0,41	2,35 ± 0,30	2,76 ± 0,39
Загальний холестерин, нмоль/г.с.м.	2,45 ± 0,44	1,89 ± 0,07	1,54 ± 0,09*	1,98 ± 0,24
Глюкоза, мг/г.с.м.	7,23 ± 0,49	7,52 ± 0,26	6,24 ± 0,60	6,66 ± 0,25
АКГ, нмоль/ г.с.м.	7,46 ± 1,46	4,87 ± 1,48 [#]	11,6 ± 1,6*	10,7 ± 1,5**

Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього, n = 5-7 мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) від значень у контрольній групі, **від значень у групі ВКІ, [#]від значень у групі АКГ, згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Споживання мишами ВКІ дещо знижувало рівень АКГ у печінці, тоді як у печінці тварин, які споживали АКГ та ВКІАКГ, рівень АКГ був вищим порівняно з групою ВКІ і недостовірно вищим від такого у контрольній групі (Табл. 3.2.1). Дивно, але рівень ТАГ у печінці всіх груп був практично однаковим у всіх групах мишей (Табл. 3.2.1), що свідчить про те, що в цьому випадку метаболічна здатність органу не була перевантажена і засвоєні жири та вуглеводи могли ефективно використовуватися. Водночас, значно підвищений рівень ТАГ у плазмі крові мишей (Рис. 3.1.4Б), які споживали ВКІ, можна розглядати як механізм, що захищає печінку від надмірного накопичення ТАГ. Однак нас здивував нижчий рівень вільного холестерину в печінці в усіх експериментальних групах порівняно з контрольною групою. Причин цього може бути декілька: 1 – пригнічення продукції холестерину, 2 – посилення його експорту у кров, або 3 – підвищене перетворення на холестерин, оскільки цей компонент жовчі необхідний для кращого перетравлення їжі. У крові мишей, які отримували ВКІ, рівень холестерину був вищим, ніж у контрольній групі (Рис. 3.1.4В), що може підтверджувати наше припущення про посилене виведення холестерину з печінки в кров.

Ми визначали активність трьох ключових (регуляторних) ферментів гліколізу у печінці: ГК, ФФК і ПК, а також активність ключового ферменту фруктолізу – ФК та Г6ФДГ – ключового ферменту пентозо-фосфатного шляху (ПФШ). На активність ГК не вплинула ВКІ, але ферментативна активність була на 24% і 46% вищою у мишей, які споживали 1% АКГ і на ВКІАКГ, відповідно, порівняно з контрольними мишами (Рис. 3.2.1А).

Активність ФК була на 31% вищою у групи мишей, які споживали ВКІ, порівняно з контролем (Рис. 3.2.1Б), але споживання 1% АКГ та ВКІАКГ не впливали на активність ферменту. У груп мишей, яких годували ВКІ або поїли розчином АКГ, активність ФФК не відрізнялась, але миші, яких годували ВКІАКГ, показали на 15 та 23% вищу активність ФФК ніж відповідні контрольні групи тварин (Рис. 3.2.1В).

Миші, яких годували ВКІ, мали на 77% і на 90% вищі активності ПК і Г6ФДГ відповідно, ніж у контрольній групі (Рис. 3.2.1Г та Рис. 3.2.1Д). Додавання АКГ не змінювало активностей ФК або Г6ФДГ у печінці мишей, а також не корегувало ефект ВКІ на ці ферменти печінки.

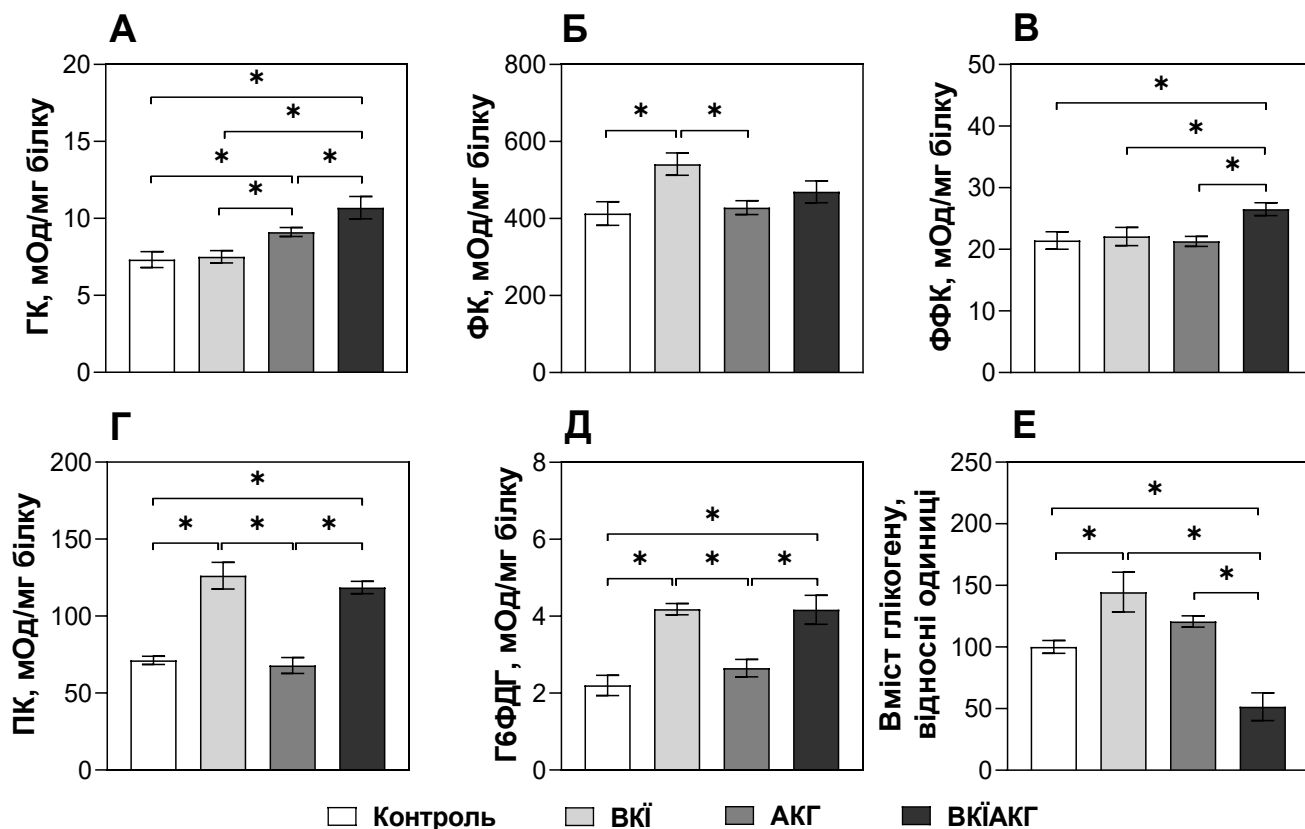


Рис. 3.2.1. Активність ключових ферментів гліколізу, фруктолізу та пентозофосфатного шляху, а також вміст глікогену в печінці мишей. Активності: (А) гексокінази (ГК), (Б) фруктокінази (ФК), (В) фосфогексокінази (ФФК), (Г) піруваткінази (ПК), (Д) глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) та (Е) вміст глікогену. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Вміст глікогену, основного резервного вуглеводу печінки був на 40% вищим у мишей, яких годували ВКІ, але на 50% нижчим у мишей, яких годували ВКІАКГ порівняно з відповідними контрольними значеннями (Рис. 3.2.1Е).

Вміст ПЛ, добре відомого продукту індукованого АФК перекисного окислення ліпідів і найбільш часто досліджуваного маркеру оксидативного стресу, був на 85% вищим у печінці мишей, які споживали ВКІ, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.2.2А).

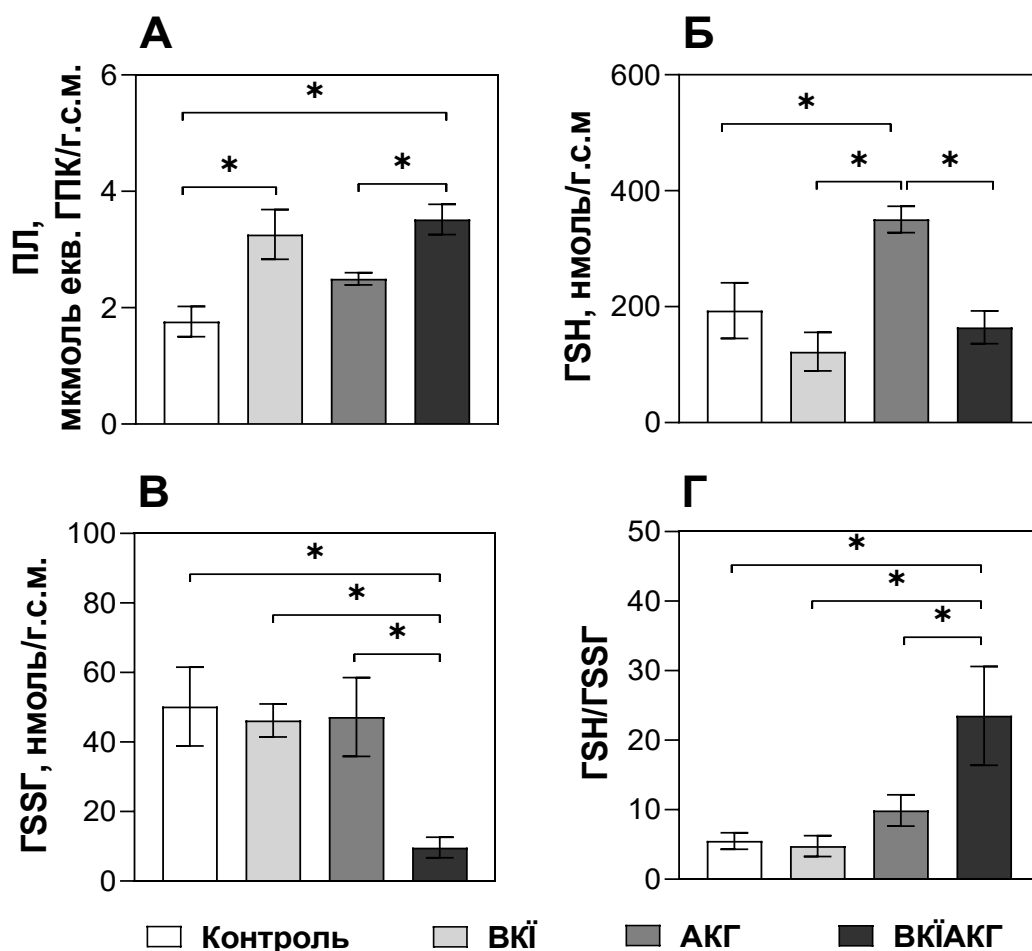


Рис. 3.2.2. Маркери оксидативного стресу в печінці мишей лінії C57BL/6J. Вміст: (А) пероксидів ліпідів (ПЛ), (Б) відновленого глютатіону (GSH), (В) окисленого глютатіону (GSSG), а також (Г) співвідношення GSH/GSSG. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Додавання у раціон АКГ суттєво не впливало на рівень ПЛ порівняно з контрольною групою або з групою мишей, які отримували ВКІ. Споживання ВКІ

не впливало ані на рівень ендogenous антиоксиданту глутатіону, ані його відновленої (GSH), чи окисленої (GSSG) форм, ані на їх співвідношення в печінці мишей (Рис. 3.2.2). Водночас, ВКІАКГ сприяли зниженню рівня GSSG на ~80% порівняно з контрольною групою та групою, що отримувала ВКІ (Рис. 3.2.2В), не впливаючи на рівень GSH (Рис. 3.2.2Б). Це призвело до чотириразового збільшення співвідношення GSH/GSSG у печінці мишей, які отримували комбіноване харчування, порівняно з контрольною групою та групою, яка отримувала ВКІ (Рис. 3.2.2Г). У печінці мишей, які отримували лише АКГ, рівень GSH був у 1,8 раза вищим (Рис. 3.2.2Б), а співвідношення GSH/GSSG мало тенденцію до підвищення (Рис. 3.2.2Г) порівняно з відповідними показниками в контрольній групі.

На рис. 3.2.2А чітко видно, що споживання ВКІ як окремо, так і в комбінації з АКГ, призводило до підвищення рівня ПЛ, продуктів АФК-індукованого окислення поліненасичених жирних кислот. Це свідчить про розвиток оксидативного стресу. Тенденція до зниження рівня GSH в обох групах, що споживали ВКІ (Рис. 3.2.2Б), підтверджує ідею про індукцію оксидативного стресу при споживанні ВКІ. Цікаво, але рівень GSSG був мінімальним у печінці мишей, які отримували ВКІАКГ (Рис. 3.2.2В). Це може бути пов'язане з вищим рівнем GSH, коли мишей годували АКГ, оскільки АКГ може використовуватися для біосинтезу GSH [16] і, що може бути причиною вищого рівня GSH у групі, яка споживала АКГ (Рис. 3.2.2Б). Нижчий рівень GSSG у мишей, які отримували ВКІАКГ, може бути пов'язаний з посиленням регуляції глутатіонредуктази (Рис. 3.2.3В), ферменту, який відновлює окислений GSSG [222]. Відсутність подібного ефекту (низький рівень GSSG) у групі мишей, що споживали ВКІ, яка також мала вищу активність ГР, може бути пов'язана з вищою активністю глутатіонокислювального ферменту, ГП. Також це може вказувати на участь тіолвмісних антиоксидантів у детоксикації АФК при споживанні ВКІАКГ (Рис. 3.2.3Б). Тенденція до зниження рівня GSH в обох групах ВКІ (Рис. 3.2.2Б) може бути пов'язана з кон'югацією GST з GSH, і він поступово виводиться з клітини, або з кон'югацією GSH з продуктами перекисного окислення ліпідів з метою

виведення цих небезпечних сполук з організму. Це може бути результатом як безпосереднього катаболізму вуглеводів чи ліпідів, так і утворенням побічних продуктів під час згаданих процесів. Важливо, що в цьому випадку навіть наявність АКГ не може врівноважити ці процеси.

Згідно з класифікацією оксидативного стресу [223], часова класифікація описує гострий та хронічний стреси, а класифікація за інтенсивністю включає базальний оксидативний стрес, легкий оксидативний стрес, сильний оксидативний стрес, і, нарешті, дуже сильний оксидативний стрес. У зоні базального та переходу до оксидативного стресу низької інтенсивності спостерігається як підвищення індукованих АФК показників, чутливих до АФК, таких як активність антиоксидантних ферментів, так і підвищення рівня речовин, модифікованих АФК, таких як ПЛ [223]. Легкий оксидативний стрес, на відміну від сильного, зазвичай призводить до посилення регуляції антиоксидантних систем для підвищення захисту організмів від шкідливого впливу АФК. Саме це спостерігається в наших результатах, а саме: ВКІ індукує оксидативний стрес низької інтенсивності у печінці мишей. З рис. 3.2.3 чітко видно, що годування мишей ВКІ призводило до підвищення активності первинних антиоксидантних ферментів, а саме каталази, ГП та GST. Однак, обидва останні ферменти використовують GSH для відновлення H_2O_2 або окислених АФК клітинних компонентів. Тому пул глутатіону повинен підтримуватися у відновленому стані [222].

У печінці мишей активність каталази була на 35% та 29% вищою у групах ВКІ та ВКІАКГ відповідно, порівняно з контролем (Рис. 3.2.3А). Однак споживання АКГ само по собі не впливало на активність каталази в печінці (Рис. 3.2.3А). Активність глутатіонзалежних ферментів, ГП та GST, у печінці мишей, які отримували ВКІ, була на 33% та 57% вищою, відповідно, ніж у тварин з контрольної групи (Рис. 3.2.3). Однак у мишей, які отримували ВКІАКГ, активність ГП і GST не відрізнялася від контрольних значень, і годування тільки АКГ не впливало на активність цих двох ферментів (Рис. 3.2.3).

Активність НХО1 була на 79%, 72% і 121% вищою у мишей, які отримували ВКІ, АКГ окремо або в комбінації з ВКІ, відповідно, порівняно з цим показником у печінці контрольної групи мишей (Рис. 3.2.3Д).

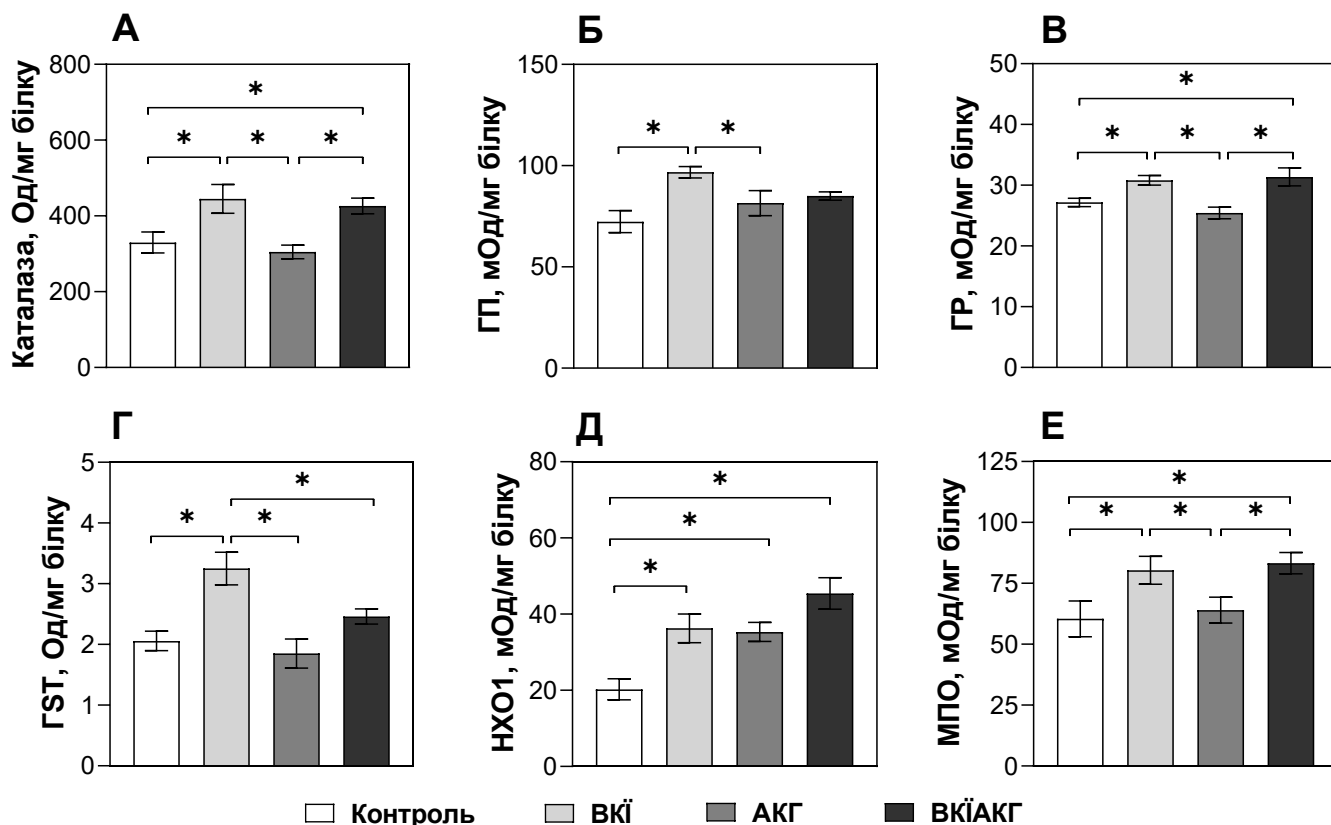


Рис. 3.2.3. Активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів у печінці мишей. Активності: (А) каталази, (Б) глутатіонпероксидази (ГП), (В) глутатіонредуктази (ГР), (Г) глутатіон-S-трансферази (ГСТ), (Д) НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1 (НХО1) та (Е) мієлопероксидази (МПО). Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Детоксикація хінонів, перетворення їх на менш реактивні форми та запобігання оксидативному стресу є головними функціями НХО1. Вища активність НХО1 у всіх досліджуваних групах вказує на посилення регуляції

активності цього ферменту через редокс-чутливі сигнальні шляхи, такі як Nrf2/KEAP1 та FOXO1 [223].

Активність ГР була на 13% та 16% вищою у групі ВКЇ та групі ВКЇАКГ відповідно, порівняно з контролем, тоді як сам по собі АКГ не впливав на активність ГР (Рис. 3.2.3В). Подібна тенденція спостерігалася і для МПО: ВКЇ та ВКЇАКГ призводили до вищої активності МПО на 33% та 37% порівняно з контрольною їжею (Рис. 3.2.3Е). Мієлопероксидаза є гемвмісною пероксидазою, яка в основному експресується в нейтрофілах [224]. У нашому дослідженні не було виявлено жодного впливу АКГ на активність МПО. Проте дослідження Muhling et al. (2010) демонструвало, що нейтрофіли інкубували з різними концентраціями АКГ (0, 5, 10, 20, 50 і 100 мкМ), і спостерігали значно вищу активність МПО в дозозалежний спосіб [225].

Гістологічний аналіз показав ознаки неспецифічного запалення у зразках печінки мишей, які отримували ВКЇ та ВКЇАКГ (Рис. 3.2.4). Споживання АКГ мишами на фоні ВКЇ не запобігало розвитку запального процесу у печінці мишей. Результати гематологічного дослідження свідчать про те, що інфільтрація запальними клітинами відбувалася переважно за рахунок лімфоцитів, оскільки за споживання мишами ВКЇ було виявлено знижений їх вміст у крові (Табл. 3.1.1), що може свідчити про їхню міграцію в тканину печінки.

Відповідно до цього, активність МПО була підвищеною в печінці мишей, які отримували ВКЇ та ВКЇАКГ. Мієлопероксидаза є ферментом, який міститься в нейтрофілах, і попередні дослідження показали корелювання активності МПО з інфільтрацією нейтрофілів у тканини [226]. Отже, можна припустити, що ВКЇ провокує прозапальні процеси в печінці мишей, а АКГ не модулює ці процеси.

Фермент ГР відновлює GSSG до GSH за рахунок НАДФН. У печінці НАДФН виробляється переважно двома ферментами пентозофосфатного шляху (ПФШ) Г6ФДГ і 6-фосфоглюконатдегідрогеназою (6ФГДГ). Ключовим ферментом цього шляху є Г6ФДГ, яка визначає інтенсивність всього ПФШ [223,

227]. Ми виявили, що активність Г6ФДГ була вищою в печінці мишей, які споживали тільки ВКЇ або ВКЇ в комбінації з АКГ (Рис. 3.2.1Д).

Таким чином: споживання ВКЇ індукувало оксидативний стрес, на який організм відповідав підвищенням ефективності антиоксидантної системи, зокрема підвищенням активності антиоксидантних (каталази, ГП та GST) та асоційованих з ними (Г6ФДГ та ГР) ферментів.

Важливо зазначити, що рівні пероксидів ліпідів (Рис. 3.2.2А) та активність Г6ФДГ (Рис. 3.2.1Д) мали однакові тенденції в усіх досліджуваних групах. Це можна пояснити двома шляхами: 1 – ПЛ посилює регуляцію експресії Г6ФДГ або 2 – підвищена активність Г6ФДГ сприяє перекисному окисленню ліпідів.

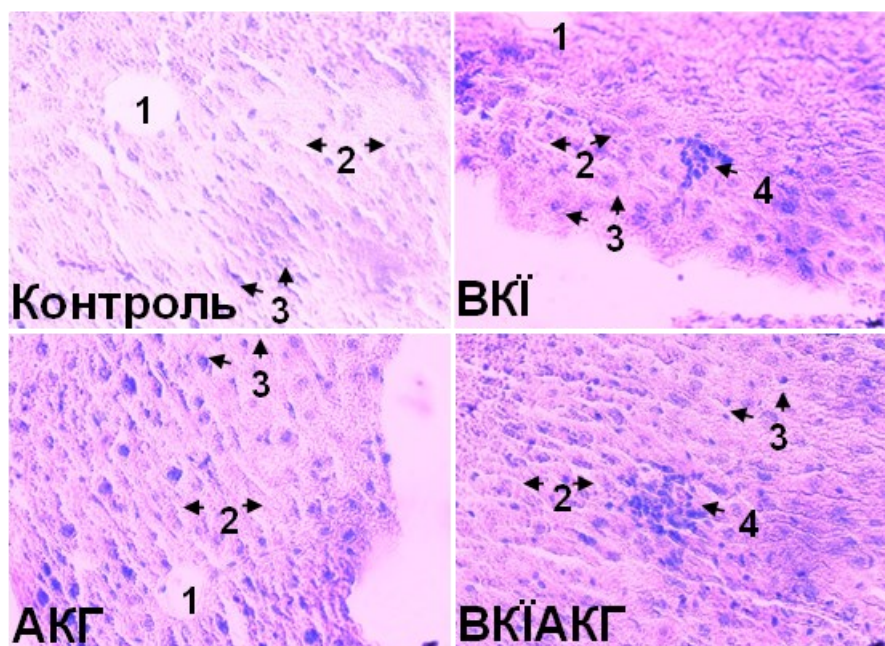


Рис. 3.2.4. Гістологічний аналіз для виявлення пошкоджень у печінці мишей. Фарбування гематоксиліном та еозином (збільшення 640×). Зрізи отримували на мікротомі, товщина зрізу – 5 мкм. 1 – центральна вена; 2 – синусоїди; 3 – гепатоцити, 4 – запальні клітини.

Останнє може бути пов'язане зі збільшенням кількості виробленого НАДФН, який є субстратом для НАДФН-оксидази, що продукує АФК внаслідок чого стимулюється перекисне окислення ліпідів [13]. Дані про вищу активність

каталази, ГП, GST, ГР та HXO1 у групах ВКІ (Рис. 3.2.3) вказують на високу ймовірність посилення регуляції активності цих ферментів через редокс-чутливі сигнальні шляхи, такі як Nrf2/KEAP1 та FOXO1 [13, 223, 228].

Активність Г6ФДГ також може регулюватися HNF4-залежним чином [229] і, як згадувалося вище, експресія мітохондріальних ферментів теж може регулюватися за допомогою HNF4. Це дозволяє припустити про участь печінкового фактору HNF4 у метаболічних ефектах ВКІ. Слід зазначити, що результати вимірювання загальної активності GST (Рис. 3.2.3Г) не відповідали рівням транскрипту GSTM3 [208]. Цю невідповідність можна пояснити наступним чином. У деяких випадках ефективність трансляції мРНК та активність відповідного білку не обов'язково відповідають рівню мРНК. Наприклад, активність білку може залежати від його специфічних посттрансляційних модифікацій. Раніше повідомлялося, що GST може піддаватися S-нітрозилуванню [230]. В іншому дослідженні припускають, що такі посттрансляційні модифікації можуть бути характерними для ізоферменту Gstm3 [231]. Оскільки печінка містить щонайменше чотири ізоферменти GST [232], то загальна активність GST, яку вимірювали в нашому випадку, може належати іншим ізоферментам, окрім Gstm3.

Насамкінець, варто зазначити про вплив АКГ. Як доповнення до базової їжі, але не до ВКІ, АКГ суттєво не впливає на гліколіз, але, подібно, збільшує утворення ацетил-КоА і функціонування електронно-транспортний ланцюг (ЕТЛ) мітохондрій через м'яку стимуляцію антиоксидантного захисту. Ймовірно, частина його потрапляє у ЦТК і таким чином теж може прискорювати його функціонування. Здається, що базова їжа з додаванням АКГ призводить до вищого біосинтезу GSH, можливо, тому, що антиоксидантні властивості АКГ можуть послаблювати регуляцію активності ГП і GST. Нижчий рівень глікогену та вища активність ГК і ФФК у печінці мишей, які споживали ВКІАКГ, а також вища активність мітохондріального комплексу V [208] можуть відображати активацію гліколізу та стимуляцію утворення АТФ. Водночас АКГ знижував активність ФК у мишей, які отримували ВКІ, що потенційно може пригнічувати

фруктоліз. Такі явища можуть вказувати на те, що АКГ частково запобігає негативним ефектам споживання фруктози у великих кількостях.

Добре відомо, що збільшення споживання їжі певною мірою посилює інтенсивність катаболізму [233]. Для того, щоб забезпечити вищу швидкість катаболізму, необхідно підвищити ефективність первинних катаболічних процесів. У випадку катаболізму глюкози – гліколіз та ПФШ – це ті процеси, які можуть бути посилені при споживанні ВКЇ. Фруктоза катаболізується через фруктоліз, що призводить до утворення дигідроксиацетонфосфату (ДГАФ) і гліцеральдегіду, який може перетворюватися на гліцеральдегід-3-фосфат (ГА3Ф). Таким чином, на рівні ДГАФ і ГА3Ф відбувається об'єднання входів від гліколізу, фруктолізу і ПФШ [7]. Іншими словами, вони об'єднуються на рівні гліколітичних інтермедіатів тріозофосфатів. Вища активність ФК у мишей, які споживали ВКЇ (Рис. 3.2.1Б) підтвердила, що цей фермент є індукцибельним і відіграє важливу роль за умов надлишку фруктози [8]. До того ж, активне залучення фруктози в метаболізм печінки через активацію ФК призводило до збільшення вмісту глікогену в печінці мишей при споживанні ВКЇ (Рис. 3.2.1Е) і не впливало на рівень глюкози в крові (Рис. 3.1.4А). Це свідчить про те, що надлишок фруктози переважно використовується для біосинтезу глікогену, а не для надходження глюкози в кров. Водночас, ВКЇ не впливала на активність першого регуляторного гліколітичного ферменту – ГК (Рис. 3.2.1А), що свідчить про те, що його активність є достатньо високою для задоволення потреб мишей.

Активність другого ключового гліколітичного ферменту, ФФК, була подібною до ГК. У поєднанні активності ФК, ГК і ФФК вказують на те, що споживання ВКЇ не впливає на гліколіз, тоді як фруктоліз активується і використовується для катаболізму надлишку фруктози. Вища активність ПК (Рис. 3.2.1Г) може забезпечувати ефективну роботу гліколізу в нижній, тріозофосфатній, частині шляху, яка забезпечується інтермедіатами як з гліколізу, так з фруктолізу, і водночас підтримувати зберігання глікогену (Рис. 3.2.1Е). Наші результати свідчать про те, що додавання лише АКГ суттєво не впливало на активність гліколітичних ферментів та ПФШ порівняно з

контрольною групою. Водночас, АКГ у поєднанні з ВКІ підвищував активність гліколітичних ферментів, ГК і ФФК, але не ферменту фруктолізу (ФК) або ПФШ (Г6ФДГ) (Рис. 3.2.1). Стимуляція утилізації глюкози може бути пов'язана зі зниженням рівня глікогену в печінці мишей, які отримували ВКІАКГ, порівняно з іншими групами. Підвищення рівня глюкози в крові в групі ВКІАКГ також могло бути наслідком інтенсивного розщеплення глікогену в печінці.

3.3. Додавання альфа-кетоглутарату по-різному модифікує оксидативний стрес у тканинах мишей, які споживали стандартну та висококалорійну їжу

Сучасний спосіб життя та харчові звички, що характеризуються надмірним споживанням висококалорійної їжі, збагаченої жирами та вуглеводами, зокрема фруктозою, є одним із ключових факторів розвитку метаболічних порушень [8]. Довготривале споживання їжі з високим вмістом жиру та фруктози може сприяти розвитку серцево-судинних захворювань, діабету 2 типу, стеатозу печінки та м'язової атрофії. Механізми розвитку цих патологій тісно пов'язані з порушенням окисно-відновного балансу та розвитком оксидативного стресу в різних тканинах [80].

На наступному етапі дослідження ми провели комплексну оцінку впливу споживання їжі з високим вмістом жиру та фруктози та 1% АКГ на параметри оксидативного стресу у вісцеральній жировій тканині, серці та скелетних м'язах у самців мишей лінії *C57BL6/J*. Особливу увагу було приділено тканиноспецифічним ефектам АКГ.

Вісцеральний жир є більш метаболічно активний та секретує більше прозапальних адипокінів, ніж підшкірний жир. Саме вісцеральне ожиріння тісно пов'язане з МС. Жирова тканина є основним депо для зберігання енергії у вигляді триацилгліцеридів. При МС надлишкове накопичення жиру перевищує адаптивну здатність жирової тканини, що сприяє порушенню метаболізму [234]. У жировій тканині при МС накопичуються макрофаги, які виробляють

прозапальні цитокіни (TNF- α , IL-6), що призводить до хронічного запалення. У дисфункціональній жировій тканині активується розщеплення жиру, що вивільняє надмірну кількість ВЖК у кров. Накопичення ліпідів у тканинах, які не призначені для їхнього зберігання (печінка, серце, м'язи), викликає порушення їхньої функції [235].

Серце має високі енергетичні потреби та особливо чутливе до метаболічних порушень. При метаболічному синдромі оксидативний стрес у серці відіграє ключову роль у розвитку серцево-судинних порушень, включаючи фіброз, аритмії та серцеву недостатність [236].

Скелетні м'язи є основним споживачем глюкози та важливим регулятором енергетичного обміну. Надлишкові жири, що накопичуються у м'язах сприяють пошкодженню клітинних структур та утворенню АФК. Активні форми кисню змінюють сигнальний шлях інсуліну через активацію прозапальних кіназ (наприклад, JNK), що спричиняє інсулінорезистентність у м'язах. Порушення функції скорочувальних білків (актин, міозин) через окисні модифікації призводить до зниження сили скорочення м'язів [237].

Споживання ВКЇ призвело до значно вищих рівнів ПЛ, маркеру інтенсивності перекисного окислення ліпідів (Рис. 3.3.1А). У мишей, які споживали АКГ або ВКЇАКГ, рівні ПЛ у жировій тканині були подібні до контрольних.

Окремо або в суміші, ВКЇ та АКГ аналогічно впливали на активність антиоксидантних ферментів, таких як ГП та НХО1 (Рис. 3.3.1Б, В). Миші, які отримували ВКЇ або АКГ, мали значно нижчу активність ГП та НХО1 порівняно з контрольними. Зокрема, активність ГП була на 80% та 70% нижчою у мишей, які отримували ВКЇ та АКГ відповідно, порівняно з контрольними мишами (Рис. 3.3.1Б).

Комбінована їжа, ВКЇАКГ, призвела до зниження активності ГП на 40% порівняно з контролем. Таким чином, група, яка споживала ВКЇАКГ, мала вищу активність ГП порівняно з мишами, які отримували ВКЇ або АКГ окремо (Рис. 3.3.1Б). Характер активності НХО1 у досліджуваних мишей був подібним до

того, що спостерігався для активності ГП (Рис. 3.3.1В). Зокрема, споживання ВКЇ або АКГ окремо призвело до дуже сильного зниження активності НХО1, на 67% та 69% відповідно, порівняно з контролем. Активність ферменту була подібною у жировій тканині контрольних мишей та мишей, які отримували ВКЇАКГ (Рис. 3.3.1В).

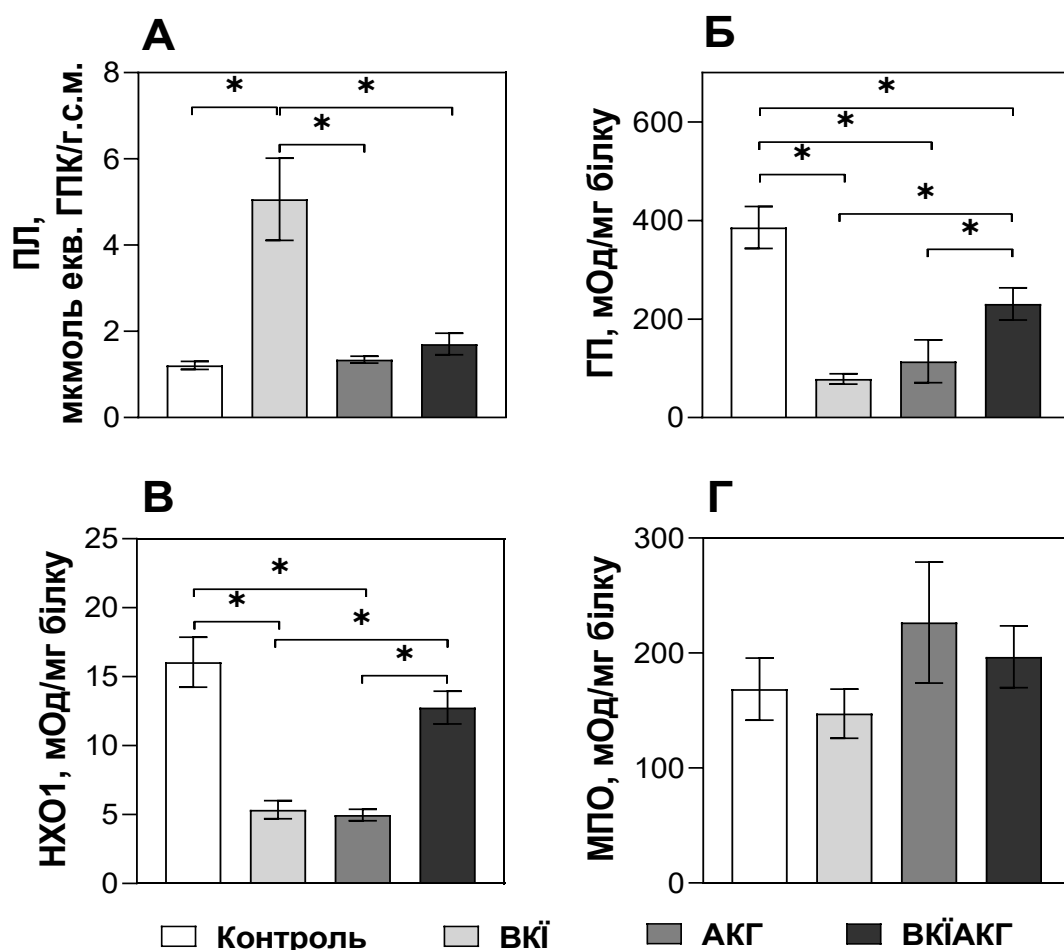


Рис. 3.3.1. Вміст пероксидів ліпідів та активність антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів у жировій тканині мишей. Вміст: (А) пероксидів ліпідів (ПЛ), (Б) активності глутатіонпероксидази (ГП), (В) НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1 (НХО1), а також (Г) мієлопероксидази (МПО). Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Активність МПО не зазнала значного впливу від жодного з досліджуваних харчових режимів (Рис. 3.3.1Г).

Споживання ВКЇ призвело до збільшення загальної маси вісцеральної жирової тканини на 30% у мишей порівняно з контрольною групою (Рис. 3.3.2А). У мишей, які отримували ВКЇАКГ, маса жирової тканини не відрізнялася від контрольних значень (Рис. 3.3.2А).

У мишей, які отримували ВКЇАКГ, маса жирової тканини не відрізнялася від контрольних значень (Рис. 3.3.2А). Мікрофотографії зрізів вісцеральної жирової тканини (епідермальний жир), забарвлених гематоксиліном-еозином, представлені на рис. 3.3.2Б. Як і очікувалося, контрольні миші та миші, які отримували АКГ, показали нормальну гістологічну структуру жирової тканини без змін у зовнішньому вигляді, інфільтрації запальними клітинами та ожиріння. Однак у жировій тканині мишей, які отримували ВКЇ та ВКЇАКГ, спостерігалися збільшені адипоцити, але без видимої присутності запальних клітин.

У нашому експерименті індуковане ВКЇ підвищення вмісту вісцерального жиру супроводжувалося вищими рівнями ПЛ, маркеру перекисного окислення ліпідів, та нижчою активністю антиоксидантних ферментів, ГП та НХО1, у жировій тканині (Рис. 3.3.1). Це узгоджується з попередніми дослідженнями, які демонструють розвиток оксидативного стресу у вісцеральній жировій тканині гризунів (мишей та щурів), які отримували висококалорійну їжу, багаті на жири або фруктозу, або обидва компоненти [238, 239]. Збільшення розмірів адипоцитів на ранніх стадіях патологічних змін супроводжується як підвищеним синтезом ТАГ, так і підвищеним окисленням жирних кислот, які активно надходять в адипоцити.

Оксидативний стрес може виникнути через збільшення утворення АФК під час мітохондріального та пероксисомального окислення вільних жирних кислот [12, 78]. Окрім того, надлишок енергетичних субстратів може призвести до активації НАДФН-оксидаз, з ізоформою NOX4, яка переважно експресується у вісцеральній жировій тканині. Було показано, що ця ізоформа є значним джерелом АФК у жировій тканині [240].

У жировій тканині спостерігається сильний оксидативний стрес зі значним збільшенням окисних пошкоджень. Додавання лише АКГ спричиняло нижчу активність антиоксидантних ферментів без змін у рівнях ПЛ у жировій тканині (Рис. 3.3.1). Коли мишей годували сумішшю ВКІАКГ, у тканинах спостерігали деяке покращення процесів, пов'язаних з АФК, порівняно з групою ВКІ, хоча зміна не досягла контрольних значень.

У серці мишей, які споживали ВКІ, вміст GSH був на 20% та 25% нижчим порівняно з контрольною групою та групою, яка отримувала АКГ, відповідно (Рис. 3.3.3Б). Рівні GSH у групі ВКІАКГ були на 38% вищими, ніж у групі, яка отримувала ВКІ. В результаті, рівні GSH у мишей, які отримували ВКІАКГ, були дуже близькими до контрольних значень. Їжа з додаванням АКГ не вплинула на рівні GSH порівняно з контрольною групою.

На рис. 3.3.3В показано, що миші, які отримували ВКІ, АКГ або їхню суміш, мали нижчі концентрації GSSG в серці. Зокрема, група, яка отримувала АКГ, продемонструвала на 78% нижчі рівні GSSG порівняно з контрольною групою. Споживання ВКІ окремо та в комбінації з АКГ знизило рівні GSSG на 62% та 35% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Співвідношення GSH/GSSG показано на рис. 3.3.3Г.

Додавання АКГ до базової їжі призвело до 5-кратного та 2,4-кратного збільшення співвідношення GSH/GSSG порівняно з контрольною їжею та ВКІ відповідно. Однак споживання ВКІАКГ призвело до 63% нижчого співвідношення GSH/GSSG порівняно з їжею, доповненою АКГ. В результаті, співвідношення GSH/GSSG у групі ВКІАКГ статистично не відрізнялося від значень у контрольній групі.

Далі ми визначили вміст ПЛ. Рис. 3.3.3А показує, що рівні пероксидів ліпідів у серці не відрізнялися між контрольною та ВКІ групами. Однак рівні ПЛ були на 37% нижчими у серці мишей, які отримували ВКІАКГ порівняно з групою мишей, що споживала ВКІ.

Для характеристики процесів, які пов'язані з АФК у серці, ми визначили активність ключових антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів.

Активність ГП не зазнала значного впливу експериментальної їжі у серці мишей середнього віку (Рис. 3.3.4А).

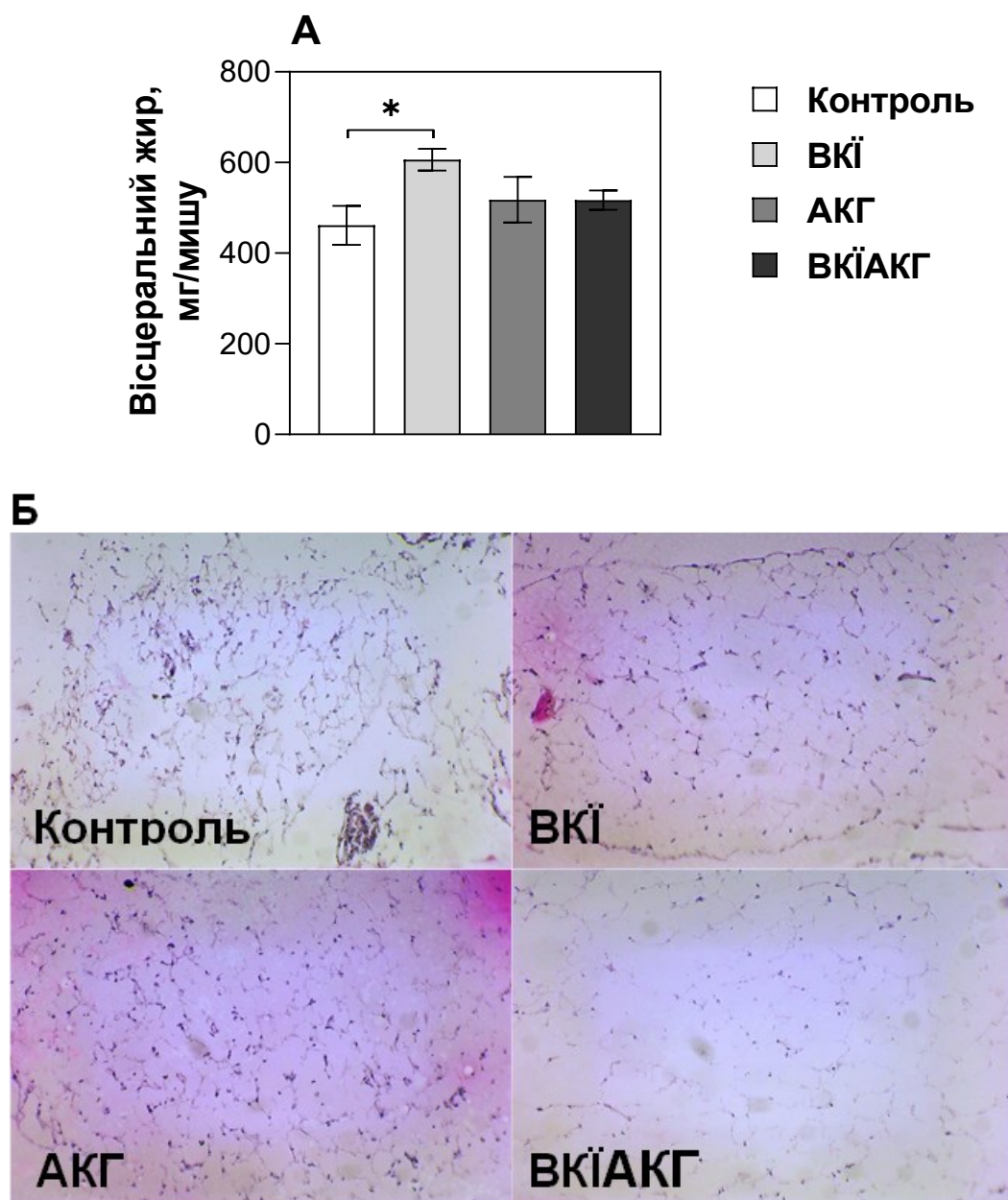


Рис. 3.3.2. Вміст вісцерального жиру та гістологічний аналіз для виявлення пошкоджень у жировій тканині мишей. (А) вміст вісцерального жиру, (Б) фарбування гематоксиліном та еозином (збільшення 160×). Зрізи отримували на мікротомі, товщина зрізу - 5 мкм. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Однак у серці мишей, які отримували ВКїАКГ, активність ГП була на 35% вищою, ніж у серці мишей, які отримували лише ВКї. Окремо ВКї та АКГ забезпечили відповідно у 2,2 та 2,6 рази вищу активність GST порівняно з контролем (Рис. 3.3.4В).

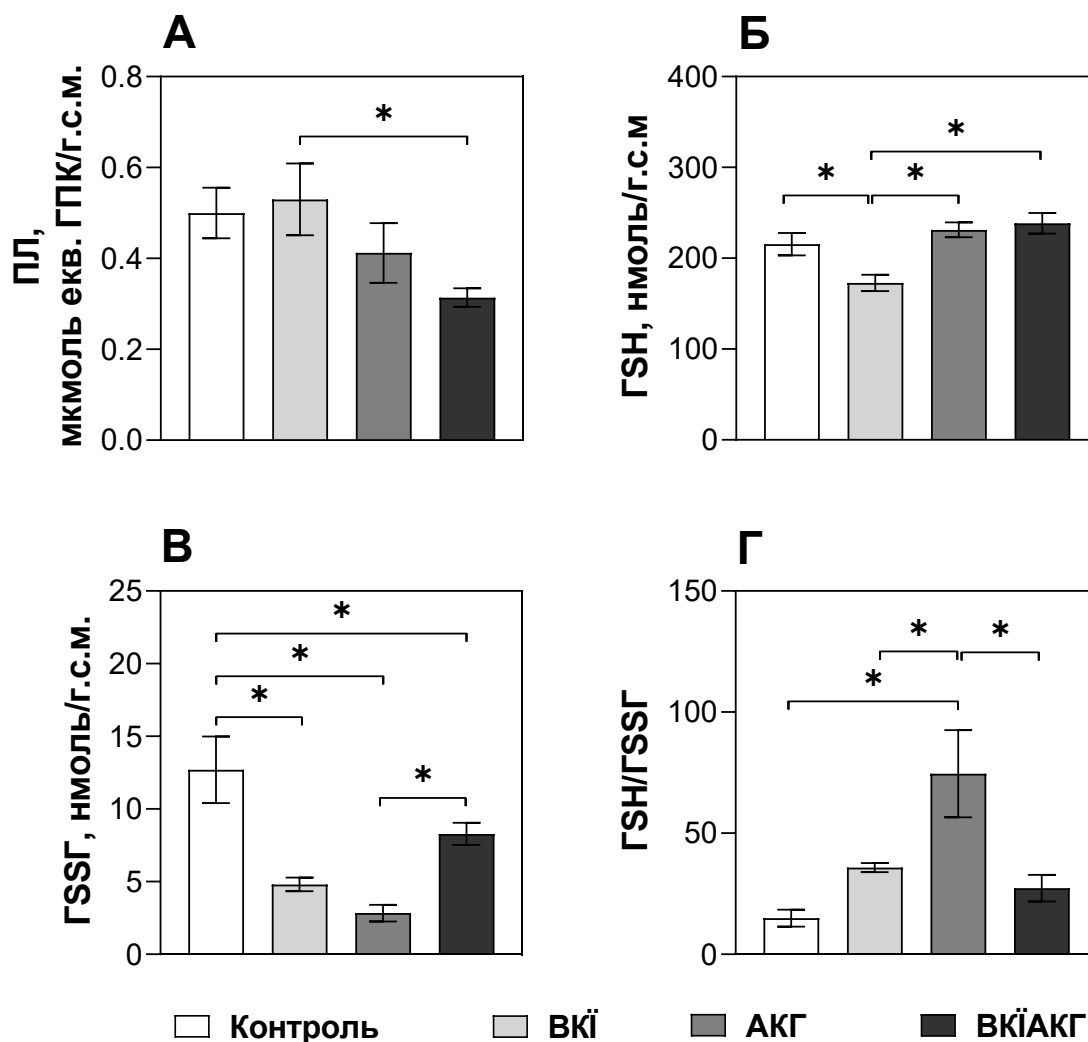


Рис. 3.3.3. Маркери оксидативного стресу в серці мишей. Вміст: (А) пероксидів ліпідів (ПЛ), (Б) відновленого глутатіону (GSH), (В) окисленого глутатіону (GSSG), а також (Г) співвідношення GSH/GSSG. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Споживання АКГ разом з ВКІ запобігало збільшенню активності GST, яке спостерігалось при ВКІ та АКГ окремо. На активність ГР не вплинула ВКІ (Рис. 3.3.4Б). У мишей, які отримували їжу ВКІАКГ, активність ГР була на 17% та 22% нижчою порівняно з контрольною групою та групою, що отримувала ВКІ, відповідно (Рис. 3.3.4Б). На активність Г6ФДГ та НХО1 у серці впливала лише ВКІ, але не АКГ чи суміш ВКІАКГ (Рис. 3.3.4Г, Д).

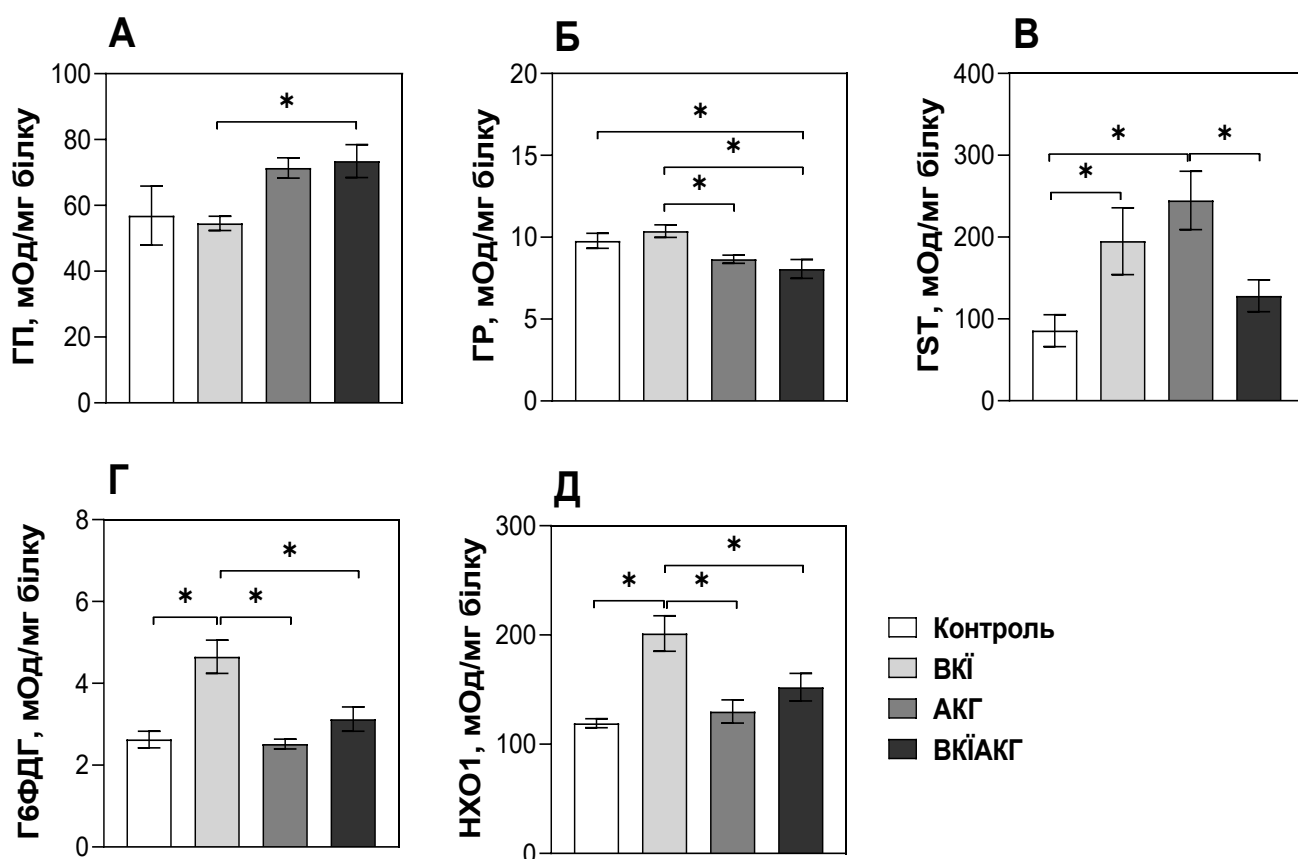


Рис. 3.3.4. Активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів у серці мишей. Активності: (А) глутатіонпероксидази (ГП), (Б) глутатіонредуктази (ГР), (В) глутатіон-S-трансферази (GST), (Г) глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) та (Д) НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1 (НХО1). Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Зокрема, ВКІ демонструвала на 77% та 55% вищу активність Г6ФДГ та НХО1 відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

Загалом, це свідчить про те, що ВКІ викликала помірний оксидативний стрес у серці мишей. Зниження рівнів GSH і GSSG може бути пов'язане з активним використанням GSH GST, активність якої була вищою у мишей, які отримували ВКІ, порівняно з контрольною групою. Таким чином, наше дослідження підтверджує чутливість серця до висококалорійної їжі, що також було показано в кількох інших дослідженнях [241, 242].

Надмірне споживання жирних кислот з їжею може призвести до збільшеного їх використання як паливного субстрату в жировій тканині, серці та скелетних м'язах. Натомість це може збільшити продукцію АФК [236, 243]. Однак, інтенсивність оксидативного стресу різна в серці, м'язах і жировій тканині мишей. Індукція механізмів захисту означає, що серце може витримувати небажані ефекти висококалорійних продуктів протягом певного періоду часу. У серці мишей спостерігалася активація антиоксидантних захистів, що вказує на адаптивну реакцію.

У серці групи мишей, яка отримувала АКГ, не було виявлено змін вмісту ПЛ, але спостерігалася підвищена активність антиоксидантних ферментів, ГП і GST, та вищі співвідношення GSH/GSSG (Рис. 3.3.4 та Рис. 3.3.3). У всіх цих випадках результати можуть вказувати на інтенсифікацію АКГ оксидативного стресу. Варто зазначити, що використання АКГ як додатку до стандартної їжі більшою мірою поліпшувало антиоксидантний захист у серці мишей, ніж у жировій тканині та м'язах, що свідчить про потенційно сприятливі ефекти для серця. Стимуляція антиоксидантного захисту може бути пов'язана зі здатністю АКГ викликати легкий оксидативний стрес, який був виявлений і обговорений у попередніх дослідженнях [19, 208]. Як проміжний продукт циклу Кребса, АКГ може входити в цей цикл і посилювати мітохондріальне дихання з подальшим збільшенням генерації АФК. Окрім того, АКГ може безпосередньо інгибувати АТФ-синтазу в мітохондріях, що також може сприяти його прооксидантним властивостям [118]. У результаті проявлення прооксидантних властивостей АКГ

може відбуватися адаптивна реакція зі стимуляцією антиоксидантного захисту [16, 160]. Однак також можливий епігенетичний ефект АКГ на деметилювання/метилювання ДНК і РНК. Так, раніше було виявлено, що АКГ опосередкував деметилювання ДНК гену *PRDM16*, який бере участь у адипогенезі бурої жирової тканини [244].

Коли мишей годували сумішшю ВКІАКГ, їхні тканини показали покращення процесів, які пов'язані з АФК, порівняно з групою ВКІ, хоча зміна не досягала контрольних значень. Наші результати свідчать про те, що використання АКГ як харчового додатку послаблює індукований ВКІ оксидативний стрес у тканинах мишей. У цьому випадку АКГ, здається, діє більше як антиоксидант, ніж як прооксидант. Взаємозв'язок між цими властивостями АКГ був детально обговорений у огляді [16]. Загалом, АКГ може діяти як антиоксидант, коли клітини зазнають сильного оксидативного стресу, тоді як за фізіологічних або відновних умов АКГ, здається, діє як помірний окислювач, щоб підвищити антиоксидантний захист через певні регуляторні шляхи, такі як Keap1/Nrf2 [208]. Таким чином, у поєднанні ВКІ з АКГ може проявляти антиоксидантні властивості, щоб мінімізувати індукований ВКІ оксидативний стрес. На фоні стандартної їжі АКГ міг би діяти як прооксидант, що призводить до стимуляції антиоксидантного захисту. Найбільш виражені захисні ефекти АКГ спостерігалися в серці мишей (Рис. 3.3.4 та Рис. 3.3.3). Гени, які кодують антиоксидантні ферменти, включаючи GST, ГП, NHO1 та Г6ФДГ, є мішенями транскрипційного фактору Nrf2 [245, 246]. Як ВКІ, так і АКГ можуть активувати сигнальний шлях Nrf2 у серці.

Ні ВКІ, ні АКГ, ні їхні комбінації суттєво не вплинули на рівні пероксидів ліпідів (Рис. 3.3.5А) та активність ГП (Рис. 3.3.6А) і GST (Рис. 3.3.6Б) у скелетних м'язах. Рівні карбонільних груп білків (КБ), маркеру окислення білків, були на 42% вищими в групі ВКІ, ніж у контрольній групі, а миші, які отримували АКГ та ВКІАКГ, мали нижчі рівні КБ, ніж контрольні миші та миші, які отримували ВКІ (Рис. 3.3.5Б). Ані АКГ, ані ВКІ, чи їх комбінація не впливали на рівні відновленого глутатіону (Рис. 3.3.5В) у м'язах мишей.

Водночас рівні окисленого глутатіону були на 37%, 30% та 32% нижчими в групах ВКІ, АКГ та ВКІАКГ, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.3.5Г). Це зниження призвело до значних змін співвідношення окисленого до відновленого глутатіону лише в групі АКГ (Рис. 3.3.5Д).

Активність НХО1 була на 39% та 37% нижчою в групі ВКІ та групі АКГ, відповідно, порівняно з контролем. У групі ВКІАКГ активність НХО1 не відрізнялася від контрольних значень (Рис. 3.3.6В).

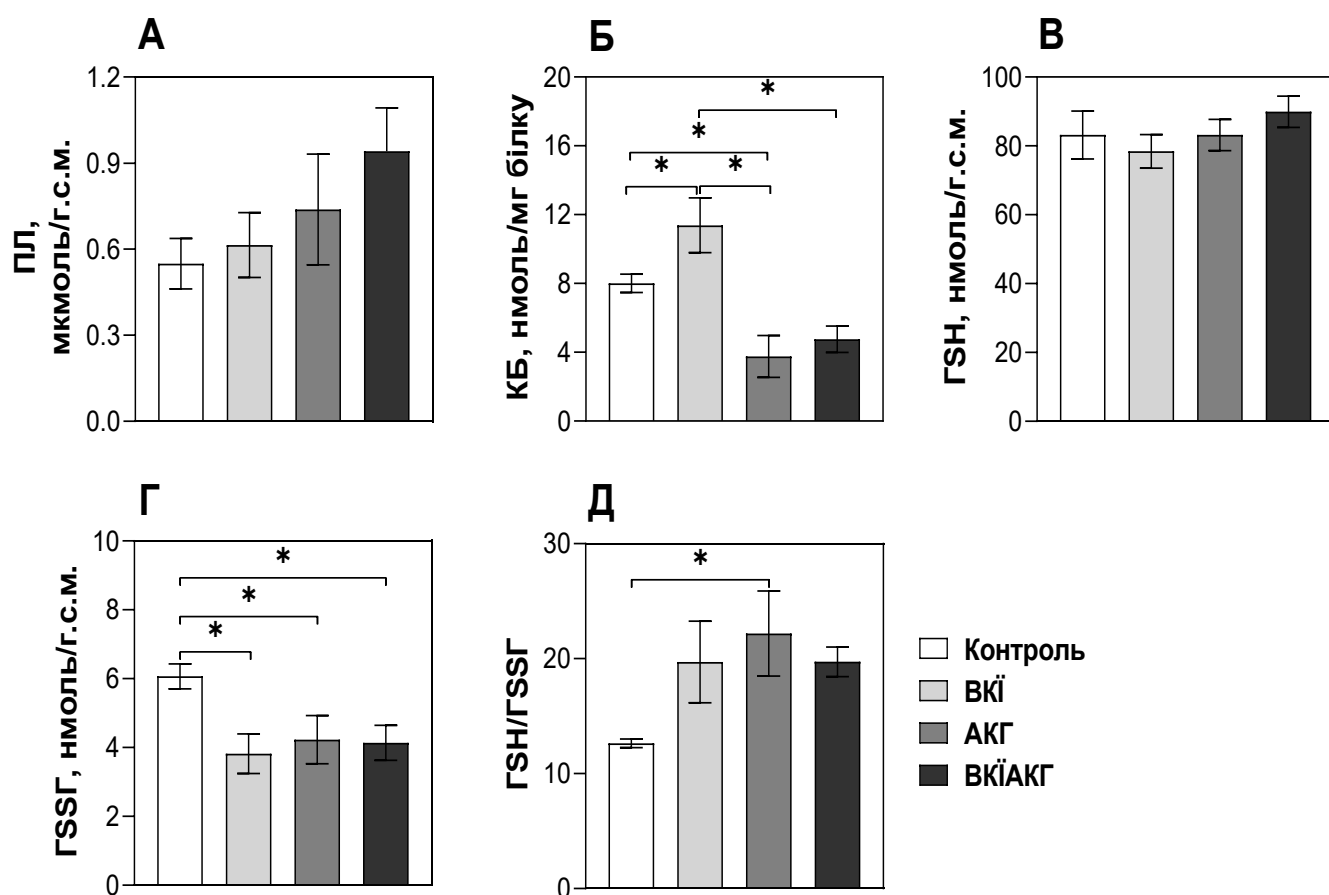


Рис. 3.3.5 Маркери окислативного стресу у м'язах мишей. Вміст: (А) пероксидів ліпідів (ЛП), (Б) карбонільних груп білків, (В) відновленого глутатіону (ГШ), (Г) окисленого глутатіону (ГССГ), а також (Д) співвідношення ГШ/ГССГ. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Таким чином, у м'язах додавання АКГ сприяло підвищенню співвідношення ГSH/ГSSG, зниженню рівня карбонільних груп білків та активності НХО1 (Рис. 3.3.5 та Рис. 3.3.6). Тобто, АКГ реально знижував інтенсивність оксидативного стресу.

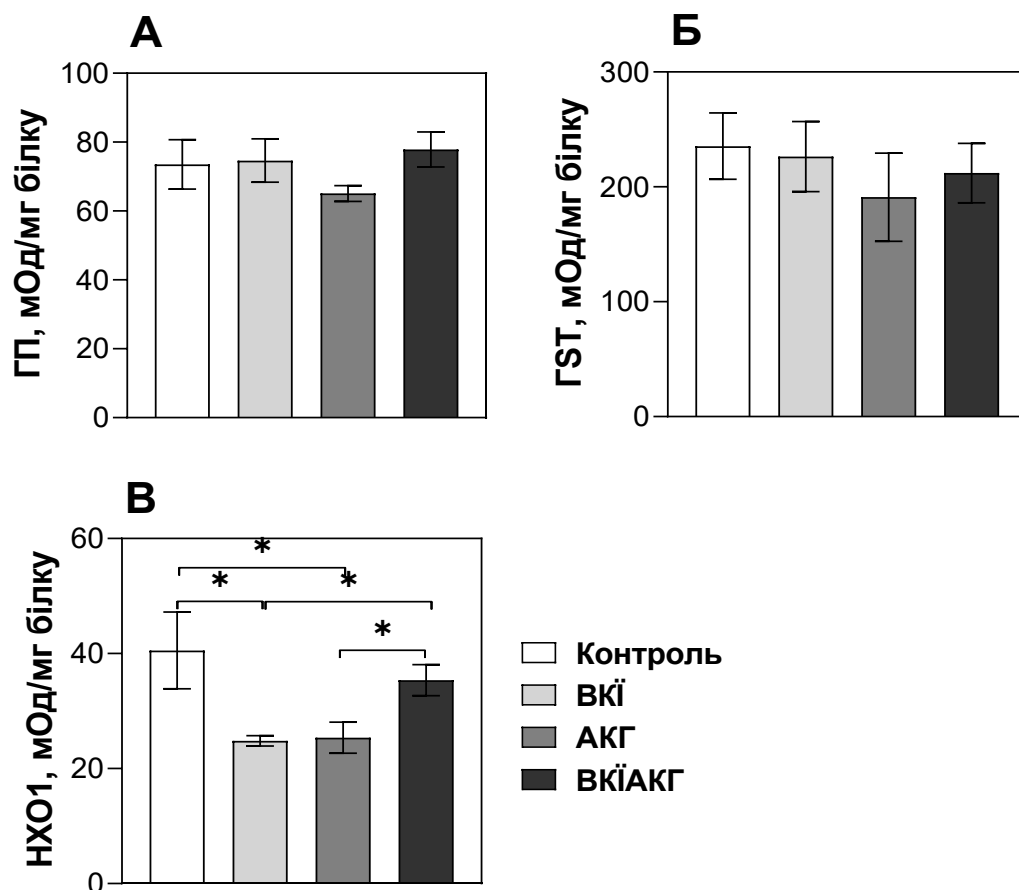


Рис. 3.3.6. Активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів у м'язах мишей. Активності: (А) глутатіонпероксидази (ГП), (Б) глутатіон-S-трансферази (GST), (В) НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1 (НХО1). Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

У скелетних м'язах мишей, які отримували ВКІ, також спостерігались окисно-відновні зміни, які виражались у зниженні рівнів окисленого глутатіону і активності НХО1 та підвищенні рівнів карбонільних груп білків. Надалі м'язи

мишей, які отримували ВКІ, демонстрували ознаки інсулінорезистентності, наприклад, вищі рівні ТАГ, нижчі рівні глікогену та загального білку (Рис. 3.4.2), а також активацію гліколізу (Рис. 3.4.1).

Тому, загалом результати свідчать про більшу залежність м'язів від окислення жирних кислот для отримання енергії може пояснювати значні окисно-відновні порушення, які викликані ВКІ [247].

3.4. У м'язах мишей альфа-кетоглутарат частково послаблює негативний вплив їжі з високим вмістом жиру та фруктози

Враховуючи те, що скелетні м'язи мають нижчу здатність метаболізувати фруктозу, ніж печінка, ми очікували, що м'язи мишей на ВКІ будуть покладатися переважно на ТАГ як джерело енергії. Тому метаболічна реакція скелетних м'язів може суттєво відрізнятися від метаболічної відповіді печінки внаслідок відмінностей в енергетичному обміні та функціональних особливостях тканин.

Отже, наступний етап роботи мав на меті дослідити вплив ВКІ та АКГ окремо та в комбінації на деякі параметри енергетичного метаболізму, такі як накопичення запасних ліпідів і глікогену, а також активність ключових гліколітичних ферментів у скелетних м'язах мишей.

Рівень глюкози у м'язах мишей був дуже близьким у всіх чотирьох групах мишей (Рис. 3.4.1А). Дослідження Sorochynska et al. (2021) вказує на подібний рівень глюкози (0,3 мг/г.с.м.) у скелетних м'язах двомісячних контрольних самців мишей лінії *C57BL/6 × sv129* [248]. За даними Hagopian et al. (2015) скелетні м'язи тримісячних мишей дикого типу мали однаковий вміст глюкози, порівняно з попереднім дослідженням (0,3 мг/г.с.м.) [249]. Вміст глікогену у м'язах мишей, які отримували ВКІ, був на 52% нижчим, ніж у контрольній групі та групі АКГ (Рис. 3.4.1Б).

Лише у м'язах мишей, які отримували ВКІ, рівень ТАГ був приблизно на 36% вищим, ніж в інших групах, тоді як рівень ТАГ в інших експериментальних групах практично відповідав рівню в м'язах контрольної групи (Рис. 3.4.1В). На

загальний рівень білку також впливав лише ВКІ. Зокрема, рівень білку був на 38% нижчим у м'язах мишей, які отримували ВКІ, ніж у контрольній групі (Рис. 3.4.1В).

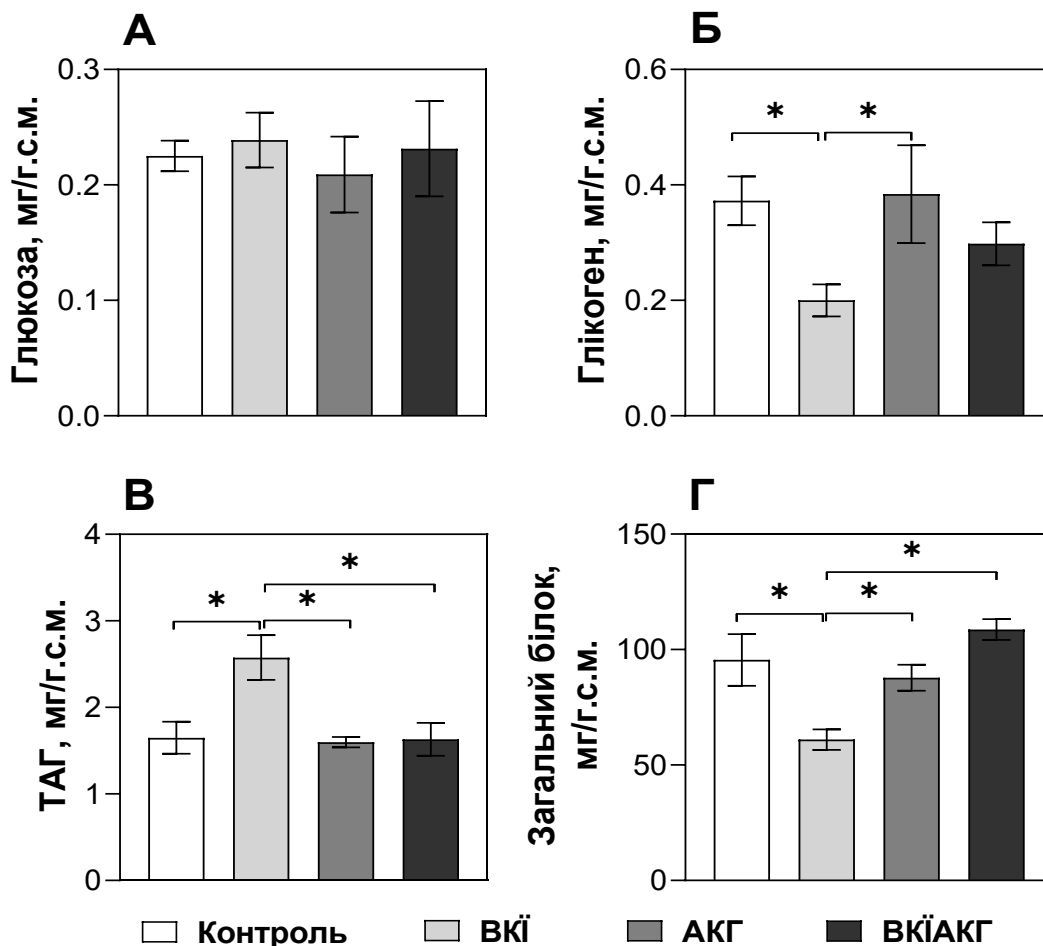


Рис. 3.4.1. Вміст метаболітів у м'язах мишей. Вміст: (А) глюкози, (Б) глікогену, (В) триацилгліцеридів (ТАГ), (Г) загального білку. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Наші результати свідчать про жирову інфільтрацію (відкладення/накопичення жиру), що часто зустрічається в скелетних м'язах, кістках та печінці [250]. Старіння, ожиріння, діабет та пошкодження м'язів, можуть сприяти інфільтрації жиру в скелетних м'язах [251, 252]. Інсулін є анаболічним фактором для скелетних м'язів, а накопичення адипоцитів і ліпідів

у м'язах знижує чутливість до інсуліну, порушуючи тут здатність до нормального синтезу білку [253].

Таким чином, зниження чутливості до інсуліну з жировою інфільтрацією в скелетних м'язах є одним зі шляхів, за допомогою якого жирова інфільтрація може безпосередньо впливати на м'язову масу [254].

Активності трьох ключових гліколітичних ферментів, а саме ГК, ФФК і ПК, демонстрували подібні тенденції в м'язах мишей за різних режимів харчування (Рис. 3.4.2). У мишей, які отримували ВКЇ, активність ГК, ФФК і ПК була на 20%, 22% і 47% вищою, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.4.2). У групі АКГ активність ГК і ФФК не відрізнялася від контрольних значень (Рис. 3.4.2А, Б), тоді як активність ПК була на 30% вищою, ніж у контрольній групі (Рис. 3.4.2В). У м'язах мишей, які отримували ВКЇАКГ, активність ГК була нижчою на 35% і 48%, ніж у контролі та мишей, які отримували ВКЇ, відповідно (Рис. 3.4.2А). Активності ФФК і ПК були подібними у контрольній групі та групі ВКЇАКГ. Однак активності ФФК і ПК були нижчими у мишей, які споживали ВКЇАКГ, порівняно з групою АКГ і групою ВКЇ. Зокрема, активність ГК, ФФК і ПК були на 47%, 38% і 47% нижчими, відповідно, у групі ВКЇАКГ, ніж у мишей, які отримували лише ВКЇ.

Скелетні м'язи – це тканина, яка використовує більшу частину енергії організму під час фізичних навантажень. Енергія, яка необхідна для м'язового скорочення, синтезу білку та інших клітинних процесів, забезпечується різними джерелами енергії. Вибір джерела енергії залежить від типу м'язів, інтенсивності та тривалості фізичного навантаження.

Короткочасні та інтенсивні навантаження забезпечуються АТФ і креатинфосфатом, тоді як при триваліших, менш інтенсивних навантаженнях використовуються глікоген і жирні кислоти, що надходять як з внутрішньом'язових запасів ТАГ, так і з запасів ТАГ у жировій тканині [255, 256].

Глікоген, який є формою зберігання глюкози у ссавців, може підтримувати як анаеробну, так і аеробну фізичну активність, тоді як жири можуть

метаболізуватися лише аеробно [257, 258]. До того ж, скелетні м'язи є однією з тканин, де інсулін стимулює поглинання глюкози для видалення глюкози з крові, а засвоєна глюкоза може запасатися у вигляді глікогену [257].

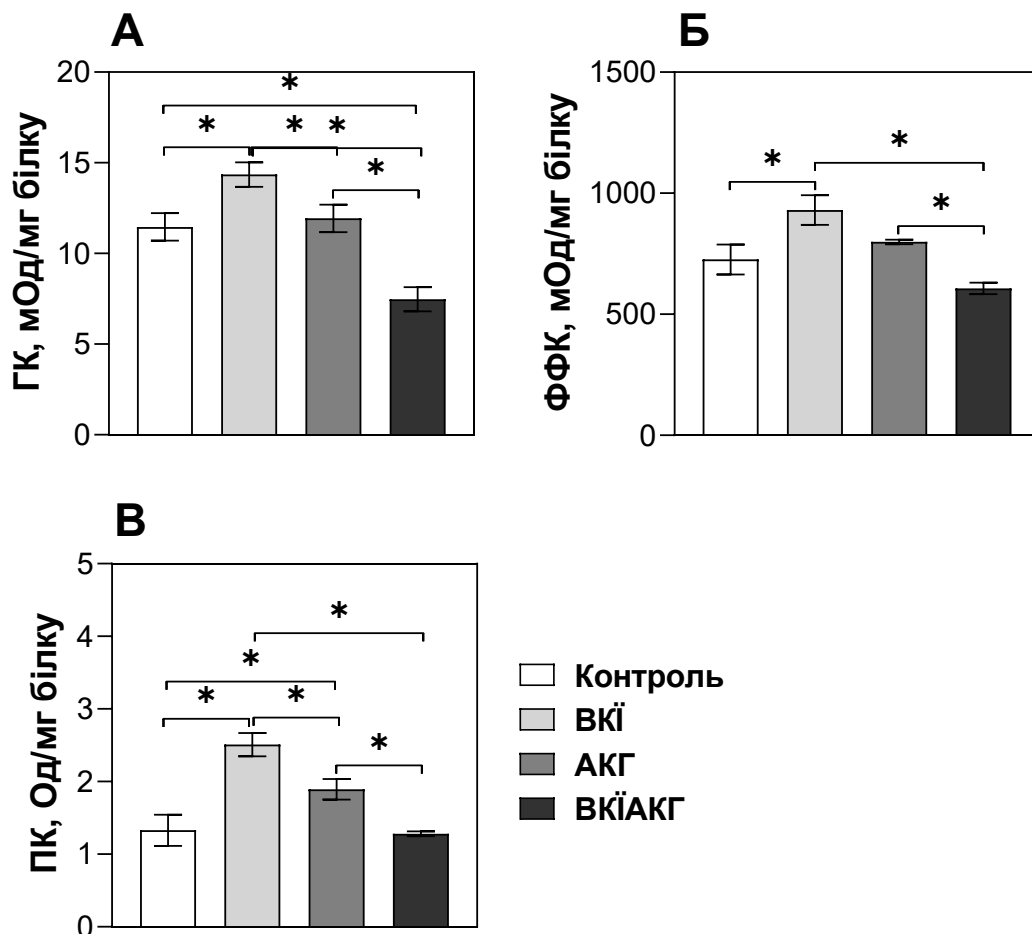


Рис. 3.4.2. Активність ключових ферментів гліколізу у м'язах мишей. Активності: (А) гексокінази (ГК), (Б) фосфофруктокінази (ФФК), (В) піруваткінази (ПК). Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього, $n = 5-7$ мишей у кожній групі. *Значимо відрізняється ($p < 0,05$) між групами згідно з одностороннім тестом ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Наше дослідження показало, що ВКІ не впливає на рівень вільної глюкози, але знижує рівень глікогену в скелетних м'язах мишей. Окрім того, у м'язах мишей, які отримували ВКІ, було виявлено вищу активність гліколітичних ферментів, вищий рівень ТАГ і нижчий рівень загального білку.

Раніше вищий вміст ТАГ у м'язах спостерігали у мишей, яких годували їжею з високим вмістом жирів [259, 260]. Передбачається, що накопичення ліпідів у м'язах та/або зміни в ліпідному обміні беруть участь у розвитку непереносимості глюкози у тварин, яких годували ВКІ [261]. Показано, що розвиток інсулінорезистентності в м'язах супроводжується виснаженням запасів глікогену, накопиченням ліпідів і порушенням нормальної функції тканин [259, 262].

Наші результати вказують на те, що їжа, яка багата як на жири, так і на фруктозу, призводить до результатів, подібних до тих, що спостерігаються у мишей з ВКІ, а саме: знижується рівень глікогену та збільшується накопичення ТАГ. Надходження ліпідів до скелетних м'язів може стимулювати ВКІ, що призводить до зниження окислення жирних кислот і посиленого накопичення ліпідів у скелетних м'язах, що може сприяти інсулінорезистентності. На підтвердження цього, дослідження на щурах показало, що годування щурів ВКІ призводило до підвищення рівня ТАГ і церамідів [263]. Дослідження Crescenzo et al. (2015) також показало, що ВКІ призводить до зниження енергетичної ефективності мітохондрій у скелетних м'язах щурів.

Знижена ефективність функціонування мітохондрій може пояснювати підвищену активність гліколітичних ферментів у скелетних м'язах мишей, які отримували ВКІ. А саме, для компенсації мітохондріальної дисфункції, тобто нездатності ефективно виробляти достатньо енергії у вигляді АТФ аеробним шляхом, для отримання енергії м'язові клітини активують гліколітичний анаеробний шлях.

Оскільки жирні кислоти з ТАГ можуть утилізуватися тільки аеробним шляхом, використання ліпідів як джерела енергії може зменшитися, і м'язові клітини активно розщеплюють глікоген, щоб забезпечити глюкозу як енергетичний субстрат (Рис. 3.4.1). Як наслідок, це може призвести до виснаження запасів глікогену у м'язах мишей, яких годували ВКІ (Рис. 3.4.1Б). Нижчий рівень глікогену у м'язах мишей, які отримували ВКІ, також свідчить про нездатність ефективно метаболізувати фруктозу через нестачу активності

ФК, яка найбільше експресується в печінці [10]. У м'язах фруктоза може метаболізуватися ГК, але глюкоза може перешкоджати фосфорилуванню фруктози ГК [264].

Піруват, який утворюється в процесі гліколізу, може далі піддаватися окислювальному декарбоксилюванню до ацетил-КоА за допомогою піруватдегідрогеназного комплексу або перетворюватися на лактат під дією лактатдегідрогенази. Піруватдегідрогеназа (ПДГ), основний фермент піруватдегідрогеназного комплексу, може інгибуватися ПДГ-кіназою (PDK), тим самим зменшуючи надходження ацетил-КоА в ЦТК або для біосинтезу жирних кислот [208, 265, 266]. До того ж, ізоформа PDK4, яка найбільше експресується в скелетних м'язах, посилено регулюється при ВКІ і часто демонструє підвищений рівень у людей з діабетом [265, 266].

З огляду на це, можна припустити, що активація гліколітичних ферментів у м'язах мишей, які отримували ВКІ, також може бути пов'язана з PDK-опосередкованим інгибуванням оксидативного метаболізму глюкози. Вищий вміст ТАГ у м'язах мишей, які отримували ВКІ, може бути пов'язаний з підвищеними рівнями ТАГ у плазмі крові цих мишей (Рис. 3.1.4А). Для компенсації дефіциту глюкози м'язові клітини активно поглинають ліпіди з крові, але через порушення мітохондріального дихання, схоже, ТАГ не використовуються активно як джерело енергії, а накопичуються у вигляді жирових депо.

Інсулінорезистентність, зазвичай, супроводжується гіперглікемією [267], але в попередньому дослідженні ми не виявили відмінностей у рівнях глюкози в крові натще між мишами, які отримували стандартний раціон та ВКІ [208]. Було показано, що в деяких випадках рівень глюкози натще у гризунів, які отримували ВКІ, може не бути підвищеним [268], коли можуть бути індуковані певні компенсаторні механізми. Зокрема, підшлункова залоза виробляє більше інсуліну, щоб компенсувати нечутливість до нього [269].

У мишей, яких годували ВКІ, також розвивалися типові ознаки виснаження м'язів, такі як слабкість, втрата м'язової маси та зменшення діаметру

волокон [270]. У цьому дослідженні ми виявили, що ВКІ призводить до зниження рівня загального білку в скелетних м'язах мишей, що може відображати втрату м'язової маси. Було висловлено припущення, що втрата м'язової маси може бути пов'язана з розвитком інсулінорезистентності [271]. Натомість інсулінорезистентність може призвести до виснаження м'язів через ослаблення сигналізації PI3K/Akt, що призводить до активації каспази-3 та убіквітин-протеасомного протеолітичного шляху і запускає деградацію м'язових білків [271]. Збільшення частки скелетних м'язових волокон з гліколітичним фенотипом [270, 272] також може сприяти атрофії різних м'язів ніг у мишей, які тривалий час перебували на їжі з високим вмістом жиру.

Загалом, зниження рівня білку, накопичення ТАГ, виснаження запасів глікогену та активація гліколізу у м'язах мишей, які отримували ВКІ, можна розглядати як ознаки розвитку інсулінорезистентності. У цьому дослідженні ми встановили причинно-наслідковий зв'язок між режимом харчування та досліджуваними метаболічними параметрами. Ми виявили, що годування ВКІ з АКГ запобігає підвищенню активності гліколітичних ферментів, накопиченню ТАГ, виснаженню пулу глікогену та зниженню рівня білку у м'язах мишей. Такі ефекти АКГ можна пояснити його безпосередньою участю у генерації АТФ та його сигнальною або регуляторною функцією у різних процесах. Як клітинний проміжний продукт, АКГ є субстратом глютаматдегідрогенази та амінотрансфераз і може безпосередню включатися у біосинтез амінокислот [126, 273, 274]. Окрім того, було показано, що додавання АКГ в їжу стимулювало поглинання амінокислот у модельних тварин [275]. Підвищуючи рівень амінокислот, АКГ може активувати кіназу – мішень рапаміцину (mTOR), яка є одним з основних регуляторів анаболічних процесів, зокрема біосинтезу білку [16, 276].

Деякі дослідження свідчать про потенційну участь АКГ у захисті від атрофії м'язів в результаті фізичних навантажень. Зокрема, встановлено, що АКГ може запобігати деградації білку через різні сигнальні шляхи, такі як пригнічення експресії ферментів, які пов'язані з протеолізмом [277], та стимуляція

секреції адреналіну через 2-оксоглутаратний рецептор 1 (OXGR1), що експресується в надниркових залозах [164]. Ці механізми опосередковують вплив АКГ на підтримку рівня загального білку в м'язах мишей групи ВКІАКГ.

Не можна виключити, що запобігання внутрішньом'язовому накопиченню ліпідів та виснаженню глікогену в групі ВКІАКГ, порівняно з групою ВКІ, також може бути пов'язане з виробленням адреналіну, яке опосередковане АКГ. Відомо, що адреналін зв'язується як з ліполітичними β -адренорецепторами, так і з $\alpha 2$ -адренорецепторами, які мають антиліполітичний ефект. Баланс між активацією $\alpha 2$ - та β -рецепторів визначає загальний рівень ліполізу в жировій тканині [278]. У клітинах скелетних м'язів адренергічна стимуляція через β -адренорецептори може збільшувати синтез глікогену [279]. Таким чином, накопичення ліпідів і виснаження запасів глікогену, яке спостерігається у мишей групи ВКІАКГ, може бути пов'язане з активацією β -адренорецепторних сигнальних шляхів. Однак механізм виснаження запасів глікогену потребує додаткового дослідження.

Окрім того, раніше було показано, що АКГ індукує проліферацію бурої жирової тканини у мишей при споживанні ВКІ, запобігаючи таким чином розвитку ожиріння [3]. Цей механізм може також сприяти захисним ефектам АКГ у скелетних м'язах мишей, які споживали ВКІ в нашому експерименті. Зокрема, АКГ може запобігати внутрішньом'язовому накопиченню ліпідів шляхом стимуляції проліферації бурої жирової тканини [3].

Метаболічні зміни у м'язах, які спричинені споживанням ВКІ, самі по собі свідчать про зниження толерантності до інсуліну. Водночас, м'язи мишей з групи ВКІАКГ не демонструють подібних ознак нечутливості до інсуліну. Попередні дослідження показали, що АКГ та його аналоги можуть стимулювати секрецію інсуліну [280, 281]. До того ж, інсулін пригнічує експресію транскрипційного фактору через сигнальний шлях mTOR [282], водночас, індукуючи цей сигнальний шлях [283, 284], що вказує на складну взаємодію між інсуліном та mTOR. Білок Nrf2 є одним з регуляторів експресії гліколітичних ферментів, і

було виявлено, що інгибування Nrf2 призводить до зниження активності гліколітичних ферментів у модельних тварин [285, 286].

Ми спостерігали, що годування мишей ВКІ з АКГ скасовувало підвищення активності гліколітичних ферментів, яке спостерігалось у мишей з ВКІ. Навіть більше, активність ГК, ферменту, який фосфорилує глюкозу, була нижчою в групі ВКІАКГ, ніж у контрольній групі. Окрім того, PDK4 є однією з мішеней Nrf2 [287]. Пригнічення PDK4 може полегшити деякі симптоми діабету 2 типу у мишей, зокрема було виявлено, що дефіцит PDK4 знижує рівень глюкози в крові та покращує толерантність до глюкози та чутливість до інсуліну у мишей з ожирінням, яке викликали їжею [288]. Інгибування Nrf2 через інсуліновий сигнал може сприяти зниженню рівня PDK4, що може призвести до активації піруватдегідрогеназного комплексу та покращення окислювального метаболізму у мишей, які споживали ВКІАКГ. Разом наші результати підтверджують опосередковане АКГ підвищення чутливості до інсуліну з подальшим інгибуванням Nrf2 у м'язах мишей, які споживали ВКІАКГ.

Резистентність до інсуліну в м'язах може суттєво впливати на інші органи та загальний стан здоров'я організму. Зокрема, резистентність до інсуліну може сприяти вивільненню вільних жирних кислот з жирової тканини в кров, що призводить до високого рівня ТАГ і підвищеного ризику серцево-судинних захворювань, таких як хвороби серця, гіпертонія та атеросклероз [269, 289].

Підвищені рівні ТАГ, які виявлені в м'язах мишей, що споживали ВКІ, можуть підтверджувати ліпотоксичність, пов'язану з повторною резистентністю до інсуліну. Водночас, виявлені ефекти АКГ на ознаки інсулінорезистентності в м'язах мишей роблять цю сполуку перспективним природним кандидатом для лікування інсулінорезистентності. Наші результати узгоджуються з нещодавніми дослідженнями, які були пов'язані з порушенням метаболізму в модельних організмах, що продемонстрували застосування АКГ у покращенні енергетичного статусу скелетних м'язів поросят, яким індукували запалення ін'єкцією ліпополісахариду (LPS) [276]. Додаток АКГ сприяв бежевому адипогенезу та зменшував ожиріння, спричинене ВКІ, у мишей середнього віку,

що пов'язано з підвищеним деметилюванням ДНК гену PRDM16 [3]. Споживання АКГ сприяє зниженню рівня PDK4, що може призвести до активації піруватдегідрогеназного комплексу та покращення окислювального метаболізму у мишей середнього віку [208].

Існує небагато досліджень, де вивчався потенційний позитивний вплив екзогенного АКГ на людину. Так дослідження на людях підтверджують ефективність використання АКГ для росту м'язів, загоєння ран і швидшого відновлення після операції [122, 126]. Таким чином, можна припустити, що АКГ потенційно може мати терапевтичний ефект у людей з ожирінням та інсулінорезистентністю, однак роль АКГ у клітинному метаболізмі в регуляції інсулінозалежних метаболічних реакцій потребує детальнішого вивчення.

Слід зазначити, що стандартний харчовий раціон, доповнений АКГ (група АКГ), суттєво не впливав на досліджувані біохімічні показники у м'язах, за винятком підвищення активності ПК (Рис. 3.4.2В). На нашому попередньому етапі дослідження ми також не спостерігали суттєвого впливу АКГ (доданого до стандартної їжі) на енергетичний метаболізм у печінці. Однак у печінці мишей, які отримували АКГ, активність ферментів антиоксидантного захисту була вищою порівняно з контрольними мишами (Рис. 3.2.3). Так виглядає, що ВКІ модулює ефекти АКГ, і навпаки, а у здорових людей та тварин АКГ, покращує роботу систем антиоксидантного захисту.

У цьому дослідженні ми встановили, що восьмижневе годування висококалорійною їжею не мало суттєвого впливу на морфометричні показники мишей середнього віку, але спричинило незначні зміни в гематологічних показниках. Додавання АКГ до ВКІ знижувало загальну кількість лейкоцитів і змінювало диференційний склад лейкоцитів, тоді як споживання АКГ зі стандартною їжею збільшувало загальну кількість лейкоцитів і впливало на відсоткове співвідношення їх форм.

Висококалорійна їжа сприяла розвитку чітких метаболічних змін у печінці, зокрема активації фруктолізу та розвитку оксидативного стресу. Додавання АКГ до ВКІ зменшувало інтенсивність оксидативного стресу в печінці через

антиоксидантну активність АКГ. Крім того, АКГ виконує регуляторну роль, підвищуючи активність гліколітичних і деяких антиоксидантних ферментів.

Оксидативний стрес викликала ВКІ у вісцеральній жировій тканині, серці та скелетних м'язах мишей. Додавання АКГ знижувало інтенсивність оксидативного стресу в цих тканинах, найвиразніше – у серці. Альфа-кетоглутарат, доданий до стандартної їжі, підвищував активність антиоксидантних ферментів у серці, але знижував її у жировій тканині та м'язах.

Восьмитижневе годування ВКІ спричинило значні метаболічні зміни в скелетних м'язах самців мишей, включаючи накопичення триацилгліцеридів, зниження рівня глікогену та загального білку, а також активацію ключових гліколітичних ферментів. Додавання АКГ до ВКІ мінімізувало ці негативні зміни, покращуючи метаболічний стан м'язової тканини.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Метаболічний синдром (МС) є комплексним захворюванням, що характеризується поєднанням метаболічних порушень, які суттєво підвищують ризик розвитку серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2 типу та можуть призвести до передчасної смерті [21]. Причини, що лежать в основі МС, є комплексними і включають поєднання генетичних факторів, факторів навколишнього середовища та особливостей способу життя. До них належать неправильне харчування, малорухомий спосіб життя та надмірна маса тіла. Поширеність МС невідомо зростає у глобальному масштабі. За даними сучасних досліджень, поширеність МС у світі варіює в межах 20-30% дорослого населення, з суттєвими регіональними відмінностями [290]. Підвищена інсулінорезистентність, вікові зміни та вісцеральне ожиріння виступають ключовими патофізіологічними механізмами зростання захворюваності. Метаболічний синдром має значний соціальний та економічний вплив, що підкреслює нагальну потребу в ранніх профілактичних заходах [291].

Зростання випадків ожиріння можна значною мірою пояснити збільшенням доступності та споживанням висококалорійних продуктів харчування, а також недостатньою фізичною активністю [21, 190]. Надмірне споживання калорій, яке перевищує витрати енергії, викликає несприятливі зміни в метаболізмі організму. Зокрема, в жировій тканині посилюється синтез та накопичення запасних ліпідів, що призводить до збільшення маси тіла.

Важливо зазначити, що надлишкове накопичення жиру супроводжується складними метаболічними порушеннями. Зокрема, відбувається активація запальних процесів через підвищену продукцію прозапальних цитокінів (IL-6, TNF- α), які порушують чутливість до інсуліну та викликають системне запалення низької інтенсивності [12]. Внаслідок надмірного утворення АФК, що пошкоджують клітинні мембрани, білки та ДНК, посилюється оксидативний стрес [146].

Накопичення жиру супроводжується розвитком оксидативного стресу та запалення в жировій та інших тканинах [191], зокрема таких, як печінка, серце, м'язи та мозок [208, 292, 293]. До того ж у тварин та людей з ожирінням жир накопичується не лише в жировій тканині, але й в інших органах, зокрема у печінці та м'язах [261, 272].

Їжа з високим вмістом калорій, особливо за рахунок жирів та вуглеводів не вважається здоровим харчуванням, оскільки вони можуть сприяти розвитку серцево-судинних захворювань та діабету [4, 294], викликати стеатоз печінки [295] та пошкодження нирок [296]. Іншим харчовим фактором ризику є високе споживання фруктози. Часто їжа з високим вмістом жиру та фруктози (або сахарози) використовуються для моделювання так званої західної дієти [294]. Цей тип харчування імітує регулярне споживання швидкої їжі, багатої на жири, разом з вживанням підсолоджених і особливо газованих напоїв [294].

Існує кілька механізмів, які можуть пояснити низку негативних ефектів ВКІ на різних рівнях. Деякі дослідження показують, що така їжа може сприяти підвищеній генерації АФК і, як наслідок, викликати оксидативний стрес [238, 297]. Добре відомо, що АФК окислюють жирні кислоти у фосфоліпідах мембран та білках, які важливі для функціонування клітин [298]. Ці окисні модифікації можуть в кінцевому підсумку призвести до порушення функціонування тканин та органів, а також до окислення ліпопротеїнів. Останнє сприяє утворенню атеросклеротичних бляшок та індукції прозапальних процесів [4, 299].

Альфа-кетоглутарат є проміжним продуктом циклу Кребса, який залучений до різноманітних метаболічних та клітинних шляхів. Це популярний харчовий додаток, який вважається корисним для здоров'я, що перевірене на тваринних моделях або в клінічних дослідженнях [16, 122]. У клітинному метаболізмі різні метаболічні шляхи беруть участь у формуванні та дисоціації АКГ. У ЦТК АКГ утворюється шляхом окисного декарбоксилювання ізоцитрату, яке каталізується ізоцитратдегідрогеназою. Утворюється АКГ глютаматдегідрогеназою шляхом окисного дезамінування глютамату. Декарбоксилюється АКГ до сукциніл-КоА та CO_2 альфа-

кетоглютаратдегідрогеназного комплексу. Важливо, що АКГ є нетоксичною сполукою зі здатністю розчинятися у воді та має високу стабільність у водних розчинах [119].

Крім того, АКГ служить попередником у різних біосинтетичних шляхах, включаючи синтез амінокислот, таких як глютамат і глютамін. Ці амінокислоти мають вирішальне значення для синтезу білку, нейротрансмісії та детоксикації, тим самим підтримуючи відновлення та функціонування клітин [300].

Альфа-кетоглютарат бере участь у різноманітних клітинних метаболічних шляхах, служить донором енергії і епігенетичним регулятором, також виконує такі фізіологічні функції, як регуляція імунітету, послаблення оксидативного стресу та уповільнення старіння [16, 160]. Рівні циркулюючого АКГ у плазмі людини також поступово знижуються з віком, особливо від 40 до 80 років [126]. Альфа-кетоглютарат є недоступним в раціоні людини, що робить вживання додатків єдиним можливим шляхом відновлення його рівня [129]. В останні роки дослідження виявили, що рівні АКГ в організмі тісно пов'язані з МС. Екзогенний додаток АКГ може сприяти зниженню рівня глюкози та ліпідів в крові та ризику розвитку серцево-судинних захворювань, пов'язаних з МС, а також бере участь у регуляції загальних патологічних механізмів МС, що свідчить про потенційну цінність застосування АКГ при МС [116].

У сукупності здається, що АКГ є перспективним і корисним харчовим додатком, який можна використовувати для запобігання МС.

Специфічною особливістю печінки є те, що вона може метаболізувати фруктозу завдяки наявності ферменту фруктокінази, яка мало експресується в інших органах, таких як м'язи [10]. У м'язах та жировій тканині фруктоза може утилізуватися ГК, яка має вищу спорідненість до глюкози ($K_M = 1,5 \text{ мМ}$), ніж для фруктози ($K_M = 0,25 \text{ мМ}$), тому мінімальна кількість фруктози метаболізується цим шляхом [301]. Константа Міхаеліса (K_M) – це концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної швидкості реакції. Нижче значення K_M вказує на вищу спорідненість ферменту до субстрату, завдяки чому фермент може ефективно зв'язувати субстрат та

каталізувати реакцію навіть за нижчих концентрацій субстрату [302]. Водночас, глюкоза є кращим субстратом для гексокінази, ніж фруктоза, і тому глюкоза конкурентно інгибує фосфорилування фруктози ГК [264]. Отже, ВКІ може викликати різні ефекти на метаболізм різних органів.

Наше дослідження спочатку зосередилося на печінці як основному органі ссавців, який реагує на зовнішні виклики, спричинені їжею, такою як ВКІ у нашому випадку. Печінка відіграє критичну роль у катаболізмі фруктози, будучи одним з небагатьох органів, що експресують фруктокіназу, і вважається ліпогенною [7, 8]. Ми вивчали метаболічні реакції печінки мишей середнього віку, які отримували їжу з високим вмістом жиру та фруктози, та оцінювали здатність додатку АКГ пом'якшувати показники розвитку метаболічних порушень, таких як оксидативний стрес. Виявилося, що їжа з високим вмістом жиру та фруктози активувала фруктоліз та гліколіз, призводила до накопичення глікогену, викликала запалення та оксидативний стрес у печінці мишей. Все це проявлялося як індукція антиоксидантних та пов'язаних ферментів, а також збільшенням рівня показників оксидативного стресу, таких як ПЛ [208]. Метаболічні ефекти ВКІ у печінці послаблювалися, коли ВКІ доповнювали АКГ [208], який є важливим інтермедіатом циклу Кребса і відіграє вирішальну роль у багатьох метаболічних процесах у тварин та людей [16]. Як додавання до основної їжі АКГ суттєво не впливало на гліколіз, але, ймовірно, інтенсифікувало утворення ацетил-КоА та функціонування електронно-транспортного ланцюга через легку стимуляцію антиоксидантного захисту (Рис. 4.1).

Наступною ми дослідили жирову тканину як основне місце накопичення ліпідів. Оскільки ВКІ може сприяти серцево-судинним захворюванням та дегенерації м'язів, ми перевірили вищезгадані параметри також в серцевому та скелетних м'язах. Метаболіти, які походять безпосередньо з ВКІ або утворюються після перетравлення її складових, можуть викликати запальну реакцію [303, 304]. Тому ми також перевірили параметри імунної системи.

ВКЇАКГ, але не зазнали впливу лише ВКЇ або АКГ. Рівні метаболітів та активності ферментів, які позначені сірим шрифтом, в даному дослідженні не вимірювалися. Скорочення: ФК – фруктокіназа, ГК – гексокіназа, Ф1Ф – фруктозо-1-фосфат, Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат, Г6Ф – глюкозо-6-фосфат, 6ФГЛ – 6-фосфоглюконолактон, ДГАФ – дигідроксиацетонфосфат, ГА3Ф – гліцеральдегід-3-фосфат, ФЕП – фосфоенолпіруват, ФГМ – фосфоглюкомутаза, ГР – глутатіонредуктаза, ТФІ – тріозофосфат ізомераза, ПДК – піруватдегідрогеназний комплекс, Ац-КоА – ацетил-КоА, ЦТК – цикл трикарбонових кислот, I-V – комплекси мітохондріального дихального ланцюга мітохондрій (модифіковано за [208]).

Ми перевірили вплив ВКЇ та АКГ на такі параметри оксидативного стресу, як рівні пероксидів ліпідів, карбонільних груп білків та глутатіону, а також активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів. Це зокрема глутатіонпероксидаза (використовуючи глутатіон відновлює органічні пероксиди, включно з ПЛ), глутатіон-S-трансфераза (кон'югує глутатіон з ксенобіотиками, перетворюючи останні на менш токсичні сполуки), глутатіонредуктаза (відновлює окислений глутатіон), глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (виробляє НАДФН для антиоксидантних потреб, зокрема для глутатіонредуктази) [77], НАД(Ф)Н-залежна хінооксидоредуктаза 1 (відновлює окислені хінони) [208], параоксоназа (ліпопротеїн-зв'язана арилестераза, яка запобігає окисленню ліпідів у ліпопротеїнах крові) [181] та мієлопероксидаза, яка є найбільш розповсюдженим прозапальним та прооксидантним ферментом у нейтрофілах, де вона каталізує утворення гіпохлоритної кислоти з пероксиду водню та генерує інші високореактивні види [217].

Споживання ВКЇ протягом восьми тижнів призвело до зменшення кількості еритроцитів, зміни в диференційній формулі лейкоцитів, накопичення вісцерального жиру та змін антиоксидантного статусу в тканинах мишей. У жировій тканині ВКЇ викликала накопичення рівнів ПЛ та зниження активності

антиоксидантних ферментів, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. У серці ВКІ знизилася рівень відновленого глутатіону та сприяла активації антиоксидантних ферментів, що вказує на розвиток легкого оксидативного стресу. У м'язах ВКІ сприяла підвищенню рівнів карбонільних груп білків та зниженню активності НАД(Ф)Н-залежної хінооксидоредуктази 1.

Додавання АКГ до ВКІ знизило відносні рівні нейтрофілів та підвищило рівні моноцитів у диференційному підрахунку лейкоцитів, а також зменшило інтенсивність оксидативного стресу в досліджуваних тканинах мишей, причому найбільш виражені захисні ефекти спостерігалися в серці. Додавання лише АКГ до стандартної їжі призвело до більшої загальної кількості лейкоцитів з вищими рівнями нейтрофілів та нижчими рівнями лімфоцитів, а також до вищої потужності антиоксидантних систем у серці мишей. У жировій тканині та м'язах споживання АКГ пригнічувало активність антиоксидантних ферментів без змін у окисних пошкодженнях.

Підсумовуючи, АКГ як харчовий додаток модулює ефекти на рівні імунних клітин у крові та антиоксидантному захисті у тканинах мишей, які отримують як ВКІ, так і стандартну їжу, хоча через різні механізми.

У скелетних м'язах основними енергетичними субстратами є м'язовий глікоген, глюкоза крові та жирні кислоти, які отримуються як з внутрішньом'язових ТАГ, так і з запасів ТАГ жирової тканини [256]. Ми припустили, що метаболічна відповідь скелетних м'язів мишей на ВКІ буде відрізнятися від такої у печінці мишей.

Таким чином, цей етап роботи мав на меті дослідити вплив ВКІ та АКГ окремо та в комбінації на деякі параметри енергетичного метаболізму, такі як накопичення запасних ліпідів та глікогену, а також активність ключових гліколітичних ферментів, а саме ГК, ФФК та ПК, у скелетних м'язах мишей. Враховуючи, що м'язи мають меншу здатність метаболізувати фруктозу (харчовий компонент ВКІ), ніж печінка, ми очікували, що м'язи мишей на ВКІ будуть покладатися переважно на ТАГ як джерело енергії. Далі, ми припустили, що ВКІ призведе до накопичення жиру та втрати білку, а також слабкості

скелетних м'язів, як це спостерігалось в попередніх подібних дослідженнях [190, 272, 305]. З огляду на використання АКГ для біосинтезу амінокислот та покращенні відновлення м'язів при травмах [16, 126, 276, 306], ми припустили, що додавання АКГ може запобігти метаболічним змінам, таким як втрата білку у мишей, які споживатимуть ВКІ.

Миші, які споживали ВКІ, мали вищі рівні запасних ТАГ, нижчі рівні глікогену та загального водорозчинного білку, а також вищу активність ключових гліколітичних ферментів, а саме ГК, ФФК та ПК, порівняно з контрольною групою. Результати свідчать про те, що м'язи мишей на ВКІ можуть страждати від ліпотоксичності. У мишей групи ВКІАКГ рівні метаболітів та активність гліколітичних ферментів не відрізнялися від відповідних значень у контрольній групі, за винятком активності ПК, яка була значно нижчою в групі ВКІАКГ порівняно з контролем (Рис. 4.2). Таким чином, метаболічні зміни в скелетних м'язах мишей, викликані ВКІ, були пом'якшені додаванням АКГ, що вказує на захисну роль АКГ.

М'язи та печінка тісно взаємопов'язані на метаболічному рівні, оскільки обмін енергетичними субстратами між цими органами відіграє ключову роль у підтримці гомеостазу організму. Узагальнена схема цієї взаємодії представлена на рис. 4.3 на основі отриманих результатів.

Ми вивчали ефекти АКГ в різних контекстах, виявивши, що він може потенційно пом'якшувати оксидативний стрес і запобігати накопиченню запасних ліпідів у помірних дозах на моделях плодової мушки та миші [19, 247]. Також ми виявили, що АКГ модулює реакцію на ВКІ у різних тканинах [162, 208, 247].

Усі ці тканиноспецифічні відмінності свідчать про те, що деякі тканини можуть лише незначно зазнавати впливу ВКІ, тоді як інші можуть бути першочерговими мішенями. Тому терапія чи профілактика могли б бути спрямовані насамперед на органи, які можуть найбільш негативно постраждати від ВКІ.

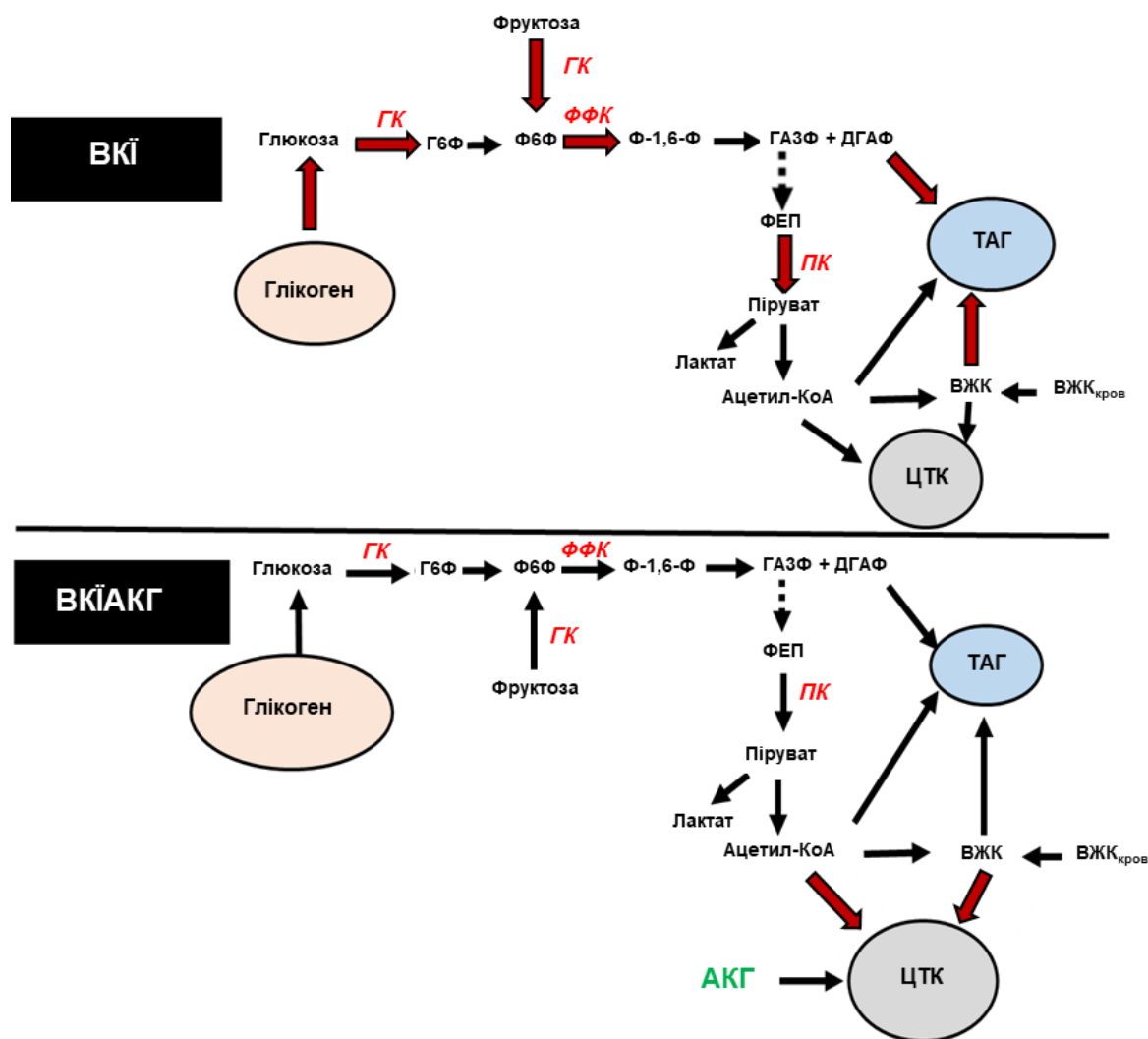


Рис. 4.2. Вплив їжі з високим вмістом жиру та фруктози та альфа-кетоглутарату на енергетичний метаболізм у скелетних м'язах мишей. Споживання ВКІ призводить до виснаження запасів глікогену, активації гліколізу та накопичення триацилгліцеридів у м'язах. Додавання АКГ до їжі запобігає метаболічним змінам, які спричинені споживанням ВКІ. Жирними червоними лініями позначена активація процесу. Скорочення: ГК – гексокіназа, Г6Ф – глюкозо-6-фосфат, Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат, Ф-1,6-Ф – фруктозо-1,6-дифосфат, ФФК – фосфофруктокіназа, ДГАФ – дигідроксиацетонфосфат, ГА3Ф – гліцеральдегід-3-фосфат, ФЕП – фосфоенолпіруват, ПК – піруваткіназа, ВЖК – вільні жирні кислоти, ЦТК – цикл трикарбонових кислот, ТАГ – триацилгліцериди (модифіковано за [247]).

додаванням 1% розчину АКГ, ФК – фруктокіназа, ГК – гексокіназа, Ф-1-Ф – фруктозо-1-фосфат, Ф-6-Ф – фруктозо-6-фосфат, Ф-1,6-Ф – фруктозо-1,6-дифосфат, Г-6-Ф – глюкозо-6-фосфат, Г-1-Ф – глюкозо-1-фосфат, ФФК – фосфотрикіназа, 6ФГЛ – 6-фосфоглюконолактон, ДГАФ – дигідроксиацетонфосфат, ГА3Ф – гліцеральдегід-3-фосфат, Г3Ф – гліцерин-3-фосфат, ГА – гліцеральдегід, ФЕП – фосфоенолпіруват, ПК – піруваткіназа, ПЛ – пероксиди ліпідів, ГР – глутатіонредуктаза, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, GST – глутатіон-S-трансфераза, ГП – глутатіонпероксидаза, GSH – відновлений глутатіон, GSSG – окислений глутатіон, НХО1 – НАД(Ф)Н-залежна хінооксидоредуктаза, ЦТК – цикл трикарбонових кислот, АКГ – альфа-кетоглютарат, ІДГ – ізоцитратдегідрогеназа, АКГДК – альфа-кетоглютаратдегідрогеназний комплекс, ГДГ – глутаматдегідрогеназа, ГС – глутамінсинтетаза, ГЗ – глутаміназа, ГлС – глутатіонсинтетаза, ВЖК – вільні жирні кислоти, ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти, ТАГ – триацилгліцериди.

Таким чином, АКГ як харчовий додаток виявляє позитивний вплив і послаблює окислювальне пошкодження у мишей, які отримували як висококалорійну, так і стандартну їжу, хоча і за допомогою різних механізмів.

Перспективним напрямом подальших досліджень може бути вивчення впливу додатку АКГ на перемикання з фруктолізу на гліколіз у мишей, які споживали їжу з високим вмістом жирів та фруктози. Також заслуговує уваги аналіз взаємозв'язку між антиоксидантними, прооксидантними та імуномодуючими властивостями АКГ як у фізіологічних умовах, так і за споживання висококалорійної їжі, що відкриє нові можливості для розуміння його впливу на метаболічні та запальні процеси.

ВИСНОВКИ

У цьому дослідженні вивчався потенціал альфа-кетоглютарату як харчового додатку для захисту організму від наслідків споживання висококалорійної їжі. Отримані в роботі результати демонструють здатність альфа-кетоглютарату коригувати метаболічні порушення, викликані короткостроковим споживанням їжі, яка багата на тваринні жири та фруктозу. Захисний ефект альфа-кетоглютарату проявлявся у зменшенні інтенсивності оксидативного стресу, посиленні антиоксидантного захисту та нормалізації енергетичного метаболізму в тканинах мишей. Як харчовий додаток на тлі базової їжі альфа-кетоглютарат модулює ефекти на рівні імунних клітин у крові та антиоксидантному захисті у тканинах мишей.

1) Восьмитижневий курс споживання висококалорійної їжі суттєво не впливав на динаміку маси тіла та індекси ожиріння, проте призводив до вищого вмісту вісцерального жиру у самців мишей середнього віку. Споживання рідини було нижчим при додаванні альфа-кетоглютарату до питної води у мишей, що споживали як базову, так і висококалорійну їжу.

2) Споживання висококалорійної їжі призводило до вищого вмісту триацилгліцеридів та незначно впливало на гематологічні показники крові мишей. Додавання альфа-кетоглютарату до висококалорійної їжі сприяло вищому вмісту глюкози в плазмі крові та спричиняло незначні зміни у диференційному складі лейкоцитів. Натомість споживання розчину альфа-кетоглютарату і стандартного раціону не впливало на біохімічні показники плазми крові мишей та викликало збільшення загальної кількості лейкоцитів зі змінами у відсотковому співвідношенні їх видів у крові мишей.

3) Восьмитижнєве годування висококалорійною їжею викликає метаболічні зміни в печінці – вища активність ферменту фруктолізу, та скелетних м'язах мишей – накопичення триацилгліцеридів, зниження рівня глікогену та загального білку, а також вищі активності ключових ферментів гліколізу. Додавання альфа-кетоглютарату до висококалорійної їжі запобігало

метаболічним змінам у скелетних м'язах мишей та призводило до вищих активностей ферментів гліколізу у печінці, що вказує на його регуляторну роль.

4) Споживання висококалорійної їжі призводило до розвитку оксидативного стресу різної інтенсивності у печінці, вісцеральній жировій тканині, серці та скелетних м'язах мишей. Додавання альфа-кетоглутарату до висококалорійної їжі зменшувало інтенсивність оксидативного стресу у тканинах мишей завдяки антиоксидантному механізму альфа-кетоглутарату. Слід зазначити, що альфа-кетоглутарат, доданий до стандартного раціону, призводив до вищих активностей антиоксидантних ферментів в печінці та серці, але водночас призводив до нижчих їх активностей у жировій тканині та м'язах.

5) Гістологічний аналіз печінки мишей на висококалорійній їжі та висококалорійній їжі з альфа-кетоглутаратом виявив ознаки неспецифічного запалення, а в жировій тканині – збільшені адипоцити. Водночас миші контрольної групи та миші, які отримували альфа-кетоглутарат, мали нормальну гістологічну структуру обох тканин.

6) Загалом, альфа-кетоглутарат проявляв тканиноспецифічні ефекти через різні механізми його дії – антиоксидантний, прооксидантний та імуномодуючий. Як харчовий додаток, альфа-кетоглутарат ефективно знижує окислювальні пошкодження тканин незалежно від типу спожитої їжі (висококалорійної чи стандартної), проте механізми цього впливу відрізняються.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Recena Aydos L, Aparecida do Amaral L, Serafim de Souza R, Jacobowski AC, Freitas Dos Santos E, Rodrigues Macedo ML. Nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57bl/6 models. *Nutrients*. 2019;11(12). doi: 10.3390/nu11123067.
2. Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2019;43(8):1491-2. doi: 10.1038/s41366-019-0363-7.
3. Tian Q, Zhao J, Yang Q, Wang B, Deavila JM, Zhu MJ, et al. Dietary alpha-ketoglutarate promotes beige adipogenesis and prevents obesity in middle-aged mice. *Aging Cell*. 2020;19(1):e13059. doi: 10.1111/accel.13059.
4. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond)*. 2016;13:15. doi: 10.1186/s12986-016-0074-1.
5. Barriere DA, Noll C, Roussy G, Lizotte F, Kessai A, Kirby K, et al. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Sci Rep*. 2018;8(1):424. doi: 10.1038/s41598-017-18896-5.
6. Garcia-Berumen CI, Ortiz-Avila O, Vargas-Vargas MA, Del Rosario-Tamayo BA, Guajardo-Lopez C, Saavedra-Molina A, et al. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):78. doi: 10.1186/s12944-019-1024-5.
7. Herman MA, Birnbaum MJ. Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease. *Cell Metab*. 2021;33(12):2329-54. doi: 10.1016/j.cmet.2021.09.010.
8. Tappy L, Rosset R. Health outcomes of a high fructose intake: the importance of physical activity. *J Physiol*. 2019;597(14):3561-71. doi: 10.1113/JP278246.

9. Semchyshyn H. Is Part of the fructose effects on health related to increased AGE formation? Dietary AGEs and their role in health and disease. 1st Edition ed.: CRC Press; 2017.

10. Ishimoto T, Lanaspas MA, Le MT, Garcia GE, Diggle CP, Maclean PS, et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(11):4320-5. doi: 10.1073/pnas.1119908109.

11. Emelyanova L, Boukatina A, Myers C, Oyarzo J, Lustgarten J, Shi Y, et al. High calories but not fat content of lard-based diet contribute to impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in C57BL/6J mice heart. *PLoS One*. 2019;14(7):e0217045. doi: 10.1371/journal.pone.0217045.

12. Bayliak MM, Abrat OB, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: comparison between *Drosophila* and mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2019;228:18-28. doi: 10.1016/j.cbpa.2018.09.027.

13. Lushchak VI. Interplay between bioenergetics and oxidative stress at normal brain aging. Aging as a result of increasing disbalance in the system oxidative stress-energy provision. *Pflugers Arch*. 2021;473(5):713-22. doi: 10.1007/s00424-021-02531-4.

14. Jiang S, Liu H, Li C. Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. *Foods*. 2021;10(8). doi: 10.3390/foods10081854.

15. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902.

16. Bayliak MM, Lushchak VI. Pleiotropic effects of alpha-ketoglutarate as a potential anti-ageing agent. *Ageing Res Rev*. 2021;66:101237. doi: 10.1016/j.arr.2020.101237.

17. Nagaoka K, Mulla, J., Cao, K., Cheng, Z., Liu, D., Mueller, W., Bay, A., Hildebrand, G., Lu, S., Huang, C.K. The metabolite, alpha-ketoglutarate inhibits

nonalcoholic fatty liver disease progression by targeting lipid metabolism. *Liver Res.* 2020;4(2020). doi: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.04.001>.

18. Aragonés G, Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martínez S, Armengol S, et al. Increased circulating levels of alpha-ketoglutarate in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154601. doi: 10.1371/journal.pone.0154601.

19. Bayliak MM, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochynska OM, Semchyshyn OI, Storey JM, et al. Dietary alpha-ketoglutarate promotes higher protein and lower triacylglyceride levels and induces oxidative stress in larvae and young adults but not in middle-aged *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2017;204:28-39. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.11.005.

20. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond).* 2016;13:65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.

21. Vataashchuk MV, Bayliak MM, Hurza VV, Storey KB, Lushchak VI. Metabolic syndrome: lessons from rodent and drosophila models. *Biomed Res Int.* 2022;2022:5850507. doi: 10.1155/2022/5850507.

22. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:351982. doi: 10.1155/2011/351982.

23. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med.* 2013;110(3):207-11.

24. Walz CCK. The mouse, a model organism for biomedical research. *Cellular and animal models in human genomics research. Translational and Applied Genomics;* 2019. p. 119–40

25. Mouse Genome Sequencing C, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520-62. doi: 10.1038/nature01262.

26. Champy MF, Selloum M, Zeitler V, Caradec C, Jung B, Rousseau S, et al. Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse. *Mamm Genome*. 2008;19(5):318-31. doi: 10.1007/s00335-008-9107-z.
27. Guenet JL. The mouse genome. *Genome Res*. 2005;15(12):1729-40. doi: 10.1101/gr.3728305.
28. Flurkey K, M. Curren J, Harrison DE. Mouse Models in Aging Research. In: Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL, editors. *The mouse in biomedical research* (second edition). Burlington: Academic Press; 2007. p. 637-72.
29. Capel F, Delmotte MH, Brun M, Lonchampt M, De Fanti B, Xuereb L, et al. Aging and obesity induce distinct gene expression adaptation in the liver of C57BL/6J mice. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(3):154-64. doi: 10.1159/000328190.
30. Narciso L, Martinelli A, Torriani F, Frassanito P, Bernardini R, Chiarotti F, et al. Natural mineral waters and metabolic syndrome: insights from obese male and female C57BL/6 mice on caloric restriction. *Front Nutr*. 2022;9:886078. doi: 10.3389/fnut.2022.886078.
31. Rodriguez-Correa E, Gonzalez-Perez I, Clavel-Perez PI, Contreras-Vargas Y, Carvajal K. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes*. 2020;10(1):24. doi: 10.1038/s41387-020-0127-4.
32. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1081-7. doi: 10.1093/jn/133.4.1081.
33. Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes*. 2005;54(7):2012-8. doi: 10.2337/diabetes.54.7.2012.
34. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):485-501. doi: 10.1677/jme.1.01909.

35. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity* (Silver Spring). 2007;15(8):1996-2005. doi: 10.1038/oby.2007.238.
36. Jia YJ, Liu J, Guo YL, Xu RX, Sun J, Li JJ. Dyslipidemia in rat fed with high-fat diet is not associated with PCSK9-LDL-receptor pathway but ageing. *J Geriatr Cardiol*. 2013;10(4):361-8. doi: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.04.007.
37. Avtanski D, Pavlov VA, Tracey KJ, Poretsky L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med*. 2019;2(4):252-8. doi: 10.1002/ame2.12084.
38. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res*. 2002;10(9):956-63. doi: 10.1038/oby.2002.130.
39. Moreno-Fernandez S, Garces-Rimon M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*. 2018;10(10). doi: 10.3390/nu10101502.
40. Sadowska J, Brzuskowska M. Comparing the effects of sucrose and high-fructose corn syrup on lipid metabolism and the risk of cardiovascular disease in male rats. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2017;16(2):231-40. doi: 10.17306/J.AFS.0482.
41. Lee WC, Wu KLH, Leu S, Tain YL. Translational insights on developmental origins of metabolic syndrome: focus on fructose consumption. *Biomed J*. 2018;41(2):96-101. doi: 10.1016/j.bj.2018.02.006.
42. Yang K, Feng C, Lip H, Bruce WR, O'Brien PJ. Cytotoxic molecular mechanisms and cytoprotection by enzymic metabolism or autoxidation for glyceraldehyde, hydroxypyruvate and glycolaldehyde. *Chem Biol Interact*. 2011;191(1-3):315-21. doi: 10.1016/j.cbi.2011.02.027.
43. Semchyshyn HM, Lozinska LM, Miedzobrodzki J, Lushchak VI. Fructose and glucose differentially affect aging and carbonyl/oxidative stress parameters in

Saccharomyces cerevisiae cells. *Carbohydr Res.* 2011;346(7):933-8. doi: 10.1016/j.carres.2011.03.005.

44. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21873-86. doi: 10.3390/ijms141121873.

45. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, et al. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes.* 2013;62(10):3307-15. doi: 10.2337/db12-1814.

46. Semchyshyn HM, Miedzobrodzki J, Bayliak MM, Lozinska LM, Homza BV. Fructose compared with glucose is more a potent glycooxidation agent in vitro, but not under carbohydrate-induced stress in vivo: potential role of antioxidant and antiglycation enzymes. *Carbohydr Res.* 2014;384:61-9. doi: 10.1016/j.carres.2013.11.015.

47. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:191-8. doi: 10.2147/DMSO.S182406.

48. Berger C, Heyne HO, Heiland T, Dommel S, Hofling C, Guiu-Jurado E, et al. A novel compound heterozygous leptin receptor mutation causes more severe obesity than in *Lepr(db/db)* mice. *J Lipid Res.* 2021;62:100105. doi: 10.1016/j.jlr.2021.100105.

49. Suriano F, Vieira-Silva S, Falony G, Roumain M, Paquot A, Pelicaen R, et al. Novel insights into the genetically obese (*ob/ob*) and diabetic (*db/db*) mice: two sides of the same coin. *Microbiome.* 2021;9(1):147. doi: 10.1186/s40168-021-01097-8.

50. Michaud EJ, Bultman SJ, Klebig ML, van Vugt MJ, Stubbs LJ, Russell LB, et al. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (*Ay*) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(7):2562-6. doi: 10.1073/pnas.91.7.2562.

51. Pelletier RM, Akpovi CD, Chen L, Vitale ML. Cholesterol metabolism and Cx43, Cx46, and Cx50 gap junction protein expression and localization in normal and

diabetic and obese ob/ob and db/db mouse testes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;314(1):E21-E38. doi: 10.1152/ajpendo.00215.2017.

52. Del Campo A, Bustos C, Mascayano C, Acuna-Castillo C, Troncoso R, Rojo LE. Metabolic syndrome and antipsychotics: the role of mitochondrial fission/fusion imbalance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:144. doi: 10.3389/fendo.2018.00144.

53. Wharton S, Raiber L, Serodio KJ, Lee J, Christensen RA. Medications that cause weight gain and alternatives in Canada: a narrative review. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018;11:427-38. doi: 10.2147/DMSO.S171365.

54. Li L, Liao G, Yang G, Lu Y, Du X, Liu J, et al. High-fat diet combined with low-dose streptozotocin injections induces metabolic syndrome in *Macaca mulatta*. *Endocrine.* 2015;49(3):659-68. doi: 10.1007/s12020-015-0542-9.

55. Harvey I, Stephenson EJ, Redd JR, Tran QT, Hochberg I, Qi N, et al. Glucocorticoid-induced metabolic disturbances are exacerbated in obese male mice. *Endocrinology.* 2018;159(6):2275-87. doi: 10.1210/en.2018-00147.

56. Samy DM, Mostafa DK, Abdelmonsif DA, Ismail CA, Hassaan PS. Crosstalk of hypothalamic chemerin, histamine, and AMPK in diet-and olanzapine-induced obesity in rats. *Life Sci.* 2021;284:119897. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119897.

57. Mueller LD, Barter TT. A model of the evolution of larval feeding rate in *Drosophila* driven by conflicting energy demands. *Genetica.* 2015;143(1):93-100. doi: 10.1007/s10709-015-9818-5.

58. Bayliak MM, Lylyk MP, Gospodaryov DV, Kotsyubynsky VO, Butenko NV, Storey KB, et al. Protective effects of alpha-ketoglutarate against aluminum toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019;217:41-53. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.11.020.

59. Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology.* 2012;55(2):395-407. doi: 10.1002/hep.24685.

60. Wassenaar PNH, Legler J. Systematic review and meta-analysis of early life exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and obesity related outcomes in rodents. *Chemosphere*. 2017;188:174-81. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.165.
61. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(2):131-45. doi: 10.2174/1573399810666140508121012.
62. Kanasaki K, Koya D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:197636. doi: 10.1155/2011/197636.
63. Fuchs T, Loureiro MP, Macedo LE, Nocca D, Nedelcu M, Costa-Casagrande TA. Animal models in metabolic syndrome. *Rev Col Bras Cir*. 2018;45(5):e1975. doi: 10.1590/0100-6991e-20181975.
64. Warden CH, Fisler JS. Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metab*. 2008;7(4):277. doi: 10.1016/j.cmet.2008.03.014.
65. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The Effects of a modified high-carbohydrate high-fat diet on metabolic syndrome parameters in male rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018;126(4):205-12. doi: 10.1055/s-0043-119352.
66. Simonson M, Boirie Y, Guillet C. Protein, amino acids and obesity treatment. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(3):341-53. doi: 10.1007/s11154-020-09574-5.
67. Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421-33. doi: 10.1007/978-1-61779-430-8_27.
68. Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2010;3(3-4):156-66. doi: 10.1242/dmm.003467.
69. Kypreos KE, Karavia EA, Constantinou C, Hatziri A, Kalogeropoulou C, Xepapadaki E, et al. Apolipoprotein E in diet-induced obesity: a paradigm shift from conventional perception. *J Biomed Res*. 2017;32(3):183-90. doi: 10.7555/JBR.32.20180007.
70. Gunawan S, Aulia A, Soetikno V. Development of rat metabolic syndrome models: A review. *Vet World*. 2021;14(7):1774-83. doi: 10.14202/vetworld.2021.1774-1783.

71. Cleary MP. Impact of obesity on development and progression of mammary tumors in preclinical models of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18(3-4):333-43. doi: 10.1007/s10911-013-9300-x.

72. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2017;11(8):215-25. doi: 10.1177/1753944717711379.

73. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8267234. doi: 10.1155/2019/8267234.

74. Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabres M, Capo X, Bouzas C, Mateos D, Pons A, et al. Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3). doi: 10.3390/antiox9030236.

75. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38. doi: 10.1002/jbt.10058.

76. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26087-124. doi: 10.3390/ijms161125942.

77. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *Ukr Biochem J*. 2015;87(6):11-8. doi: 10.15407/ubj87.06.011.

78. DeVallance E, Li Y, Jurczak MJ, Cifuentes-Pagano E, Pagano PJ. The role of NADPH oxidases in the etiology of obesity and metabolic syndrome: contribution of individual isoforms and cell biology. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(10):687-709. doi: 10.1089/ars.2018.7674.

79. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981-90. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

80. Masenga SK, Kabwe LS, Chakulya M, Kirabo A. Mechanisms of oxidative stress in metabolic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9). doi: 10.3390/ijms24097898.

81. Manna P, Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13(10):423-44. doi: 10.1089/met.2015.0095.

82. Colak E, Pap D. The role of oxidative stress in the development of obesity and obesity-related metabolic disorders. *J Med Biochem*. 2021;40(1):1-9. doi: 10.5937/jomb0-24652.

83. Sharebiani H, Mokaram M, Mirghani M, Fazeli B, Stanek A. The effects of antioxidant supplementation on the pathologic mechanisms of metabolic syndrome and cardiovascular disease development. *Nutrients*. 2024;16(11). doi: 10.3390/nu16111641.

84. McMurray F, Patten DA, Harper ME. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity-recent findings and empirical approaches. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(11):2301-10. doi: 10.1002/oby.21654.

85. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008;57(8):1071-7. doi: 10.1016/j.metabol.2008.03.010.

86. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(5):e330-41. doi: 10.1016/j.orcp.2013.05.004.

87. Bayliak MM, Dmytriv TR, Melnychuk AV, Strilets NV, Storey KB, Lushchak VI. Chamomile as a potential remedy for obesity and metabolic syndrome. *EXCLI J*. 2021;20:1261-86. doi: 10.17179/excli2021-4013.

88. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, World Obesity F. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev*. 2017;18(7):715-23. doi: 10.1111/obr.12551.

89. Zou P, Liu L, Zheng L, Liu L, Stoneman RE, Cho A, et al. Targeting FoxO1 with AS1842856 suppresses adipogenesis. *Cell Cycle*. 2014;13(23):3759-67. doi: 10.4161/15384101.2014.965977.

90. Klotz LO, Sanchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbanek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 2015;6:51-72. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019.
91. Martemucci G, Fracchiolla G, Muraglia M, Tardugno R, Dibenedetto RS, D'Alessandro AG. Metabolic syndrome: a narrative review from the oxidative stress to the management of related diseases. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(12). doi: 10.3390/antiox12122091.
92. Srikanth KK, Orrick JA. Biochemistry, Polyol or sorbitol pathways. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Josephine Orrick declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2024.
93. Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, et al. The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell Metab.* 2018;28(3):337-52. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.014.
94. Scioli MG, Storti G, D'Amico F, Rodriguez Guzman R, Centofanti F, Doldo E, et al. Oxidative stress and new pathogenetic mechanisms in endothelial dysfunction: potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets. *J Clin Med.* 2020;9(6). doi: 10.3390/jcm9061995.
95. Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: an update. *Ageing Res Rev.* 2017;39:36-45. doi: 10.1016/j.arr.2016.08.005.
96. Mehta M, Istfan NW, Apovian CM. Obesity: overview of weight management. *Endocr Pract.* 2021;27(6):626-35. doi: 10.1016/j.eprac.2021.04.001.
97. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017;39:46-58. doi: 10.1016/j.arr.2016.10.005.
98. Xie K, Neff F, Markert A, Rozman J, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, et al. Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nat Commun.* 2017;8(1):155. doi: 10.1038/s41467-017-00178-3.
99. Bayliak MM, Soroachynska OM, Kuzniak OV, Gospodaryov DV, Demianchuk OI, Vasylyk YV, et al. Middle age as a turning point in mouse cerebral

cortex energy and redox metabolism: modulation by every-other-day fasting. *Exp Gerontol.* 2021;145:111182. doi: 10.1016/j.exger.2020.111182.

100. Gonzalez-Castejon M, Rodriguez-Casado A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. *Pharmacol Res.* 2011;64(5):438-55. doi: 10.1016/j.phrs.2011.07.004.

101. Perez-Torres I, Castrejon-Tellez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4). doi: 10.3390/ijms22041786.

102. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr.* 2008;138(9):1677-83. doi: 10.1093/jn/138.9.1677.

103. Weidner C, Wowro SJ, Rousseau M, Freiwald A, Kodelja V, Abdel-Aziz H, et al. Antidiabetic effects of chamomile flowers extract in obese mice through transcriptional stimulation of nutrient sensors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family. *PLoS One.* 2013;8(11):e80335. doi: 10.1371/journal.pone.0080335.

104. Lee SJ, Chandrasekran P, Mazucanti CH, O'Connell JF, Egan JM, Kim Y. Dietary curcumin restores insulin homeostasis in diet-induced obese aged mice. *Aging (Albany NY).* 2022;14(1):225-39. doi: 10.18632/aging.203821.

105. Li Y, Hruby A, Bernstein AM, Ley SH, Wang DD, Chiuve SE, et al. Saturated fats compared with unsaturated fats and sources of carbohydrates in relation to risk of coronary heart disease: a prospective cohort study. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(14):1538-48. doi: 10.1016/j.jacc.2015.07.055.

106. Di Daniele N, Noce A, Vidiri MF, Moriconi E, Marrone G, Annicchiarico-Petruzzelli M, et al. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget.* 2017;8(5):8947-79. doi: 10.18632/oncotarget.13553.

107. Wang PX, Deng XR, Zhang CH, Yuan HJ. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Chin Med J (Engl).* 2020;133(7):808-16. doi: 10.1097/CM9.0000000000000696.

108. Dmytriv TR, Storey KB, Lushchak VI. Intestinal barrier permeability: the influence of gut microbiota, nutrition, and exercise. *Front Physiol.* 2024;15:1380713. doi: 10.3389/fphys.2024.1380713.
109. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 2013;499(7456):97-101. doi: 10.1038/nature12347.
110. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514(7521):181-6. doi: 10.1038/nature13793.
111. Kawano Y, Edwards M, Huang Y, Bilate AM, Araujo LP, Tanoue T, et al. Microbiota imbalance induced by dietary sugar disrupts immune-mediated protection from metabolic syndrome. *Cell.* 2022;185(19):3501-19 e20. doi: 10.1016/j.cell.2022.08.005.
112. Santa K, Kumazawa Y, Nagaoka I. Prevention of Metabolic syndrome by phytochemicals and vitamin D. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3). doi: 10.3390/ijms24032627.
113. Christou GA, Katsiki N, Blundell J, Fruhbeck G, Kiortsis DN. Semaglutide as a promising antiobesity drug. *Obes Rev.* 2019;20(6):805-15. doi: 10.1111/obr.12839.
114. Gabery S, Salinas CG, Paulsen SJ, Ahnfelt-Ronne J, Alanentalo T, Baquero AF, et al. Semaglutide lowers body weight in rodents via distributed neural pathways. *JCI Insight.* 2020;5(6). doi: 10.1172/jci.insight.133429.
115. Pontes-da-Silva RM, de Souza Marinho T, de Macedo Cardoso LE, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Obese mice weight loss role on nonalcoholic fatty liver disease and endoplasmic reticulum stress treated by a GLP-1 receptor agonist. *Int J Obes (Lond).* 2022;46(1):21-9. doi: 10.1038/s41366-021-00955-7.
116. Li Y, Wang Y, Yuan Q. Latest findings on the role of alpha-ketoglutarate in metabolic syndrome. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2024;55(3):783-92. doi: 10.12182/20240560302.
117. Liu S, He L, Yao K. The antioxidative function of alpha-ketoglutarate and its applications. *Biomed Res Int.* 2018;2018:3408467. doi: 10.1155/2018/3408467.

118. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, et al. The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*. 2014;510(7505):397-401. doi: 10.1038/nature13264.
119. Naeini SH, Mavaddatiyan L, Kalkhoran ZR, Taherkhani S, Talkhabi M. Alpha-ketoglutarate as a potent regulator for lifespan and healthspan: evidences and perspectives. *Exp Gerontol*. 2023;175:112154. doi: 10.1016/j.exger.2023.112154.
120. Zdzisinska B, Zurek A, Kandefer-Szerszen M. Alpha-ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(1):21-36. doi: 10.1007/s00005-016-0406-x.
121. Filip R, Pierzynowski SG. The absorption, tissue distribution and excretion of enterally administered alpha-ketoglutarate in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008;92(2):182-9. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00725.x.
122. Gyanwali B, Lim ZX, Soh J, Lim C, Guan SP, Goh J, et al. Alpha-ketoglutarate dietary supplementation to improve health in humans. *Trends Endocrinol Metab*. 2022;33(2):136-46. doi: 10.1016/j.tem.2021.11.003.
123. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016;24(1):1-8. doi: 10.4062/biomolther.2015.078.
124. Guo L, Chen S, Ou L, Li S, Ye ZN, Liu HF. Disrupted alpha-ketoglutarate homeostasis: understanding kidney diseases from the view of metabolism and beyond. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2022;15:1961-74. doi: 10.2147/DMSO.S369090.
125. Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Ann Med*. 2008;40(6):402-17. doi: 10.1080/07853890801986594.
126. Harrison AP, Pierzynowski SG. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art--review article. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 1:91-106.

127. Yang Y, He P, Hou Y, Liu Z, Zhang X, Li N. Osmundacetone modulates mitochondrial metabolism in non-small cell lung cancer cells by hijacking the glutamine/glutamate/alpha-KG metabolic axis. *Phytomedicine*. 2022;100:154075. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154075.
128. He L, Wu J, Tang W, Zhou X, Lin Q, Luo F, et al. Prevention of oxidative stress by alpha-ketoglutarate via activation of CAR signaling and modulation of the expression of key antioxidant-associated targets in vivo and in vitro. *J Agric Food Chem*. 2018;66(43):11273-83. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04470.
129. Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, Hsu YM, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, et al. Alpha-ketoglutarate, an endogenous metabolite, extends lifespan and compresses morbidity in aging mice. *Cell Metab*. 2020;32(3):447-56 e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.004.
130. TeSlaa T, Chaikovsky AC, Lipchina I, Escobar SL, Hochedlinger K, Huang J, et al. Alpha-ketoglutarate accelerates the initial differentiation of primed human pluripotent stem cells. *Cell Metab*. 2016;24(3):485-93. doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.002.
131. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, et al. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. 2006;439(7078):811-6. doi: 10.1038/nature04433.
132. Morris JPt, Yashinskie JJ, Koche R, Chandwani R, Tian S, Chen CC, et al. Alpha-ketoglutarate links p53 to cell fate during tumour suppression. *Nature*. 2019;573(7775):595-9. doi: 10.1038/s41586-019-1577-5.
133. Wernerman J, Hammarqvist F, Vinnars E. Alpha-ketoglutarate and postoperative muscle catabolism. *Lancet*. 1990;335(8691):701-3. doi: 10.1016/0140-6736(90)90811-i.
134. Yuan Y, Zhu C, Wang Y, Sun J, Feng J, Ma Z, et al. Alpha-ketoglutaric acid ameliorates hyperglycemia in diabetes by inhibiting hepatic gluconeogenesis via serpinale signaling. *Sci Adv*. 2022;8(18):eabn2879. doi: 10.1126/sciadv.abn2879.
135. Zhang K, Ma Y, Luo Y, Song Y, Xiong G, Ma Y, et al. Metabolic diseases and healthy aging: identifying environmental and behavioral risk factors and promoting

public health. *Front Public Health*. 2023;11:1253506. doi: 10.3389/fpubh.2023.1253506.

136. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300. doi: 10.1093/geronj/11.3.298.

137. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):391. doi: 10.1038/s41392-022-01251-0.

138. Rusu ME, Fizesan I, Vlase L, Popa DS. Antioxidants in age-related diseases and anti-aging strategies. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10). doi: 10.3390/antiox11101868.

139. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Kurlak P, Pierzynowski SG. Dietary 2-oxoglutarate mitigates gastrectomy-evoked structural changes in cartilage of female rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(1):14-24. doi: 10.1177/1535370215595466.

140. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Muszynski S, Blicharski T, Pierzynowski SG. Dietary 2-oxoglutarate prevents bone loss caused by neonatal treatment with maximal dexamethasone dose. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(7):671-82. doi: 10.1177/1535370217693322.

141. Son ED, Choi GH, Kim H, Lee B, Chang IS, Hwang JS. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(8):1395-9. doi: 10.1248/bpb.30.1395.

142. Zurek A, Mizerska-Kowalska M, Slawinska-Brych A, Kalawaj K, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszen M, et al. Alpha ketoglutarate exerts a pro-osteogenic effect in osteoblast cell lines through activation of JNK and mTOR/S6K1/S6 signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;374:53-64. doi: 10.1016/j.taap.2019.04.024.

143. Kalawaj K, Slawinska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zurek A, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszen M, et al. Alpha ketoglutarate exerts in vitro anti-osteosarcoma effects through inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis via

the JNK and Caspase 9-dependent mechanism, and suppression of TGF-beta and VEGF production and metastatic potential of cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24). doi: 10.3390/ijms21249406.

144. Tian Q, Bravo Iniguez A, Sun Q, Wang H, Du M, Zhu MJ. Dietary Alpha-ketoglutarate promotes epithelial metabolic transition and protects against DSS-induced colitis. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(7):e2000936. doi: 10.1002/mnfr.202000936.

145. Bravo Iniguez A, Tian Q, Du M, Zhu MJ. Alpha-ketoglutarate promotes goblet cell differentiation and alters urea cycle metabolites in DSS-induced colitis mice. *Nutrients.* 2022;14(6). doi: 10.3390/nu14061148.

146. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-75. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.

147. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol.* 2011;101(1):13-30. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006.

148. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol.* 2024;98(5):1323-67. doi: 10.1007/s00204-024-03696-4.

149. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem.* 2023;11:1158198. doi: 10.3389/fchem.2023.1158198.

150. Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players. *J Food Biochem.* 2020;44(3):e13145. doi: 10.1111/jfbc.13145.

151. Long LH, Halliwell B. Artefacts in cell culture: alpha-ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;406(1):20-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.091.

152. Sokolowska M, Oleszek A, Wlodek L. Protective effect of alpha-keto acids on the oxidative hemolysis. *Pol J Pharmacol.* 1999;51(5):429-34.
153. Bayliak M, Burdyliuk N, Lushchak V. Growth on alpha-ketoglutarate increases oxidative stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Microbiol.* 2017;2017:5792192. doi: 10.1155/2017/5792192.
154. Hariharakrishnan J, Anand T, Satpute RM, Jayaraj R, Prasad GB, Bhattacharya R. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes in different organs of rats after subacute cyanide exposure: effect of alpha-ketoglutarate. *Drug Chem Toxicol.* 2009;32(3):268-76. doi: 10.1080/01480540902882218.
155. Niemiec T, Sikorska J, Harrison A, Szmidt M, Sawosz E, Wirth-Dzieciolowska E, et al. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice. *J Physiol Pharmacol.* 2011;62(1):37-43.
156. Greilberger J, Greilberger M, Wintersteiger R, Zangger K, Herwig R. Alpha-ketoglutarate: a potential inner mitochondrial and cytosolic protector against peroxynitrite and peroxynitrite-induced nitration? *Antioxidants (Basel).* 2021;10(9). doi: 10.3390/antiox10091501.
157. Liu L, Zhang W, Liu T, Tan Y, Chen C, Zhao J, et al. The physiological metabolite alpha-ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress. *Redox Biol.* 2023;62:102663. doi: 10.1016/j.redox.2023.102663.
158. Si X, Jia H, Liu N, Li J, Pan L, Wang J, et al. Alpha-ketoglutarate attenuates colitis in mice by increasing *Lactobacillus* abundance and regulating stem cell proliferation via Wnt-Hippo signaling. *Mol Nutr Food Res.* 2022;66(10):e2100955. doi: 10.1002/mnfr.202100955.
159. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:761264. doi: 10.1155/2014/761264.
160. Bayliak MM, Gospodaryov DV, Lushchak VI. Mimicking caloric restriction for anti-aging effects: the pro-oxidant role of alpha-ketoglutarate. *Current*

Opinion in Toxicology. 2022;30:100339. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2022.02.012>.

161. Demianchuk O, Lylyk M, Balatskiy V, Gospodaryov D, Bayliak M. Alpha-ketoglutarate supplementation in long-lived *Drosophila melanogaster*: impact on lifespan and metabolic responses. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2024;116(1):e22116. doi: 10.1002/arch.22116.

162. Demianchuk O, Vatashchuk M, Gospodaryov D, Hurza V, Ivanochko M, Derkachov V, et al. High-fat high-fructose diet and alpha-ketoglutarate affect mouse behavior that is accompanied by changes in oxidative stress response and energy metabolism in the cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2024;1868(1):130521. doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130521.

163. Lushchak VI. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J*. 2014;13:922-37.

164. Yuan Y, Xu P, Jiang Q, Cai X, Wang T, Peng W, et al. Exercise-induced alpha-ketoglutaric acid stimulates muscle hypertrophy and fat loss through OXGR1-dependent adrenal activation. *EMBO J*. 2020;39(7):e103304. doi: 10.15252/emboj.2019103304.

165. Radzki RP, Bienko M, Pierzynowski SG. Effect of dietary alpha-ketoglutarate on blood lipid profile during hypercholesterolaemia in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(2):175-80. doi: 10.1080/00365510802464633.

166. Tekwe CD, Yao K, Lei J, Li X, Gupta A, Luan Y, et al. Oral administration of alpha-ketoglutarate enhances nitric oxide synthesis by endothelial cells and whole-body insulin sensitivity in diet-induced obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(13):1081-8. doi: 10.1177/1535370219865229.

167. Liu M, Chen Y, Wang S, Zhou H, Feng D, Wei J, et al. Alpha-ketoglutarate modulates macrophage polarization through regulation of PPARgamma transcription and mTORC1/p70S6K pathway to ameliorate ALI/ARDS. *Shock*. 2020;53(1):103-13. doi: 10.1097/SHK.0000000000001333.

168. Ewa Śliwa PD, Marcin R. Tatara, Stefan G. Pierzynowski. Alpha-ketoglutarate partially protects newborns from metabolic changes evoked by chronic

maternal exposure to glucocorticoids. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2007;1(1):55-9.

169. Bhattacharya R, Kumar D, Sugendran K, Pant SC, Tulsawani RK, Vijayaraghavan R. Acute toxicity studies of alpha-ketoglutarate: a promising antidote for cyanide poisoning. *J Appl Toxicol*. 2001;21(6):495-9. doi: 10.1002/jat.786.

170. Sorochynska O, Bayliak M, Vasylyk Y, Kuzniak O, Drohomyska I, Klonovskyi A, et al. Intermittent fasting causes metabolic stress and leucopenia in young mice. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2019;91:53-64. doi: 10.15407/ubj91.01.053.

171. Bayliak MM, Sorochynska OM, Kuzniak OV, Drohomyska IZ, Klonovskyi AY, Hrushchenko AO, et al. High stability of blood parameters during mouse lifespan: sex-specific effects of every-other-day fasting. *Biogerontology*. 2022;23(5):559-70. doi: 10.1007/s10522-022-09982-x.

172. Houwen B. Blood film preparation and staining procedures. *Clin Lab Med*. 2002;22(1):1-14, v. doi: 10.1016/s0272-2712(03)00064-7.

173. Rathkolb B, Fuchs H, Gailus-Durner V, Aigner B, Wolf E, Hrabe de Angelis M. Blood collection from mice and hematological analyses on mouse blood. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2013;3(2):101-19. doi: 10.1002/9780470942390.mo130054.

174. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

175. Lushchak VI, Bagnyukova TV, Husak VV, Luzhna LI, Lushchak OV, Storey KB. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(8):1670-80. doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.024.

176. Sorochynska OM, Bayliak MM, Gospodaryov DV, Vasylyk YV, Kuzniak OV, Pankiv TM, et al. Every-other-day feeding decreases glycolytic and mitochondrial energy-producing potentials in the brain and liver of young mice. *Front Physiol*. 2019;10:1432. doi: 10.3389/fphys.2019.01432.

177. Shen A, Kim HJ, Oh GS, Lee SB, Lee S, Pandit A, et al. Pharmacological stimulation of NQO1 decreases NADPH levels and ameliorates acute pancreatitis in mice. *Cell Death Dis.* 2018;10(1):5. doi: 10.1038/s41419-018-1252-z.
178. Lushchak VI, Bahnjukova TV, Storey KB. Effect of hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion tissues. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(8):1059-67. doi: 10.1590/s0100-879x1998000800005.
179. Adelman RC, Ballard FJ, Weinhouse S. Purification and properties of rat liver fructokinase. *J Biol Chem.* 1967;242(14):3360-5.
180. Mogarekar MR, Chawhan SS. The determination of Q192R polymorphism of paraoxonase 1 by using non-toxic substrate p-nitrophenylacetate. *Indian J Hum Genet.* 2013;19(1):71-7. doi: 10.4103/0971-6866.112897.
181. Vatashchuk M, Hurza V, Bayliak M. Adapting of spectrophotometric assay of paraoxonase activity with 4-nitrophenylacetate for murine plasma and liver. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University.* 2023;9(4):6-14. doi: 10.15330/jpnu.9.4.6-14.
182. Mohanty BR, Sahoo PK, Mahapatra KD, Saha JN. Innate immune responses in families of indian major carp, *Labeo rohita*, differing in their resistance to *Edwardsiella tarda* infection. *Current Science.* 2007;92:1270-4.
183. Lushchak VI, Semchyshyn HM, Lushchak OV. The Classic methods to measure oxidative damage: lipid peroxides, thiobarbituric-acid reactive substances, and protein carbonyls. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems.* 2011. p. 420-31.
184. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159-65. doi: 10.1038/nprot.2006.378.
185. Lushchak OV, Kubrak OI, Nykorak MZ, Storey KB, Lushchak VI. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: possible protective role of glutathione. *Aquat Toxicol.* 2008;87(2):108-14. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.01.007.

186. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
187. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* 2008;2008:pdb prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot4986.
188. Hayden MR. Overview and new insights into the metabolic syndrome: risk factors and emerging variables in the development of type 2 diabetes and cerebrocardiovascular disease. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(3). doi: 10.3390/medicina59030561.
189. Athanasakis K, Bala C, Kokkinos A, Simonyi G, Karoliova KH, Basse A, et al. The economic burden of obesity in 4 south-eastern European countries associated with obesity-related co-morbidities. *BMC Health Serv Res.* 2024;24(1):354. doi: 10.1186/s12913-024-10840-4.
190. Sishi B, Loos B, Ellis B, Smith W, du Toit EF, Engelbrecht AM. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. *Exp Physiol.* 2011;96(2):179-93. doi: 10.1113/expphysiol.2010.054189.
191. Lechuga-Sancho AM, Gallego-Andujar D, Ruiz-Ocana P, Visiedo FM, Saez-Benito A, Schwarz M, et al. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191547. doi: 10.1371/journal.pone.0191547.
192. Dama A, Shpati K, Daliu P, Dumur S, Gorica E, Santini A. Targeting metabolic diseases: the role of nutraceuticals in modulating oxidative stress and inflammation. *Nutrients.* 2024;16(4). doi: 10.3390/nu16040507.
193. Jin Q, Liu T, Qiao Y, Liu D, Yang L, Mao H, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols. *Front Immunol.* 2023;14:1185317. doi: 10.3389/fimmu.2023.1185317.

194. Dmytriv TR, Duve KV, Storey KB, Lushchak VI. Vicious cycle of oxidative stress and neuroinflammation in pathophysiology of chronic vascular encephalopathy. *Front Physiol.* 2024;15:1443604. doi: 10.3389/fphys.2024.1443604.
195. Ziegler M, Wallert M, Lorkowski S, Peter K. Cardiovascular and Metabolic Protection by Vitamin E: A Matter of Treatment Strategy? *Antioxidants (Basel).* 2020;9(10). doi: 10.3390/antiox9100935.
196. Han J, Wang S, Wang H, Zhang T, Yang Y, Zhao T, et al. SIRT1 reduction contributes to doxorubicin-induced oxidative stress and meiotic failure in mouse oocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2023;476:116671. doi: 10.1016/j.taap.2023.116671.
197. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR-alpha activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition.* 2020;78:110791. doi: 10.1016/j.nut.2020.110791.
198. Hu S, Wang L, Yang D, Li L, Togo J, Wu Y, et al. Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. *Cell Metab.* 2018;28(3):415-31 e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.010.
199. Zapata RC, Singh A, Pezeshki A, Avirineni BS, Patra S, Chelikani PK. Low-protein diets with fixed carbohydrate content promote hyperphagia and sympathetically mediated increase in energy expenditure. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(21):e1900088. doi: 10.1002/mnfr.201900088.
200. Chaumontet C, Azzout-Marniche D, Blais A, Piedcoq J, Tome D, Gaudichon C, et al. Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2019;316(5):R486-R501. doi: 10.1152/ajpregu.00316.2018.
201. Burke B, Ahmad R, Staples KJ, Snowden R, Kadioglu A, Frankenberger M, et al. Increased TNF expression in CD43⁺⁺ murine blood monocytes. *Immunol Lett.* 2008;118(2):142-7. doi: 10.1016/j.imlet.2008.03.012.
202. Zhang D, Jiang X, Fang P, Yan Y, Song J, Gupta S, et al. Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates

atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation*. 2009;120(19):1893-902. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.866889.

203. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(6):H2411-9. doi: 10.1152/ajpheart.01098.2001.

204. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2(1):1. doi: 10.1186/2050-7771-2-1.

205. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1182-90. doi: 10.1038/ni1275.

206. Sato Mito N, Suzui M, Yoshino H, Kaburagi T, Sato K. Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. *J Nutr Health Aging*. 2009;13(7):602-6. doi: 10.1007/s12603-009-0170-2.

207. Costa M, Cruz E, Oliveira S, Benes V, Ivacevic T, Silva MJ, et al. Lymphocyte gene expression signatures from patients and mouse models of hereditary hemochromatosis reveal a function of HFE as a negative regulator of CD8⁺ T-lymphocyte activation and differentiation in vivo. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124246. doi: 10.1371/journal.pone.0124246.

208. Bayliak MM, Vatachchuk MV, Gospodaryov DV, Hurza VV, Demianchuk OI, Ivanochko MV, et al. High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: alpha-ketoglutarate effects. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022;1866(12):130226. doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130226.

209. Unruh D, Srinivasan R, Benson T, Haigh S, Coyle D, Batra N, et al. Red blood cell dysfunction induced by high-fat diet: potential implications for obesity-related atherosclerosis. *Circulation*. 2015;132(20):1898-908. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017313.

210. Raabe BM, Artwohl JE, Purcell JE, Lovaglio J, Fortman JD. Effects of weekly blood collection in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(5):680-5.
211. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*. 2013;27(1):41-53. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.003.
212. Xu K, Mo Y, Li D, Yu Q, Wang L, Lin F, et al. N(6)-methyladenosine demethylases Alkbh5/Fto regulate cerebral ischemia-reperfusion injury. *Ther Adv Chronic Dis*. 2020;11:2040622320916024. doi: 10.1177/2040622320916024.
213. Gao Y, Zimmer JT, Vasic R, Liu C, Gbyli R, Zheng SJ, et al. ALKBH5 modulates hematopoietic stem and progenitor cell energy metabolism through m(6)A modification-mediated RNA stability control. *Cell Rep*. 2023;42(10):113163. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113163.
214. Meyer KD, Jaffrey SR. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(5):313-26. doi: 10.1038/nrm3785.
215. Yang B, Liu Y, Xiao F, Liu Z, Chen Z, Li Z, et al. Alkbh5 plays indispensable roles in maintaining self-renewal of hematopoietic stem cells. *Open Med (Wars)*. 2023;18(1):20230766. doi: 10.1515/med-2023-0766.
216. Shen F, Huang W, Huang JT, Xiong J, Yang Y, Wu K, et al. Decreased N(6)-methyladenosine in peripheral blood RNA from diabetic patients is associated with FTO expression rather than ALKBH5. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(1):E148-54. doi: 10.1210/jc.2014-1893.
217. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KL, Wojtkiewicz G, et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One*. 2013;8(7):e67976. doi: 10.1371/journal.pone.0067976.
218. Hua W, Zhang X, Tang H, Li C, Han N, Li H, et al. AKG attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury through c-Fos/IL-10/Stat3 signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:6839385. doi: 10.1155/2022/6839385.
219. He L, Li H, Huang N, Zhou X, Tian J, Li T, et al. Alpha-ketoglutarate suppresses the NF-kappaB-mediated inflammatory pathway and enhances the PXR-

regulated detoxification pathway. *Oncotarget*. 2017;8(61):102974-88. doi: 10.18632/oncotarget.16875.

220. Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol*. 2014;24(5):313-20. doi: 10.1016/j.tcb.2013.11.008.

221. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018;128(2):545-55. doi: 10.1172/JCI96702.

222. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012;2012:736837. doi: 10.1155/2012/736837.

223. Lushchak VI, Storey KB. Oxidative stress concept updated: definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI J*. 2021;20:956-67. doi: 10.17179/excli2021-3596.

224. O'Neill CC, Locke EJ, Sipf DA, Thompson JH, Drebusenko EK, Berger NS, et al. The effects of exercise training on glucose homeostasis and muscle metabolism in type 1 diabetic female mice. *Metabolites*. 2022;12(10). doi: 10.3390/metabo12100948.

225. Muhling J, Tussing F, Nickolaus KA, Matejec R, Henrich M, Harbach H, et al. Effects of alpha-ketoglutarate on neutrophil intracellular amino and alpha-keto acid profiles and ROS production. *Amino Acids*. 2010;38(1):167-77. doi: 10.1007/s00726-008-0224-5.

226. Duval DL, Howard D, McCalden TA, Billings RE. The determination of myeloperoxidase activity in liver. *Life Sci*. 1990;47(24):PL145-50. doi: 10.1016/0024-3205(90)90164-m.

227. Bouzier-Sore AK, Bolanos JP. Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:89. doi: 10.3389/fnagi.2015.00089.

228. Dong XC. FOXO transcription factors in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res*. 2017;1(3):168-73. doi: 10.1016/j.livres.2017.11.004.

229. Laliotis GP, Bizelis I, Argyrokastritis A, Rogdakis E. Cloning, characterization and computational analysis of the 5' regulatory region of ovine glucose 6-phosphate dehydrogenase gene. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2007;147(4):627-34. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.04.001.
230. Samanta L, Swain N, Ayaz A, Venugopal V, Agarwal A. Post-translational modifications in sperm proteome: the chemistry of proteome diversifications in the pathophysiology of male factor infertility. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(7):1450-65. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.001.
231. Llavanera M, Delgado-Bermudez A, Fernandez-Fuertes B, Recuero S, Mateo Y, Bonet S, et al. GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of boar sperm. *J Anim Sci Biotechnol*. 2019;10:61. doi: 10.1186/s40104-019-0370-5.
232. Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice. *Biochem J*. 2002;365(Pt 2):405-16. doi: 10.1042/BJ20020320.
233. Mole PA. Impact of energy intake and exercise on resting metabolic rate. *Sports Med*. 1990;10(2):72-87. doi: 10.2165/00007256-199010020-00002.
234. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:22. doi: 10.3389/fcvm.2020.00022.
235. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320(3):C375-C91. doi: 10.1152/ajpcell.00379.2020.
236. Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, Wende AR, Abel ED. Cardiac energy metabolism in heart failure. *Circ Res*. 2021;128(10):1487-513. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318241.
237. Merz KE, Thurmond DC. Role of skeletal muscle in insulin resistance and glucose uptake. *Compr Physiol*. 2020;10(3):785-809. doi: 10.1002/cphy.c190029.

238. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica (Cairo)*. 2016;2016:5029414. doi: 10.1155/2016/5029414.

239. Kovacevic S, Brkljacic J, Vojnovic Milutinovic D, Gligorovska L, Bursac B, Elakovic I, et al. Fructose Induces visceral adipose tissue inflammation and insulin resistance even without development of obesity in adult female but not in male rats. *Front Nutr*. 2021;8:749328. doi: 10.3389/fnut.2021.749328.

240. Han CY, Umemoto T, Omer M, Den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *J Biol Chem*. 2012;287(13):10379-93. doi: 10.1074/jbc.M111.304998.

241. Littlejohns B, Pasdois P, Duggan S, Bond AR, Heesom K, Jackson CL, et al. Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. *PLoS One*. 2014;9(6):e100579. doi: 10.1371/journal.pone.0100579.

242. Gasparini PVF, Matias AM, Torezani-Sales S, Kobi J, Siqueira JS, Correa CR, et al. High-Fat and combined high-fat and sucrose diets promote cardiac oxidative stress independent of Nox2 redox regulation and obesity in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2021;55(5):618-34. doi: 10.33594/000000441.

243. Pinho RA, Sepa-Kishi DM, Bikopoulos G, Wu MV, Uthayakumar A, Mohasses A, et al. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free Radic Biol Med*. 2017;110:381-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.005.

244. Yang Q, Liang X, Sun X, Zhang L, Fu X, Rogers CJ, et al. AMPK/alpha-ketoglutarate axis dynamically mediates DNA demethylation in the Prdm16 promoter and brown adipogenesis. *Cell Metab*. 2016;24(4):542-54. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.010.

245. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
246. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13). doi: 10.3390/ijms21134777.
247. Vatashchuk MV, Bayliak MM, Hurza VV, Demianchuk OI, Gospodaryov DV, Lushchak VI. Alpha-ketoglutarate partially alleviates effects of high-fat high-fructose diet in mouse muscle. *EXCLI J.* 2023;22:1264-77. doi: 10.17179/excli2023-6608.
248. Sorochynska OM, Kuzniak OV, Bayliak MM, Vasylyk YV, Storey KB, Lushchak VI. Every-other-day fasting reduces glycolytic capability in the skeletal muscle of young mice. *Biologia.* 2021;76(5):1627-34. doi: 10.1007/s11756-021-00717-w.
249. Hagopian K, Tomilov AA, Kim K, Cortopassi GA, Ramsey JJ. Key glycolytic enzyme activities of skeletal muscle are decreased under fed and fasted states in mice with knocked down levels of Shc proteins. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124204. doi: 10.1371/journal.pone.0124204.
250. Wang L, Valencak TG, Shan T. Fat infiltration in skeletal muscle: Influential triggers and regulatory mechanism. *iScience.* 2024;27(3):109221. doi: 10.1016/j.isci.2024.109221.
251. Song MY, Ruts E, Kim J, Janumala I, Heymsfield S, Gallagher D. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):874-80. doi: 10.1093/ajcn/79.5.874.
252. Li CW, Yu K, Shyh-Chang N, Jiang Z, Liu T, Ma S, et al. Pathogenesis of sarcopenia and the relationship with fat mass: descriptive review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022;13(2):781-94. doi: 10.1002/jcsm.12901.
253. Rivas DA, McDonald DJ, Rice NP, Haran PH, Dolnikowski GG, Fielding RA. Diminished anabolic signaling response to insulin induced by intramuscular lipid accumulation is associated with inflammation in aging but not obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;310(7):R561-9. doi: 10.1152/ajpregu.00198.2015.

254. Hamrick MW, McGee-Lawrence ME, Frechette DM. Fatty infiltration of skeletal muscle: mechanisms and comparisons with bone marrow adiposity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:69. doi: 10.3389/fendo.2016.00069.
255. Barclay CJ. Energy demand and supply in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2017;38(2):143-55. doi: 10.1007/s10974-017-9467-7.
256. Hargreaves M, Spriet LL. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat Metab*. 2020;2(9):817-28. doi: 10.1038/s42255-020-0251-4.
257. Jensen J, Rustad PI, Kolnes AJ, Lai YC. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. *Front Physiol*. 2011;2:112. doi: 10.3389/fphys.2011.00112.
258. Urschel KL, McKenzie EC. Nutritional influences on skeletal muscle and muscular disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2021;37(1):139-75. doi: 10.1016/j.cveq.2020.12.005.
259. Goto-Inoue N, Yamada K, Inagaki A, Furuichi Y, Ogino S, Manabe Y, et al. Lipidomics analysis revealed the phospholipid compositional changes in muscle by chronic exercise and high-fat diet. *Sci Rep*. 2013;3:3267. doi: 10.1038/srep03267.
260. Martinez-Huenchullan SF, Maharjan BR, Williams PF, Tam CS, McLennan SV, Twigg SM. Differential metabolic effects of constant moderate versus high intensity interval training in high-fat fed mice: possible role of muscle adiponectin. *Physiol Rep*. 2018;6(4). doi: 10.14814/phy2.13599.
261. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*. 2008;94(2):231-41. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.049.
262. Racheck LI. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;121:267-92. doi: 10.1016/B978-0-12-800101-1.00008-9.
263. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, et al. The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur J Nutr*. 2015;54(2):183-92. doi: 10.1007/s00394-014-0699-7.

264. Varma V, Boros LG, Nolen GT, Chang CW, Wabitsch M, Beger RD, et al. Metabolic fate of fructose in human adipocytes: a targeted (13)C tracer fate association study. *Metabolomics*. 2015;11(3):529-44. doi: 10.1007/s11306-014-0716-0.
265. Leblanc PJ, Mulligan M, Antolic A, Macpherson L, Inglis JG, Martin D, et al. Skeletal muscle type comparison of pyruvate dehydrogenase phosphatase activity and isoform expression: effects of obesity and endurance training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(4):R1224-30. doi: 10.1152/ajpregu.90320.2008.
266. Rinnankoski-Tuikka R, Silvennoinen M, Torvinen S, Hulmi JJ, Lehti M, Kivela R, et al. Effects of high-fat diet and physical activity on pyruvate dehydrogenase kinase-4 in mouse skeletal muscle. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):53. doi: 10.1186/1743-7075-9-53.
267. Lee Y, Fluckey JD, Chakraborty S, Muthuchamy M. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced insulin resistance causes alterations in cellular bioenergetics and activation of inflammatory signaling in lymphatic muscle. *FASEB J*. 2017;31(7):2744-59. doi: 10.1096/fj.201600887R.
268. Siersbaek MS, Ditzel N, Hejbol EK, Praestholm SM, Markussen LK, Avolio F, et al. C57BL/6J substrain differences in response to high-fat diet intervention. *Sci Rep*. 2020;10(1):14052. doi: 10.1038/s41598-020-70765-w.
269. Shinozaki K, Naritomi H, Shimizu T, Suzuki M, Ikebuchi M, Sawada T, et al. Role of insulin resistance associated with compensatory hyperinsulinemia in ischemic stroke. *Stroke*. 1996;27(1):37-43. doi: 10.1161/01.str.27.1.37.
270. Abrigo J, Rivera JC, Aravena J, Cabrera D, Simon F, Ezquer F, et al. High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation, and myonuclear apoptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9047821. doi: 10.1155/2016/9047821.
271. Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mitch WE. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006;147(9):4160-8. doi: 10.1210/en.2006-0251.

272. Denies MS, Johnson J, Maliphol AB, Bruno M, Kim A, Rizvi A, et al. Diet-induced obesity alters skeletal muscle fiber types of male but not female mice. *Physiol Rep*. 2014;2(1):e00204. doi: 10.1002/phy2.204.

273. Bayliak M, Lylyk M, Vytvytska O, Lushchak V. Assessment of antioxidant properties of alpha-keto acids in vitro and in vivo. *European Food Research and Technology*. 2016;242:179-88. doi: 10.1007/s00217-015-2529-4.

274. Chen J, Su W, Kang B, Jiang Q, Zhao Y, Fu C, et al. Supplementation with alpha-ketoglutarate to a low-protein diet enhances amino acid synthesis in tissues and improves protein metabolism in the skeletal muscle of growing pigs. *Amino Acids*. 2018;50(11):1525-37. doi: 10.1007/s00726-018-2618-3.

275. Lambert BD, Filip R, Stoll B, Junghans P, Derno M, Hennig U, et al. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs. *J Nutr*. 2006;136(11):2779-84. doi: 10.1093/jn/136.11.2779.

276. Wang L, Yi D, Hou Y, Ding B, Li K, Li B, et al. Dietary supplementation with alpha-ketoglutarate activates mTOR signaling and enhances energy status in skeletal muscle of lipopolysaccharide-challenged piglets. *J Nutr*. 2016;146(8):1514-20. doi: 10.3945/jn.116.236000.

277. Cai X, Yuan Y, Liao Z, Xing K, Zhu C, Xu Y, et al. Alpha-ketoglutarate prevents skeletal muscle protein degradation and muscle atrophy through PHD3/ADRB2 pathway. *FASEB J*. 2018;32(1):488-99. doi: 10.1096/fj.201700670R.

278. Schmidt SL, Bessesen DH, Stotz S, Peelor FF, 3rd, Miller BF, Horton TJ. Adrenergic control of lipolysis in women compared with men. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(9):1008-19. doi: 10.1152/japplphysiol.00003.2014.

279. Yamamoto DL, Hutchinson DS, Bengtsson T. Beta(2)-adrenergic activation increases glycogen synthesis in L6 skeletal muscle cells through a signalling pathway independent of cyclic AMP. *Diabetologia*. 2007;50(1):158-67. doi: 10.1007/s00125-006-0484-0.

280. Rabaglia ME, Gray-Keller MP, Frey BL, Shortreed MR, Smith LM, Attie AD. Alpha-ketoisocaproate-induced hypersecretion of insulin by islets from diabetes-

susceptible mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(2):E218-24. doi: 10.1152/ajpendo.00573.2004.

281. Willenborg M, Panten U, Rustenbeck I. Triggering and amplification of insulin secretion by dimethyl alpha-ketoglutarate, a membrane permeable alpha-ketoglutarate analogue. *Eur J Pharmacol.* 2009;607(1-3):41-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.02.014.

282. Ghosh A, Abdo S, Zhao S, Wu CH, Shi Y, Lo CS, et al. Insulin inhibits Nrf2 gene expression via heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/K in diabetic mice. *Endocrinology.* 2017;158(4):903-19. doi: 10.1210/en.2016-1576.

283. Rapley J, Oshiro N, Ortiz-Vega S, Avruch J. The mechanism of insulin-stimulated 4E-BP protein binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 and its contribution to mTOR complex 1 signaling. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38043-53. doi: 10.1074/jbc.M111.245449.

284. Muta K, Morgan DA, Rahmouni K. The role of hypothalamic mTORC1 signaling in insulin regulation of food intake, body weight, and sympathetic nerve activity in male mice. *Endocrinology.* 2015;156(4):1398-407. doi: 10.1210/en.2014-1660.

285. Fu J, Xiong Z, Huang C, Li J, Yang W, Han Y, et al. Hyperactivity of the transcription factor Nrf2 causes metabolic reprogramming in mouse esophagus. *J Biol Chem.* 2019;294(1):327-40. doi: 10.1074/jbc.RA118.005963.

286. Bayliak MM, Demianchuk OI, Gospodaryov DV, Abrat OB, Lylyk MP, Storey KB, et al. Mutations in genes *cnc* or *dKeap1* modulate stress resistance and metabolic processes in *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2020;248:110746. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.110746.

287. Hammoutene A, Laouirem S, Albuquerque M, Colnot N, Brzustowski A, Valla D, et al. A new NRF2 activator for the treatment of human metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *JHEP Rep.* 2023;5(10):100845. doi: 10.1016/j.jhepr.2023.100845.

288. Jeoung NH, Harris RA. Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(1):E46-54. doi: 10.1152/ajpendo.00536.2007.

289. Khafagy R, Dash S. Obesity and cardiovascular disease: the emerging role of inflammation. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:768119. doi: 10.3389/fcvm.2021.768119.

290. Li W, Qiu X, Ma H, Geng Q. Incidence and long-term specific mortality trends of metabolic syndrome in the United States. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1029736. doi: 10.3389/fendo.2022.1029736.

291. Rus M, Crisan S, Andronie-Cioara FL, Indries M, Marian P, Pobirci OL, et al. Prevalence and risk factors of metabolic syndrome: a prospective study on cardiovascular health. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(10). doi: 10.3390/medicina59101711.

292. Bhatt BA, Dube JJ, Dedousis N, Reider JA, O'Doherty RM. Diet-induced obesity and acute hyperlipidemia reduce IkappaBalpha levels in rat skeletal muscle in a fiber-type dependent manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(1):R233-40. doi: 10.1152/ajpregu.00097.2005.

293. Lepczynski A, Ozgo M, Michalek K, Dratwa-Chalupnik A, Grabowska M, Herosimczyk A, et al. Effects of three-month feeding high fat diets with different fatty acid composition on myocardial proteome in mice. *Nutrients.* 2021;13(2). doi: 10.3390/nu13020330.

294. Clemente-Suarez VJ, Beltran-Velasco AI, Redondo-Florez L, Martin-Rodriguez A, Tornero-Aguilera JF. Global impacts of western diet and its effects on metabolism and health: a narrative review. *Nutrients.* 2023;15(12). doi: 10.3390/nu15122749.

295. Roberts MD, Mobley CB, Toedebush RG, Heese AJ, Zhu C, Krieger AE, et al. Western diet-induced hepatic steatosis and alterations in the liver transcriptome in adult Brown-Norway rats. *BMC Gastroenterol.* 2015;15:151. doi: 10.1186/s12876-015-0382-3.

296. Sun Y, Ge X, Li X, He J, Wei X, Du J, et al. High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis.* 2020;11(10):914. doi: 10.1038/s41419-020-03122-4.
297. Ballal K, Wilson CR, Harmancey R, Taegtmeyer H. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2010;344(1-2):221-30. doi: 10.1007/s11010-010-0546-y.
298. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(3). doi: 10.3390/antiox8030072.
299. Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calo LA. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:714653. doi: 10.1155/2013/714653.
300. Xu M, Zhang Q, Liu X, Lu L, Li Z. Impact of alpha-ketoglutarate on skeletal muscle health and exercise performance: a narrative review. *Nutrients.* 2024;16(22). doi: 10.3390/nu16223968.
301. Khitan Z, Kim DH. Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J Nutr Metab.* 2013;2013:682673. doi: 10.1155/2013/682673.
302. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015;59:1-41. doi: 10.1042/bse0590001.
303. Tanaka S, Nemoto Y, Takei Y, Morikawa R, Oshima S, Nagaishi T, et al. High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;522(4):971-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.158.
304. Melo BP, Zacarias AC, Oliveira JCC, de Souza LMC, Sabino J, Ferreira AVM, et al. Thirty days of combined consumption of a high-fat diet and fructose-rich beverages promotes insulin resistance and modulates inflammatory response and histomorphometry parameters of liver, pancreas, and adipose tissue in Wistar rats. *Nutrition.* 2021;91-92:111403. doi: 10.1016/j.nut.2021.111403.

305. Rasool S, Geetha T, Broderick TL, Babu JR. High fat with high sucrose diet leads to obesity and induces myodegeneration. *Front Physiol.* 2018;9:1054. doi: 10.3389/fphys.2018.01054.

306. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Bienko M, Radzki RP, Pierzynowski SG. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats. *Br J Nutr.* 2013;110(4):651-8. doi: 10.1017/S0007114512005570.

307. Shymanskyi I.O., Mazanova A.O., Lisakovska O.O., Labudzynskyi D.O., Makarova O.O., Komisarenko Yu.I., Veliky M.M. The role of vitamin D-auto-/paracrine system in the development of metabolic inflammation of liver tissue in experimental type 2 diabetes. *Endokrynologia.* 2021;26(3):271-280. doi:10.31793/1680-1466.2021.26-3.271.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Видання, що входять до наукометричної бази даних Scopus:

1. **Vatashchuk M. V.**, Bayliak M. M., Hurza V. V., Storey K. B., & Lushchak V. I. Metabolic syndrome: lessons from rodent and *Drosophila* models. *BioMed research international*. 2022. № 2022. 5850507. ISSN: 23146133.

DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5850507>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85133257893&origin=resultslist>

2. Bayliak M. M., **Vatashchuk M. V.**, Gospodaryov D. V., Hurza V. V., Demianchuk O. I., Ivanochko M. V., Burdyliuk N. I., Storey K. B., Lushchak O., & Lushchak V. I. High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: alpha-ketoglutarate effects. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. 2022. № 1866(12). 130226. ISSN: 03044165.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130226>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85136514964&origin=resultslist>

3. **Vatashchuk, M. V.**, Bayliak, M. M., Hurza, V. V., Demianchuk, O. I., Gospodaryov, D. V., & Lushchak, V. I. Alpha-ketoglutarate partially alleviates effects of high-fat high-fructose diet in mouse muscle. *EXCLI journal*. 2023. № 22. P. 1264–1277. ISSN: 16112156.

DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2023-6608>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85179361428&origin=resultslist>

Фахові видання України (категорія Б):

4. **Vatashchuk M.**, Hurza V., & Bayliak M. Adapting of spectrophotometric assay of paraoxonase activity with 4-nitrophenylacetate for murine plasma and liver. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*. 2023. № 9(4). P. 6–14. ISSN: 2413-2349.

DOI: <https://doi.org/10.15330/jpnu.9.4.6-14>

URL: <https://journals.pnu.edu.ua/index.php/jpnu/article/view/6610>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Ватащук М.**, Гурза В., Сорочинська О., Байляк М., Лушак В. Вплив альфа-кетоглютарату на антропометричні параметри мишей // *XIX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»* (м. Львів, 3–4 грудня 2020р.). – С. 40.

URL:

https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2020/4/AB_2020_22_4_6_conf.pdf

2. **Ватащук М.**, Гурза В., Дем'янчук О., Байляк М., Лушак В. Вплив дієти з високим вмістом жирів та альфа-кетоглютарату на антропометричні показники та активність мітохондріальних комплексів у печінці мишей // *XVII Міжнародна наукова конференція для студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 19–21 квітня 2021р.). – С.32.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2021/04/MIP_2021.pdf

3. О.І. Дем'янчук, Д.В. Господарьов, **М.В. Ватащук**, М.П. Лирик, М.М. Байляк. Вплив дієти з високим вмістом жирів і фруктози на гліколіз і фруктоліз та коригувальний ефект альфа-кетоглютарату // *XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених* (м. Львів, 19 травня 2022р.). – С. 37.

URL:

https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2022/2/AB_2022_24_2_conference.pdf

4. **Vatashchuk M.**, Hurza V., Bayliak M. Effects of high-calorie diet and alpha-ketoglutarate on the content of lipid peroxides in mouse tissues // *All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the russian invader* (Kyiv, from 15 th to 17 th of June 2022). – P. 101.

URL: [https://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20the%20All-Ukrainian%20Conference%20on%20Molecular%20and%20Cell%20Biology%20with%20international%20participation%20\(Apdated\).pdf](https://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20the%20All-Ukrainian%20Conference%20on%20Molecular%20and%20Cell%20Biology%20with%20international%20participation%20(Apdated).pdf)

5. **Ватащук М.**, Гурза В, Байляк М., Лушак В. Ефекти дієти з високим вмістом жиру та фруктози і альфа-кетоглютарату на вміст метаболітів у печінці та плазмі молодих мишей // VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (м. Дніпро, 6–7 жовтня 2022р.). – С.143-144.

URL: <https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2022/10/Abstract-book-Dnipro-2022.pdf>



Міністерство освіти і науки України
Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

вул. Шевченка, 57, м. Івано-Франківськ, 76018, тел. (0342) 75-23-51, факс (0342) 53-15-74
 е-mail office@pnu.edu.ua, сайт https://pnu.edu.ua, код ЄДРПОУ 02125266

31.01.2025 № 03.04-29/06

На № _____ від _____

Довідка

про впровадження результатів дисертаційного дослідження
Ваташук Мирослави Володимирівни на тему
«Енергетичні та вільнорадикальні процеси у мишей за споживання
висококалорійної їжі та альфа-кетоглутарату»
 представленого на здобуття наукового ступеня доктора філософії
 за спеціальністю 091 Біологія

Матеріали наукового дослідження Ваташук Мирослави Володимирівни впроваджені та використовуються в освітньому процесі кафедри біохімії та біотехнології факультету природничих наук Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Результати роботи використовуються для підготовки лекцій, практичних і лабораторних занять із курсу «Моделі біохімічних досліджень» (результати досліджень включені в тему «Лабораторні миші як модельний об'єкт» – 2 год лекційних і 2 год практичних); «Основи роботи з лабораторними мишами» (результати досліджень включені в теми «Дозування речовин та способи введення їх мишам» – 2 год лекційних і 2 год практичних); «Біологічно активні природні речовини» (результати досліджень включені в тему «Альфа-кетоглутарат як харчовий додаток» – 2 год лекційних і 2 год практичних) та «Великий практикум з біохімії» (результати досліджень включені в тему «Спектрофотометричні методи. Визначення активності параоксонази» – 2 год лабораторних).

З огляду на високий науковий рівень дисертації Ваташук М.В. й актуальність наукової проблематики роботи, стверджуємо про доцільність впровадження його результатів у практику закладів вищої освіти України.

Довідку про апробацію та впровадження результатів дослідження Ваташук М.В. затверджено на засіданні кафедри біохімії та біотехнології (протокол № 10 від 28 січня 2025 року).

Перший проректор

Валентина ЯКУБІВ

Завідувач кафедри біохімії та біотехнології

Марія БАЙЛЯК

