

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>