

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

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГУРЗА ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.1+591.5+612.015+612.39+591.39

**Дисертація
КОРЕКЦІЯ ДІЄТОЮ СПРИЧИНЕНИХ ВІКОМ ТА СПОЖИВАННЯМ
МАРГАРИНУ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У МИШЕЙ:
ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН ТА ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС**

Спеціальність 091 Біологія
Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктор філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідні джерела
_____В.В. Гурза

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор,
Луцак Володимир Іванович

Івано-Франківськ – 2025

АНОТАЦІЯ

Гурза В.В. Корекція дієтою спричинених віком та споживанням маргарину метаболічних порушень у мишей: енергетичний обмін та оксидативний стрес. – 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.

Наукова робота виконана на базі кафедри біохімії та біотехнології факультету природничих наук Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника (Івано-Франківськ, Україна) та частково кафедри нейрофізіології, Інститут фізіології, Тюбінгенського університету імені Еберхарда Карла (Тюбінген, Німеччина) протягом 2020-2025 років.

Дисертація складається з двох частин. Перша частина присвячена дослідженню впливу маргарин-вмісної їжі окремо та в поєднанні з водним відваром квітів ромашки лікарської (ВВР) або режимом голодування через день (ГЧД), як потенційних харчових модуляторів, що здатні змінювати перебіг метаболічних процесів в організмі мишей. Для дослідження були використані миші лінії *C57BL/6J* обох статей, яким протягом чотирьох місяців до лабораторного корму додавали маргарин 70% жирності, маргарин та ВВР, а також застосовували ГЧД на тлі маргарин-вмісної їжі. Метою першої частини роботи було виявити чи збагачена маргарином їжа може викликати метаболічний синдром (МС), або пов'язані з ним порушення, а також чи додавання ВВР або застосування ГЧД зможуть пом'якшити негативні ефекти, які можуть виникнути внаслідок споживання маргарину. Також метою роботи було перевірити чи однаково будуть реагувати самці та самки мишей на дослідні види харчування.

Одними із ключових ознак МС є наявність ожиріння, високі рівні триацилгліцеридів (ТАГ) та глюкози, розвиток інсулінорезистентності, а також запалення та оксидативного стресу (ОС). Для того, щоб перевірити які порушення могли виникнути у мишей після споживання їжі з маргарином, було визначено

морфометричні, фізіологічні та біохімічні показники. Протягом дослідження було виявлено, що споживання маргарину окремо та на тлі ВВР або ГЧД не викликало розвиток ожиріння. При цьому індекс маси тіла та індекс ожиріння Лі були у межах норми, хоча самки, які споживали маргарин постійно, та самці на ГЧД набирали масу швидше, ніж інші групи. Як самці, так і самки, у всіх експериментальних групах споживали менше їжі та пили менше води, або ВВР, ніж в контролі. Було виявлено, що тварини віддають перевагу маргарину порівняно з лабораторним кормом. Хоча обидві статі на експериментальних раціонах споживали менше їжі, дослідні самці отримували більше калорій, ніж контрольні, а самки таку ж кількість калорій, як і контрольна група. Отримані у цій роботі результати вказують на те, що споживання маргарину протягом чотирьох місяців має сильніший негативний вплив на самок мишей, ніж на самців. Крім того, що вони набирали масу тіла швидше, у них було виявлено нижчу активність параоксонази (ПОН) в плазмі крові. Це підтверджує розвиток ОС в печінці, нирках та корі головного мозку. На противагу самкам, у самців був високий рівень пероксидів ліпідів (ПЛ) у жировій тканині, та спостерігалась тенденція до збільшення рівня інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β), що свідчить про слабкі ознаки запалення. Також вони мали сильнішу інтенсивність ОС у корі головного мозку. При цьому в печінці дослідних тварин активність каталази була вищою, що зумовило зменшення ОС у цьому органі. Як у самців, так і у самок після споживання маргарину активність гліколітичних ферментів (фосфофруктокінази та піруваткінази) печінки була вищою, що може вказувати на інтенсифікацію гліколізу.

Додавання ВВР до збагаченої маргарином їжі запобігало набору маси тіла самок та покращувало споживання їжі у самців. Проте ромашка по-різному впливала на органи тварин. У самок ВВР проявляв антиоксидантні властивості у печінці та сприяв зменшенню рівня глюкози у плазмі крові. У самців ВВР збільшив активність глутатіонпероксидази (ГП) у нирках, але посилив ОС у серці. У корі головного мозку як самців, так і самок не було виявлено ознак ОС, що свідчить про позитивний вплив ВВР на мозок тварин.

Цим дослідженням вперше показано, що застосування ГЧД разом із маргарином може бути шкідливим для самців мишей. Окрім того, що вони швидше набирали масу тіла, ці тварини також були схильні до переїдання у дні, коли мали доступ до їжі. У крові самців був підвищений загальний вміст лейкоцитів, що є ознакою розвитку запальних процесів у організмі. Також у плазмі крові було виявлено низький рівень ТАГ, але високий рівень глюкози. У печінці самців спостерігали накопичення ТАГ на тлі низького вмісту глікогену. Разом із результатами, отриманими у плазмі крові, це свідчить про порушення гліколітичного та ліпідного обміну. Було виявлено розвиток ОС у серці самців, проте активність ГП у нирках та корі головного мозку була вищою, що вказує на слабку антиоксидантну дію ГЧД у цих органах. Самки мишей навпаки показали позитивні зміни після застосування такого режиму харчування. На відміну від тварин, які постійно споживали маргарин, самки, які періодично голодували, набирали вагу повільніше. Також у них був нижчий рівень маркерів запалення, активність МПО у плазмі крові та ІЛ-1 β у жировій тканині. Було виявлено зменшення інтенсивності ОС у печінці та збільшення активності антиоксидантних ферментів у нирках та серці самок. Проте ГЧД не запобігало розвитку ОС у корі головного мозку мишей цієї статі.

Загалом отримані результати свідчать про сильнішу вразливість самок до харчування збагаченого маргарином, а самців до ГЧД, проте не вказують на розвиток МС, а лише на певні порушення пов'язані з ним. Відвар ромашки завдяки своїм антиоксидантним властивостям може зменшувати негативний вплив маргарину в самок, але не у самців. Режим харчування через день теж виявляє більшу позитивну дію для самок, хоча не захищає кору головного мозку від розвитку ОС.

Друга частина дисертаційної роботи присвячена дослідженню впливу калорійного обмеження (КО) як такого режиму харчування, що може зменшувати пошкодження в організмі, які виникають з віком. Це дослідження було проведене на мишах лінії *C57BL/6N* середнього та старшого віку. Після досягнення тваринами трьох та шести місяців, середнього та старшого віку відповідно, їм

давали на 30% менше їжі. Така дієта тривала до досягнення тваринами дев'яти (середнього віку) та вісімнадцяти (старшого віку) місяців. Метою цієї частини роботи було перевірити, чи буде КО викликати зміни у системі захисту від активних форм кисню (АФК) у печінці, нирках та корі головного мозку, а також чи впливатиме такий тип харчування на інтенсивність гліколізу печінки дослідних тварин.

Відомо, що протягом старіння в організмі послаблюються системи захисту, а рівень пошкоджень в клітинах зростає, що є причиною збільшення кількості АФК. Обмеження в харчуванні може діяти як слабкий стресовий фактор, який активує антиоксидантну систему. Це дослідження показало, що КО зменшило інтенсивність ОС у тварин середнього віку, але не мало впливу на групу старшого віку. Зокрема, було виявлено нижчий рівень ПЛ у нирках та корі головного мозку, в корі головного мозку на тлі вищої активності глутатіон-залежних ферментів у мишей середнього віку. Також було виявлено, що після КО у тварин середнього віку була вища активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, проте у мишей старшого віку її активність була меншою. Разом із нижчою активністю ферментів гліколізу та низьким вмістом глюкози у печінці, це свідчить про інтенсивнішу роботу пентозофосфатного шляху в тварин середнього віку, яким обмежували калорійність їжі. Саме посилення інтенсивності цього шляху сприяє виробленню НАДФН, який є коферментом для глутатіонової системи захисту від АФК.

Дані, які було отримано протягом дисертаційного дослідження, поглиблюють знання про вплив висококалорійних продуктів, зокрема маргарину, а також ВВР та ГЧД на морфометричні, фізіологічні та біохімічні показники, зокрема на стан про-/антиоксидантної системи і енергетичного обміну, а також про зміни в цих системах, які можуть викликатися КО, що застосували у середньому та старшому віці. Спираючись на ці результати, відвар ромашки та періодичне голодування можна рекомендувати для подальших досліджень на пацієнтах жіночої статі, які мають початкові ознаки МС, а КО – на особах середнього віку з метою пом'якшення порушень, які пов'язані зі старінням.

Ключові слова: антиоксидантні ферменти; відвар ромашки; гліколіз; запалення; калорійне обмеження; маргарин; маса тіла; метаболічний синдром; миші; оксидативний стрес; періодичне голодування; пероксиди ліпідів; печінка; старіння; триацилгліцериди.

ANNOTATION

Hurza V.V. Dietary correction of age- and margarine-induced metabolic disorders in mice: energy metabolism and oxidative stress. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis 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 study was conducted at the Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University (Ivano-Frankivsk, Ukraine) and partially at Department of Neurophysiology, Institute of Physiology, Eberhard Karls University of Tübingen (Tübingen, Germany) during 2020-2025.

The dissertation consists of two parts. The first part is devoted to the study of the effect of margarine-containing foods separately and in combination with a chamomile flower water decoction (CWD) or every-other-day fasting regimen (EODF) as potential supplements to nutrition that can change the course of metabolic processes in the mice body. For the study, *C57BL/6J* mice of both sexes were used, which were fed 70%-fat margarine, margarine and CWD, and margarine with EODF for four months. The study aimed to determine whether margarine-enriched food can cause metabolic syndrome (MS) or related disorders, and whether the addition of CWD or the use of EODF can mitigate negative effects that may arise from margarine consumption. Another goal was to test whether male and female mice would respond equally to the experimental diet.

Obesity is one of the key features of MS, along with high levels of triacylglycerols (TAG) and glucose, the development of insulin resistance,

inflammation, and oxidative stress (OS). Morphometric, physiological, and biochemical parameters were determined to check what disturbances may occur in mice after consuming food with margarine. The study showed that margarine consumption alone, and in combination with CWD or EODF, did not cause obesity. At the same time body mass index and Lee's obesity index were within normal limits, although females who consumed margarine constantly and males who were on the EODF gained weight faster than other groups. Both males and females in all experimental groups consumed less food and drank less water, or CWD compared with controls. It was found that the animals preferred margarine to laboratory chow. Although both sexes consumed less food on the studied regimens, the experimental males received more calories than the control males, and the females received the same amount as the control group. The results obtained in this study indicate that consumption of margarine for four months has a stronger negative effect on female mice compared with males. In addition to gaining body weight faster, they had lower plasma paraoxonase (PON) activity. This indicates the development of OS in the liver, kidneys, and cerebral cortex. In contrast to females, males had elevated levels of lipid peroxides (LOOH) in adipose tissue and a tendency to increase interleukin-1 β (IL-1 β) levels, indicating mild signs of inflammation. They also had a higher intensity of OS in the cerebral cortex. At the same time, in the liver, higher catalase activity was observed, which led to a decrease in OS in this organ. In both males and females, the activity of hepatic glycolytic enzymes (phosphofructokinase and pyruvate kinase) was higher after margarine consumption, which is a sign of more intense glycolysis.

Adding CWD to margarine-enriched food prevented weight gain in females and improved food intake in males. However, chamomile had different effects on animal organs. In females, CWD showed antioxidant properties in the liver and caused lower plasma glucose levels. In males, BBR induced higher glutathione peroxidase (GPx) activity in the kidneys, but intensified OS in the heart. No signs of OS were found in the cerebral cortex of both males and females, indicating a positive effect of CWD on the animal brain.

This study is the first to show that consumption of EODF together with margarine can be harmful to male mice. In addition to gaining weight faster, these animals also tended to overeat on days when they had access to food. In the blood of males, the total number of leukocytes was higher, which is a sign of inflammatory processes. They also had low plasma TAG levels but high glucose levels. In the liver of males, accumulation of TAG was observed with low glycogen content. Together with the results obtained in the blood plasma, this indicates a disturbance in glycolytic and lipid metabolism. The development of OS was detected in the heart of males, but the activity of GPx in the kidney and cerebral cortex was higher, indicating a weak antioxidant effect of EODF in these organs. Female mice, on the other hand, showed positive changes after using this diet. In contrast to animals that constantly consumed margarine, females that periodically starved gained body weight more slowly. They also had lower levels of inflammatory markers, lower plasma MPO activity, and lower levels of IL-1 β in adipose tissue. We found a lower intensity of OS in the liver and higher activity of antioxidant enzymes in the kidneys and heart of females. However, EODF did not prevent the development of OS in the cerebral cortex of mice of this sex.

Overall, the results indicate a greater vulnerability of females to margarine-enriched diets and males to EODF, but do not indicate the development of MS, only certain associated comorbidities. Due to its antioxidant properties, chamomile decoction can reduce the negative effects of margarine on females, but not on males. Fasting every other day also shows a greater positive effect for females, although it does not protect cerebral cortex from development OS.

The second part of the dissertation is devoted to studying the impact of caloric restriction (CR) as a dietary regimen that can reduce the damage in the body that occurs with age. The study was conducted on middle-aged and older *C57BL/6N* mice. When the animals reached three and six months, middle age and older, respectively, they were given 30% less food. This diet continued until the animals reached nine (middle-aged) and eighteen (older) months. This part of the study aimed to test whether CR would cause changes in the defense system against reactive oxygen species (ROS) in the liver,

kidneys, and brain cortex and whether this type of nutrition would affect the intensity of liver glycolysis in experimental animals.

It is known that during aging, the body's ROS defense systems weaken, and the level of damage in cells increases, which leads to increasing ROS levels. Dietary restriction can act as a mild stressor that activates the antioxidant system. This study showed that CR reduced the intensity of OS in middle-aged animals but had no effect on the older group. In particular, lower levels of LOOH were found in the kidneys and cerebral cortex, in the cortex to the higher activity of glutathione-dependent enzymes in middle-aged mice. It was also shown middle-aged animals had higher glucose-6-phosphate dehydrogenase activity under CR conditions, but its activity was lower at older group. Combined with the lower activity of glycolytic enzymes and low glucose content in hepatocytes, this indicates that the pentose phosphate pathway is intensive in middle-aged animals that were restricted in caloric intake. It is the increase in the intensity of this pathway that contributes to the production of NADPH, which is a coenzyme for the glutathione system of defense against ROS.

The data obtained in the dissertation research deepen the knowledge of the effect of high-calorie foods, in particular margarine, CWD, and EODF on morphometric, physiological, and biochemical parameters of mice, on the pro-/antioxidant system, and energy metabolism, as well as changes in these systems that may be induced by the use of CR in middle age and older. Based on these results, chamomile decoction and intermittent fasting can be recommended for further research in female patients with early signs of MS, and CR in middle-aged people to mitigate aging-related disorders.

Key words: aging; antioxidant enzymes; caloric restriction; chamomile decoction; glycolysis; inflammation; margarine; body weight; metabolic syndrome; mice; oxidative stress; intermittent fasting; lipid peroxides; liver; triacylglycerols.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані наукові результати дисертації:

Видання, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Vatashchuk M., Hurza V., Stefanyshyn N., Bayliak M., Gospodaryov D., Garaschuk O., Lushchak V. Impact of caloric restriction on oxidative stress and key glycolytic enzymes in the cerebral cortex, liver and kidney of old and middle-aged mice. *Neuropharmacology*. 2024. № 247. 109859. ISSN: 0028-3908.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109859>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85184921348&origin=resultslist>

Фахові видання України (категорія Б):

2. Hurza V., Vatashchuk M., Bayliak M. Pathogenesis and biomarkers of metabolic syndrome. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*. 2021. № 8(4). P. 7-19.

DOI: <https://doi.org/10.15330/jpnu.8.4.7-19>

URL: <https://journals.pnu.edu.ua/index.php/jpnu/article/view/6136>

3. Hurza V., Vatashchuk M., Bayliak M. A margarine-supplemented diet alone and in combination with chamomile decoction decreases food intake but has a mild effect on body mass in mice. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*. 2023. № 10. P. 45-55.

DOI: <https://doi.org/10.15330/jpnubio.10.45-55>

URL: <https://journals.pnu.edu.ua/index.php/jpnubio/article/view/7625>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М., Луцак В.І. Вплив маргарину на масу тіла та інтенсивність споживання корму у мишей // *XIX Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція молодих вчених «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»* (м. Львів, 3-4 грудня 2020 рік). – С. 52.

URL: https://www.inenbiol.com/images/stories/konfer/2020/AB_2020_22_4co nf.pdf

2. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М., Луцак В.І. Вплив різних

типів дієт на масу тіла й інтенсивність споживання їжі у мишей // *XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 19-21 квітня 2021 рік). – С. 205.

URL: <https://sci.ldubgd.edu.ua/bitstream/123456789/8700/1/6.pdf>

3. Гурза В.В., Ватащук М.В., Дем'янчук О.І. Вплив маргарину на вміст пероксидів ліпідів у різних органах мишей // *XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених* (м. Львів, 19 травня 2022 рік). – С. 35.

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

4. Hurza V.V., Vatachchuk M.V., Bayliak M.M. Effects of margarine on activity of antioxidant enzymes in the mouse liver // *The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation* (Kyiv, June 15-17, 2022). – P. 35.

URL: <http://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20All-Ukrainian%20Conference%20of%20Molecular%20and%20Cell%20Biology.pdf>

5. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М. Вплив маргарин-вмісної їжі на деякі біохімічні показники у печінці та плазми крові мишей // *VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології»* (м. Дніпро, 6-7 жовтня 2022 рік). – С. 170.

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

6. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М. Вплив маргарину та водного відвару ромашки на антиоксидантну систему печінки мишей // *92 науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023 рік). – С. 14.

URL: <https://www.scribd.com/document/714930730/Матеріали-92-конференції-Інновації-в-медицині-та-фармації-с-48-53-2023pdf>

7. Hurza V.V., Vatachchuk M.V., Bayliak M.M., Lushchak V.I. Influence of margarine diet alone and on the background of feeding every other day on the

antioxidant system of mouse liver and heart // *48-th FEBS Congress “Mining biochemistry for human health and well being”* (Milan, Italy, 29 June – 3 July 2024). – P. 443.

URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/2211-5463.13837>

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ВПЛИВ ВИСОКОКАЛОРІЙНОГО ХАРЧУВАННЯ, ФЛАВОНОЇДІВ ТА ДІЄТИЧНОГО ОБМЕЖЕННЯ НА РОЗВИТОК МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ	25
1.1. Метаболічний синдром та його характеристика	25
1.1.1. Визначення метаболічного синдрому.....	25
1.1.2. Інсулінорезистентність за умов метаболічного синдрому	26
1.1.3. Основні маркери запалення при метаболічному синдромі	28
1.1.4. Оксидативний стрес та метаболічний синдром	30
1.2. Маргарин як потенційний фактор розвитку метаболічного синдрому	34
1.3. Флавоноїди та ромашка лікарська, як потенційні протектори при метаболічних порушеннях	37
1.3.1. Флавоноїди та їх вплив на показники метаболічного синдрому	37
1.3.2. Ромашка лікарська. Її склад та корисні властивості	39
1.3.3. Потенційний захисний вплив ромашки за умов метаболічного синдрому	43
1.4. Періодичне голодування як потенційний засіб захисту при метаболічних порушеннях.....	49
1.5. Обмеження калорійності як засіб захисту організму від пошкоджень викликаних старінням	52
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	54
2.1. Схема експерименту з додаванням маргарину.....	54
2.2. Схема експерименту із використанням калорійного обмеження	57
2.3. Приготування водного відвару квітів ромашки	58

2.4. Визначення морфометричних та фізіологічних показників	58
2.5. Забір зразків.....	59
2.6. Приготування мазків крові та їх аналіз.....	60
2.7. Приготування супернатантів	60
2.8. Визначення вмісту інтерлейкіну-1 β	61
2.9. Визначення активності параоксонази	62
2.10. Визначення активності мієлопероксидази.....	63
2.11. Визначення вмісту пероксидів ліпідів	64
2.12. Визначення вмісту тіолових груп	64
2.13. Визначення активності глутатіон-S-трансферази	65
2.14. Визначення активності глутатіонпероксидази	66
2.15. Визначення активності каталази	66
2.16. Визначення активності супероксиддисмутази	67
2.17. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази	67
2.18. Визначення активності піруваткінази та фосфофруктокінази	68
2.19. Визначення вмісту глюкози та глікогену	68
2.20. Визначення вмісту триацилгліцеридів.....	69
2.21. Визначення вмісту загального холестеролу	70
2.22. Визначення вмісту загального білку.....	70
2.23. Статистична обробка даних.....	71
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ МАРГАРИН-ВМІСНОЇ ЇЖИ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ТА	
ФІЗІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ МИШЕЙ.....	73
3.1. Зміна морфометричних показників мишей, які споживали маргарин з	
додаванням відвару ромашки та застосуванням голодування через день.....	73

- 3.2. Зміна фізіологічних показників мишей, які споживали маргарин з додаванням відвару ромашки та застосуванням періодичного голодування 78

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ХАРЧУВАННЯ З ДОДАВАННЯМ МАРГАРИНУ, ВІДВАРУ РОМАШКИ ТА ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА ЛЕЙКОЦИТАРНУ ФОРМУЛУ КРОВІ ТА МАРКЕРИ ЗАПАЛЕННЯ 87

- 4.1. Вплив маргарин-вмісної їжі разом з відваром ромашки та голодуванням через день на лейкоцитарну формулу крові дослідних тварин 87

- 4.2. Маркери запалення у плазмі крові та в жировій тканині дослідних тварин 92

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ЇЖІ З МАРГАРИНОМ ТА ДОДАВАННЯМ ВІДВАРУ РОМАШКИ, АБО ЗАСТОСУВАННЯМ ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ МИШЕЙ 97

- 5.1. Маркери оксидативного стресу в різних органах мишей, які споживали маргарин-вмісну їжу окремо, з додаванням відвару ромашки чи застосуванням періодичного голодування 97

- 5.2. Вплив відвару ромашки та голодування через день на фоні їжі з додаванням маргарину на антиоксидантну систему захисту мишей 104

- 5.2.1. Вплив експериментальних видів харчування на антиоксидантну систему печінки 104

- 5.2.2. Вплив маргарину, відвару ромашки та голодування через день на активність глутатіон-залежних ферментів у різних органах дослідних мишей 111

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ МАРГАРИН-ВМІСНОЇ ЇЖІ ОКРЕМО ТА В ПОЄДНАННІ З ВІДВАРОМ РОМАШКИ ТА ПЕРІОДИЧНИМ ГОЛОДУВАННЯМ НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МИШЕЙ 121

- 6.1. Зміни рівня головних метаболітів у плазмі крові дослідних тварин 121

- 6.2. Метаболічні зміни в печінці дослідних тварин 123

6.3. Вплив дослідного харчування на рівень триацилгліцеридів у різних органах мишей	132
РОЗДІЛ 7. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ЕКСПЕРИМЕНТУ З ДОДАВАННЯМ МАРГАРИНУ, ВІДВАРУ РОМАШКИ ТА ЗАСТОСУВАННЯМ ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ	134
РОЗДІЛ 8. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КАЛОРІЙНОГО ОБМЕЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	144
8.1. Вплив калорійного обмеження на зміну інтенсивності оксидативного стресу в мишей різного віку.....	144
8.2. Вплив калорійного обмеження на рівень субстратів гліколізу та активність гліколітичних ферментів	148
ВИСНОВКИ	153
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	154
ДОДАТКИ	193

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ВВР – водний відвар квітів ромашки

ВКЇ – висококалорійна їжа

Г6Ф – глюкозо-6-фосфат

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

ГП – глутатіонпероксидаза

ГЧД – голодування через день

ГST – глутатіон-S-трансфераза

ГSH – відновлений глутатіон

ДТНБ – 2-нітро-5-тіобензоат

ДТТ – дитіотрейтол

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЖК – жирні кислоти

ІЛ-1 β – інтерлейкін-1 β

ІЛ-6 – інтерлейкін-6

ІМТ – індекс маси тіла

КО – калорійне обмеження

КФБ – калій-фосфатний буфер

ЛПВГ – ліпопротеїди високої густини

ЛПНГ – ліпопротеїди низької густини

МДА – малоновий діальдегід

МОП – мієлопероксидаза

МС – метаболічний синдром

НАД – окислений нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДН – відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФ – окислений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НАДФН – відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки

ОС – оксидативний стрес

ПК – піруваткіназа

ПЛ – пероксиди ліпідів

ПОН – параоксоназа

ПФШ – пентозофосфатний шлях

СОД – супероксиддисмутаза

СРБ – С-реактивний білок

ССЗ – серцево-судинні захворювання

ТАГ – триацилгліцериди

ТНЖК – транс-ненасичені жирні кислоти

ТХО – трихлороцтова кислота

ФАДН₂ – відновлений флавінаденіндинуклеотид

ФБ – фосфатний буфер

ФНП- α – фактор некрозу пухлини альфа

ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид

ФФК – фосфофруктокіназа

АМРК – АМФ-залежна протеїнкіназа

FOXO1 – the forkhead box O1

H₂O₂ – пероксид водню

NF- κ B – ядерний фактор- κ B

mTOR – механістична мішень для рапаміцину

Nrf2 – ядерний фактор еритроїдного походження 2

PPAR γ – рецептор, який активований проліфератором пероксисом γ

STAT3 – the signal transducer and activator of transcription 3 (білок, який перетворює сигнал та активує транскрипцію 3)

TBARS – thiobarbituric acid reactive substances (реактивні речовини тіобарбітурової кислоти)

ВСТУП

Актуальність. Метаболічний синдром (МС) – одне з найпоширеніших захворювань сучасності. Поєднання нездорового харчування з малорухомим способом життя веде до метаболічних порушень в організмі, які підвищують ризик розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ) та діабету II типу. Оскільки смертність від ССЗ у світі знаходиться на першому місці, то можна стверджувати, що МС підвищує ризик смертності серед населення [1, 2]. За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я, МС – це патологічний комплексний стан, що характеризується ожирінням, інсулінорезистентністю, артеріальною гіпертензією та гіперліпідемією [1]. Серед клінічних показників у пацієнтів з МС спостерігається підвищення рівня глюкози, триацилгліцеридів (ТАГ), ліпопротеїнів низької густини (ЛПНГ) у плазмі крові, а також рівня показників запалення та оксидативного стресу [2, 3].

Відомо, що МС розвивається внаслідок надмірного споживання продуктів, які містять багато жирів та вуглеводів у своєму складі [2, 4]. Дослідження, які були проведені на мишах та щурах, підтверджують негативний вплив на організм висококалорійної їжі (ВКІ). Зокрема, їжа, до складу якої входять транс-ненасичені жирні кислоти (ТНЖК) промислового походження, підвищує ризик розвитку ССЗ та запалення [5, 6]. Головним продуктом, що містить ТНЖК, є маргарин, який виготовляють шляхом промислової гідрогенізації рослинних олій [6, 7]. Із попередніх досліджень на мишах та щурах відомо, що тривале споживання маргарину чи інших ТНЖК-вмісних продуктів призводить до розвитку метаболічних порушень різного ступеня, зокрема ожиріння [8, 9], розвитку неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) [10] та атеросклерозу [11].

Традиційно продукти, які містять ТНЖК промислового походження, входять до складу так званої «Західної дієти» [6, 12]. Такий стиль харчування став дуже популярним в останні роки, та передбачає вживання хлібобулочних виробів, чіпсів, гострих, смажених страв, а також продуктів з високим вмістом цукру, солі та жирів [13]. Оскільки маргарин входить до продуктів «Західної дієти» та може

викликати метаболічні порушення, ми вирішили використати його для того, щоб викликати МС у дослідних тварин. Також, з огляду на те, що в попередніх експериментах досліджували вплив маргарину лише на тварин однієї статі, ми вирішили перевірити, чи однаково впливає вживання цього продукту на самців та самок дослідних мишей. Щоб запобігти розвитку МС внаслідок споживання маргарину або пом'якшити негативні зміни, що могли б виникнути, ми застосували водний відвар квітів ромашки лікарської (ВВР), а також голодування через день (ГЧД).

Ромашка лікарська (*Matricaria chamomilla* L.) – широко розповсюджена рослина, яку часто використовують у традиційній медицині для лікування порушень травлення, гінекологічних та шкірних захворювань, інфекцій очей та ротової порожнини, а також як антисептичний, заспокійливий та знеболювальний засіб [14, 15, 16]. Біологічно активні речовини, що містяться в ромашці, зокрема фенольні сполуки, забезпечують фармакологічні властивості цієї рослини [14]. Апігенін є одним із флавоноїдів ромашки. Його найвищу концентрацію спостерігають у квітах (близько 17%), і використовують для стандартизації препаратів цієї рослини [17, 18]. Існують дослідження, які показують, що додавання апігеніну до ВКІ призводить до зниження маси тіла, рівня глюкози, ТАГ у плазмі крові та інших показників ожиріння [19, 20, 21]. Вибір ВВР пояснюється тим, що саме чай з квітів цієї рослини є основною формою споживання препаратів ромашки в побуті та в медичних цілях. З попередніх досліджень також відомо, що споживання ВВР на тлі їжі з високим вмістом жирів або вуглеводів виявляє антиоксидантні ефекти та здатність зменшувати прояви МС [15, 22, 23].

Попередні дослідження показали, що обмежене споживання калорій та періодичне голодування знижує ризик оксидативного стресу (ОС) та ожиріння [24, 25, 26]. В нашій лабораторії вже досліджувався режим харчування через день, та показав досить непогані результати на фізіологічному та біохімічному рівнях [27, 28]. Проте ці дослідження проводились на мишах, які споживали звичайний корм, а не висококалорійний. Park et al. (2020) підтверджують, що ГЧД на тлі ВКІ

знижує масу тіла, індекс маси тіла (ІМТ) та рівень загального холестеролу [29]. У пацієнтів з НАЖХП також спостерігали позитивний ефект ГЧД: на додаток до попередніх показників був нижчим також рівень ТАГ в плазмі крові [30].

Відомо, що калорійне обмеження (КО) також може зменшувати пошкодження, які виникають в організмі протягом старіння, та здатне збільшувати тривалість життя [31, 32]. Зокрема, захисні ефекти КО проявляються через активацію антиоксидантної системи [33], зменшення рівня глюкози в крові натще [34] та збільшення інтенсивності гліколізу [35]. Мозок та серце найкраще вивчені в плані дії старіння [36, 37, 38]. Вважається, що інші органи, зокрема печінка та нирки, стійкіші до впливу віку [36, 39, 40]. Беручи до уваги корисні властивості КО для старіючого організму, ми вирішили перевірити вплив режиму харчування з 30% обмеженням калорій на мишей середнього та старшого віку. Такий тип обмеження в харчуванні зустрічається рідко, а також його вплив на антиоксидантну систему та енергетичний метаболізм печінки, нирок та кори головного мозку недостатньо вивчений.

Об'єкт дослідження: лабораторні миші лінії *C57BL/6J* та *C57BL/6N*.

Предмет дослідження: морфометричні, фізіологічні та біохімічні зміни в органах та крові мишей, що виникли внаслідок перебування тварин на дослідних видах харчування.

Мета: дослідити вплив харчування з додаванням маргарину на розвиток метаболічних порушень у мишей, оцінити ефективність їхньої профілактики за допомогою відвару ромашки і періодичного голодування, а також вплив 30% калорійного обмеження у контексті вікових змін.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі **завдання**:

1. Оцінити морфометричні показники (маса тіла, індекс маси тіла, індекс ожиріння Лі) у мишей, які споживали їжу з додаванням маргарину.
2. Дослідити фізіологічні показники (кількість спожитої їжі, води/відвару ромашки, отримані калорії) у мишей, які протягом чотирьох місяців споживали збагачену маргарином їжу.

3. Визначити лейкоцитарну формулу крові мишей, які споживали маргарин, пили відвар ромашки та зазнавали періодичного голодування.

4. Проаналізувати біохімічні показники плазми крові, печінки, нирок, жирової тканини, серця та кори головного мозку мишей після чотиримісячного споживання їжі з додаванням маргарину.

5. Оцінити біохімічні параметри плазми крові, печінки, нирок та кори головного мозку мишей середнього та старшого віку, які перебували на калорійному обмеженні протягом шести та дванадцяти місяців.

У дисертаційній роботі були використані такі **методи дослідження**:

1. Статистичні – для аналізу та підрахунку отриманих результатів.
2. Морфометричні – для визначення маси тіла, довжини тіла, індексу маси тіла, індексу ожиріння ЛІ.
3. Фізіологічні – для визначення кількості спожитої їжі та води (відвару ромашки), кількості спожитих калорій.
4. Гематологічні – для дослідження лейкоцитарної формули крові.
5. Біохімічні – для визначення активності ферментів та вмісту метаболітів.

Наукова робота була виконана в межах **грантових програм**, які були підтримані Міністерством освіти та науки України «Розробка нових немедикаментозних методів корекції метаболічного синдрому: нормалізація фізіолого-біохімічних показників у тварин» (#0118U003477, 2018-2020 рр.) та Німецькою Службою академічних обмінів (DAAD) у рамках програми «Ukraine digital: Ensuring academic success in times of crisis» (2022 р). Робота виконувалась на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника та частково на кафедрі нейрофізіології, Інституту фізіології Тюбінгенського університету імені Еберхарда Карла (Тюбінген, Німеччина).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше було виявлено, що вплив їжі з додаванням маргарину, ВВР та ГЧД на організм мишей залежить від статі тварин. Ми спостерігали сильніші порушення в самок, які споживали

маргарин протягом чотирьох місяців, ніж у самців. Також було виявлено, що ВВР та ГЧД виявляють протекторний ефект у самок, але не у самців, а ГЧД разом з маргарином взагалі може бути шкідливим для самців мишей.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати можуть бути корисними в медичній практиці, для розробки дієт з метою корегування проявів МС з огляду на статеві особливості. Також результати, які були отримані в цьому дослідженні, будуть корисними для науковців біологічних та медичних галузей для розробки подальших експериментів.

Результати роботи впроваджені у навчальну та наукову діяльність кафедри біохімії та біотехнології, зокрема отримані дані використовуються для підготовки лекцій та практичних занять з дисциплін «Біологічно активні природні речовини», «Моделі біохімічних досліджень» та «Патофізіологія ожиріння», а також враховуються при постановці експериментів, які пов'язані з впливом ВКІ.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою було самостійно проведено аналіз наукової літератури по тематиці, обрано методики дослідження, проведено експериментальну частину роботи, статистичну обробку даних та аналіз отриманих результатів. Планування експерименту та підготовка рукописів до публікації були проведені разом з науковим керівником, доктором біологічних наук, професором кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника Володимиром Луцаком, а також консультативної допомоги доктора біологічних наук, професорки Марії Байляк. Експериментальна частина наукової роботи була виконана особисто дисертанткою, деякі дослідження були проведені також за участю студентів та співробітників кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Наукові внески усіх учасників висвітлені у спільних публікаціях.

Апробація матеріалів роботи. Результати дослідження були апробовані на: XIX Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції молодих вчених «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 3-4 грудня 2020 р.), XVII Міжнародній науковій

конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 19-21 квітня 2021 р.), XX Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Львів, 19 травня 2022 р.), All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation (Kyiv, June 15-17, 2022), VI Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 6-7 жовтня 2022 р.), 92-гій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023 р.), 48-th FEBS Congress “Mining biochemistry for human health and well being” (Milan, Italy, 29 June – 3 July 2024).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати та їх обговорення, узагальнення результатів, висновки та список використаних джерел (292 найменування). Робота включає 196 сторінок. До складу дисертації входить 32 рисунки, 8 таблиць та додатки.

РОЗДІЛ 1. ВПЛИВ ВИСОКОКАЛОРИЙНОГО ХАРЧУВАННЯ, ФЛАВОНОЇДІВ ТА ДІЄТИЧНОГО ОБМЕЖЕННЯ НА РОЗВИТОК МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

1.1. Метаболічний синдром та його характеристика

1.1.1. Визначення метаболічного синдрому

Метаболічний синдром (МС) – це сукупність метаболічних порушень, які підвищують ризик розвитку ССЗ, діабету, інсульту та інших патологічних станів. Ці аномалії включають ожиріння, гіпертензію, інсулінорезистентність та атерогенну дисліпідемію [41]. Приблизно 20-30% дорослого населення в більшості країн світу страждає на МС [42]. Метаболічні порушення, які пов'язані з цим синдромом, вивчаються вже понад 100 років, але в останні 30 років проблема МС привернула до себе особливу увагу. За цей період кілька разів змінювалося його визначення та характеристики. У 2009 році провідними організаціями охорони здоров'я було прийнято уніфіковане визначення МС, в якому МС визначається як патологічний багатогранний стан, що характеризується обов'язковим підвищенням рівня ТАГ, зниженням рівня ліпопротеїдів високої густини (ЛПВГ), інсулінорезистентністю, підвищенням артеріального тиску та рівня глюкози натще [2]. Коли у пацієнта виявляють як мінімум три з цих ознак, то ставлять діагноз МС [15, 43]. Незважаючи на те, що останніми роками було встановлено тісний зв'язок між МС та ожирінням, наявність абдомінального ожиріння було виключено з обов'язкових характеристик цього захворювання. Це пов'язано зі спостереженнями, що не у всіх людей з ожирінням розвиваються симптоми МС, і не всі пацієнти з діагнозом МС страждають від ожиріння [2, 44]. Переїдання, постійне споживання висококалорійної їжі та недостатня фізична активність, що веде до збільшення маси тіла та подальшого ожиріння, вважаються ключовими факторами розвитку МС. Старіння, емоційні стреси, вживання різних лікарських препаратів, склад мікробіоти кишківника, генотип, якість сну та гормональні зміни також впливають на виникнення МС [2, 4, 45].

Досі тривають дискусії щодо етіології та патогенезу цього синдрому, оскільки лишається достеменно невідомим єдиний механізм, що лежить в його основі. Проте існує три головні фактори, які сприяють прогресуванню МС та подальшому розвитку ССЗ та цукрового діабету II типу: інсулінорезистентність, хронічне запалення та ОС [46].

1.1.2. Інсулінорезистентність за умов метаболічного синдрому

Інсулін – гормон, який виробляється β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози. При підвищенні рівня глюкози в крові утворення цієї речовини теж підвищується. Інсулін пригнічує ліполіз та глюконеогенез у печінці, водночас стимулюючи поглинання глюкози в печінці, м'язах і жировій тканині [47]. Вважається, що ожиріння та вісцеральна жирова тканина відіграють одну з головних ролей у розвитку МС. Метаболізм глюкози та ліпідів пов'язаний із вісцеральною жировою тканиною через залучення певних механізмів. Жирова тканина є основним джерелом вільних жирних кислот (ЖК), які безпосередньо пов'язані з печінкою через спланхнічну циркуляцію [48]. У печінці вільні ЖК призводять до посилення глюконеогенезу, а також збільшення рівня ТАГ і виробництва ЛПНГ [45]. Інтенсифікація окислення вільних ЖК в печінці викликає зниження вмісту ксилулозо-5-фосфату, що призводить до активації глюконеогенезу (шляхом інгибування фосфофруктокінази-1 та активації фруктозо-1,6-дифосфатази). Накопичення ліпідних метаболітів (церамідів, диацилгліцеролу, ацетил-КоА та ЖК) знижує чутливість клітин до інсуліну. Ці ліпідні метаболіти, натомість, активують серин/треонінкінази (протеїнкіназу-С, ядерний фактор- κ B (NF- κ B), інгібіторну κ B-кіназу β (IKK β)), які потім фосфорилують субстрат рецептора інсуліну і протеїнкіназу B/Akt, і, отже, пригнічують передачу сигналів інсуліну [49].

Надмірне споживання їжі може призвести до накопичення надлишку поживних речовин у жировій тканині у вигляді ТАГ. Інсулін діє на жирову тканину, стимулюючи поглинання глюкози та синтез ТАГ з одночасним

пригніченням гідролізу ТАГ. Накопичення жиру супроводжується збільшенням об'єму адипоцитів [15]. Гіпертрофована жирова тканина виділяє специфічні активні сполуки (адипокіни), які включають хемокіни, прозапальні цитокіни, лептини (регулятори апетиту), сенсibilізатори інсуліну та атеропротектори (адипонектин) [50]. Дослідження показали, що ожиріння пов'язане з порушенням регуляції секреції адипокінів з підвищенням рівня інгібітору активатора плазміногену (РАІ-1), фактора некрозу пухлини альфа (ФНП- α), моноцитарного хемотаксичного білка-1 (MCP-1), ангіотензиногену та інтерлейкіну 6 (ІЛ-6). Останні три речовини, ФНП- α , MCP-1 та ІЛ-6, є прозапальними цитокінами, які сприяють системному запаленню низької інтенсивності, виявленому при МС. Водночас РАІ-1 підвищує ризик тромбозу та прискорює розвиток атеросклерозу. Розвиток запалення призводить до подальшої резистентності м'язів до інсуліну, а також до руйнування β -клітин острівців Лангерганса [49]. Окрім того було виявлено, що рівень лептину (гормону, який регулює відчуття насичення, витрату енергії та гомеостаз глюкози) безпосередньо пов'язаний з кількістю білої жирової тканини. За фізіологічних умов лептин сприяє насиченню та сигналізує гіпоталамусу про кількість накопиченого жиру. Проте, за розвитку МС виникає стійкість до лептину або певна межа його можливого впливу, виходячи за яку нова доза лептину діє незначно [51]. З іншого боку, при ожирінні спостерігається зниження рівня адипонектину, який запобігає утворенню атеросклеротичних змін у судинах. Основною дією адипонектину є фосфорилування та активація ключових проміжних продуктів у сигнальному шляху інсуліну, що підвищує чутливість до останнього [52]. Отже, нестача адипонектину при МС сприяє інсулінорезистентності та порушує гомеостаз глюкози. При інсулінорезистентності, в жировій тканині порушується інгибування ліполізу, яке забезпечується інсуліном. У результаті чого збільшується кількість вільних ЖК, що натомість підсилює резистентність до інсуліну, викликаючи зміни в інсуліновому сигнальному каскаді в різних органах [47].

Дифузія глюкози в клітину здійснюється завдяки її транспортерам (GLUT). GLUT-4 є основним транспортером глюкози в жировій тканині, скелетних м'язах і

міокарді. Інсулін зв'язується з інсуліновими рецепторами і активує каскад передачі сигналу, що призводить до посилення експресії GLUT-4 в плазматичній мембрані, а отже, до посилення поглинання глюкози з кровообігу [53]. Посилений потік метаболітів у мітохондрії, зміни в мітохондріальних білках і зниження експресії антиоксидантних ферментів можуть призвести до підвищення рівня активних форм кисню (АФК) при ожирінні та діабеті. Ці форми кисню викликають інсулінорезистентність через порушення передачі сигналу інсулінових рецепторів, і зниження експресії транспортера GLUT-4 на клітинній мембрані [54]. На ранніх стадіях розвитку інсулінорезистентності нормальна толерантність до глюкози підтримується компенсаторною гіперінсулінемією, що з часом призводить до десенсибілізації периферійних тканин до інсуліну [55]. Змінена чутливість до інсуліну знижує рівень GLUT-4 у клітинній мембрані адипоцитів і активує в них чутливу до гормону ліпазу. Це, натомість, зменшує поглинання глюкози жировою тканиною, а також стимулює ліполіз [47]. Концентрація вільних ЖК у плазмі збільшується через ліполіз у жировій тканині, особливо у вісцеральному жирі. У м'язах вільні ЖК сприяють зменшенню транслокації GLUT-4 на поверхню мембрани, що знижує поглинання глюкози. Одночасно вільні ЖК впливають на гепатоцити, стимулюючи ліпогенез та глюконеогенез. В результаті формується гіперінсулінемічний стан для того, щоб підтримати нормальний рівень глюкози. Високі концентрації вільних ЖК беруть участь у синтезі ТАГ та естерів холестеролу, а також ЛПНГ, які містять в своєму складі ТАГ [47].

1.1.3. Основні маркери запалення при метаболічному синдромі

При МС спостерігається підвищений рівень прозапальних маркерів, таких як інтерлейкін-1 β (ІЛ-1 β), ІЛ-6, ФНП- α та С-реактивний білок (СРБ) [56]. Розвиток запалення веде до подальшого фіброзу тканин, атерогенезу та, згодом, ССЗ [47]. Макрофаги, що походять із жирової тканини, функціонують як основне джерело прозапальних цитокінів як на місцевому рівні, так і в системному

кровообігу. Макрофаги жирової тканини поділяються на два основні типи: M1 (класично активовані макрофаги) та M2 (альтернативно активовані макрофаги) [46].

IL-1 β є одним з ключових регуляторів запальної відповіді організму і відіграє важливу роль у перебігу різних захворювань. Зокрема, він є однією з ключових ланок у розвитку аутоімунних захворювань та захворювань, які асоційовані з МС, таких як атеросклероз, хронічна серцева недостатність та цукровий діабет II типу [57]. Було виявлено, що цей цитокін порушує процес секреції інсуліну, а також викликає загибель β -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, що посилюється під впливом ФНП- α [58]. Дослідження *in vitro* виявили, що пригнічення сигналізації IL-1 β підвищує чутливість до інсуліну та вказує на його патогенетичну роль у розвитку інсулінорезистентності [57].

IL-6 продукується майже кожною клітиною організму, яка містить ядро. Він часто виділяється макрофагами M1 і Т-клітинами, щоб стимулювати імунну відповідь проти інфекцій та пошкодження тканин. Дисфункція адипоцитів, яка часто супроводжує МС, пов'язана зі збільшенням популяції M1 макрофагів у жировій тканині. При МС IL-6 та інші прозапальні цитокіни діють через кілька клітинних сигнальних шляхів, таких як mTOR (механістична мішень для рапаміцину), що призводить до інсулінорезистентності. IL-6 також бере участь у порушенні функцій судин та розвитку атеросклерозу шляхом пошкодження ендотеліальних клітин [46]. Підвищення рівня IL-6 у сироватці крові асоціюється зі зниженням толерантності до глюкози, цукровим діабетом, високим кров'яним тиском та ожирінням у людей [59].

ФНП- α також виробляється макрофагами в жировій тканині. Він знижує метаболічний ефект інсуліну, порушуючи передачу сигналу останнього в адипоцитах та гепатоцитах шляхом інактивації рецепторів інсуліну [47]. У гризунів з ожирінням цілеспрямоване видалення ФНП- α та його рецепторів покращувало чутливість до інсуліну та толерантність до глюкози [60]. Цей цитокін сприяє розвитку резистентності до інсуліну завдяки індукції печінкового ліполізу, в результаті чого підвищується рівень вільних ЖК [47]. У пацієнтів з МС

та ожирінням спостерігали значно вищий рівень ФНП- α та інших прозапальних цитокінів у сироватці крові, що було пов'язано з інсулінорезистентністю та гіпертригліцеридемією. Отже, ФНП- α регулює запальну відповідь, апоптоз жирових клітин, ліпідний обмін, печінковий ліпогенез, інсулінову сигналізацію та ОС [59].

Ожиріння підвищує рівень сироваткового ФНП- α , який індукує вивільнення ІЛ-6 з імунних клітин та адипоцитів, і знижує рівень системних протизапальних цитокінів, сприяючи розвитку системного запалення [55]. Високий рівень ІЛ-6 та ФНП- α викликає вироблення СРБ – показника гострої фази запалення. І навпаки, підвищення рівня СРБ також індукує продукцію цих двох цитокінів [46, 47]. Переважно цей білок продукується гепатоцитами, але також міститься в макрофагах, ендотеліальних клітинах, адипоцитах та м'язових клітинах [46]. Він запускає класичний комплементарний шлях вродженого імунітету після зв'язування з полісахаридами мікроорганізмів [61]. Було встановлено, що збільшення СРБ корелює з ССЗ, цукровим діабетом II типу та МС [47]. Оскільки ІЛ-6 та ФНП- α пов'язані з порушенням функції адипоцитів при МС, СРБ також залучений до розвитку запалення, яке опосередковане ожирінням [46]. Рівень СРБ тісно пов'язаний з інсулінорезистентністю, підвищенням артеріального тиску, низьким рівнем ЛПВГ і ТАГ [56]. Цей білок індукує ендотеліальну дисфункцію та знижує активність ендотеліальної синтази оксиду азоту 3, що призводить до підвищення артеріального тиску [62]. Було встановлено, що чим більше у пацієнта ознак МС, тим вищим буде рівень СРБ [63].

1.1.4. Оксидативний стрес та метаболічний синдром

Надмірне споживання жирів, вуглеводів і насичених ЖК, особливо транс-жирних кислот, стимулює специфічні внутрішньоклітинні шляхи, що призводить до ОС [55, 64]. Цей стан характеризується підвищеним рівнем АФК шляхом порушення балансу між їх утворенням та антиоксидантною дією відповідних

ферментів [65]. Ці кисневмісні продукти можуть брати участь у нормальних фізіологічних процесах або сприяти дезадаптивним реакціям. Ці реакції призводять до метаболічної дисфункції та передачі сигналів запалення – залежно від джерела АФК, типу клітин і тканинного середовища. Надмірне вироблення АФК призводить до шкідливого впливу на експресію генів, збільшує рівень факторів росту та елементів відповіді на стрес, а також активує апоптоз [66]. Двома основними джерелами АФК всередині клітини є ферменти НАДФН-оксидази та мітохондрії. НАДФН-оксидази – це родина ферментів, які розташовані у клітинній мембрані, причому деякі з них є важливими за більшості патологічних станів [67]. У мітохондріях АФК утворюються при окисному фосфорилуванні шляхом окислення відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН) до НАД. Супероксид-аніон, який генерується мітохондріями і НАДФН-оксидазою, швидко перетворюється супероксиддисмутазою (СОД) в пероксид водню (H_2O_2), який слугує сигнальною молекулою [68, 69]. Останній є потужним окислювачем, тому клітини експресують антиоксидантні білки, зокрема пероксиредоксин, каталазу, глутатіон і тіоредоксин, які здатні відновити H_2O_2 до води. За нормальних умов продукція H_2O_2 повинна відповідати його відновленню [55].

Завдяки суворо контрольованій регуляції окисно-відновних процесів, сигнальній функції та чутливості, АФК мають важливе значення для нормальних біологічних функцій за фізіологічних умов [55, 70]. Окисна посттрансляційна модифікація, також відома як окисна модифікація білків, є важливим молекулярним процесом, що впливає на біологічні реакції клітин. Редокс-чутливі білки включають транспортери іонів, рецептори, сигнальні молекули, фактори транскрипції, структурні білки цитоскелету та матричні металопротеази [55, 66]. Білки, зазвичай, є мішенями для зворотної окисної модифікації. Однак у патологічних станах, які пов'язані з ОС (наприклад гіпертонія), багато білків зазнають незворотної посттрансляційної модифікації. Це призводить до втрати функції білків і, як наслідок, пошкодження клітин, тканин і порушення структури та функцій органів-мішеней [71, 72]. Результатом цих процесів є утворення АФК,

які активують фактори транскрипції, зокрема індукований HIF-1 α . Цей фактор виконує низку функцій, а саме: регулює ангиогенез; активує шлях фосфоінозитид-3 кінрази, що регулює клітинний ріст; активує NF- κ B, який у нормальних умовах запобігає апоптозу клітин; активує шлях мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), який регулює клітинну проліферацію [73]. Також АФК стимулюють транскрипцію прозапальних хемокінів і цитокінів, а також залучення й активацію запальних та імунних клітин [55, 74].

Дослідження на тваринах і клітинних культурах показали, що ОС може відігравати ключову роль в ожирінні, збільшуючи проліферацію та диференціацію преадипоцитів, а також змінюючи інтенсивність споживання їжі. Надмірне вироблення АФК може виникати не лише при ожирінні, а й при таких патологічних розладах, як резистентність до інсуліну, гіперглікемія, хронічне запалення та дисліпідемія [55, 64, 75]. Небезпека ОС полягає в тому, що за надлишку АФК пошкоджують різні компоненти клітини, зокрема ДНК, білки і ліпіди. Ліпіди, присутні в плазматичних мембранах мітохондрій і ендоплазматичному ретикулумі, є основними мішенями атаки АФК і перокисного окислення [68, 76]. Проміжні продукти перокисного окислення ліпідів, відомі як пероксиди ліпідів (ПЛ), можуть бути токсичними для клітини та потребують видалення, що реалізується частково шляхом використання глутатіону [68]. Багато досліджень виявили, що пацієнти з МС мали нижчу активність антиоксидантних ферментів у плазмі крові та вищий рівень маркерів ОС, ніж здорові люди [77, 78, 79]. Білки та нуклеїнові кислоти також можуть піддаватися окисленню АФК та нітрозилуванню. Ці кінцеві продукти зазвичай не є безпосередньо токсичними для клітини [80]. Однак накопичення неактивних білків може перевантажити здатність клітини метаболізувати їх, і у подальшому призвести до пошкодження ДНК, оскільки вони можуть активувати апоптоз. Накопичення модифікованих АФК білків порушує їхнє функціонування, що призводить до серйозної втрати нормальної активності клітин [81]. Порушення окисно-відновного балансу також сприяє розвитку прозапальних і профіброзних шляхів, які впливають на передачу сигналів інсуліну та ендотеліальну

дисфункцію, викликають запалення та фіброз, що сприяє пошкодженню органів-мішеней [55, 66].

Запалення та ОС тісно пов'язані з ожирінням. В адипоцитах людей з ожирінням активуються прозапальні транскрипційні фактори, зокрема NF- κ B та білок-активатор 1. Вони чутливі до процесів окислення/відновлення та викликають вивільнення запальних цитокінів, таких як ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6. Останні посилюють вироблення АФК, створюючи замкнене коло [47, 64]. Запалення та ОС є важливими компонентами патофізіологічних станів, які пов'язані з ожирінням, таких як атеросклероз, резистентність до інсуліну, діабет II типу та рак [82].

В результаті функціонування гліколізу та циклу трикарбонових кислот утворюються НАДН та відновлений флавінаденіндинуклеотид (ФАДН₂), які є донорами електронів [83, 84]. При надмірному харчуванні надлишок глюкози посилює метаболізм через гліколіз і цикл трикарбонових кислот. Це призводить до збільшення утворення НАДН і ФАДН₂ у електрон-транспортному ланцюгу мітохондрій. Підвищений градієнт протонів на внутрішній мембрані мітохондрій викликає витік електронів і змушує реакційноздатні проміжні продукти виробляти супероксидні аніони на додаток до тих, що утворюються активованою НАДФН-оксидазою [75]. Супероксидні аніони за допомогою СОД перетворюються на H₂O₂ [68]. Надлишок вільних радикалів, які не встигли конвертуватися СОД, пригнічує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу та активує чотири альтернативних шляхи, які збільшують утворення вільних радикалів. Це знижує антиоксидантний захист, викликаючи оксидативний та нітрозативний стреси [75]. До цих альтернативних шляхів належить: 1) Активація поліольного шляху, який включає відновлення глюкози в сорбітол під дією альдолазоредуктази. Остання використовує НАДФН, що призводить до виснаження цитозольного НАДФН і подальшого збільшення утворення АФК [85]. 2) Перетворення фруктозо-6-фосфату на глюкозамін-6-фосфат, який пригнічує дію тіоредоксину та викликає ОС [75]. 3) Утворення з тріозофосфатів метилглюксалою – основного попередника кінцевих продуктів глікації. Ці

продукти активують шляхи НАДФН-оксидази, які збільшують генерацію АФК та активних форм азоту (АФА). Одночасно NF-κB змінює експресію генів і викликає транскрипцію прозапальних цитокінів (включно з ФНП-α та ІЛ-6), молекул адгезії, мікроРНК та індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), які беруть участь у адипогенезі, запаленні та ОС [86]. 4) Утворення диацилгліцеролу з дигідроксиацетонфосфату, перший активує протеїнкіназу-С, що відіграє важливу роль у розвитку серцево-судинних ускладнень через активацію каскадів мітоген-активованої протеїнкінази [87].

Ожиріння пов'язане з підвищенням рівня вільних ЖК у плазмі крові та надмірним накопиченням жиру в білій жировій тканині. Патологічне підвищення рівня вільних ЖК у сироватці крові спричинене надмірним накопиченням жиру в людей з ожирінням. Також цей процес ускладнює метаболізм глюкози, посилює накопичення енергетичних субстратів у печінці, м'язах та жировій тканині, а також підвищує активність мітохондріального та пероксисомального окислення [55]. Розвиток ОС у жировій тканині призводить до збільшення продукції цитокінів, таких як ФНП-α, що, натомість генерує більше АФК в тканинах і стимулює перекисне окислення ліпідів [82].

1.2. Маргарин як потенційний фактор розвитку метаболічного синдрому

Маргарин – це жировмісний продукт, який за своїм виглядом нагадує масло, проте жир, що входить до його складу, відрізняється від молочного. Цей продукт являє собою емульсію, в якій водна фаза диспергована у вигляді дрібних крапель у рідких жирах рослинного походження, та стабілізована у кристалах твердого жиру [88, 89].

Більшість рослинних олій у незмінному вигляді мають обмежене застосування, оскільки багато з них є рідкими при кімнатній температурі. Для маргарину використовують процес гідрогенізації рідких олій, щоб забезпечити йому тверду форму [6]. Гідрогенізація — це реакція, при якій подвійні зв'язки, що

присутні в ненасичених ЖК, насичуються за допомогою розчиненого водню та каталізатора. Це викликає перетворення рідких олій в напівтверді або пластичні жири. Процес гідрогенізації підвищує температуру плавлення та змінює консистенцію рідких олій, сприяє окислювальній стабільності та підвищує технічну функціональність. Однак часткова гідрогенізація призводить до втрати незамінних ЖК і викликає перетворення цис-ізомерів на транс-ізомери, які більш термодинамічно стабільні [89, 90]. Сполуки, які утворюються в результаті часткової гідрогенізації рідких жирів мають назву ТНЖК і мають один або декілька подвійних зв'язків у транс-положенні. У випадку подвійного транс-зв'язку два атоми водню, зв'язані з атомами вуглецю, які утворюють подвійний зв'язок, розташовані на протилежних сторонах вуглецевого ланцюга [6]. Частина ТНЖК, які споживає людина, виробляється промисловим способом шляхом часткової гідрогенізації рослинних олій і міститься у продуктах смажених у фритюрі, випічці, печиві, маргарині та ін. Інший набір транс-жирних кислот природним чином синтезується в кишківнику жуйних тварин шляхом бактеріальної біогідрогенізації, та присутній у м'ясі та молочних продуктах великої рогатої худоби, кіз та овець [6, 10].

Було виявлено, що ТНЖК з різних джерел мають різний вплив на організм людини [91]. Зокрема, деякі дослідження стверджують, що споживання ТНЖК тваринного походження знижує ризик розвитку МС, зокрема ССЗ [92, 93]. Інші науковці вважають, що ТНЖК, утворені в результаті промислової переробки, шкідливіші для організму, ніж ТНЖК природного походження [94]. Проте існує думка, що ТНЖК промислового походження мають ідентичний вплив на організм з ТНЖК тваринного походження [95]. Відомо, що ТНЖК промислового походження підвищують ризик ССЗ та запалення, зокрема через підвищення рівня прозапальних цитокінів та інших медіаторів [2, 6, 96]. Хоча деякі науковці вважають, що ТНЖК не мають впливу на організм, деякі з них можуть проявляти протизапальні властивості [91]. Проте більшість сучасних досліджень дійшли спільного висновку, що саме транс-жири промислового походження мають низку негативних ефектів на організм. Вони можуть накопичуватися в жировій тканині

та включатися в мембранні ліпіди, що робить мембрани менш пластичними. Це може впливати на функцію та взаємодію мембранних білків та утворення ліпідних шарів, що впливає на сигнальні процеси в клітинах [5, 6]. Транс-жири підвищують рівень ЛПНГ, водночас знижуючи рівень ЛПВГ, що зумовлює ризик розвитку ССЗ. Зокрема, було виявлено зв'язок між споживанням промислових ТНЖК та прогресуванням ішемічної хвороби серця. Було встановлено, що транс-жири підвищують ризик смертності не лише від ССЗ, а й загалом [10]. Крім того, ТНЖК підвищують рівень маркерів запалення (СРБ та ІЛ-6), і беруть участь у розвитку метаболічних захворювань [5]. Oteng et al. (2019) виявили, що споживання ТНЖК промислового походження сприяє розвитку НАЖХП. Зокрема, вони зазначили, що годування мишей їжею, яка збагачена промисловими транс-жирними кислотами, посилює стеатоз печінки та фіброз, а також підвищує рівень ТАГ та холестеролу в ній, і підвищує активність аланінамінотрансферази у плазмі крові тварин [10].

Більшість науковців вбачає чіткий зв'язок між споживанням ТНЖК та розвитком ожиріння [97, 98, 99]. Зокрема, дослідження на самцях мишей лінії *C57BL/6* виявило, що тварини, які споживали їжу, до складу якої входили ТНЖК, мали значно вищу масу тіла та низьку толерантність до глюкози. Також було виявлено, що вони мали сильний стеатоз печінки порівняно до тварин, які їли звичайну їжу [98]. Аналізуючи отримані результати, автори дійшли висновку, що у цих мишей розвинулось ожиріння. У самців щурів, які споживали їжу з додаванням ТНЖК протягом 10 тижнів, на кінець експерименту були підвищені маса тіла, рівень загального холестеролу, холестеролу низької густини, глюкози та інсуліну в сироватці крові порівняно до контрольної групи [99]. Проте існують інші дослідження, які не підтверджують зв'язок між споживанням ТНЖК та розвитком ожиріння [100, 101]. Зокрема, Ge et al. (2019) не спостерігали збільшеної маси тіла у мишей *C57BL/6*, коли їм додавали до їжі ТНЖК [101].

Хоча споживання промислових ТНЖК з їжею пов'язують із запаленням, діабетом II типу та ССЗ, розуміння впливу харчових жирів, таких як маргарин або вершкове масло, на здоров'я людини залишається складним завданням. Це

обумовлено широким спектром їх компонентів та індивідуальним впливом складників на метаболізм [102]. Зокрема, до основного складу маргарину входять насичені та ненасичені ЖК, певна частка ТНЖК, а також низка інших компонентів (емульгатори, сіль, ароматизатори, консерванти, регулятори кислотності тощо). Деякі дослідження повідомляють, що їжа, до складу якої входить маргарин, може бути пов'язана з розвитком МС [103], викликати зміну рівня метаболітів у сироватці крові людини [102], змінювати експресію генів, пов'язаних з ліпогенезом [104], викликати розвиток запалення у білій жировій тканині [105] та збільшувати масу тіла [106]. Також було виявлено, що маргарин викликає зміни ендоканабіноїдної системи у самок щурів, що може сприяти розвитку переїдання [8]. Проте вплив маргарину на організм залишається недостатньо вивченим. Зокрема, бракує досліджень, які б комплексно оцінювали вплив маргарину на здоров'я, залежність його впливу від статі та режиму харчування.

1.3. Флавоноїди та ромашка лікарська, як потенційні протектори при метаболічних порушеннях

1.3.1. Флавоноїди та їх вплив на показники метаболічного синдрому

Низка досліджень стверджує, що харчування, яке збагачене біологічно активними сполуками, зокрема середземноморська дієта, може бути використане для лікування та попередження МС [107, 108, 109]. Саме ця дієта має в своєму складі високий рівень поліфенолів, що й зумовлює її корисні властивості для організму. Поліфеноли належать до великої групи біологічно активних речовин рослинного походження, і поділяються на два основні класи – флавоноїди та нефлавоноїди. До флавоноїдів належать флавоноли, антоціаніди, антоціаніни, ізофлавоони, флавоони, флаванолі (катехіни), флаванони та флаванолі. Нефлавоноїдні компоненти включають фенольні кислоти, стилбени та лігнани [110].

Флавоноїди входять до складу різноманітних харчових продуктів, таких як фрукти (особливо цитрусові), овочі, чай, червоне вино, какао та зернові. Вони відповідають за надання продуктам смаку та кольору [111]. Останнім часом до цих сполук зростає науковий інтерес через їх потенційний корисний вплив на організм людини, а також їх доступність. Низка досліджень показала позитивний вплив цих речовин на серцево-судинну, нервову системи, а також при лікуванні ракових захворювань. Вчені вважають, що це пов'язано з їх антиоксидантними, протизапальними, антимутагенними та антиканцерогенними властивостями [111, 112, 113, 114]. Також було виявлено, що ці речовини здатні знижувати певні метаболічні показники, які значно зростають при МС. В оглядовій статті Gouveia et al. (2022) описано, що під впливом різних флавоноїдів змінюються деякі показники, які безпосередньо пов'язані з МС, а також знижується інтенсивність запалення та ОС [115]. Зокрема, автори, аналізуючи попередні роботи, зазначають, що були виявлені позитивні зміни у таких параметрах: артеріальний тиск, інсулінорезистентність, ЛПВГ, ЛПНГ, загальний холестерол, ТАГ, рівень глюкози в крові та окружність талії. Проте, ці дослідники не виявили впливу фенольних сполук на зміну маси тіла та ІМТ. Також автори дійшли висновку, що флавоноїди знижують рівень маркерів запалення, такі як ФНП- α та СРБ [115]. Проте було виявлено, що не всі феноли мають однаковий вплив на той самий показник. Наприклад, кверцетин не вплинув на рівень ТАГ, глюкози, ФНП- α та СРБ у пацієнтів з ожирінням [116], а гесперидин навпаки знизив рівень глюкози та інсуліну, рівень ТАГ, а також ФНП- α та СРБ [117]. У продуктах харчування фенольні речовини завжди існують у комплексі, хоча деякі сполуки можуть переважати. Також до складу продуктів можуть входити інші компоненти, що впливатимуть на їх властивості. Тому, важливо дослідити саме ефект комплексного впливу флавоноїдів на розвиток та запобігання МС.

Метою цієї дисертаційної роботи було знайти саме немедикаментозні способи запобігання розвитку МС, які будуть широкодоступні людям. Тому, для дослідження був використаний ВВР, як аналог ромашкового чаю, що широко

застосовується у лікувальній практиці. Фармакологічні властивості цієї рослини зумовлені низкою фенольних сполук, що містяться в ній [14].

1.3.2. Ромашка лікарська. Її склад та корисні властивості

Ромашка лікарська (*Matricaria chamomilla* L.) – трав'яна рослина, яка широко розповсюджена на території України. Її часто використовують у традиційній медицині для лікування розладів травлення, гінекологічних та шкірних захворювань, інфекцій очей та ротової порожнини, а також як заспокійливий та знеболювальний засіб [15, 118]. Лікарські властивості цієї рослини зумовлені наявністю в її квітах таких біологічно активних речовин, як сесквітерпени (хамазулен, бісаболол, фернезен), кумарини (умбеліферон, герніарин, кумарини), флавоноїди (апігенін, кверцетин, лютеолін) та інші фенольні речовини (кофеїнова кислота, хлорогенова кислота). На рис. 1.1 представлено їх хімічні формули. Вміст цих сполук у квітках залежить від стадії розвитку рослини та впливу довкілля. Найбільше їх на початку цвітіння ромашки [14, 17]. Кожна активна речовина, що входить до складу цієї лікарської рослини, має низку корисних властивостей, які можуть покращити якість та продовжити тривалість життя людини. Зокрема, хамазулен знижує рівень прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ФНП- α , що визначає його протизапальні властивості, а також проявляє антиоксидантну здатність завдяки нейтралізації вільних радикалів та інгибуванню перокисного окислення ліпідів [119]. Також хамазулен, як і бісаболол, демонструє протиракову активність через включення апоптичного шляху ракових клітин [120]. Бісаболол може інгибувати запалення за рахунок зниження експресії циклооксигенази 2. Також відомо, що він стимулює антиоксидантні системи захисту та пригнічує утворення АФК, має антибактеріальні та антисептичні властивості [121].

Фернезен відомий своїми антиоксидантними властивостями. Було виявлено, що він має потужну антибактеріальну активність проти грампозитивних та грамнегативних бактерій, зокрема *Staphylococcus aureus* [122]. Також було

виявлено, що він захищає рослини від шкідників, зокрема його додають до репелентів для боротьби з попелицею [123].

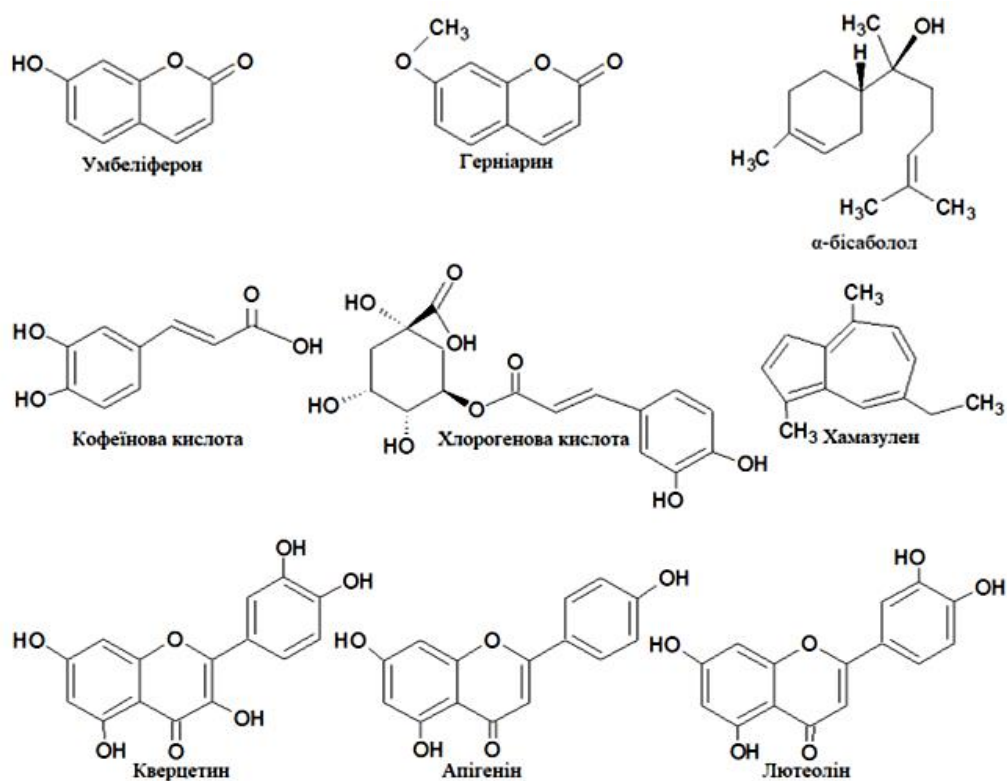


Рис. 1.1. Основні біологічно активні речовини, які входять до складу ромашки та обумовлюють її терапевтичні властивості.

Пов'язані з кумарином сполуки виявляють антимікробну та протизапальну активність. Наприклад, умбеліферон проявляє різноманітні біологічні властивості, зокрема, антиоксидантну активність *in vitro*, інгибування реплікації ВІЛ-1 та інгибування клітинної проліферації різних клітинних ліній пухлин людини [124]. Його антиоксидантна дія зумовлена тим, що він збільшує активність СОД. Умбеліферон та герніарин часто використовують у сонцезахисних кремах, оскільки вони добре поглинають ультрафіолетове випромінювання на кількох довжинах хвиль [124]. Дослідження на щурах виявило, що герніарин здатний пригнічувати ОС та запалення, знижуючи рівень ІЛ-1 та ФНП-α [125].

Апігенін є одним з флавоноїдів з найвищою концентрацією у квітках ромашки (приблизно 17%) і використовується для стандартизації препаратів ромашки [17, 18]. Ця речовина також має потенціал для посилення клітинної системи антиоксидантного захисту за рахунок збільшення активності глутатіон-залежних ферментів, каталази та СОД [126]. Також було встановлено, що апігенін має протизапальні властивості, зменшуючи утворення прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ФНП- α в макрофагах мишей, яким додавали апігенін після ін'єкції ліпополісахаридом [18]. Існують свідчення, що цей флавоноїд має значну протидіабетичну дію завдяки своїй здатності пригнічувати фермент α -глюкозидазу, посилювати вироблення інсуліну, та нейтралізувати АФК у клітині [125]. Окрім того, він зменшує інтенсивність гліколізу та поглинання глюкози, підвищуючи функцію мітохондрій. Апігенін забезпечує ендотеліальні клітини необхідною кількістю NO $\cdot$, що знижує ризик їх пошкодження і дисфункції, яка може виникнути внаслідок гіперглікемії. Також є свідчення про нейропротекторну функцію цього поліфенолу [125]. Низка досліджень підтверджує, що додавання апігеніну до ВКІ призводить до зниження маси тіла, рівня глюкози, ТАГ у плазмі крові та інших показників ожиріння [19, 20, 21].

Кверцетин – ще один флавоноїд, що входить до складу ромашки, та має високий терапевтичний потенціал. Зокрема відома його потужна антиоксидантна та протизапальна дія на організм. Протизапальний ефект кверцетину був зумовлений зменшенням рівня прозапальних цитокінів, АТФ і сайтів зв'язування NF- κ B [127]. Кверцетин може знижувати активність таких ферментів, як протеїнкінази та циклооксигенази, у такий спосіб пригнічуючи апоптоз і проліферацію клітин. Також ця речовина сприяє регенерації β -клітин в острівцях Лангерганса підшлункової залози, збільшує вивільнення інсуліну та нормалізує рівень глюкози в крові [128]. Кверцетин має пряму проапоптичну дію на ракові клітини, сповільнюючи прогресування раку [127]. Іншою важливою особливістю кверцетину є його здатність зв'язуватися з іонами металів, такими як Fe $^{2+}$, Fe $^{3+}$, Cu $^{2+}$ і Ni $^{2+}$. Ці комплекси кверцетину з металами показали протиалергічну,

противиразкову, протимікробну, протипухлинну активність, а також захисні властивості при хворобі Альцгеймера [127].

Лютеолін, як і апігенін з кверцетином, є активним компонентом квітів ромашки. Його фармакологічні ефекти включають антиоксидантну, протипухлинну, протизапальну та антимікробну дії [15]. Лютеолін може мати сприятливий вплив при боротьбі з ожирінням та інсулінорезистентністю [129]. Було виявлено, що лютеолін підвищував транскрипційну активність рецептору, який активований проліфератором пероксисом γ (PPAR γ), в адипоцитах, та підвищував їхню чутливість до інсуліну шляхом посилення експресії інсулінозалежних рецепторів транспортера глюкози (GLUT-4). Лютеолін також посилює експресію гена адипонектину, який є однією з мішеней PPAR γ і бере участь у регуляції рівня глюкози та розщепленні ЖК [129]. Лютеолін володіє значними кардіопротекторними ефектами, запобігаючи утворенню АФК і пом'якшуючи втрату потенціалу мітохондріальної мембрани. Було виявлено, що серед багатьох біологічно активних речовин, присутніх у метанольному екстракті ромашки, лютеолін і апігенін мають найвищу здатність стимулювати ангіогенез [130]. Також він зменшує негативний фотобіологічний вплив на клітини шкіри, діючи як потужний антиоксидант і протизапальний засіб. Лютеолін пригнічує прозапальні медіатори, зокрема ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ -17, ІЛ -22, ФНП- α та циклооксигеназу-2, а також регулює клітинну передачу сигналів через NF- κ B, JAK-STAT і TLR шляхи [131]. Цей флавоноїд є нейропротекторним агентом. Було показано, що він уповільнює нейрозапальні реакції, послаблює активацію глії та контролює ОС і пошкодження при таких патологіях, як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, розсіяний склероз і черепно-мозкові травми [132].

Хлорогенова кислота є важливим антиоксидантним компонентом екстракту ромашки лікарської та бере участь у захисті клітин від окисного пошкодження та пероксисного окислення ліпідів, також вона знижує рівень ФНП- α , одного із основних маркерів запалення [133]. Було показано, що хлорогенова кислота запобігає підвищенню систолічного артеріального тиску та послаблює діастолічну жорсткість лівого шлуночка при ожирінні. Ймовірно, це відбувається

шляхом зменшення відкладення колагену та запобігання інфільтрації запальних клітин. На моделях щурів було показано, що вона зменшує запалення та відкладення жиру в печінці та знижує ризик дисрегуляції ферментів печінки [134].

Кавова кислота володіє антивірусними, антибактеріальними та протираковими властивостями. Нещодавно було виявлено, що похідні кавової кислоти можуть бути антагоністами вірусних білків SARS-CoV-2, відповідальних за інфекційність вірусу [135]. Також було виявлено, що вона підсилює дію певних антибіотиків, таких як еритроміцин, кліндаміцин і цефокситин [136].

1.3.3. Потенційний захисний вплив ромашки за умов метаболічного синдрому

Як можна побачити з наведеного вище, усі активні компоненти ромашки лікарської загалом мають потужні антиоксидантні та протизапальні властивості. Як зазначалось раніше, саме запалення та ОС є одними з основних при розвитку МС. Антиоксидантні властивості цієї рослини забезпечуються першочергово флавоноїдами. Через наявність активних гідроксильних груп вони можуть служити донорами електронів і поглинати вільні радикали, а також відновлювати окислені біомолекули. Феноли з більшою кількістю гідроксильних груп мають більшу електронодонорну активність і, відповідно, вищі антиоксидантні властивості [15].

Багато попередніх досліджень на щурах з діабетом показало, що вживання етанольного екстракту з квітів ромашки зменшувало розвиток постпрандіальної гіперглікемії, інтенсивність ОС, та посилювало антиоксидантну систему захисту [20, 23, 137, 138]. Було виявлено, що лікування інсулінорезистентних мишей, які перебували на ВКІ, етанольним екстрактом ромашки, значно знизило резистентність до інсуліну, непереносимість глюкози та рівні ТАГ, неетерифікованих ЖК і холестеролу низької густини в плазмі [139]. Також є досліді і з водним відваром, які показали перспективні результати для лікування та попередження МС. Зокрема такий екстракт знижував підвищений рівень

глюкози в крові натще у щурів із діабетом [140]. Інше дослідження показало, що відвар ромашки запобігає збільшенню маси тіла, розвитку ОС в печінці та нирках, а також порушенню ліпідного профілю крові у щурів, яких годували їжею з високим вмістом жиру [22]. Також було виявлено, що відвар ромашки пом'якшував негативні зміни, спричинені АФК, та запаленням в мозку щурів, що споживали ВКІ [23]. Ромашка покращує чутливість до інсуліну, впливаючи на родину рецепторів, які активовані проліфератором пероксисом (PPAR), групу факторів транскрипції, які беруть участь у гомеостазі глюкози та ліпідів. Активацію PPAR зазвичай використовують для лікування інсулінорезистентності та дисліпідемії [141]. Показано, що екстракт ромашки активує ядерний рецептор PPAR γ у первинних адипоцитах людини, що призводить до специфічної експресії цільових генів PPAR γ [139]. Ці результати разом підтверджують потенційну активність препаратів ромашки проти ожиріння та ліпідемії.

Потенційний механізм дії ромашки, як захисної речовини при ожирінні, був описаний у статті Bayliak et al. (2021) [15]. Фенольні сполуки ромашки, особливо флавоноїди (апигенін, лютеолін і кверцетин), а також їх глікозиди, здатні уповільнювати перетравлення та всмоктування їжі в кишківнику. Це реалізується за рахунок інгибування ферментів, які беруть участь у розщепленні вуглеводів (амілази та мальтази) та інгибування транспортерів для моносахаридів. Квіти ромашки містять β -ситостерин, який перешкоджає всмоктуванню холестеролу в кишківнику за допомогою конкурентного механізму, та перешкоджає біосинтезу холестеролу *de novo*. Фенольні сполуки та ефірні олії ромашки мають антиоксидантні властивості, тому можуть захищати від ОС, пов'язаного з ожирінням [15]. Ожиріння характеризується розвитком хронічного запалення, основним фактором якого є NF- κ B. Коли рівень АФК зростає, підсилюється активація NF- κ B [142]. Послаблення продукції АФК при ожирінні завдяки антиоксидантній активності препаратів ромашки може сприяти запобіганню гіперактивації NF- κ B і подальшому вивільненню наступних запальних цитокінів. Пряма активація PPAR γ може бути ще одним захисним механізмом, який зменшує ліпотоксичність і покращує резистентність до інсуліну при ожирінні.

протеїнкіназа; mTOR – механістична мішень для рапаміцину; NF-κB – ядерний фактор-κB; Nrf2 – ядерний фактор еритроїдного походження 2; PPARγ – рецептор, який активований проліфератором пероксисом γ.

Ми вважаємо, що саме апігенін забезпечує протекторні властивості ромашки на тлі МС. Було виявлено, що саме цей флавоноїд запобігає накопиченню ліпідів у гепатоцитах HepG2, які піддавали впливу пальмітинової кислоти або високих концентрацій глюкози [145, 146]. Це було зумовлене тим, що апігенін посилював фосфорилування АМФ-залежної кінрази (АМРК) і знизив рівні 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктази та ацетил-КоА-карбоксилази [145, 146]. Ці дослідження підтверджують, що апігенін може мати протекторний ефект при дисліпідемії та діабеті шляхом регуляції енергетичного обміну. Lv et al. (2019) виявили, що апігенін запобігав розвитку НАЖХП у мишей, яких годували їжею з високим вмістом жиру [20]. Це було зумовлене тим, що апігенін скасував активацію інфламасоми NLRP3 (яка активується за споживання їжі з високим вмістом жиру), що в свою чергу призвело до зниження генерації прозапальних цитокінів IL-1β та IL-18, інгибування активності ксантиноксидази та зниження виробництва сечової кислоти, а також АФК [20]. Гепатопротекторні властивості апігеніну пов'язані з підвищенням експресії генів, залучених до окислення жирних кислот, циклу трикарбонових кислот і окисного фосфорилування, а також пригніченням експресії ліполітичних і ліпогенних генів [147]. Було встановлено, що модуляція активності PPARγ відповідає за метаболічні та транскрипційні зміни у мишей, до яких застосовували апігенін на тлі харчування з високим вмістом жиру [148]. У жировій тканині цих тварин апігенін активував PPARγ та блокував транслокацію комплексу PPARγ і p65 (активної субодиниці фактора NF-κB) у ядро. Це зменшило активацію NF-κB і, зрештою, пригнічувало запалення [148]. У печінці апігенін не мав значного впливу на PPARγ, але значно пригнічував експресію його таргетних генів. Ці гени кодують білки, які пов'язані з метаболізмом ліпідів [137]. У той же час, апігенін викликав активацію фактора транскрипції Nrf2. Останній транслокувався в ядро і впливав на експресію генів,

продукти яких могли пригнічувати ліпідний метаболізм та підвищувати антиоксидантний захист. Науковці висловили припущення, що активація Nrf2 може протидіяти активації PPAR γ у мишей, яких годували їжею з високим вмістом жиру та апігеніном [137]. Було виявлено, що апігенін може зменшувати глюконеогенез та літогенез [149]. Цей флавоноїд інгибував експресію глюконеогенних і ліпогенних генів у культурі клітин людини HepG2. Це супроводжувалося активацією сигнального шляху Nrf2, що свідчить про те, що останній бере участь у інгибуванні експресії глюконеогенних ферментів [149].

Апігенін не виявляв антиадипогенної дії у людських преадипоцитах (мезенхімальних жирових клітинах). Однак він запобігав накопиченню ТАГ у зрілих адипоцитах шляхом активації ліполізу [150]. Апігенін може пригнічувати адипогенез у мишачих преадипоцитах 3T3-L1 на ранніх та останніх стадіях диференціювання [151]. Aranaz et al. (2019) припускають, що фенольні сполуки взаємодіють зі специфічними залишками рецептора PPAR γ . Це може визначати їх потенційну антиадипогенну активність на ранніх стадіях диференціації [151].

Ще одним ключовим елементом в розвитку ожиріння є STAT3 (білок, який перетворює сигнал та активує транскрипцію 3). Активність STAT3 підвищена у вісцеральних адипоцитах пацієнтів із ожирінням, і вважається патогенним фактором вісцерального ожиріння [15]. Їжа з високим вмістом жиру підвищує фосфорилювання STAT3, що призводить до його переміщення в ядро та посиленої транслокаційної активності у вісцеральній жировій тканині [152]. Було виявлено, що апігенін зв'язується з нефосфорильованим STAT3 і у такий спосіб знижує фосфорилювання останнього. Цей флавоноїд також знижує експресію цільових генів, включаючи ген CD36, в адипоцитах [152].

Білок, який експресується геном CD36, вперше був ідентифікований, як трансмембранний транспортер жирних кислот. Спершу вважали, що він бере участь у поглинанні жирних кислот з довгим ланцюгом у тканинах, але тепер він визнаний багатофункціональним рецептором [15]. Інгибування диференціації адипоцитів під час лікування апігеніном супроводжувалося зниженням експресії CD36 та PPAR γ [152]. Wu et al. (2021) помітили, що апігенін може знижувати

рівні білків, які зв'язують регуляторні елементи стеролу – SREBP-1c та SREBP-2. Також апігенін знижує активність підпорядкованих їм генів, що кодують синтазу жирних кислот, стеарил-КоА-десатуразу 1 і 3-гідрокси-3-метил-глутарил-КоА-редуктазу в клітинах HepG2 з високим вмістом ліпідів, а також гепатоцитах мишей, яких годували їжею з високим вмістом жиру [153]. Ці результати підтверджують здатність апігеніну захищати клітини від надлишкового накопичення ліпідів.

Отже, завдяки апігеніну, ромашка лікарська має усі перспективи, як засіб боротьби з ожирінням та іншими захворюваннями, пов'язаними з МС. У цьому дослідженні ми вирішили застосувати саме ВВР, адже він є аналогом ромашкового чаю, який легко доступний та часто використовується у медичній практиці. Ми ставили за мету перевірити, чи буде впливати ВВР на показники ОС, запалення та перебіг гліколізу в мишей обох статей, які споживали їжу з додаванням маргарину.

У попередніх дослідженнях ВВР переважно застосовували на щурах, яких годували їжею з високим вмістом жиру [22, 23, 154], або на щурах з діабетом, який був викликаний стрептозоцином [140, 155, 156]. На мишах краще досліджений вплив етанольних екстрактів ромашки [139], або окремих флавоноїдів, зокрема апігеніну [19, 20, 153]. Застосування ВВР у харчуванні мишей, у яких є метаболічні порушення, залишається недостатньо дослідженим. Із літератури відомо, що застосування відварів різної концентрації сприяє формуванню помітних ефектів у щурів. Jabri et al. (2017) готували ВВР у співвідношенні 1 г : 5 мл, що відповідало концентрації 17%. Дослідники давали щурам ВВР щоденно методом гаважування із розрахунку 100 мг ромашки на 1 кг маси тіла тварини. Така доза відвару запобігала приросту маси тіла, знижувала рівні ТАГ і загального холестеролу в плазмі крові, та активувала систему антиоксидантного захисту в печінці [22].

Khan et al, (2014) у своєму експерименті використовували чай з ромашки, який готували у співвідношенні 1 г (1 чайний пакетик) : 150 мл води, і давали споживати щурам *ad libitum*. Не зважаючи на досить низьку концентрацію

ромашки у відварі (0,7%), дослідники спостерігали нижчий рівень глюкози в крові (натще та після їжі) та глікозильованого гемоглобіну в щурів з діабетом [157]. Оскільки ми планували досліджувати ВВР у тому вигляді, в якому його найчастіше застосовують у медичній практиці, то було вирішено готувати його за інструкцією виробника. Тому, кінцева концентрація ВВР, яку споживали миші, становила 1,6%. Також ми намагалися дослідити вплив ВВР у максимально природних умовах для мишей, тому не застосовували метод гаважування. Тварини споживали ВВР *ad libitum* замість води.

1.4. Періодичне голодування як потенційний засіб захисту при метаболічних порушеннях

Дієтичне обмеження – це зменшення споживання їжі відносно звичайного режиму харчування. Відомо, що його застосування має багато позитивних ефектів на здоров'я, як людини, так і тварин [27, 158]. Було встановлено, що дієтичне обмеження подовжує середню та максимальну тривалість життя, а також знижує ризик розвитку різноманітних вікових патологій [159, 160]. Відомо, що таке обмеження зменшує масу тіла і нормалізує рівень глюкози, інсуліну та лептину в крові у тварин і людей з ожирінням [161, 162]. Також дослідження показують, що обмежене харчування покращує роботу центральної нервової системи, та послаблює симптоми вікових нейродегенеративних розладів у моделях на гризунах [159, 163].

Існують два основних підходи моделювання дієтичного обмеження на гризунах – це калорійне обмеження (КО) та періодичне голодування [164]. Протягом КО дослідні тварини отримують їжу щодня, проте її кількість обмежується відповідно до умов експерименту – найчастіше на 30-40% менше, ніж при харчуванні *ad libitum*. При періодичному голодуванні тварини мають доступ до їжі лише на певний час, а в інший проміжок часу голодують. Наприклад, тварини можуть бути позбавлені їжі на цілий день, або на кожен другий день, або один день з трьох, а в проміжках між голодуваннями вони мають

доступ до їжі *ad libitum* [27, 163]. Найбільш перспективним вважають режим голодування через день (ГЧД). При ГЧД споживання їжі та голодування чергуються кожні 24 години [159, 160].

Дослідження показують, що ГЧД може бути ефективним підходом до лікування симптомів МС. Зокрема, завдяки метааналізу було встановлено, що харчування через день знижує масу тіла, ІМТ та загальний холестерол у людей з надмірною вагою [29]. У пацієнтів з НАЖХП позитивний ефект ГЧД проявлявся у зменшенні дисліпідемії зі значним зниженням рівня ТАГ у сироватці крові [30]. Дослідження ГЧД на молодих мишах, що споживали корм для гризунів, показали помірний пом'якшувальний вплив цього режиму харчування на біоенергетику та параметри ОС [28, 158, 163]. Періодичне голодування, яке застосоване до мишей, що споживали їжу з високим вмістом жиру, теж показало перспективні результати. Було встановлено, що у групі тварин, яких годували протягом восьмигодинного періоду, спостерігали зменшення ваги, підвищення чутливості до інсуліну, менший гепатостеатоз, зниження рівня маркерів запалення та покращену рухову координацію. Також у цих тварин спостерігали покращення функціонування CREB (cAMP response element-binding protein), mTOR і AMPK [165]. Інше дослідження на мишах за подібних умов теж показало зниження маси тіла, зменшення інсулінорезистентності, а також зниження рівня холестеролу та ФНП-α, порівняно як з групою, яка споживала ВКЇ, так і з групою тварин, що споживали стандартний лабораторний корм [166]. Також було виявлено, що годування протягом певного обмеженого часу підтримує циркадні ритми, регулює рівні лептину та адипонектину [167]. Миші після ГЧД демонстрували збільшення кількості бурого жиру, зниження рівня ожиріння, кращу чутливість до інсуліну та менший стеатоз печінки. Вважається, що ці ефекти залежать від кишкової мікробіоти, яка покращується при голодуванні [168].

Отже, було виявлено, що періодичне голодування може впливати на інсулінорезистентність, за рахунок регулювання рівня лептину та адипонектину, покращувати метаболізм глюкози у печінці та послаблювати запалення. Також обмежене споживання їжі, через зниження рівня холестеролу в плазмі, зниження

синтезу ЖК, регуляції рівня лептину та адипонектину, може покращувати стан організму при гіперліпідемії [49]. Такий режим харчування зменшує порушення в мітохондріях, що виникають при ожирінні, інгибує гіпертрофію адипоцитів, стимулює розвиток утворення бурої жирової тканини за рахунок нормалізації мікробіоти, а також зменшує внутрішньом'язові жирові депо, що обумовлює терапевтичний ефект при ожирінні. Захисний ефект періодичного голодування при гіпертензії зумовлений підвищенням парасимпатичної активності через посилення регуляції нейротрофічного фактору головного мозку, посилення виділення норадреналіну через нирки, підвищення чутливості до інсуліну та натрійуретичних пептидів [49].

Проте дослідниками були виявлені і негативні ефекти ГЧД, особливо для особин молодого віку. Зокрема, застосування ГЧД на молодих самках щурів знижувало їх вагу та споживання їжі, але збільшувало вміст запасних жирів, підвищувало концентрацію інсуліну в плазмі крові та зменшувало м'язову масу [169]. Також було виявлено, що застосування ГЧД в молодому віці викликає метаболічний стрес у мишей, які перед тим не страждали на МС [158]. Можна зробити висновок, що періодичне голодування може бути корисним лише у випадку наявності певних метаболічних порушень або в старшому віці, для попередження процесів старіння.

Оскільки періодичне голодування показало низку позитивних ефектів у боротьбі з різними порушеннями зумовленими МС, ми вирішили застосувати його як коригуючий режим харчування при споживанні їжі, збагаченої ТНЖК. З огляду на те, що вплив ГЧД на молодих тварин лишається неоднозначним, ми застосували його до одномісячних самців та самок мишей, які паралельно зі звичайним кормом споживали маргарин, як джерело ТНЖК. Також, беручи до уваги, що попередні дослідження виконані на тваринах лише однієї статі, ми вирішили перевірити, чи однаковий ефект буде мати така їжа на самців та самок за однакових умов перебігу експерименту.

1.5. Обмеження калорійності як засіб захисту організму від пошкоджень викликаних старінням

Калорійне обмеження (КО) – добре відомий режим харчування для продовження тривалості життя шляхом регулювання ключових фізіологічних і біохімічних процесів, зокрема проліферацію, запалення, аутофагію, а також активність мітохондрій та ендогенних антиоксидантних систем [31, 32]. Дефіцит поживних речовин інгибує шляхи, пов'язані з рецептором IGF-1 (insulin growth factor-1) та системою mTOR, і сприяє більш ефективному дихальному метаболізму, шляхом активації AMPK, сіртуїнів, та НАД⁺-залежних деацетилаз. AMPK фосфорилує численні клітинні мішені, інгибуючи mTOR та активуючи фактори виживання, такі як транскрипційний регулятор FOXO1. Крім того, AMPK активує катаболічні шляхи, зокрема гліколіз, окислення жирних кислот, окислювальне фосфорилування та розщеплення білків шляхом аутофагії [170].

Посилення потенціалу антиоксидантного захисту, зокрема, підвищення активності СОД, каталази та глутатіон-залежних ферментів, є ще одним важливим адаптивним механізмом [33, 171]. Нещодавно було виявлено, що у корі головного мозку самців мишей, які перебували на ГЧД, активність глутатіон-S-трансферази (GST) була вищою [163]. Цей фермент є важливим компонентом системи антиоксидантного захисту та стійкості до ксенобіотиків. Крім того, ГЧД зупиняє вікову втрату активності аконітази, ферменту, чутливого до окислення [163]. Протилежні ефекти були отримані в мозочку, де ГЧД викликав підвищення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ), але зниження активності GST [172]. Цей фермент забезпечує утворення відновлювальних еквівалентів (у вигляді відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату, НАДФН) для таких компонентів антиоксидантного захисту, як глутатіон, тіоредоксин і глутаредоксинредуктази [171]. Отже, навіть близькоспоріднені тканини можуть по-різному реагувати на КО.

Досліджень, які аналізують вплив КО на енергетичний метаболізм та антиоксидантний захист у різних тканинах мишей – небагато, на відміну від

численних досліджень у галузі транскриптоміки, протеоміки та метаболоміки [35, 173, 174]. Незважаючи на те, що вони надають великі масиви даних для майбутніх механістичних досліджень, ці дані потребують подальшої перевірки запропонованих молекулярних механізмів. Тому, функціональні дослідження, що вивчають відмінності в активності певних ферментів, кількості певних білків і концентрації певних метаболітів, можуть зробити значний внесок у розуміння результатів досліджень, що наведені вище.

У попередніх експериментах було виявлено, що дієтичні втручання дійсно впливають на енергетичний обмін та антиоксидантний захист [27, 28, 163, 172]. Гліколітичні та споріднені ферменти чутливі до окислення, і їхня активність може поступово знижуватися з віком [175]. З іншого боку, гліколіз є маркером проліферації та старіння клітин, і його зниження з віком може регулюватися також на рівнях транскрипції та трансляції [170]. У цій роботі ми зосередили увагу на впливі КО на розвиток ОС та порушення метаболічного обміну в печінці тварин, а також на систему антиоксидантного захисту нирок та кори головного мозку.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема експерименту з додаванням маргарину

Для дослідження впливу маргарину, ВВР та ГЧД були використані миші лінії *C57BL/6J* обох статей. Тварини були отримані з Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, м. Київ, Україна. Далі миші були розведені та утримувались на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені В. Стефаника. Схема експерименту наведена на рис. 2.1.



Рис. 2.1. Схема експерименту з додаванням маргарину.

До досягнення одномісячного віку тварини споживали корм для лабораторних тварин ПП «Резон-1» (м. Київ, Україна). До його складу входило: 22,8-23% білку, 6,3% жирів, 5,5-6,5% клітковини. Детальний склад лабораторного корму наведений в табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

Склад корму для лабораторних тварин ПП «Резон-1» (м. Київ, Україна):

кукурудза, ячмінь, пшениця, пшеничні висівки, макуха соняшникова, макуха соєва, рибне борошно, дріжджі кормові, молоко сухе знежирене, соняшникова олія, сіль, вітамінно-мінеральний комплекс, антиоксидант, інгібітор плісняви.

Енергетична цінність	ккал	3295
Сирий білок	%	22,8-23,0
Сира клітковина	%	5,50-6,50
Сирий жир	%	6,30
Метіонін+цистеїн	%	0,83
Лізин	%	1,20
Треонін	%	0,58
Ca	%	0,85
P	%	0,75
Na	%	0,14
Вітамін А	МО/кг	15000
Вітамін D3	МО/кг	2500
Вітамін Е	мг/кг	40
Вітамін К3	мг/кг	2
Вітамін В1	мг/кг	4
Вітамін В2	мг/кг	6
Вітамін В3	мг/кг	18
Вітамін В4	мг/кг	400
Вітамін В6	мг/кг	4
Вітамін В7	мг/кг	200
Вітамін В9	мг/кг	2
Вітамін В12	мг/кг	40
Fe	мг/кг	100
Zn	мг/кг	120
I	мкг/кг	280
Co	мкг/кг	1000
Se	мкг/кг	280
Mn	мг/кг	80

Протягом усього експерименту миші перебували в умовах 12-годинного циклу світло/темрява (світловий період з 6 год до 18 год) при температурі повітря $22 \pm 2^\circ\text{C}$ та вологості 50-60%. Після того як миші досягли необхідного віку (один місяць), їх було переведено на експериментальне харчування. У кожній групі було

по шість самців та самок, по дві клітки на групу, в кожній по три миші однієї статі. Для кожної експериментальної групи було використано мінімально необхідну кількість тварин, щоб уникнути недостовірності даних або недостатньої кількості результатів.

Перша група (контрольна) продовжила споживати лабораторний корм. Другій групі, окрім базового корму, до раціону додавали маргарин 70% жирності («Сонячний щедрик», ТМ Олком) (Табл. 2.2).

Таблиця 2. 2.

Склад маргарину «Сонячний щедрик», ТМ Олком (м. Київ, Україна).

Склад:	жири рослинні гідрогенізовані, олія соняшникова рафінована дезодорована; вода питна; емульгатори: моногліцериди, лецитин соєвий; цукор; молоко сухе знежирене; сіль кухонна харчова; консервант сорбат калію; регулятор кислотності кислота лимонна; ароматизатор «Масло-Крем»; барвник бета-каротин.
Поживна (харчова) цінність 100 г продукту:	Жири – 70 г (з яких насичені 12,9-18,2 г). Вуглеводи – 0,1 г (включно з цукром 0,1 г). Білки – 0,1 г. Сіль – 0,2 г. Енергетична цінність – 2648 кДж (633 ккал)

Маргарин давали у надлишку, в окремій посудині, одна ємність на клітку (14 г), замінювали раз на два дні. Третя група мишей споживала корм та маргарин, але замість води їм давали ВВР, який готували заздалегідь із сухої речовини (ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола»), та заморожували. Відвар замінювали кожен день, о 9 год, аби уникнути бактеріального зараження. Четвертій групі тварин давали їжу (маргарин та корм) через день. Їжу давали чи забирали кожного дня о 9 год. Усі тварини мали необмежений доступ до води та їжі, які замінювались раз на тиждень. На дослідних видах харчування миші перебували протягом чотирьох місяців.

2.2. Схема експерименту із використанням калорійного обмеження

Для дослідження впливу КО на тварин різного віку були використані самці та самки мишей лінії *C57BL/6N*, які утримувались на базі кафедри нейрофізіології Тюбінгенського університету, м. Тюбінген, Німеччина. Схема експерименту наведена на рис. 2.2.

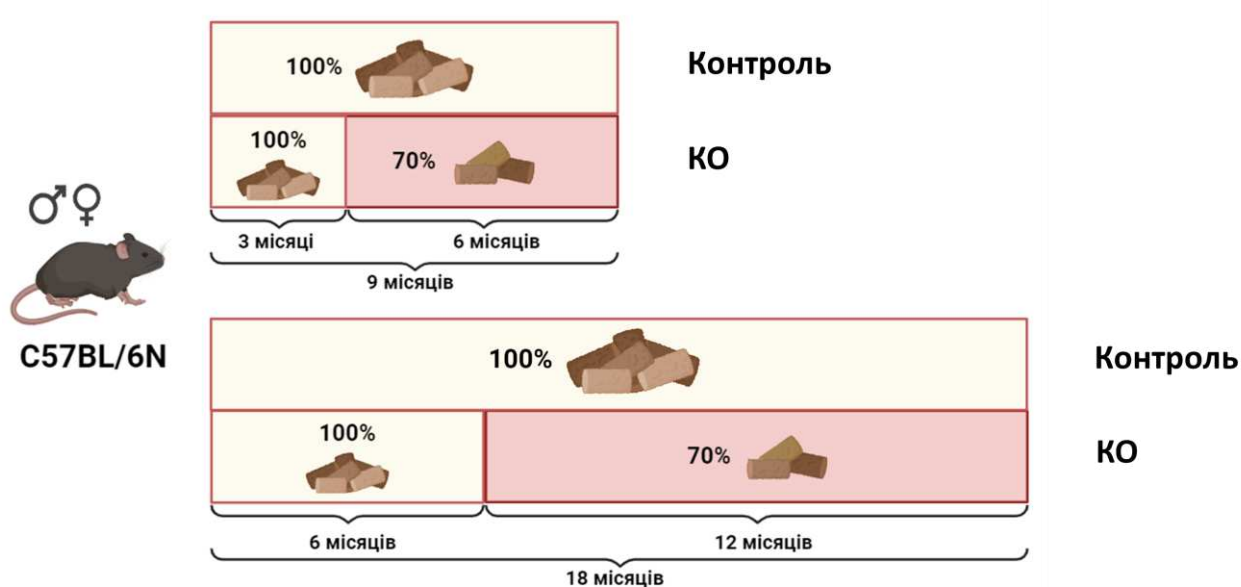


Рис. 2.2. Схема експерименту із застосуванням калорійного обмеження (КО).

У цьому дослідженні було використано дві контрольні та дві дослідні групи тварин. Контрольні групи мишей споживали лабораторний корм *ad libitum* протягом усього періоду, до досягнення дев'яти- (середнього) або вісімнадцятимісячного (старшого) віку. Дослідні групи тварин отримували 70% від індивідуального споживання їжі *ad libitum*. У групі середнього віку режим КО починався з трьохмісячного віку і тривав шість місяців, а в групі старшого віку розпочинався у шість місяців і тривав протягом дванадцяти місяців. Отже, контрольні та дослідні групи мали однаковий вік на кінець експерименту. Тварин тримали по одній у клітці, із постійним доступом до води, в умовах 12-годинного

циклу світло/темрява. У контрольних групах було використано шість мишей середнього віку та чотири миші старшого віку. До складу груп, яким застосовували КО, входили три тварини середнього віку, та дві – старшого. Через малу кількість мишей у старшій групі з КО були проведені технічні повтори визначення біохімічних параметрів.

Усі маніпуляції з лабораторними тваринами у експериментах із додаванням маргарину та застосуванням КО були проведені відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради Європейського Союзу про захист тварин, які використовуються в наукових цілях, та схвалені Комісією з питань етики Прикарпатського національного університету імені В. Стефаника (протокол №1 від 05.01.2021 року).

2.3. Приготування водного відвару квітів ромашки

Для приготування ВВР використовували аптечний препарат фармацевтичної фабрики «Віола». Відвар готували відповідно до інструкції виробника. Сухі квіти ромашки розтирали у ступці та заливали водою у співвідношенні 1:30 (1 г сировини на 30 мл води). Далі суміш ставили кип'ятити, після закипання варили ще 5 хв. Отриманий відвар охолоджували, відціджували та доводили до вихідного об'єму дистильованою водою. Цей розчин заморожували та зберігали у морозильній камері при -20°C . Перед тим, як давати відвар мишам, його розморожували та розводили у співвідношенні 1:1 питною водою. Кінцева концентрація відвару, який отримували тварини, становила 1,6%.

2.4. Визначення морфометричних та фізіологічних показників

Протягом перебування мишей на дослідних видах харчування у них визначали масу тіла, об'єм випитої води, або відвару ромашки та кількість спожитої їжі. Експериментальних тварин зважували щотижня використовуючи електронні ваги. Так само раз на тиждень вимірювали об'єм випитої води та кількість корму, який з'їли тварини. Кількість маргарину та ВВР, що спожили

миші, вимірювали протягом їх заміни раз у два дні чи раз на день відповідно. Показник знімали в межах 9-10 год ранку. Довжину тіла мишей визначали перед забоєм, вимірюючи відстань від кінчика носа тварини до основи хвоста з черевного боку. Довжину вимірювали в сантиметрах, використовуючи лінійку.

Щоб визначити, чи виникли у мишей морфометричні ознаки ожиріння, у тварин визначали індекс маси тіла (ІМТ) та індекс ожиріння Лі. Для розрахунку ІМТ, масу мишей ділили на довжину тіла піднесену до квадрата. Індекс ожиріння Лі розраховували шляхом ділення кубічного кореня ваги тварин на їх довжину. Цей показник розроблено спеціально для визначення ожиріння у гризунів [9, 176]. Для розрахунку ІМТ та індексу ожиріння Лі використовували значення маси тіла, яке було виміряне перед забоєм.

2.5. Забір зразків

Після досягнення п'ятимісячного віку, мишей, які споживали маргарин, ВВР та ГЧД, піддавали анестезії за допомогою вуглекислого газу, і проводили забір крові. Кров для досліджень брали з ретроорбітального синуса за допомогою скляних мікрокапілярів (HIRSCHMANN, Німеччина). Після чого мишей евтаназували, застосовуючи цервікальну дислокацію, та проводили забір органів. Кров центрифугували з додаванням 10 мкл антикоагулянту (гепарин) при 4°C, 1500 g, 15 хв, для отримання плазми. Після забору печінку, нирки, серце, кору головного мозку та жирову тканину промивали у фізіологічному розчині NaCl (0,9%), щоб позбутися від залишків крові, та підсушували фільтрувальним папером. Отриману плазму та органи піддавали швидкому заморожуванню за допомогою рідкого азоту, а далі зберігали при -80°C у криопробірках [27, 158].

Кров у мишей, які перебували на експерименті з КО, брали прижиттєво з хвостової вени. Для забору органів тварин спочатку анестезували, використовуючи кетамін (200 мг/кг маси тіла) та ксилазин (20 мг/кг маси тіла). Далі розтинали черевну стінку через серединний розріз. Грудну порожнину відкривали шляхом розрізання ребер знизу вгору. Після цього оголювали серце і

вводили перфузійну канюлю в лівий шлуночок. Правий шлуночок проколювали для відтоку крові. Через канюлю серце перфузували холодним калій-фосфатним буферним розчином, KH_2PO_4 (КФБ), протягом 2 хв, поки в судинах та органах не залишалось крові [170, 177]. Після забору печінку, нирки та кору головного мозку заморожували на сухому льоду. Плазму отримували шляхом центрифугування крові при 4°C , 4000g, протягом 15 хв. Отримані органи та плазму крові зберігали при -80°C [170].

2.6. Приготування мазків крові та їх аналіз

Для приготування мазків використовували свіжу кров, взятую з ретроорбітального синуса. Краплину крові наносили на попередньо знежирене у суміші Нікіфорова предметне скельце, на відстані 1 см від краю. До краплі крові, під кутом 45° , прикладали шліфувальне скельце, чекали поки кров рівномірно розтечеться по його ребрі, а потім швидким рухом розтягували кров по предметному склі. Отриманий мазок висушували на повітрі та фарбували методом Паппенгейма-Крюкова [158, 178]. Спочатку мазок покривали 1 мл розчину Май-Грюнвальда і тримали 40 хв., потім промивали дистильованою водою. Далі на скельце наносили фарбу Романовського-Гімзи на 20 хв, після чого промивали дистильованою водою. Пофарбовані мазки крові досліджували під світловим мікроскопом, використовуючи імерсійний об'єктив зі збільшенням $\times 1000$. Фарби готували безпосередньо перед використанням: фарбу Май-Грюнвальда розводили у 96% етанолі у співвідношенні 1:3. Фарбу Романовського-Гімзи розводили у дистильованій воді, 20 крапель на 10 мл води.

2.7. Приготування супернатантів

Для визначення активності СОД, каталази, Г6ФДГ, глутатіон-залежних ферментів та вмісту тіолових груп, тканини гомогенізували у співвідношенні 1:10 у середовищі гомогенізації, до складу якого входили 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) та 0,8 мМ фенілметилсульфонілфторид

(ФМСФ) розчинений у 96% етанолі (вказано кінцеві концентрації), а також дистильована вода, якою доводили розчин до необхідного об'єму. Для визначення гліколітичних ферментів (фосфофруктокінази, ФФК, та піруваткінази, ПК) гомогенізацію проводили у середовищі, що містило: 50 мМ імідазольний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ розчинений в 96% етанолі, 1 мМ дитіотрейтол (ДТТ), 20 мМ NaF, 150 мМ KCl (вказано кінцеві концентрації) та доводили дистильованою водою до необхідного об'єму. Отримані гомогенати центрифугували при 16000 g, 4°C, протягом 15 хв.

Для визначення вмісту ПЛ тканини гомогенізували у співвідношенні 1:10 (1:20 для печінки) у 96% етанолі. Центрифугування здійснювали при 12000 g, 4°C, протягом 10 хв. Гомогенізацію для визначення глюкози та глікогену проводили у співвідношенні 1:10, у середовищі, що містило: 50 мМ КФБ (рН 7,4), 0,09% NaN₃ (вказано кінцеві концентрації) та воду. Далі зразки інкубували на водяній бані при 70°C, протягом 5 хв, а потім переносили на лід на 5 хв. для осадження білків. Далі проби центрифугували при 12000 g, 21°C, протягом 15 хв.

Для визначення ТАГ та загального холестеролу тканини гомогенізували у PBST буфері (phosphate-buffered saline, що містить 10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0.05% Triton x-100, рН 7,4 (вказано кінцеві концентрації)). Далі проби інкубували на водяній бані (70°C) протягом 10 хв, а далі центрифугували при 12000 g, 21°C, протягом 15 хв.

Гомогенізацію всіх тканин проводили на льоді. Центрифугування проводили на центрифугузі Eppendorf 5415R (Німеччина).

2.8. Визначення вмісту інтерлейкіну-1β

ІЛ-1β визначали у жировій тканині та плазмі крові мишей обох статей, використовуючи імуноферментний аналіз (ІФА). Жирову тканину спочатку гомогенізували в охолоджену буфері, що містив 50 мМ Tris рН 7,5, 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100 та інгібітор протеаз (20 мг/мл, SIGMAFAST S8820) (вказано кінцеві концентрації). Далі гомогенати інкубували протягом 2 год. при

4°C для лізису клітин. Після центрифугування при 16000 g протягом 15 хв. при 4°C супернатанти відбирали і використовували для визначення рівня ІЛ-1 β . Зразки зберігали при -80°C. Далі їх розводили у співвідношенні 1:1 1х фосфатним буфером (ФБ), з розрахунку 250 нг білку на лунку. Плазму крові розводили в п'ять разів, і додавали 100 мкл розведеної плазми в кожен лунку для кожного зразка. Потім жирову тканину інкубували при 4°C протягом 12 год, а плазму крові інкубували протягом 2 год при кімнатній температурі. Після цього та кожного наступного етапу зразки тричі промивали 100 мкл ФБ. Для блокування використовували 200 мкл 4% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (2 год. при кімнатній температурі). Альбумін розводили в ФБ. Після цього до зразків додавали первинні антитіла проти ІЛ-1 β (ab9722) (попередньо розведені дистильованою водою до концентрації 100 мкг/мл), розведені в 4% БСА (1:100), і залишали на 2 год при кімнатній температурі. Вторинні анти-кролячі антитіла (CellSignaling #7074S), розведені в 4% БСА (1:2500), додавали після промивання. Зразки інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі. Після промивання до зразків додавали 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидину дигідрохлориду, який є субстратом для пероксидази хрому на вторинних антитілах. Потім зразки інкубували при 37°C протягом 22 хв до появи синього забарвлення. Після інкубації реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2М H₂SO₄ і визначали оптичне поглинання при 450 нм. Визначення проводили на мікропланшетному фотометрі Multiskan MCC/340 (Фінляндія). Результати виражали у відносних одиницях від середнього значення поглинання контрольної групи кожної статі.

2.9. Визначення активності параоксонази

Параоксоназа (ПОН) запобігає окисному пошкодженню ЛПВГ та ЛПНГ, розщеплюючи окислені ліпіди; її активність збільшується протягом розвитку запальних процесів в організмі [179, 180].

Для визначення ПОН плазму розводили в 10 разів у суміші для визначення ферменту. Суміш готували безпосередньо перед визначенням, до її складу

входили: 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), 1 мМ CaCl_2 (вказано кінцеві концентрації), та доводили дистильованою водою до необхідного об'єму. Суміш перебувала на водяній бані при 25°C. Для визначення використовували пластикову кювету, яка поглинає ультрафіолет. У кювету послідовно вносили реакційну суміш, 5-10 мкл розведеного супернатанту (залежно від активності ферменту в пробі), 160 мМ 4-динітрофенілацетат, та доводили дистильованою водою до 1250 мкл. Паралельно з дослідними зразками готували холості проби. Останні визначали паралельно, замість супернатанту в кювету додавали дистильовану воду. Активність ферменту визначали на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) при довжині хвилі 405 нм протягом 90 секунд з інтервалом в 10 секунд. Активність ферменту виражали у ммоль/л [180].

2.10. Визначення активності мієлопероксидази

Мієлопероксидаза (МПО) є одним із захисних ферментів організму. При наявності субстрату може викликати пошкодження тканин внаслідок окислення. За наявності запальних процесів активність МПО в крові зростає [180, 181].

Для визначення активності МПО ми використали метод, який базується на здатності 3,3',5,5'-тетраметилбензидину окислюватися H_2O_2 під впливом МПО з утворенням оксибензидину коричневого кольору. Активність ферменту визначали спектрофотометричним методом, фіксуючи зміну інтенсивності забарвлення розчину [182, 183].

Для визначення готували паралельно контрольну та дослідну проби. На 300 мкл проби до лунки послідовно додавали розчин Хенкса, 10 мкл плазми (нерозведеної), 20 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин гідрохлорид, 1 М H_2O_2 (вказано кінцеві концентрації). У контрольну пробу замість супернатанту додавали розчин Хенкса. Інкубували при кімнатній температурі протягом двох хвилин. Після завершення інкубації до всіх проб вносили 4 М H_2SO_4 для зупинки реакції. Визначення проводили на мікропланшетному фотометрі Multiskan

МСС/340 (Фінляндія) при довжині хвилі 450 нм. Активність ферменту виражали у ммоль/л.

2.11. Визначення вмісту пероксидів ліпідів

Вміст ПЛ визначали непрямим методом, використовуючи ксиленол оранжевий. Після того, як ПЛ окислюють іони Fe^{2+} до Fe^{3+} , останній формує специфічний комплекс з ксиленолом оранжевим, що поглинає світло при 580 нм.

Для визначення ПЛ в пробірку послідовно додавали 4 мМ ксиленол оранжевий, 1 М H_2SO_4 , 1 мМ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 20 мкл супернатанту, та доводили дистильованою водою до 1500 мкл (вказано кінцеві концентрації). Для холостої проби замість супернатанту додавали 20 мкл 96% етилового спирту. Зразки інкубували протягом 60 хв. при кімнатній температурі. Проби готували у двох повторях. Визначення проводили при довжині хвилі 580 нм на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) у пластиковій кюветі. Отримані результати виражали в еквівалентах гідропероксиду кумену на грам сирової маси (екв. ГПК/г.с.м.) [184, 185].

2.12. Визначення вмісту тіолових груп

В основі цього методу лежить реакція тіолдисульфідного обміну, результатом перебігу якої є утворення 2-нітро-5-тіобензоату (ДТНБ). Останній дуже чутливий до рН середовища та поглинає світло за довжини хвилі 412 нм.

Паралельно готували проби для визначення низькомолекулярних та загальних тіолів. Щоб визначити низькомолекулярні тіоли, необхідно осадити білки, тому до супернатантів додавали 30% трихлороцтову кислоту (ТХО) у співвідношенні 2:1. Проби з ТХО центрифугували при 16000 g, 4°C, протягом 5 хв. Отримані супернатанти переносили у пластикові мікропробірки та зберігали при 4°C.

Для визначення загальних тіолів готували дослідні та одну холосту проби. У холосту пробу замість супернатанту додавали середовище гомогенізації. У

дослідну пробу (1500 мкл) послідовно додавали 100 мМ КФБ (рН 8,0), 1 мМ ДТНБ та 50 мкл супернатанту (вказано кінцеві концентрації). Для низькомолекулярних тіолів також готували холосту пробу. У пробірку для визначення низькомолекулярних тіолів послідовно вносили 100 мМ Трис-НСІ буфер (рН 9,0), 1 мМ ДТНБ та 75 мкл супернатанту з ТХО, загальний об'єм 1500 мкл (вказано кінцеві концентрації). Далі проби для визначення низькомолекулярних та загальних тіолів ставили інкубувати на 30 хв. при кімнатній температурі. Визначення проводили при довжині хвилі 412 нм на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) у пластиковій кюветі, онулювали прилад по повітрю. Результати виражали у мкмоль/г.с.м. Вміст високомолекулярних тіолів розраховували, як різницю між загальними та низькомолекулярними тіолами [185].

2.13. Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Глутатіон-S-трансфераза (GST) каталізує реакцію кон'югації відновленого глутатіону (GSH) та 1-хлоро-2,4-динітробензену (ХДНБ), результатом якої є утворення комплексу динітрофенілтіоестеру. Активність GST визначали спектрофотометрично за швидкістю утворення кінцевого продукту реакції (динітрофенілтіоестеру) при довжині хвилі 340 нм.

Для визначення активності ферменту в кювету послідовно додавали реакційну суміш, 2 мкл супернатанту, 1 мМ ХДНБ, загальний об'єм проби становив 1250 мкл. Паралельно з дослідними пробами готували холості, де супернатант замінювали на аналогічний об'єм середовища гомогенізації. До складу реакційної суміші входило: 50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ GSH та вода (вказано кінцеві концентрації). Суміш інкубували на водяній бані при 25°C. Визначення проводили на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) у пластиковій кюветі протягом 90 с з інтервалом в 10 с, онулювали прилад по повітрю. Результати виражали у Од/мг білку [172, 186].

2.14. Визначення активності глутатіонпероксидази

Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали непрямим методом, реєструючи швидкість окислення НАДФН до НАДФ⁺. НАДФН разом з глутатіонредуктазою бере участь у реакції відновлення окисленого глутатіону до GSH. Окислений глутатіон утворюється в результаті детоксикації ПЛ завдяки ГП.

Спочатку готували реакційну суміш, яку інкубували на водяній бані при 25°C протягом всього визначення. До її складу входило: 50 мМ КФБ, 0,5 мМ ЕДТА, 4 мМ NaN₃, 0,25 мМ НАДФН та вода. Для визначення активності ферменту у пластикову кювету послідовно вносили реакційну суміш, 1 Од/мл глутатіонредуктази, 0,2 мМ H₂O₂ та 50 мкл супернатанту (вказано кінцеві концентрації). Загальний об'єм проби становив 1250 мкл. Паралельно з дослідними готували холості проби, де об'єм супернатанту замінювали ідентичною кількістю середовища гомогенізації. Визначення проводили на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) при 340 нм протягом 90 с з інтервалом в 10 с, онулювали прилад по повітрю. Результати виражали у мОд/мг білку [172, 186].

2.15. Визначення активності каталази

Активність ферменту визначали на основі реакції розпаду H₂O₂ до води та кисню під дією каталази.

Суміш для визначення містила 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та воду. До кювети додавали суміш, 10 мкл супернатанту та 10 мМ H₂O₂ (вказано кінцеві концентрації). Об'єм проби становив 2 мл. Визначення проводили в УФ-області при 240 нм у кварцовій кюветі, на спектрофотометрі СФ-46. Прилад онулювали по реакційній суміші. Реєстрували зміну оптичного поглинання кожні 70 с з інтервалом 5 с. Результати виражали в Од/мг білку [172, 187].

2.16. Визначення активності супероксиддисмутази

В основі методу знаходиться інгибування реакції окислення кверцетину СОД. Для визначення активності цього ферменту використовували N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), який може утворювати супероксидний аніон-радикал при наявності кисню. До складу реакційної суміші входив: 30 мМ Трис-буфер (рН 10,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ ТЕМЕД та вода (вказано кінцеві концентрації). До цієї суміші додавали різні концентрації супернатанту та кверцетин (кінцева концентрація 0,05 мМ). Активність СОД визначали спектрофотометрично, фіксуючи швидкість реакції окислення кверцетину протягом 70 с при довжині хвилі 406 нм. Після додавання до суміші кверцетину та супернатанту реакція окислення сповільнювалася, бо обидві речовини починали конкурувати за супероксидний аніон-радикал. При додаванні більшої концентрації супернатанту швидкість окислення кверцетину знижувалась. Криву інгибування та константу половинного інгибування кверцетину будували та розраховували за допомогою комп'ютерної програми KINETICS. Результати виражали в Од/мг білку [172, 186].

2.17. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

Активність Г6ФДГ визначали спектрофотометричним методом, фіксуючи реакцію відновлення НАДФ до НАДФН. Відновлення НАДФ відбувається за участі іонів Mg^{2+} , та каталізується Г6ФДГ в межах окислення глюкозо-6-фосфату (Г6Ф) до 6-фосфоглюколактону.

Для визначення активності ферменту готували реакційну суміш, що містила: 50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ Г6Ф, 0,2 мМ НАДФ та воду (вказано кінцеві концентрації). Загальний об'єм проби становив 1250 мкл, з них 20 мкл супернатанту. Визначення проводили на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) при 340 нм протягом 90 с з інтервалом в 10 с, онулювали прилад по повітрю. Результати виражали у мОд/мг білку [172, 186].

2.18. Визначення активності піруваткінази та фосфофруктокінази

Активність ферментів визначали завдяки спряженим реакціям окислення НАДН.

Активність ПК визначали використовуючи реакційну суміш, до якої входило: 50 мМ імідазольного буферу (рН 7,5), 1 мМ фосфоенолпірувату, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl , 2,5 мМ АДФ, 0,16 мМ НАДН, 2,5 Од лактатдегідрогенази (ЛДГ) та вода (вказано кінцеві концентрації).

Для визначення активності ФФК використовували суміш, яка містила 50 мМ імідазольного буферу (рН 7,5), 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl , 5 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН, 0,5 Од альдолази, 0,5 Од тріозофосфатізомерази, 2 Од гліцерол-3-фосфатдегідрогенази, 5 мМ фруктозо-6-фосфат (вказано кінцеві концентрації).

Загальний об'єм проб для визначення активності ПК та ФФК становив 1 мл. Визначення проводили на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) при 340 нм протягом 90 с з інтервалом в 10 с, онулювали прилад по повітрю. Результати виражали у мОд/мг білку [172].

2.19. Визначення вмісту глюкози та глікогену

Глюкозу та глікоген для експерименту з маргарином визначали за допомогою діагностичного набору «Глюкоза-моно-400-Р» ПрАТ «Реагент» (Дніпро, Україна). Для експерименту з калорійним обмеженням використовували набір D-Glucose Assay Kit (GOPOD Format) від Megazyme Ltd. (Брей, Ірландія), дотримуючись інструкції, що входила до його складу. В основі методу – окислення глюкози з утворенням H_2O_2 за участю ферменту глюкозооксидази. Кількість виділеного H_2O_2 відповідає кількості глюкози. Далі він відновлюється до води пероксидазою в присутності 4-амінофеназону. Сполука, яка утворюється в результаті цієї реакції – 4-(*p*-бензохінономоніміно)-феназон – рожевого кольору, що поглинає світло при довжині хвилі 540 нм.

Щоб визначити глікоген, до проби додавали амілоглюкозидазу. Фермент розщеплював його до глюкози, яку визначали за принципом наведеним вище.

Паралельно готували дослідні проби та проби для калібрувального графіка. У калібрувальні зразки додавали різні об'єми стандартного розчину глюкози, що входив до набору, до досягнення кінцевих концентрацій – 0 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 12 мкг/мл, 16 мкг/мл, 20 мкг/мл. У пробірки для визначення глікогену додавали 10 мкл супернатанту, 1 мкл 9% NaN_3 , 10 мкл 5,5 Од амілоглюкозидази та доводили водою до 100 мкл, після чого ставили на інкубацію при 37°C на 4 год. Після завершення інкубації до цих проб додавали 500 мкл робочого розчину з набору і знову інкубували при тій же температурі протягом 15 хв.

Для визначення глюкози у пробірки додавали 10 мкл супернатанту та 80 мкл води. Далі до зразків та калібрувальних проб додавали по 500 мкл робочого розчину з набору та ставили інкубувати на 15 хв при 37°C. Після завершення останньої інкубації до всіх проб додавали 500 мкл води та визначали кількість глюкози на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм, використовували пластикову кювету. Онулювали прилад по першій калібрувальній пробі, що не містила глюкози. Результати виражали в мг/г.с.м. [170, 183].

2.20. Визначення вмісту триацилгліцеридів

Визначення ТАГ проводили за допомогою діагностичного набору «Тригліцериди-моно-100-Р» ПрАТ «Реагент» (Дніпро, Україна). Принцип методу базується на розщепленні ліпідів із утворенням гліцеролу. Останній піддається фосфорилуванню, а далі окисленню, в результаті чого утворюється H_2O_2 , як побічний продукт. Пероксид окислює 4-аміноантипірін, що входить до складу робочого розчину (з набору), до хіноніміну малинового забарвлення, що поглинає світло при довжині хвилі 540 нм.

Для визначення ТАГ готували дослідні та калібрувальні проби. Пробі для побудови калібрувального графіка містили різну концентрацію стандартного розчину ТАГ (0 мкг/мл, 2,2 мкг/мл, 4,4 мкг/мл, 8,8 мкг/мл, 13,2 мкг/мл, 17,6

мкг/мл, 22 мкг/мл – мкг ТАГ у мл зразку, вказано кінцеві концентрації). У дослідні проби додавали по 50 мкл супернатанту та доводили водою до 100 мкл. Далі до всіх пробірок додавали по 300 мкл робочого розчину, та перемішували на струшувачі Vortex ZX4 по 10 с кожно. Потім ставили у термостат на 15 хв при 37°C. Після інкубації об'єм проб доводили до 1 мл водою, перемішували на струшувачі протягом 10 с та вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі Spekol 211 (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. Визначення проводили у пластиковій кюветі, онулювали прилад по першій пробі калібровки, в якій був відсутній стандартний розчин ТАГ. Результати виражали в мг/г.с.м. [183].

2.21. Визначення вмісту загального холестеролу

Під дією холестеролоксидази відбувається окислення холестеролу до Δ -4-холестенону з утворенням H_2O_2 . Останній взаємодіє з 4-амінофеназоном та утворює забарвлену сполуку – хінонімін. Залежно від інтенсивності забарвлення, визначали вміст загального холестеролу спектрофотометричним методом.

Для визначення використовували діагностичний набір «Холестерин-моно-100-Р» ПрАТ «Реагент» (Дніпро, Україна). Готували холості, калібрувальні та дослідні проби. Калібрувальні проби містили різну концентрацію холестеролу (калібрувального розчину): 0 ммоль/л, 0,65 ммоль/л, 1,3 ммоль/л, 2,6 ммоль/л, 3,9 ммоль/л, 5,2 ммоль/л (вказано кінцеві концентрації). У дослідні проби додавали по 3 мкл супернатанту, а в холості по – 3 мкл води. Далі до всіх зразків додавали 250 мкл монореагенту (з набору), перемішували та ставили в термостат на 15 хв при 37°C. Визначення проводили одразу після інкубації на мікропланшетному фотометрі Multiskan MCC/340 (Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм. Результати виражали в ммоль/г.с.м.

2.22. Визначення вмісту загального білку

Активності ферментів перераховували на мг білку. Для визначення його вмісту в зразку застосовували метод Бредфорда. Цей метод базується на тому, що

білки, зв'язуючись з барвником Кумасі G-250, утворюють сполуки синього кольору, що поглинають світло при довжині хвилі 595 нм [188].

Для визначення вмісту загального білку спочатку готували калібрувальні проби, за значеннями яких будували калібрувальний графік. До їх складу входив розчин БСА різних концентрацій (0 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 12 мкг/мл, 16 мкг/мл, вказано кінцеві концентрації). У дослідні проби додавали по 1 мкл супернатанту. Проби готували у двох повторях, щоб уникнути похибки. Далі до калібрувальних та дослідних проб вносили 1000 мкл розчину Кумасі G-250 та інкубували протягом 10 хв. Загальний об'єм проб становив 2 мл. Визначення проводили на фотометрі Eppendorf BioPhotometer (Німеччина). Нулювали прилад по першій пробі калібровки. Результати визначення виражали у грамах білку на літр супернатанту.

2.23. Статистична обробка даних

Отримані результати обраховували за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. Статистичний аналіз проводили, використовуючи програмне забезпечення R (версія 3.2.4 для Windows). Для визначення статистичної відмінності між показниками, отриманими на експерименті з маргарином, використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з подальшим множинним порівнянням за допомогою множинного критерію Дункана, через R (пакет «DescTools»).

Для експерименту з КО дані були перевірені на нормальність за критерієм Ліліфорса та однорідність дисперсії за критерієм Левена з використанням R (пакет «DescTools»). За необхідності дані були трансформовані за допомогою масштабованого ступеневого перетворення інструментами, реалізованими в R (пакет «car»). Для проведення попарних порівнянь між групами було застосовано метод оцінки граничних середніх за допомогою пакета R «emmeans».

Різницю між показниками, які були отримані в двох експериментах, вважали достовірною за значення $p \leq 0,05$. Порівняння проводили між усіма

групами, що приймали участь в експерименті, а також між статями. Візуалізацію даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism версія 8.0.2 для Windows. Результати представляли у вигляді середнього значення $\pm$ стандартна похибка середнього ($M \pm SEM$).

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ МАРГАРИН-ВМІСНОЇ ЇЖІ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ МИШЕЙ

3.1. Зміна морфометричних показників мишей, які споживали маргарин з додаванням відвару ромашки та застосуванням голодування через день

Відомо, що споживання їжі з високим вмістом жирів та вуглеводів може викликати ожиріння, основним параметром якого є збільшення маси тіла. Більшість досліджень проведено на самцях гризунів, що свідчить про їхню чутливість до розвитку ожиріння [189, 190, 191, 192, 193]. Вважається, що самки стійкіші до ВКІ та слабше проявляють метаболічні зміни [194, 195]. Для того, щоб змодельовати ожиріння, варто використовувати їжу з вмістом жиру вище 45%. Науковці виявили, що споживання їжі з вмістом жиру 45% та 60% викликає розвиток ожиріння, інсулінорезистентність, гіпертригліцеридемію, стеатоз печінки та гіпертензію. Хоча інтенсивність отриманих ефектів сильно залежить від типу жиру (рослинного чи тваринного походження), який використано в дієті, тривалості експерименту та виду гризунів [191]. Також було встановлено, що споживання їжі з додаванням маргарину викликало збільшення маси тіла у самців мишей [196] та щурів обох статей [8, 9].

У цьому дослідженні ми спостерігали поступове збільшення маси тіла тварин на усіх дослідних видах харчування (рис. 3.1 А, Б). Це пов'язано з тим, що для експерименту були використані дуже молоді (одномісячні) миші, які продовжували свій ріст, що підтверджують попередні дослідження [158, 189, 193]. Отримані результати показали, що додавання маргарину до харчування викликало тенденцію до зростання маси тіла самців та самок мишей порівняно до контрольних груп (рис. 3.1 А, Б). Через внутрішньогрупову варіабельність лише самці, які споживали маргарин, мали достовірно вищу масу тіла, ніж контрольні миші наприкінці експерименту (рис. 3.1 В). Їх маса була на 23% вищою, ніж у мишей, що споживали лише лабораторний корм. Додавання ВВР до їжі,

збагаченої маргарином, призвело до того, що маса тіла самців на момент завершення експерименту була на 12% нижчою порівняно з групою, яка споживала маргарин без відвару.

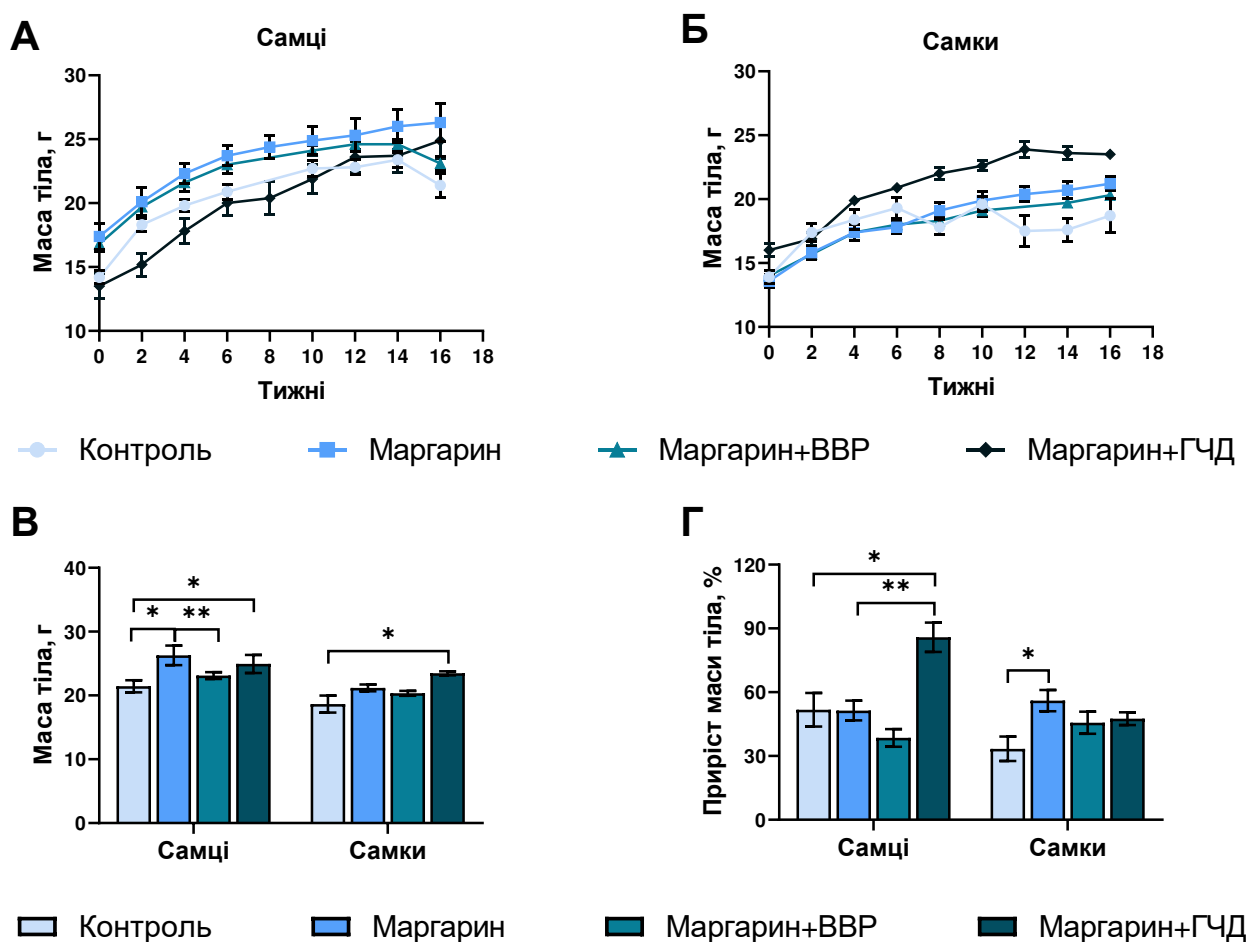


Рис. 3.1. Динаміка зміни маси тіла самців (А) та самок (Б) протягом експерименту. Маса тіла тварин на останній день експерименту (В). Приріст маси тіла тварин (Г). ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Не було виявлено значного впливу маргарину окремо, та ВВР у поєднанні з маргарином на масу тіла самок порівняно з контрольною групою. Застосування

ГЧД викликало достовірне збільшення ваги, як самців, так і самок на 16% та 26% відповідно порівняно до контрольних груп (рис. 3.1 В).

Слід зазначити, що через випадковий розподіл мишей на групи на початку експерименту, вихідна маса тіла в групах дещо відрізнялася (рис. 3.1 А, Б). Оскільки початкова маса тіла тварин впливає на їх кінцеву масу, ми розрахували приріст маси тіла у відсотках відносно початкової маси (рис. 3.1 Г). Ми виявили, що споживання маргарину *ad libitum* не впливало на приріст маси тіла у самців, але викликало його збільшення у самок на 40% порівняно з контрольною групою. Результати, які були отримані на самцях, відрізняються від літературних даних, що можна пояснити відмінністю в режимі харчування та способі подачі їжі. У дослідженні Zhu et al. (2019), маргарин змішували зі стандартним кормом і давали самцям щурів [9]. У дослідженні Satta et al. (2018) спостерігали збільшення маси тіла самок щурів, при цьому маргарин давали в окремій посудині, тобто тварини могли обирати – їсти корм чи маргарин [8]. У нашому експерименті маргарин давали окремо, як самцям, так і самкам, не змішуючи зі стандартною їжею. Було виявлено, що самки надавали перевагу маргарину замість стандартного корму. Ми передбачаємо, що більше споживання маргарину зумовило вищий приріст маси тіла у мишей цієї статі.

У нашому дослідженні споживання їжі з додаванням маргарину та ВВР показало тенденцію до зниження приросту маси тіла у самців та тенденцію до збільшення у самок, порівняно до відповідних контрольних груп (рис. 3.1 Г). За даними Jabri et al. (2022) додавання ВВР до їжі, яка містить високу частку жиру, знижує масу тіла самців щурів [23]. У нашому випадку спостерігалась подібна тенденція – додавання ВВР до їжі, що містить маргарин, зменшило приріст маси тіла в обох статей, порівняно до груп, які споживали лише маргарин. Але достовірної різниці виявлено не було (рис. 3.1 Г).

Багато дослідників стверджують, що застосування періодичного голодування сприяє зниженню ваги у людей, які страждають на ожиріння або мають надлишкову вагу [24, 197, 198, 199]. Із попередніх досліджень, які були проведені на мишах, відомо, що ГЧД, застосоване на тлі звичайної їжі забезпечує

нижчу масу тіла, як у самців, так і в самок [27, 158]. Результати нашого дослідження показали протилежний ефект у самців та відсутність статистично достовірних змін у самок (рис. 3.1 Г). Коли самці споживали маргарин у поєднанні з ГЧД, приріст маси тіла у них був на 40% більшим порівняно з контрольною групою та групою, яка споживала маргарин постійно. У самок таких змін не спостерігали. У контрольній групі самок та самок, які перебували на ГЧД, приріст маси тіла був на 35% та 45% нижчим ніж у відповідних груп самців. Проте не було виявлено різниці між групами, які споживали маргарин *ad libitum*, та групами, які пили ВВР (рис. 3.1 Г).

З огляду на те, що у деяких експериментальних груп тварин було виявлено збільшення приросту маси тіла, було важливо перевірити, чи виникло в них ожиріння. Для цього у дослідних мишей були розраховані ІМТ та індекс ожиріння Лі. Результати визначення ІМТ наведені на рис. 3.2 А.

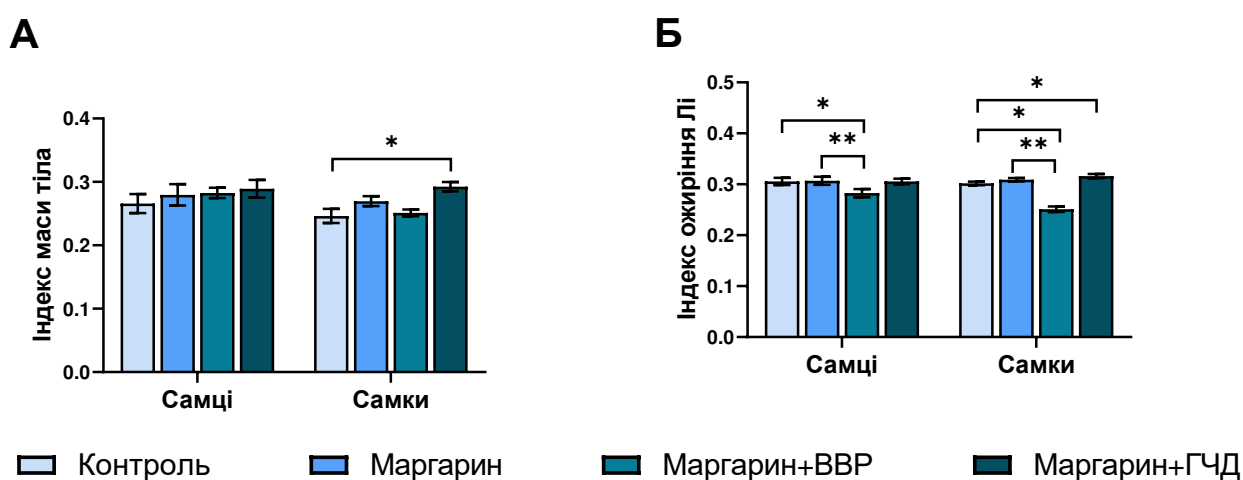


Рис. 3.2. Морфометричні параметри мишей, які споживали дослідні режими харчування. Індекс маси тіла (А). Індекс ожиріння Лі (Б). ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Було виявлено, що споживання маргарину окремо, а також разом із ВВР, не мало впливу на зміну цього показника у тварин обох статей. У самців, що перебували на ГЧД, ІМТ теж був у межах контрольних значень. Проте, як зазначалося раніше, їх маса тіла була вищою від контрольної групи (рис. 3.1 В, Г). Це пояснюється тим, що для розрахунку ІМТ, окрім ваги, використовується також значення довжини тіла тварин. Як можна побачити з табл. 3.1, самці з більшою масою мали відповідно більшу довжину тіла. Тому, в результаті перерахунку маси на квадрат довжини тіла, були отримані значення ІМТ, які входять у межі норми. У самок тварин, які голодували, значення ІМТ було на 19% та 16% вищим порівняно до контрольної групи та групи, яка пила ВВР відповідно.

Таблиця 3.1.

Маса та довжина тіла самців мишей, до яких застосовували голодування через день.

№	Маса тіла, г	Довжина тіла, см
1.	23,2	9,0
2.	22,6	9,0
3.	24,7	10,0
4.	22,8	9,5
5.	23,5	9,0
6.	24,0	9,5

На рис. 3.2 Б зображено значення індексу ожиріння Лі у тварин після завершення експерименту. Як видно з графіка, при постійному споживанні маргарину без додатків, цей параметр не змінився порівняно з контрольною групою, як у самців, так і в самок. Індекс ожиріння Лі у самців, яким додавали ВВР до їжі збагаченої маргарином, був на 10% меншим порівняно до контрольної групи та групи, яка споживала маргарин *ad libitum*. У самок, які пили ВВР, цей індекс також був нижчий на 17% порівняно до контрольної групи та на 19% –

порівняно до групи, що споживала маргарин окремо. Індекс ожиріння Лі у самців, яким застосовували ГЧД був на рівні контрольних значень, а у самок на цій же дієті – на 5% вищим, ніж у контрольних.

Проте, незважаючи на відмінності, які ми спостерігали у значеннях ІМТ та індексу ожиріння Лі, отримані параметри були у межах фізіологічних. Щоб говорити про ожиріння, ІМТ у мишей має перевищувати 0,35 [200], а індекс ожиріння Лі 0,31 [201]. У нашому випадку найбільше значення ІМТ було у групі ГЧД і дорівнювало 0,24, як у самців, так і в самок. Найвищий індекс ожиріння Лі був у самок на ГЧД – 0,31, що є верхньою межею норми.

3.2. Зміна фізіологічних показників мишей, які споживали маргарин з додаванням відвару ромашки та застосуванням періодичного голодування

Як відомо, зміна маси тіла тісно пов'язана з кількістю спожитої їжі та її калорійністю. Результати визначення кількості спожитої їжі протягом усієї тривалості експерименту наведено на рис. 3.3. Графіки показують, що додавання маргарину до харчування знижувало інтенсивність споживання їжі, як в самок, так і в самців мишей (рис. 3.3 А, Б). На рис. 3.3 В та 3.3 Г наведено середню кількість їжі, яку споживала одна миша за день. Ці графіки підтверджують, що тварини, яким додавали до раціону маргарин, споживали менше їжі загалом, а також базового корму зокрема. Ми виявили, що самці, які споживали маргарин *ad libitum*, в середньому їли на 15% менше їжі, ніж контрольна група (рис. 3.3 В), а самки – на 30% менше (рис. 3.3 Г). Загалом додавання маргарину до дослідного харчування, зумовило нижче споживання їжі самками – вони їли на 30% менше, ніж контрольна група (рис. 3.3 Г). Самці, яким додавали ВВР, споживали таку саму кількість їжі, як і контрольна група, та на 11% більше – порівняно з тваринами, які споживали маргарин *ad libitum* (рис. 3.3 В). Ми передбачаємо, що ромашка, можливо, здатна покращувати апетит. Зокрема, нещодавнє дослідження на самцях японських перепілок показало, що додавання до їжі порошку із квітів ромашки покращило споживання їжі та підвищило масу тіла [202].

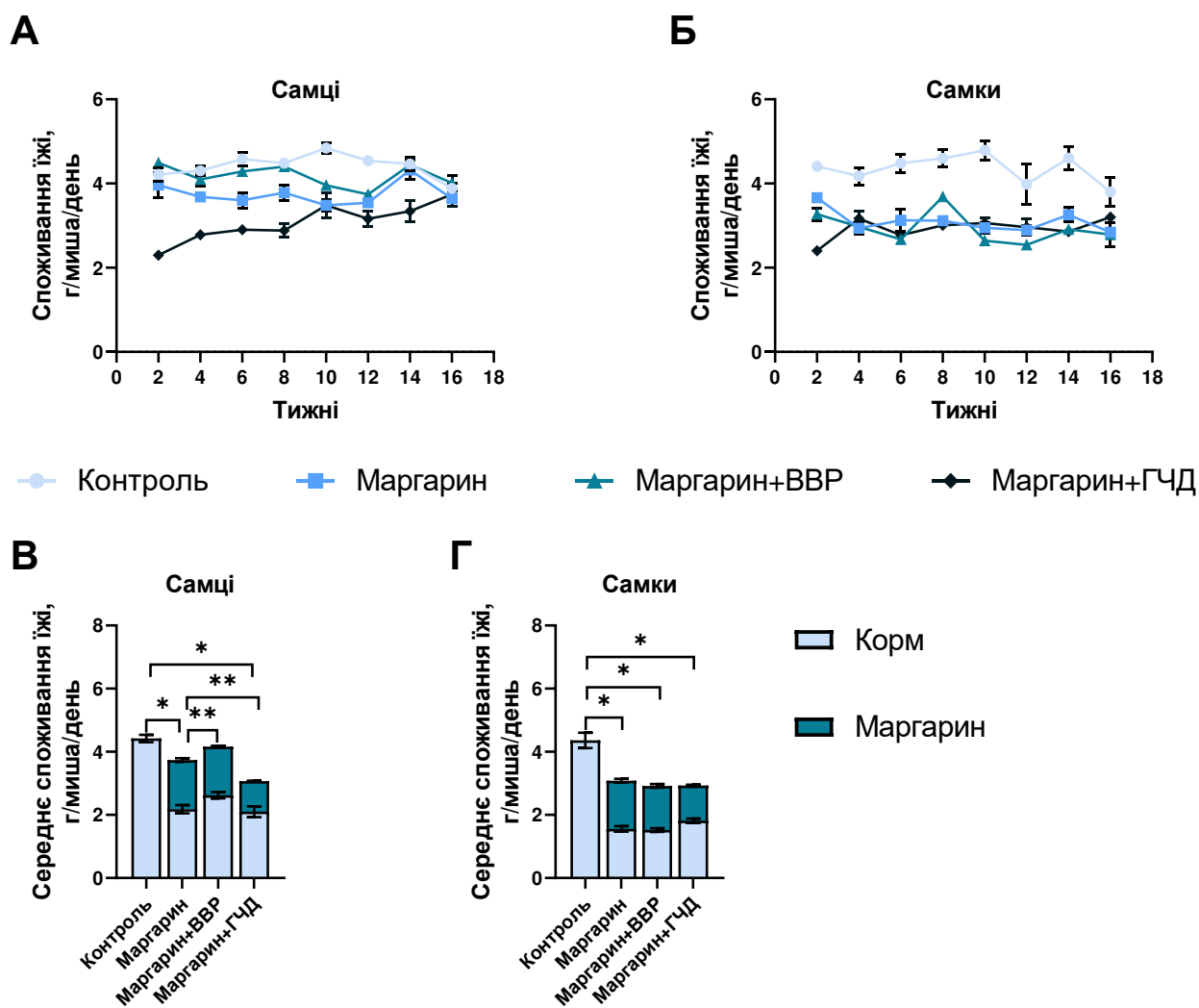


Рис. 3.3. Споживання їжі самцями (А) та самками (Б) протягом експерименту. Середня кількість їжі спожита однією мишею за один день (В, Г), блакитним кольором позначено кількість спожитого корму, синім – кількість спожитого маргарину. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Самці, до яких застосовували ГЧД, споживали менше їжі на 30% порівняно до контрольних тварин, та на 18% – порівняно до групи, яка споживала маргарин *ad libitum* (рис. 3.3 В). Дослідження інших науковців теж

підтверджують, що ВКІ знижує інтенсивність споживання їжі дослідними тваринами [195, 203, 204].

На рис. 3.4 А та 3.4 Б видно, що тварини споживали менше базового корму, коли до їжі додавали маргарин, незважаючи – чи окремо, чи на тлі ВВР, чи за ГЧД. Рис. 3.4 В та 3.4 Г ілюструють, яку кількість маргарину споживали миші впродовж експерименту.

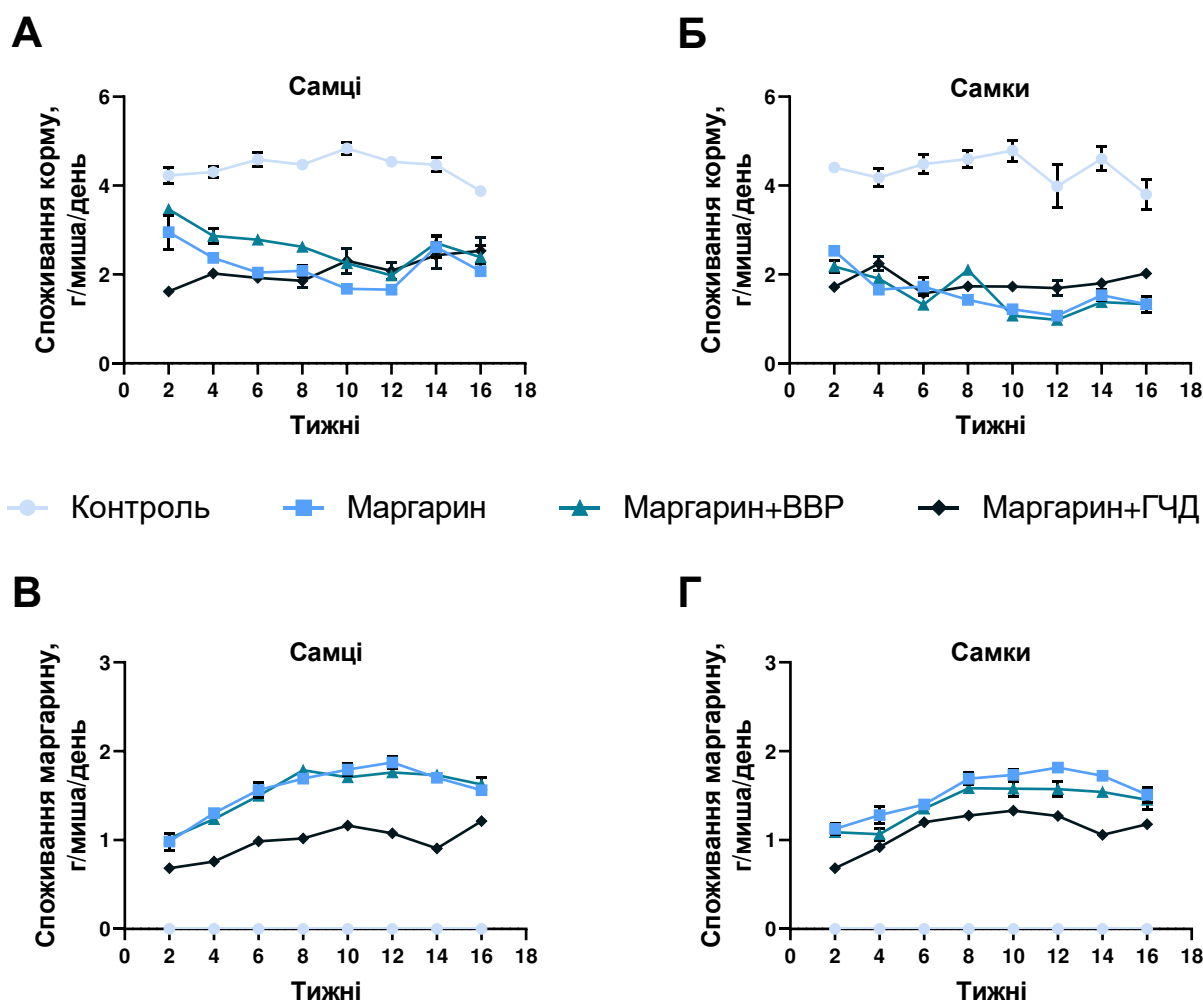


Рис. 3.4. Кількість спожитого корму самцями (А) та самками (Б) протягом експерименту. Кількість спожитого маргарину самцями (В) та самками (Г) протягом експерименту. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. Дані представлені як $M \pm SEM$.

З графіків видно, що самці та самки, які кожен другий день голодували споживали менше маргарину, ніж інші групи (рис. 3.4). Отже, збільшення ваги самців після ГЧД та самок після споживання маргарину *ad libitum* не пов'язано з кількістю спожитої їжі, адже ці тварини їли загалом менше, ніж контрольна група (рис. 3.3 В, Г). Головним чином, збільшення ваги тварин залежало від кількості спожитих мишами калорій.

Із рис. 3.5 А видно, що самці, які споживали маргарин окремо та з додаванням ВВР, отримували більше калорій з їжі, ніж контрольні тварини. Це підтверджує рис. 3.5 В, де розраховано середнє споживання калорій однією мишею за один день. Самці, які споживали маргарин *ad libitum*, та ті, які пили ВВР, отримували на 18% та 27% більше калорій, ніж контрольна група. На перший погляд самці, які голодували через день, споживали менше калорій, проте з рис. 3.5 А видно, що з кожним тижнем цей показник поступово зростає. Тому, середнє значення кількості спожитих калорій в цієї групи тварин було на 17% вищим, ніж у контрольної, проте на 8% нижчим, ніж у групи тварин, яка пила ВВР (рис. 3.5 В). Результати споживання калорій у групі самців за умов ГЧД відповідають тенденції, яку видно на графіку кількості спожитої їжі (рис. 3.3 А). Також з рис. 3.1 А видно, що у них постійно зростала маса тіла порівняно до контрольної групи. Хоча ця група тварин отримувала менше калорій від маргарину, бо споживала його теж менше, ніж інші дві групи, які споживали маргарин постійно (рис. 3.6 А). Проте, протягом проведення експерименту, ми виявили, що самці за умов ГЧД у ті дні, коли отримували корм та маргарин, споживали в півтора рази більше їжі, ніж самці, які отримували маргарин постійно. Очевидно, що в умовах тривалого переривчастого голодування миші прагнули компенсувати нестачу енергії, а спожиті калорії витрачалися економно, і зберігалися в організмі самців у якості резерву. Попередні дослідження також показали, що ГЧД знижує загальне споживання їжі протягом експериментального періоду, навіть якщо споживання їжі в дні годування може бути вищим, ніж у відповідних груп *ad libitum* [27, 158, 205, 206].

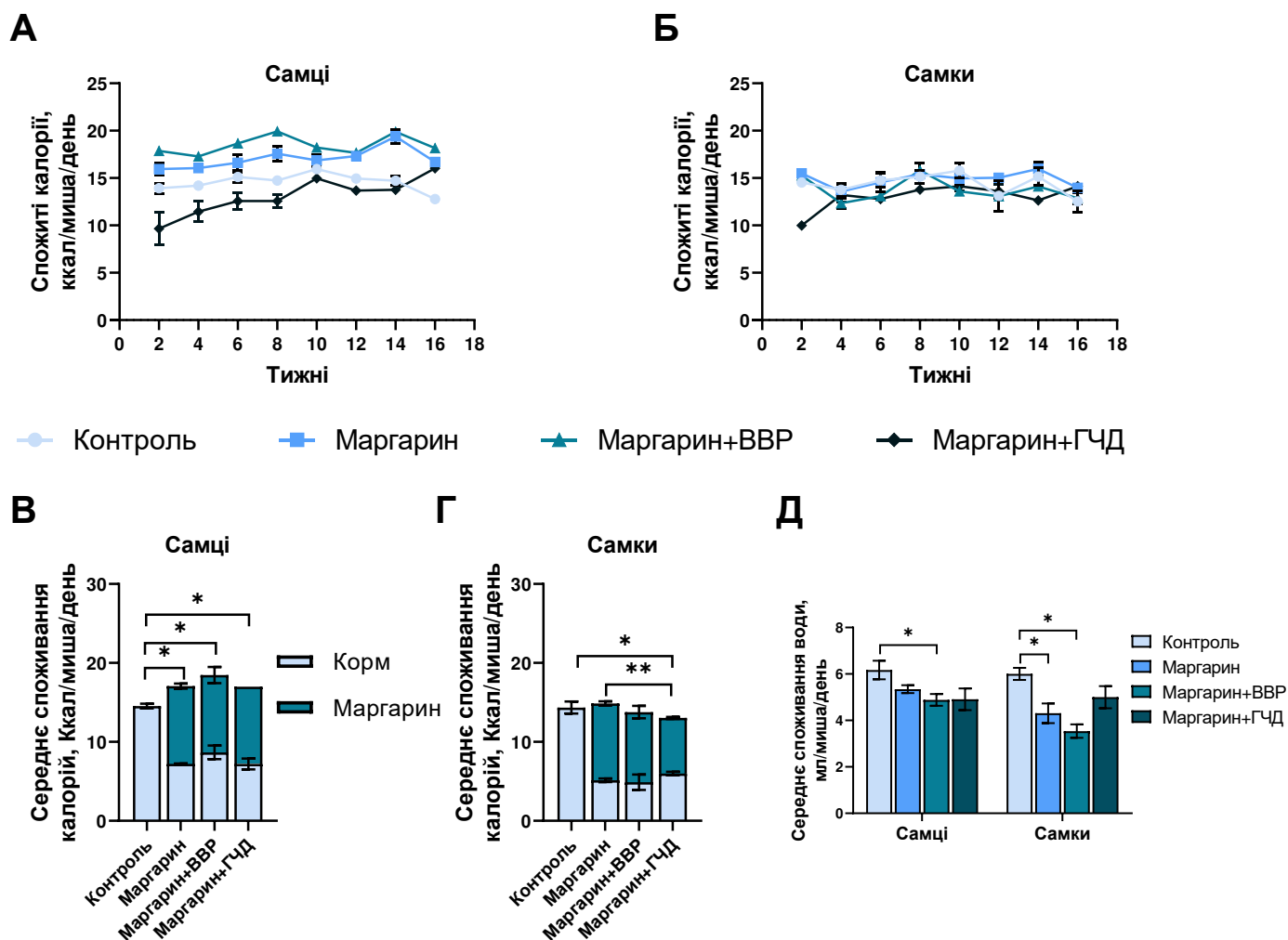


Рис. 3.5. Кількість калорій, спожитих самцями (А) та самками (Б) протягом експерименту. Середня кількість калорій, спожита самцями (В) та самками (Г) протягом дня, блакитним кольором позначено кількість калорій отриманих від корму, синім – від маргарину. Середня кількість спожитої води/ВВР однією мишею за один день (Д). ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Також є свідчення, що коли щури споживали маргарин безперервно щодня, кількість спожитої їжі не відрізнялася від контрольних значень. Але коли дослідні тварини споживали маргарин тричі на тиждень, споживання їжі було вищим, ніж

у контрольній групі [8]. Ми припускаємо, що вага самців у нашому експерименті збільшилася через накопичення запасних жирів, що підтверджують результати визначення ТАГ у печінці. З огляду на те, що тварини отримували їжу не кожен день, їх метаболізм перемкнувся на такий режим роботи, щоб накопичувати поживні речовини у якості резерву.

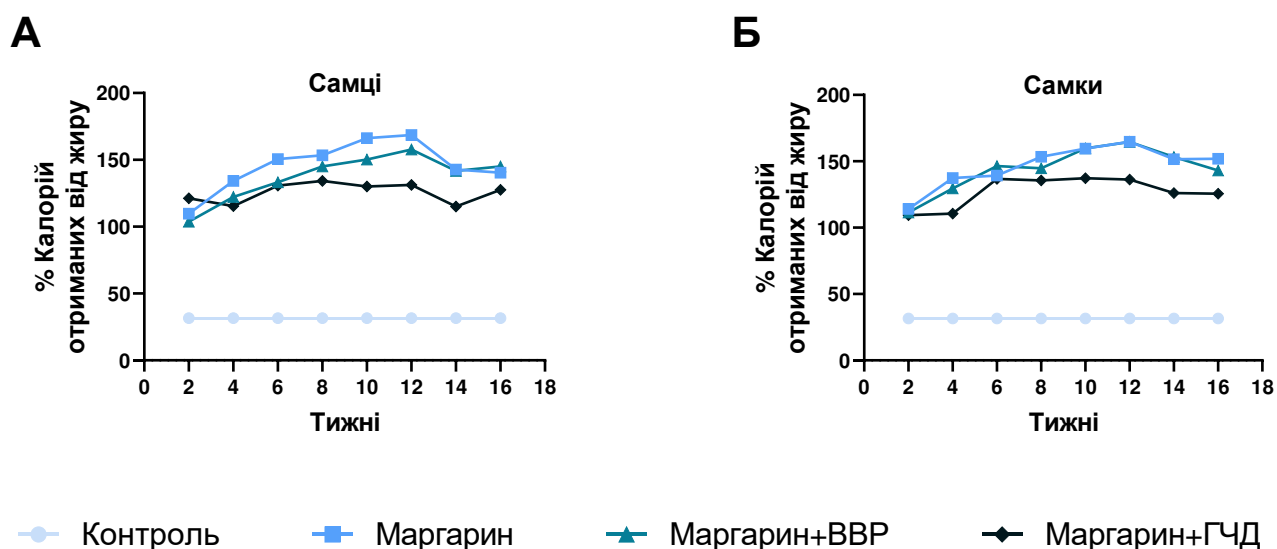


Рис. 3.6. Кількість калорій отриманих самцями (А) та самками (Б) із жиру протягом експерименту. BVP – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. Дані представлені як $M \pm SEM$.

Самки мишей, яким застосовували дослідне харчування, мали подібну динаміку споживання калорій, як і контрольна група (рис. 3.5 Б). Проте, як було показано на рис. 3.3 Б, тварини, до харчування яких додавали маргарин, споживали менше їжі, ніж контрольні (зокрема, базового корму) (рис. 3.3 Б). Тому, нестачу калорій від корму вони компенсували калоріями, отриманими з маргарину (рис 3.5 Г). В середньому самки, які їли маргарин *ad libitum* кожного дня, отримували таку ж кількість калорій як і контрольна група, а на дієті ГЧД – на 9% та 12% менше, ніж контрольна група та група, що споживала лише маргарин, відповідно (рис 3.5 Г). Це підтверджує рис. 3.6 Б, де добре видно, що

миші на ГЧД отримували менше калорій від жиру, ніж групи тварин, що споживали лише маргарин та маргарин з ВВР.

Хоча самки, яким додавали маргарин, споживали в середньому менше їжі, ніж відповідні групи самців (рис. 3.3 В, Г), вони майже не відрізнялись від контрольної групи за споживанням калорій (рис. 3.5 Г). Це свідчить про те, що загальна кількість спожитих калорій не є ключовим фактором у збільшенні маси тіла у самок, оскільки самці отримували більше калорій, але не демонстрували збільшення маси тіла після споживання маргарину *ad libitum*, та маргарину з ВВР (рис. 3.1 Г). Водночас слід зазначити, що самки споживали більше калорій з жирів (маргарину), ніж відповідна група самців (рис. 3.6 А, Б). Можна припустити, що склад маргарину та його більше споживання може сприяти збільшенню маси тіла у самок.

Загалом, отримані результати по споживанню калорій дослідними мишами, за умов додавання маргарину до їжі, узгоджуються з літературними даними. Нещодавні дослідження стверджують, що самці лінії *C57BL/6J* отримували більше калорій при споживанні ВКІ, яка містила смалець [190, 207].

Споживання води групами тварин, яким до їжі додавали маргарин, було нижчим або мало тенденцію до зниження (рис. 3.5 Д). У самців достовірна різниця була виявлена лише після споживали ВВР. Вони пили на 19% менше рідини, ніж контрольна група. Самки, які споживали маргарин постійно, пили на 28% менше води, ніж ті, які споживали лише базовий корм. Додавання ВВР теж викликало менше споживання води у самок на 42% порівняно до відповідної контрольної групи.

У ВВР, який був використаний у цьому дослідженні, було визначено загальну антиоксидантну активність, концентрацію загальних фенолів та флавоноїдів. Результати наведені у табл. 3.2. Ці параметри були визначені іншою науковою командою кафедри біохімії та біотехнології, проте ще не опубліковані.

У табл. 3.3 наведено кількість фенольних речовин, які отримували миші обох статей щоденно після споживання ВВР. Враховуючи, що самки пили менше відвару, вони отримували менше фенольних речовин, ніж самці.

Таблиця 3.2.

Загальна антиоксидантна активність (ЗАА), загальна кількість фенолів та флавоноїдів, які входять до складу відвару ромашки

Показник	Водний екстракт	Суша речовина
ЗАА	2,26±0,031 мкмоль екв. Trolox/мл	-
Загальні феноли	0,643±0,029 мг екв. галової кислоти/мл	19,94±0,90 мг екв. галової кислоти/г
Флавоноїди	0,541±0,031 мг екв. кверцетину/мл	16,78±0,98 мг екв. кверцетину/г

Дані представлені як $M \pm SEM$, n=4-5.

Таблиця 3.3.

Середня кількість загальних фенолів, яку отримувала одна миша з відвару ромашки щодня (мг/мишу) та середня кількість цих речовин перерахована на масу тварини (мг/г маси).

Показник	Самці	Самки
Загальні феноли:		
мг/мишу	3,14±0,14	2,28±0,10
мг/кг маси тіла	157±7	133±6

Дані представлені як $M \pm SEM$.

Щодо параметру споживання води тваринами, думки науковців розходяться. Зокрема, одні дослідники стверджують, що при споживанні ВКІ миші п'ють більше води [208], а інші – навпаки кажуть, що споживання води знижується [183, 209]. Ми вважаємо, що споживання маргарину викликало підвищення рівня метаболічної води в організмі тварин. Метаболічна вода утворюється в результаті окислення продуктів, які надходять з їжею. Відомо, що при високій вологості повітря (66%) за окислення ліпідів в організмі утворюється більше метаболічної води [210]. Наш експеримент проходив за вологості 50-60%,

тому вірогідно, що рівень метаболічної води, отриманої з жиру, підвищився, в результаті чого в мишей зменшилась фізіологічна потреба у питній воді.

Відомо, що споживання ВКІ не завжди супроводжується розвитком видимого ожиріння. Зокрема, якщо у висококалорійному раціоні не вистачає білку або певних амінокислот, ожиріння у мишей може не розвиватися, але спостерігатися порушення метаболізму [183, 211]. У нашому дослідженні миші, яким додавали маргарин, споживали менше основної їжі, а отже, і меншу кількість білку. Цим можна пояснити відсутність значного збільшення маси тіла дослідних тварин. Проте, навіть без видимих ознак ожиріння, ВКІ може викликати метаболічні порушення [183].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ХАРЧУВАННЯ З ДОДАВАННЯМ МАРГАРИНУ, ВІДВАРУ РОМАШКИ ТА ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА ЛЕЙКОЦИТАРНУ ФОРМУЛУ КРОВІ ТА МАРКЕРИ ЗАПАЛЕННЯ

4.1. Вплив маргарин-вмісної їжі разом з відваром ромашки та голодуванням через день на лейкоцитарну формулу крові дослідних тварин

Підрахунок загальної кількості лейкоцитів, а також визначення лейкоцитарної формули, є одними з важливих показників клінічної діагностики крові. У самців мишей, яких годували через день, лейкоцитів було на 47 % більше, порівняно до контрольної групи (рис. 4.1 А). У нормі кількість лейкоцитів у крові 2-3 місячних самців лінії *C57BL/6J* в середньому $2,2 \pm 0,9 \cdot 10^3/\text{мм}^3$ [212], що відповідає отриманим нами результатам. Відомо, що кількість лейкоцитів у крові зростає у відповідь на гостре запалення, а також при ожирінні [213]. Як видно із дослідження Pini et al. 2011, самці, яких протягом трьох місяців годували їжею з вмістом жиру 60%, мали більше лімфоцитів, а також більшу масу тіла, ніж відповідна контрольна група [213]. У нашому випадку при споживанні маргарину *ad libitum* кількість лейкоцитів достовірно не відрізнялася від контролю. Додавання до їжі з маргарином ВВР значно не вплинуло на кількість лейкоцитів у крові, як самців, так і самок. Ми помітили, що лейкоцитоз виник у самців, які споживали їжу через день (рис. 4.1 А). Ми припускаємо, що у самців мишей після ГЧД могло виникнути запалення через надмірне споживання маргарину в дні, коли вони мали доступ до їжі.

Нейтрофіли – це клітини крові, які першими реагують на запалення, що виникає в організмі. Ці клітини поділяють на незрілі форми, паличкоядерні (мають несегментоване ядро), які відносно рідко зустрічаються в кровообігу, та зрілі нейтрофіли, сегментоядерні (мають сегментоване ядро), яких у крові більше [214]. Вміст паличкоядерних нейтрофілів у крові дослідних тварин зображено на рис. 4.1 Б. У самців мишей достовірних відмінностей цього показника не спостерігали. Проте у тих тварин, які споживали маргарин *ad libitum*, була

помітна тенденція до більшої кількості цих нейтрофілів, а при додаванні ВВР та ГЧД – до меншої.

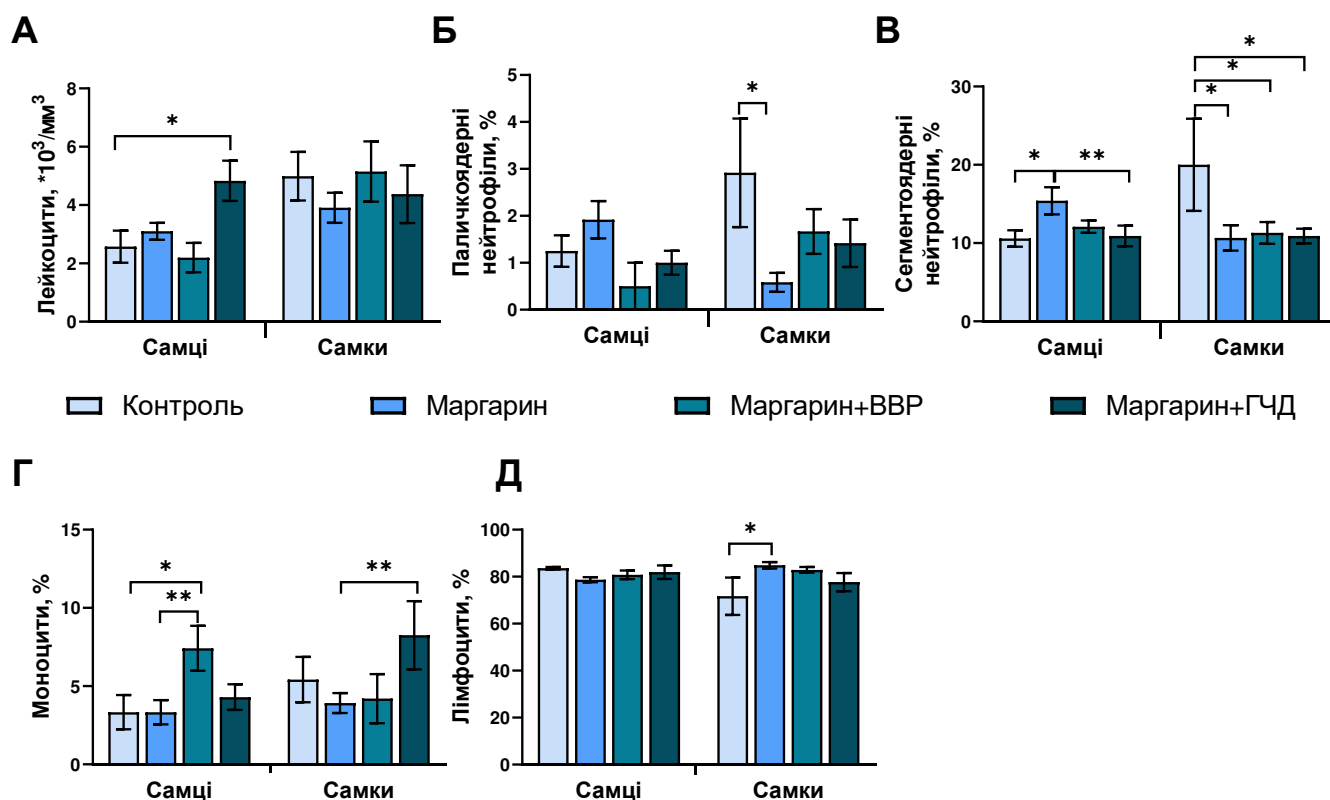


Рис. 4.1. Загальна кількість лейкоцитів (А), кількість паличкоядерних нейтрофілів (Б), сегментоядерних нейтрофілів (В), моноцитів (Г) та лімфоцитів (Д) у мазку крові дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=4-6$.

Вміст паличкоядерних нейтрофілів у контрольних самок дуже варіював у межах групи, тому і зумовив наявність великої похибки. При споживанні маргарину *ad libitum* рівень цих клітин був у них на 80% нижчим порівняно до відповідної контрольної групи. Після додавання ВВР та застосування ГЧД вміст паличкоядерних нейтрофілів у крові самок мав тенденцію до збільшення

порівняно до групи, яка споживала маргарин безперервно. Тенденція, яку ми спостерігали у самців мишей після додавання до раціону ВВР, подібна до результатів отриманих на самцях щурів. Так само як і в нашому дослідженні, щурі, які споживали ВКЇ з додаванням ромашки мали менше незрілих нейтрофілів, ніж ті тварини, що споживали лише ВКЇ [215].

Отримані нами результати на режимі ГЧД також відповідають літературним даним. У дослідженні ефекту періодичного голодування на мишей обох статей було виявлено, що застосування такого режиму харчування протягом місяця не вплинуло на кількість паличкоядерних нейтрофілів у крові тварин, хоча спостерігалась відмінність між статями [158]. Це може свідчити про відсутність запальних процесів при споживанні маргарину. Проте, нейтрофіли здатні мігрувати безпосередньо до місця запалення, і вже там викликати імунну відповідь, що призводить до вивільнення АФК у місці запалення [216, 217]. Після міграції до тканин-мішеней ці клітини здійснюють фагоцитоз та вивільняють вміст своїх гранул у місце запалення. Після чого в цій ділянці розпочинається активне утворення АФК та цитокінів. Останні є маркерами запалення та залучають інші лейкоцити до ураженої зони [214]. Тому є ймовірність, що нейтрофіли в нашому випадку транслокувалися до тканин, в яких почалося запалення.

На рис. 4.1 В наведено рівень сегментоядерних нейтрофілів у тварин, що протягом чотирьох місяців споживали їжу з додаванням маргарину, ВВР та ГЧД. У крові контрольних самців було в середньому $10,6 \pm 1,0\%$ сегментоядерних нейтрофілів, що відповідає літературним даним [212]. Значення гематологічних показників навіть у здорових тварин можуть сильно варіювати. Наприклад, у дослідженні Santos et al. (2016) кількість сегментоядерних нейтрофілів у самців коливалась від 8 до 20% в межах однієї групи [212]. Самці, які споживали маргарин *ad libitum*, мали на 31% більше цих клітин, ніж контрольна група. Після додавання ВВР кількість сегментоядерних нейтрофілів у них була меншою, ніж після споживання одного маргарину, проте достовірних відмінностей не спостерігалось. Після застосування ГЧД кількість нейтрофілів у крові самців була

на 29% меншою, ніж у групи мишей, що споживала маргарин постійно. Самки, які споживали маргарин окремо, разом з ВВР, або ГЧД мали менше цих нейтрофілів, ніж в крові контрольної групи, на 47%, 44% та 46% відповідно. Кількість сегментоядерних нейтрофілів може збільшуватися у відповідь на інтенсивний стрес або надмірну фізичну активність [158, 218]. Тому, можна зробити висновок, що довготривале споживання їжі з вмістом маргарину було стресовим фактором для самців, але не для самок.

Таку саму тенденцію ми спостерігали у кількості паличкоядерних нейтрофілів (рис. 4.1 Б). Отже, у самців, які споживали маргарин постійно, дійсно виник стрес та запалення, а паличкоядерні клітини просто мігрували в жирову тканину – центр запалення.

У крові самців, яким до харчування додавали ВВР, ми помітили тенденцію до зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів порівняно з групою, яка споживала лише маргарин (рис. 4.1 В). Це узгоджується з попереднім дослідженням лейкоцитарної формули крові щурів, які споживали ВКІ з додаванням сухих квітів ромашки [215]. Попереднє дослідження крові самок мишей на режимі ГЧД стверджує, що вміст цих нейтрофілів при періодичному голодуванні зростає [158]. Проте, у нашому випадку після ГЧД кількість сегментоядерних нейтрофілів самців була у межах контрольних значень, а у самок значно нижча (рис. 4.1 В). Це можна пояснити тим, що у дослідженні Sorochynska et al. (2019) миші перебували на експериментальній дієті лише один місяць [158]. Тому, кількість сегментоядерних нейтрофілів зросла у відповідь на стрес, який був зумовлений відсутністю їжі протягом певних днів. У нашому дослідженні тварини перебували на цій дієті значно довше – чотири місяці. Ми вважаємо, що за цей період часу миші адаптувалися до періодичної нестачі їжі, тому це вже не було для них стресовим фактором, і не призвело до збільшення кількості нейтрофілів.

Вміст моноцитів у контрольних груп був вищим, ніж у дослідженні Santos et al. (2016) [212], проте відповідав значенням, раніше отриманим у нашій лабораторії [158]. Результати визначення кількості моноцитів наведено на рис. 4.1

Г. Споживання маргарину *ad libitum* не вплинуло на кількість цих клітин, ані в крові самок, ані в самців, що відповідає попередньому дослідженню впливу ВКІ [213]. У крові самців, які споживали ВВР, кількість моноцитів була у два рази більшою порівняно до контрольної групи та групи, що споживала лише маргарин *ad libitum*. У самок, які перебували на ГЧД, моноцитів було у два рази більше, ніж при постійному вживанні маргарину. Відсутність достовірної зміни кількості моноцитів у самців після ГЧД відповідає літературним даним [158]. Проте у самок на цьому режимі харчування кількість моноцитів була вищою від контрольних, хоча достовірних відмінностей ми не спостерігали, що суперечить результатам Sorochynska et al. (2019) [158]. Тривалість життя циркулюючих моноцитів у крові мишей – близько одного дня. Далі вони можуть мігрувати до тканин, де перетворюються на макрофаги, які здатні фагоцитувати пошкоджені клітини, або потенційно небезпечні мікроорганізми [219]. Можливо, у самців після ВВР та у самок після ГЧД збільшилась кількість моноцитів у відповідь на запалення.

Загалом, кількість лімфоцитів у контрольних груп була трохи нижчою від літературних даних [212]. Вміст лімфоцитів у крові дослідних самців був у межах контрольних значень, а у самок, які споживали маргарин *ad libitum*, був більшим на 18% порівняно до контрольної групи (рис. 4.1 Д). Наші результати відповідають попереднім дослідженням. Зокрема, миші, яких протягом 13 тижнів годували ВКІ, не показали зміни кількості лімфоцитів [213]. Додавання до ВКІ сухих суцвіть ромашки теж не вплинуло на вміст цих клітин у крові щурів [215]. Отримані дані на режимі ГЧД теж відповідають попереднім [158].

Із отриманих результатів підрахунку кількості лейкоцитів, а також визначення лейкоцитарної формули крові, можна зробити висновок, що у самців, які споживали маргарин постійно, виникли запальні процеси. На це вказує збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів, і тенденція до збільшення паличкоядерних клітин та загальної кількості лейкоцитів. Збільшення кількості лейкоцитів у самців на режимі харчування ГЧД може свідчити про наявність

юних форм клітин, адже кількість інших видів лейкоцитів у цієї групи була в межах контрольних значень.

4.2. Маркери запалення у плазмі крові та в жировій тканині дослідних тварин

Як відомо, збільшення кількості лейкоцитів може виникати у відповідь на розвиток запальних процесів. Щоб підтвердити наші припущення, було визначено декілька маркерів запалення у плазмі крові та жировій тканині тварин.

Мієлопероксидаза (МПО) – фермент, який входить до складу гранул незрілих (паличкоядерних) нейтрофілів [214]. Протягом запалення цей фермент здатний генерувати АФК та окислювати ЛПВГ [180]. Отже, її активність мала б корелювати із кількістю нейтрофілів крові. Результати визначення МПО у плазмі крові експериментальних тварин наведено на рис. 4.2 А.

У самців різних дослідних груп активність ферменту не змінилася, у самок також, окрім режиму ГЧД. У самок, які споживали їжу через день, активність ферменту була нижчою на 67% порівняно до контрольної групи та групи, яка споживала маргарин постійно. Отримані результати відповідають відсутності змін кількості паличкоядерних нейтрофілів у крові дослідних мишей (рис. 4.1 Б). Водночас, ці дані суперечать одному з попередніх досліджень, в якому пацієнти, що споживали їжу з високим вмістом жиру, мали вищий рівень МПО в крові, ніж контрольна група [220]. Проте цей експеримент був одноразовий, отримані дані були визначені через чотири години після прийому висококалорійного коктейлю, який містив 1 г/кг маси тіла жиру, 0,5 г/кг маси тіла вуглеводів. Дослідження впливу ультраоброблених харчових продуктів на пацієнтів, що мали як мінімум три ознаки МС, не показало достовірного збільшення активності МПО [221]. Проте активність цього ферменту була вища у пацієнтів, які споживали більше оброблених продуктів. Також експеримент на самцях щурів, які споживали ненасичені ЖК, підтверджує зростання активності МПО в плазмі [222].

Відомо, що на ранній стадії ожиріння нейтрофіли інфільтруються у жирову тканину, де виділяють запальні цитокіни, що викликає залучення макрофагів у ділянку запалення. Також у жировій тканині нейтрофіли експресують МПО, яка бере участь в ініціації запальної відповіді [223].

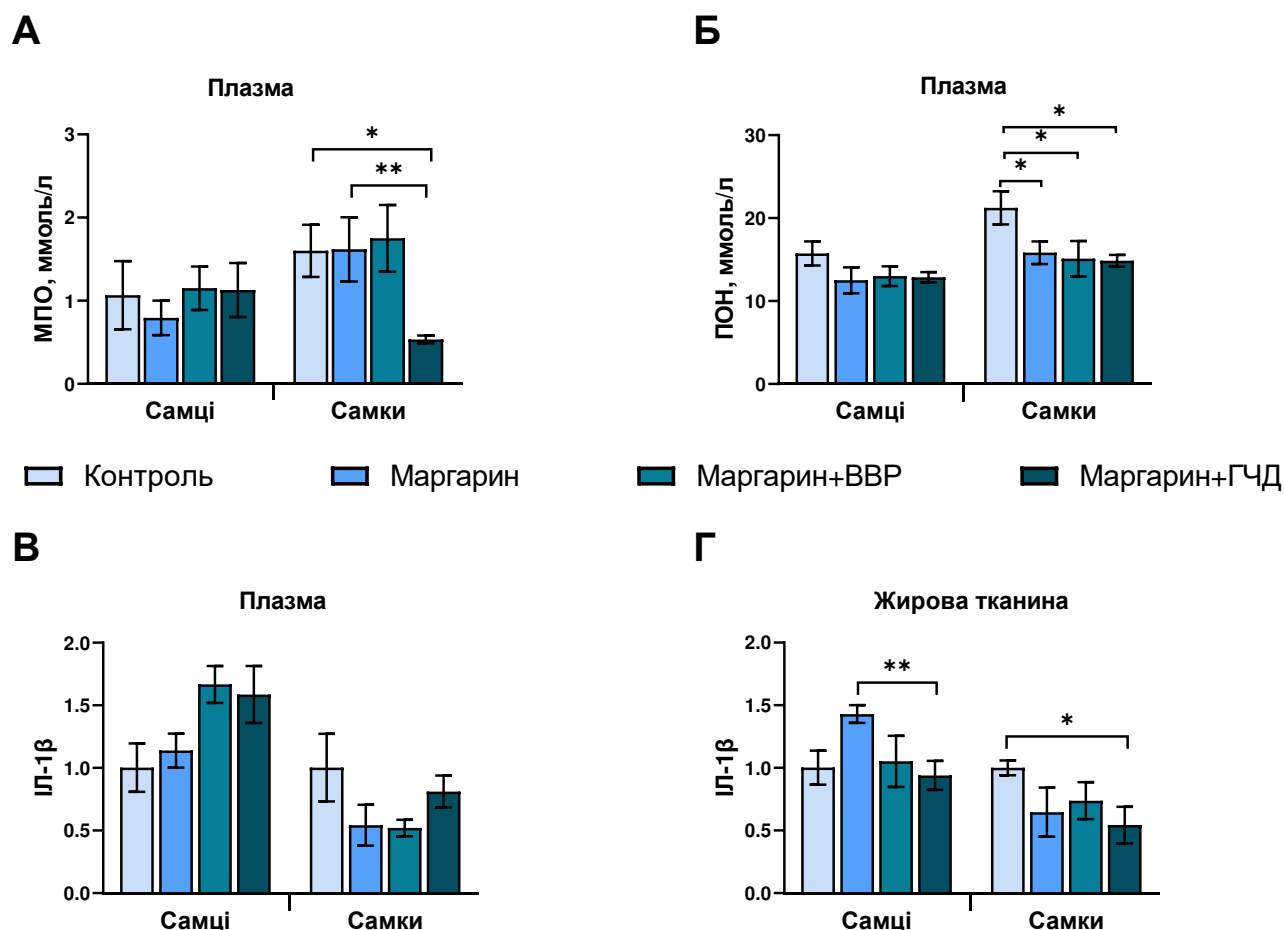


Рис. 4.2. Активність мієлопероксидази, МПО (А) та параоксонази, ПОН (Б) у плазмі крові дослідних тварин. Рівень інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β) у плазмі крові (В) та жировій тканині (Г) мишей різних експериментальних груп. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$.

Ми вважаємо, що у тварин в нашому експерименті ще не виникло ожиріння, проте вже з'явилися перші ознаки запалення. Це може пояснити відсутність зміни активності в МПО плазми крові дослідних тварин.

Активність МПО тісно пов'язана з активністю параоксонази (ПОН). Остання є антиоксидантним ферментом, який запобігає окисленню ліпопротеїдів та здатний знешкоджувати АФК. Цей фермент може формувати комплекс разом з МПО та ЛПВГ, в якому здійснюється взаємне інгибування ферментів. При наявності запалення та ОС концентрація ПОН знижується [180]. Вплив дослідного харчування на активність цього ферменту наведено на рис. 4.2 Б. У плазмі крові самців експериментальних тварин активність ПОН була трохи нижчою від контрольної групи, проте достовірної різниці не було виявлено. Активність ПОН у групі тварин, які постійно споживали маргарин, відповідає дослідженню ненасичених ЖК на самцях щурів [222]. Споживання їжі, збагаченої соєвою олією (ненасичені ЖК), викликало зменшення активності ПОН у плазмі крові щурів [222]. У самок мишей її активність була нижчою після споживання маргарину окремо, разом з ВВР, або ГЧД на 25%, 29% , або 30% відповідно, порівняно до контрольної групи. Отже, можна стверджувати про наявність ОС у тварин, але не запалення.

Щоб переконатися, чи після споживання маргарин-вмісної їжі у тварин виникло запалення, було визначено рівень прозапального цитокіну ІЛ-1 β у плазмі крові (рис. 4.2 В). Як виявилось, у мишей обох статей достовірних змін рівня ІЛ-1 β не було. Хоча у самців спостерігалась тенденція до зростання рівня цього цитокіну після вживання ВВР та ГЧД, а у самок додавання маргарину до харчування викликало тенденцію до зниження цього показника. Результати, отримані при споживанні маргарину *ad libitum*, відповідають даним, які отримані протягом дослідження ультраобробленої їжі на пацієнтах з МС [221]. У піддослідних, які споживали більше обробленої їжі, не спостерігали змін ІЛ-1 β у плазмі крові [221]. Відомо, що застосування апігеніну, одного із основних флавоноїдів ромашки, має протизапальні властивості. У щурів з індукованим запаленням лікування апігеніном знизило вміст ІЛ-1 β у сироватці крові [224]. У

нашому дослідженні самці навпаки мали підвищений рівень цього цитокіну при споживанні ВВР, а у самок змін не спостерігали.

З огляду на те, що в плазмі крові не було виявлено достовірного збільшення кількості ІЛ-1 β , було визначено вміст цього інтерлейкіну в жировій тканині. Адже саме в ній виробляються цитокіни у відповідь на запалення [46]. Зміни вмісту ІЛ-1 β у жировій тканині дослідних тварин представлений на рис. 4.2 Г. У самців, які споживали маргарин *ad libitum*, спостерігали тенденцію до збільшення цього показника порівняно до контрольної групи. Подібний ефект був виявлений і у показниках зміни кількості лейкоцитів та нейтрофілів у крові самців після споживання маргарину (рис.4.1 А-В). Це підтверджує той факт, що паличкоядерні нейтрофіли із крові перейшли до жирової тканини.

Було відзначено, що при застосуванні разом з маргарином ВВР та ГЧД, рівень цього інтерлейкіну в жировій тканині самців був на рівні контрольних значень. Споживання маргарину через день знизило рівень ІЛ-1 β у самців мишей на 34% порівняно до тварин, які споживали його постійно. У самок лише на режимі ГЧД вміст цього інтерлейкіну був на 45% нижчим порівняно до контрольної групи.

Як можна побачити з цих результатів, лише у самців, які споживали маргарин *ad libitum*, з'являються слабкі ознаки розвитку запальних процесів у жировій тканині. Проте отримані дані суперечать дослідженню на мишах *C57BL/6*, яких протягом трьох місяців годували їжею з високим вмістом жиру [225]. У цих тварин рівень ІЛ-1 β був значно вищим, а також їхня маса була більшою, ніж у контрольних тварин [225]. У нашому випадку лише самці після ГЧД та самки після споживання маргарину *ad libitum* мали вищий приріст маси (рис. 3.1 Г). Ймовірно, це зумовлено складом їжі, яку використовували для експерименту. Для раціону харчування, що містив 60% жиру, McGillicuddy et al. (2011) використовували вже готовий комерційний корм. У нашому ж випадку корм та маргарин давали окремо [225].

Отже, з огляду на результати, які ми обговорювали у цьому та попередньому підрозділах, у дослідних мишей були виявлені слабкі прояви

запальних процесів, особливо у самців, що споживали маргарин *ad libitum* та при періодичному голодуванні.

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ЇЖІ З МАРГАРИНОМ ТА ДОДАВАННЯМ ВІДВАРУ РОМАШКИ, АБО ЗАСТОСУВАННЯМ ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ МИШЕЙ

5.1. Маркери оксидативного стресу в різних органах мишей, які споживали маргарин-вмісну їжу окремо, з додаванням відвару ромашки чи застосуванням періодичного голодування

Як видно з попереднього Розділу 4, активність ПОН у плазмі крові дослідних тварин була нижчою від контрольних груп, що може свідчити про наявність ОС. Тому було вирішено визначити вміст ПЛ у різних органах мишей, щоб підтвердити попередні припущення щодо запалення та ОС.

Надходячи з їжею, ЖК можуть впливати на чутливість клітин до ОС, через зміни у складі ЖК клітинних мембран. Було виявлено, що фосфоліпіди в біологічних мембранах, які містять транс-жирні кислоти, здатні притягувати холестерол. Це явище, ймовірно, змінює структуру клітинної мембрани [226]. Коли транс-жирні кислоти вбудовуються в клітинні мембрани, проникність останніх знижується, і клітини не функціонують належним чином. Це призводить до утворення АФК, які вмикають процес перокисного окислення ліпідів. Отже, вміст ПЛ буде вищим у тварин, яким до їжі додавали транс-жирні кислоти [227].

Рівень ПЛ у різних органах дослідних тварин зображено на рис. 5.1. Рис. 5.1 А ілюструє зміни показника в печінці мишей. У самців, які споживали маргарин постійно та разом з ВВР, вміст ПЛ був нижчим, ніж у контрольної групи, на 55% та 49% відповідно. Голодування значно не вплинула на вміст ПЛ у печінці самців. Результати, отримані у печінці самців, не відповідають попереднім дослідженням. Наприклад, за умов споживання їжі з додаванням смальцю та фруктози, рівень ПЛ у самців мишей був вищим, ніж у контрольних тварин [183]. Інше дослідження, вже за участю маргарину, показало зростання маркерів ОС у печінці самців [227]. У статті Dhibi et al. (2011) визначали вміст малонового

диальдегіду (МДА) та кон'югованого дієну, як показників перокисного окислення ліпідів [227].

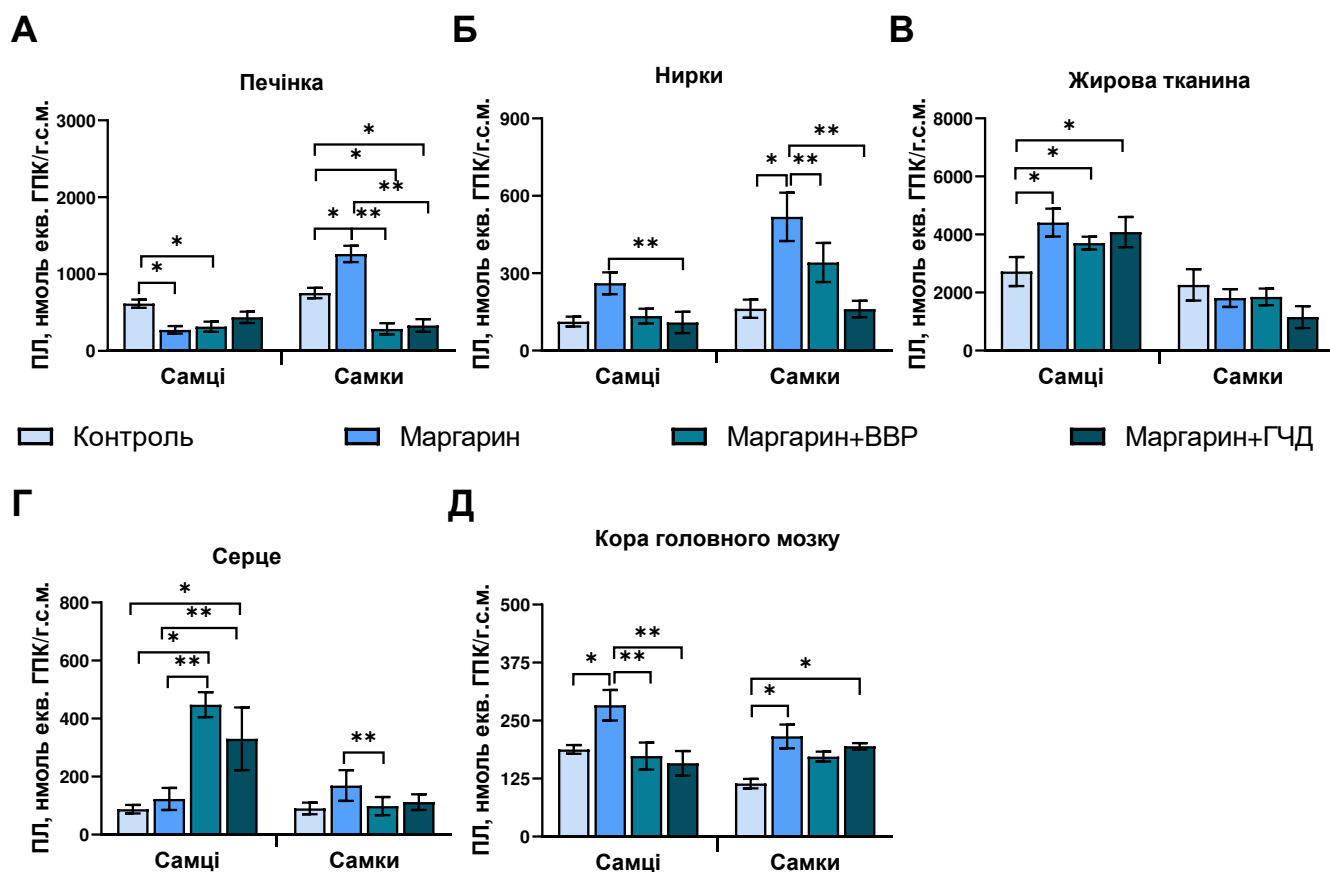


Рис. 5.1. Рівень пероксидів ліпідів (ПЛ) у печінці (А), нирках (Б), жировій тканині (В), серці (Г), та корі головного мозку (Д) дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=5-6$.

Інше дослідження на самцях мишей лінії *BALB/c* не підтверджує достовірного збільшення МДА в печінці тварин за умов споживання їжі з додаванням 30% маргарину та 15% фруктози [228]. У самок, які постійно споживали маргарин, рівень ПЛ у печінці був на 67% вищим порівняно з

контролем. Додавання до їжі з маргарином ВВР знизило рівень цього показника у самок на 62% та 77% порівняно до контролю та групи, яка споживала маргарин *ad libitum*, відповідно. На дієті ГЧД рівень ПЛ теж був нижчим у самок на 56% та 74% порівняно до контрольної групи та групи, що постійно споживала маргарин.

Результати, отримані після споживання ВВР, відповідають літературним даним. Зокрема, дослідження печінки щурів, які споживали їжу з високим вмістом жиру та додаванням відвару ромашки, показало менший вміст МДА (маркера ОС) ніж при споживанні такого харчування без відвару [22]. Такий самий ефект показав спиртовий екстракт ромашки застосований на щурах з ознаками діабету [229]. Результати, отримані після ГЧД, теж відповідають попереднім дослідженням [230]. З огляду на отримані дані щодо вмісту ПЛ в печінці дослідних тварин можемо стверджувати, що печінка самок більш чутлива до споживання їжі з маргарином, а застосування ВВР та ГЧД здатне знижувати рівень ОС у цьому органі.

Додавання маргарину до харчування також вплинуло на розвиток ОС у нирках експериментальних тварин. На рис. 5.1 Б зображено зміну вмісту ПЛ у цих органах. У нирках самців, які споживали маргарин постійно, була виявлена тенденція до збільшення показника порівняно до контрольної групи. Вміст ПЛ був нижчим при споживанні ВВР та ГЧД у мишей, які споживали маргарин *ad libitum*. Проте лише на режимі ГЧД було виявлено достовірну різницю. Цей показник був на 58% нижчим, ніж при споживанні маргарину *ad libitum*. У нирках самок, що споживали лише маргарин, рівень ПЛ був у три рази вищим ніж у контрольної групи.

Додавання ВВР до маргарин-вмісної їжі призвело до зниження цього показника на 34% порівняно до групи, яка споживала маргарин без ВВР. Після застосування ГЧД вміст ПЛ у самок був нижчим на 69% порівняно до тварин, які споживали лише маргарин.

Отримані результати в нирках дослідних тварин, які споживали маргарин окремо, підтверджуються попередніми дослідженнями, в яких застосовано їжу з високим вмістом жиру [22, 231, 232, 233]. Зокрема, науковці описували

підвищення вмісту МДА в нирках щурів після споживання їжі з високим вмістом жиру [22]. За умов споживання мишами їжі з високим вмістом лінолевої кислоти (поліненасиченої ЖК), у нирках збільшувався вміст реактивних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS), які утворюються як побічний продукт перокисного окислення ліпідів [233]. Відомо, що при споживанні їжі з високим вмістом жиру, мітохондрії нирок можуть змінювати свою будову. В результаті цього порушується їхня функція, що надалі веде до утворення АФК та накопичення жиру [234]. Ми вважаємо, що маргарин теж міг мати подібний вплив на мітохондрії мишей, а також міг призвести до накопичення запасних жирів навколо нирок. Noeman et al. (2011) вважають, що накопичення жирової тканини навкруг нирок викликає їх пошкодження, результатом чого є виділення клітинами АФК. Науковці також стверджують, що підвищене окислення ліпідів у цих органах пов'язане з дисбалансом між ліпогенезом і ліполізмом, що призводить до накопичення ліпідів у нирках [235].

Результати, отримані при додаванні ВВР до харчування, в складі якого був маргарин, теж відповідають літературним даним. Зокрема, науковці описували підвищення вмісту МДА в нирках щурів після споживання їжі з високим вмістом жиру, та його зниження при додаванні екстракту ромашки [22]. До складу квітів ромашки входить апігенін, що має потужні антиоксидантні властивості. Було показано, що апігенін підвищує активність антиоксидантних ферментів і знижує рівень МДА в нирках щурів, пошкоджених наночастинками або гентаміцином [236].

Голодування кожен другий день також очікувано знизило кількість ПЛ у дослідних мишей. Подібні результати спостерігали на мишах [170] та щурах [237], яким застосовували КО. Такі зміни науковці пояснюють активацією системи антиоксидантного захисту при обмеженому споживанні калорій [238]. Отримані нами результати свідчать про розвиток ОС у нирках мишей обох статей при споживанні маргарину *ad libitum*. Також ми виявили, що нирки самок, як і печінка, сильніше реагують на постійне споживання маргарину. Проте додавання

ВВР, або споживання їжі через день, демонструє протекторний ефект у нирках самок мишей, та має позитивну протекторну тенденцію у самців.

Рівень ПЛ у жировій тканині експериментальних тварин зображений на рис. 5.1 В. У самців вміст ПЛ був на 65% вищим після споживання маргарину *ad libitum*, ніж у контрольної групи. Додавання ВВР та застосування ГЧД теж збільшило вміст ПЛ у цій тканині на 36% та 50% порівняно до контролю. У жировій тканині самок достовірних відмінностей не спостерігали. Наше дослідження показало, що споживання маргарину *ad libitum* призводить до підвищення рівня ПЛ у жировій тканині самців, але не у самок. Це узгоджується з результатами дослідження на самцях мишей, які мали високі рівні TBARS у жировій тканині після споживання їжі з високим вмістом жирів [239]. Науковці припускають, що ОС у жировій тканині є раннім ініціатором МС і може спричинити порушення регуляції продукції адипоцитокінів (включно з прозапальними цитокінами) [240]. Біла жирова тканина вважається основним джерелом прозапальних медіаторів, що запускають розвиток хронічного запалення, атеросклерозу та інсулінорезистентності [239]. Тому, рівень ПЛ у жировій тканині може бути тісно пов'язаний із рівнем ІЛ-1 β . Отримані нами результати вмісту ПЛ у цій тканині мають такі самі тенденції, як і на графіку визначення ІЛ-1 β (рис. 4.2 Г). У такий спосіб тенденція до підвищення рівня прозапального ІЛ-1 β може сприяти ранньому розвитку ОС та запалення в жировій тканині самців мишей. Продукція АФК в жировій тканині може досягатися завдяки активації НАДФН-оксидази, ферменту, який каталізує утворення супероксидного аніону з кисню, і бере участь в редокс-сигналізації, що призводить до гіпертензії, ангіогенезу, атеросклерозу, активації ендотелію, ендотеліальної дисфункції, а також бере участь у розвитку стеатозу печінки і пошкодженнях нирок [22]. Sohet et al. (2009) спостерігали зниження вмісту ПЛ у печінці та жировій тканині мишей лінії *C57BL/6J* після споживання ВКІ. Науковці пояснювали це присутністю вітаміну Е у складі харчування, адже він є потужним антиоксидантом [241]. Це пояснення можна застосувати і в нашому випадку, бо одним із складників маргарину є соняшникова олія, яка містить вітамін Е.

Зміни рівня ПЛ у серці дослідних тварин наведено на рис. 5.1 Г. Постійне споживання маргарин-вмісної їжі не викликало змін рівня ПЛ у серці мишей обох статей, але у самок показало тенденцію до збільшення. Це підтверджує нещодавнє дослідження, в якому рівень TBARS не змінився в серці самців мишей при споживанні їжі з високим вмістом жиру [242]. Проте в іншому дослідженні, в якому використовували смалець, було виявлено збільшення рівня МДА в серці самців мишей [243]. Відмінність із нашими результатами може бути пов'язана з іншим типом ЖК, які були використані в нашому експерименті. У складі смальцю переважають насичені ЖК. Відомо, що їжа, збагачена насиченими ЖК, може збільшувати інтенсивність перокисного окислення ліпідів у серці [243, 244]. Однак, у досліді, ми використали маргарин, в якому переважають ненасичені ЖК, що може бути причиною відсутності змін ПЛ у серці експериментальних тварин.

Самці, які споживали маргарин з ВВР, мали вищий вміст ПЛ, порівняно до контрольної групи та групи, що споживала маргарин, в п'ять та чотири рази відповідно. Після застосування ГЧД відповідний показник у серці тварин теж показав подібну тенденцію. У самців, яким застосовували ГЧД, вміст ПЛ був вищим в чотири рази від контрольної групи та в три рази від групи, що споживала маргарин постійно. У серці самок, додавання до їжі ВВР викликало зниження цього показника на 57% порівняно до групи, що споживала маргарин *ad libitum*. Інших достовірних змін у серці самок не спостерігали.

Позитивний вплив ромашки при пошкодженнях, які виникають у серці, відомий з літератури. Зокрема нещодавнє дослідження на самках мишей із пухлиною Ерліха, виявило позитивний вплив ромашки на біохімічні та імуногістологічні показники серця [245]. Також відомий позитивний вплив апігеніну проти розвитку запальних процесів у серці щурів [224]. Отримані результати у серці самок підтверджують протизапальні ефекти ромашки, проте у самців спростовують. Відомо, що періодичне голодування може знижувати ризик ССЗ у людей через активацію системи антиоксидантного захисту та зниження ОС [246, 247]. Тому, результати, отримані у самок, були очікуваними. В своєму огляді Azevedo et al. (2013) описують позитивний вплив періодичного

голодування для самців. Зокрема, у щурів відбулося зменшення гіпертрофії кардіоміоцитів і області фіброзу, зниження ОС, покращилась робота серця та збільшилась тривалість життя [248]. Проте зміни, які ми спостерігали в серці самців після ГЧД, так само як і після споживання ВВР, були протилежні літературним даним. Отримані результати визначення ПЛ у серці (рис. 5.1 Г) та жировій тканині (рис. 5.1 В) разом із підвищеним вмістом ІЛ-1 β у плазмі крові (рис. 4.2 В) свідчать про розвиток запальних процесів у самців, яким до їжі додавали ВВР та застосовували ГЧД.

На рис. 5.1 Д зображено рівень ПЛ у корі головного мозку дослідних тварин. У самців, яким до їжі додавали лише маргарин, цей показник був вищим на 51% порівняно до контролю. Після ВВР та ГЧД показник був у межах контрольних значень, та нижчим у порівнянні з групою, яка споживала маргарин *ad libitum*, на 39% та 44% відповідно. У корі головного мозку самок, яким додавали лише маргарин та застосовували ГЧД, рівень ПЛ був вищим, ніж в контрольної групи, на 90% та 71% відповідно.

Результати, отримані при споживанні мишами маргарину *ad libitum*, відповідають попереднім дослідженням із застосуванням ТНЖК [249] та їжі з додаванням смальцю і фруктози [250]. Відомо, що довготривале споживання їжі з високим вмістом жиру викликає інсулінорезистентність, яка може індукувати окисно-відновний дисбаланс, зміни вмісту та активності ферментативних і неферментативних антиоксидантів мозку, та посилене окислювальне пошкодження кори головного мозку та гіпоталамусу. Причиною цього є збільшення активності АФК-генеруючих ферментів (НАДФН-оксидази та ксантинооксидази) у цих відділах мозку після споживання такої їжі [251]. Ці ферменти також можуть стимулювати вивільнення MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) у адипоцитах. MCP-1 сприяє трансформації моноцитів у макрофаги та підсилює секрецію прозапальних цитокінів [252]. З огляду на те, що при інсулінорезистентності в головному мозку спостерігають підвищену експресію прозапальних агентів, можна стверджувати, що НАДФН-оксидаза та

ксантинооксидаза є не лише джерелом АФК, а й індукують запалення у гіпоталамусі та корі головного мозку [251].

Відомо, що лікування відваром ромашки захищає від порушення окислювально-відновного балансу мозку, шляхом пригнічення вироблення АФК, покращення системи антиоксидантного захисту та зменшення рівня запалення в мозку [23]. У нашому дослідженні додавання до харчування мишей ВВР викликало зниження рівня маркерів ОС у корі головного мозку експериментальних тварин, що підтверджують попередні дослідження [23, 253]. Споживання їжі через день також може активувати антиоксидантну систему в корі головного мозку [163], що підтверджують наші дані. Отже, маргарин викликає пошкодження та запалення в корі головного мозку обох статей мишей. Споживання ВВР та ГЧД знижують інтенсивність ОС у самців, але у самок викликають лише тенденцію до її зменшення.

Отже, ми виявили, що, у мишей обох статей, споживання маргарину викликало розвиток ОС. Проте у самців він розвинувся у серці, жировій тканині та корі головного мозку, а у самок – ще й в печінці та нирках, але не в жировій тканині. Тому ми зробили висновок, що у самок ОС розвивається інтенсивніше, ніж у самців. Позитивний ефект ВВР та ГЧД також спостерігали у самок мишей – зокрема у печінці, нирках та серці вони обумовили нижчий рівень ПЛ. У самців дія цих двох харчових модуляторів була суперечливою. В нирках та корі головного мозку ВВР та ГЧД знижували ОС, проте у жировій тканині та серці – навпаки, підвищували.

5.2. Вплив відвару ромашки та голодування через день на фоні їжі з додаванням маргарину на антиоксидантну систему захисту мишей

5.2.1. Вплив експериментальних видів харчування на антиоксидантну систему печінки

Відомо, що підвищене споживання транс-жирних кислот пов'язане зі зниженням ефективності системи антиоксидантного захисту і, відповідно, з

підвищенням рівня ОС в печінці щурів [227]. Вплив цих ЖК реалізується через посилення внутрішніх сигнальних механізмів, що призводять до хронічного прозапального стану. Споживання їжі з високим вмістом транс-жирних кислот може викликати довготривалі прогресуючі зміни активностей антиоксидантних ферментів [227].

З огляду на те, що споживання маргарину викликало помітне збільшення рівня ПЛ у печінці самок, але не у самців (рис. 5.1 А), а додавання ВВР та застосування ГЧД значно знижувало його у різних органах самок, зокрема і в печінці, було важливо перевірити, як ця їжа впливає на ферменти, що беруть участь у антиоксидантному захисті. Як раніше зазначалося, ВВР та періодичне голодування, зокрема завдяки активації низки антиоксидантних ферментів, можуть забезпечувати захист органів від АФК. Тому, щоб підтвердити наявність цього протекторного механізму, ми визначили зміну активностей СОД, каталази, ГП, GST та Г6ФДГ у печінці експериментальних тварин.

Супероксиддисмутаза (СОД) – фермент, який каталізує реакцію перетворення супероксидного аніон-радикалу до H_2O_2 . Останній розщеплюється каталазою або ГП. Глютатіонпероксидаза також може знижувати рівень ПЛ. Вона бере участь у реакції окислення відновленого глютатіону при взаємодії останнього з ПЛ [68]. Зміну активності СОД у печінці мишей після споживання дослідної їжі зображено на рис. 5.2 А. Як у самців, так і у самок мишей, які споживали маргарин *ad libitum*, активність цього ферменту достовірно не відрізнялась від контрольної групи. Проте у самців, які пили ВВР або через день голодували, активність СОД була на 32% вищою, ніж при споживанні самого маргарину. У печінці самок різницю спостерігали лише після застосування ГЧД. Активність СОД на цій дієті була вищою на 54% і 45% порівняно до контрольної групи та групи, яка споживала маргарин *ad libitum*, відповідно (рис. 5.1 А).

Активність каталази у печінці мишей наведено на рис. 5.2 Б. У самців, які споживали маргарин постійно, та у тих, кому до їжі додавали ВВР, активність цього ферменту була відповідно на 87% та у два рази вищою, ніж у контрольної групи. У печінці тварин, які перебували на режимі ГЧД, активність каталази була

на 65% вищою, ніж у контрольної групи. У самок зміни активності цього ферменту не спостерігали.

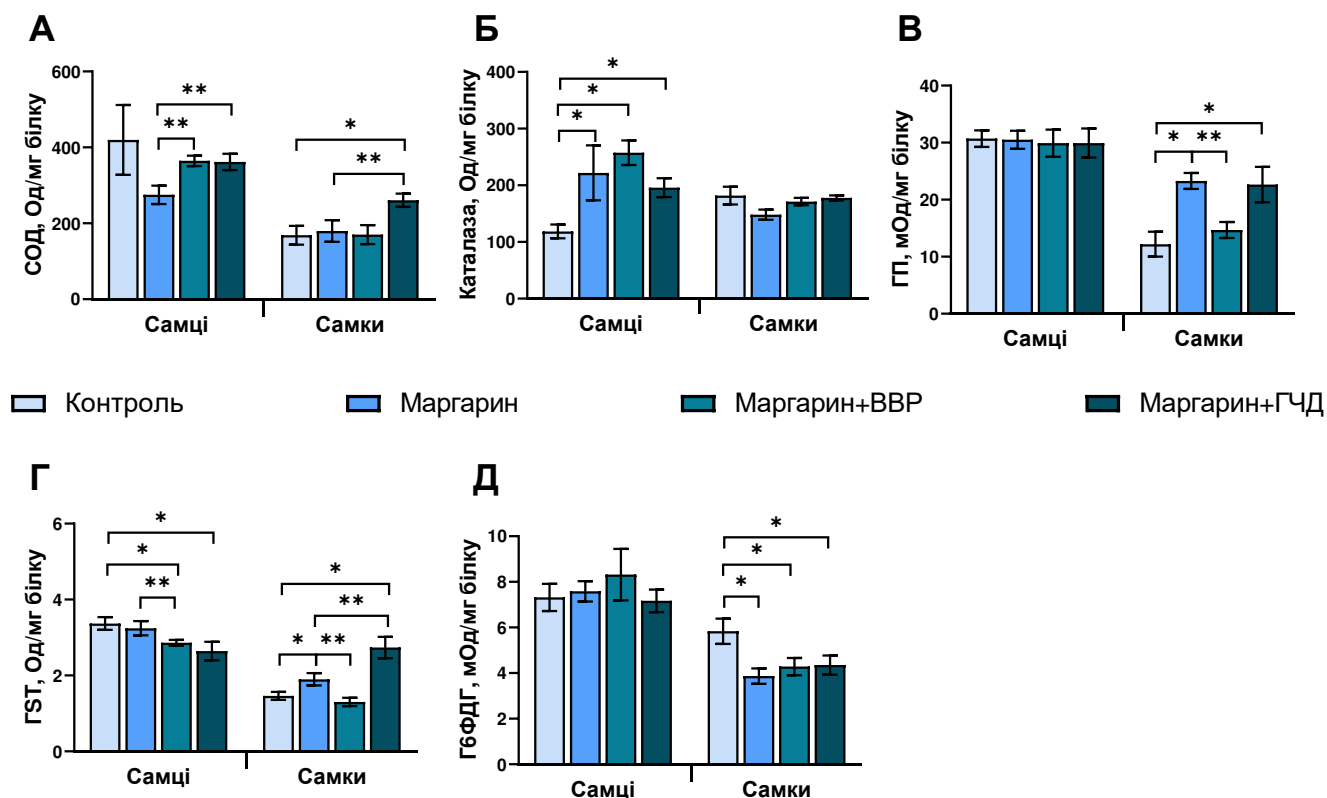


Рис. 5.2. Активність супероксиддисмутази, СОД (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази, ГП (В), глутатіон-S-трансферази, GST (Г) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, Г6ФДГ (Д) у печінці дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=4-6$.

Рис. 5.2 В ілюструє вплив маргарину, ВВР та ГЧД на активність ГП. У печінці самців не спостерігали зміни активності цього ферменту. Проте, у самок після споживання маргарину *ad libitum* активність ГП була на 91% вищою, ніж у контрольної групи. Активність ферменту після додавання ВВР була на 37%

нижчою, ніж після споживання маргарину *ad libitum*. Після ГЧД активність ГП була на 86% вищою, ніж у контрольній групі самок.

Отримані результати суперечать дослідженню Dhibi et al. (2011), в якому автори спостерігали зниження активності СОД, каталази та ГП у печінці щурів після споживання маргарину [227]. Проте у роботі, яка опублікована в цій статті, маргарин змішували разом із базовою їжею і він становив 20% від її складу. У нашому ж випадку маргарин давали окремо. Dhibi et al. (2011) спостерігали підвищений вміст МДА у печінці тварин на тлі зниження активностей антиоксидантних ферментів, що підтверджувало розвиток ОС у печінці [227].

Підвищений рівень перокисного окислення ліпідів призводить до інактивації ферментів [235]. Це викликає накопичення супероксиду, H_2O_2 і гідроксильних радикалів, які можуть додатково стимулювати перекисне окислення ліпідів. Цей механізм підтверджує зниження активності каталази, ГП та СОД у щурів, що споживали кафетерійну їжу [235].

Наш експеримент показав збільшення рівня ПЛ лише у самок мишей (рис. 5.1 А). Тому, з огляду на отримані результати, можемо зробити висновок, що споживання маргарину не викликає ОС у печінці самців. Підвищена активність каталази на тлі відсутності змін рівня ПЛ підтверджує, що печінка знешкодила АФК. У самок, навпаки, інтенсифікувався ОС у печінці після споживання маргарину *ad libitum*. Це підтверджує відсутність змін активностей СОД та каталази на фоні високого рівня ПЛ, а також високу активність ГП.

Відомо, що ромашка лікарська збільшує активність СОД, каталази та ГП, і знижує рівень маркерів ОС у печінці [154]. Періодичне голодування теж активує ферменти антиоксидантного захисту печінки щурів [254]. У самців вживання ВВР збільшило активність СОД і каталази, але в самок не мало впливу на активність цих ферментів. Ми вважаємо, що додавання ромашки до їжі з маргарином може бути корисне для печінки самок, адже після споживання мишами ВВР рівень ПЛ, а також активність СОД, каталази та ГП були у межах контрольних значень. Періодичне голодування теж показало позитивний вплив при застосуванні разом із маргарином. Отже, цей режим харчування збільшив активність СОД та каталази

у самців. У самок зросла активність СОД та ГП, що викликало зниження рівня ПЛ.

Ще один антиоксидантний фермент – GST. Він бере участь у знешкодженні різних токсичних продуктів, що утворюються після взаємодії з АФК. Цей фермент каталізує реакцію взаємодії утворених продуктів із GSH [255]. У такий спосіб він може знешкоджувати ПЛ.

Зміна активності GST після додавання в їжу мишам маргарину, ВВР та ГЧД зображена на рис. 5.2 Г. Споживання маргарину *ad libitum* не мало впливу на активність цього ферменту в печінці самців. Проте, коли тварини споживали ВВР, активність GST була на 15% нижчою, ніж у контрольних самців, та на 12%, ніж у тих, які споживали лише маргарин. Після ГЧД активність цього ферменту в печінці самців теж була на 23% нижчою, ніж у контрольних тварин.

У печінці самок, які споживали маргарин *ad libitum*, активність GST була на 30% вищою, ніж у контрольної групи. Додавання ВВР до харчування знизило активність цього ферменту на 32% порівняно до самок, які споживали маргарин без відвару. Після періодичного голодування активність GST у печінці самок була вищою, ніж у контрольної групи, і групи, яка споживала маргарин *ad libitum*, на 88% та 44% відповідно. Отримані результати зміни активності GST відповідають активності ГП (рис. 5.2 Г) у печінці мишей обох статей. Це підтверджує той факт, що у самок після споживання маргарину розвивається сильний ОС, а ВВР та ГЧД можуть запобігти його утворенню у печінці.

Також у печінці тварин було визначено активність Г6ФДГ (рис. 5.2 Д). Цей фермент каталізує першу реакцію пентозофосфатного шляху (ПФШ) та забезпечує утворення НАДФН. Останній бере участь у відновленні окисленого глутатіону, який утворюється внаслідок детоксикації H_2O_2 ГП. Отже, за наявності ОС, активність Г6ФДГ буде нижчою [256]. У печінці самців ми не спостерігали зміни активності цього ферменту. В самок, після застосування експериментального харчування, активність Г6ФДГ була нижчою, ніж у контрольної групи. Після споживання маргарину *ad libitum* активність ферменту була на 34% нижчою, а після ВВР та ГЧД – на 27% та 26% нижчою, ніж у

контрольної групи самок. Нижча активність Г6ФДГ на фоні високого рівня ПЛ (рис. 5.1 А), а також підвищеної активності ГП та GST (рис. 5.2 В, Г) підтверджує, що у самок, яким додавали до їжі маргарин *ad libitum*, розвивається ОС.

З огляду на те, що ГП, GST та опосередковано Г6ФДГ беруть участь у реакціях окислення/відновлення глутатіону, ми визначили вміст тіолів у мишей, які споживали їжу з додаванням маргарину, ВВР та ГЧД. Тіоли – це сірковмісні сполуки, які мають зв'язані з вуглецем сульфгідрильні групи. Вони можуть окислюватися АФК з утворенням сульфенової кислоти, у такий спосіб забезпечуючи детоксикацію АФК. Глутатіон є одним із представників низькомолекулярних тіолів. Це цистеїн-вмісний трипептид, який є найважливішим ендogenousним антиоксидантом [257].

Вміст тіолів у печінці дослідних мишей наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Вміст загальних, низькомолекулярних та високомолекулярних тіолів у печінці дослідних тварин. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день.

Групи тварин	Загальні тіоли, мкмоль/г.с.м.		Низькомолекулярні тіоли, мкмоль/г.с.м.		Високомолекулярні тіоли, мкмоль/г.с.м.	
	самці	самки	самці	самки	самці	самки
Контроль	8,98±0,44	8,69±0,33	3,67±0,22	5,66±0,67	5,33±0,33	3,97±0,73
Маргарин	8,23±0,44	9,46±0,65	3,16±0,62	5,64±0,62	5,01±0,26	3,78±0,09
Маргарин+ ВВР	10,3±0,5**	9,96±0,56	3,64±0,55	5,92±0,91	5,90±0,36	5,05±0,62
Маргарин+ ГЧД	8,84±0,25	9,44±0,39	2,35±0,31 *	5,10±0,92	6,49±0,23	4,34±0,80

Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$.

Рівень загальних тіолів був у межах контрольних значень. Лише у самців, які споживали ВВР, він був на 26% вищий, ніж після споживання їжі з маргарином без відвару (табл.5.1). Вміст низькомолекулярних тіолів у самців після ГЧД був на 35% нижчим, ніж у контрольної групи. У самок змін в межах груп не спостерігали. Рівень високомолекулярних тіолів теж достовірно не змінювався в межах груп тварин однієї статі.

У самців, які періодично голодували, знизився рівень низькомолекулярних тіолів, зокрема GSH. Останній, разом із GST, забезпечує детоксикацію шкідливих сполук, які утворюються в результаті дії АФК. Як було виявлено раніше, у печінці самців на дієті ГЧД активність цього ферменту теж була нижчою (рис. 5.2 Г), проте активність каталази зросла (рис. 5.2 Б). Це може свідчити про те, що в печінці самців виник надлишок пероксиду водню, який міг заінгибувати дію GST.

Отже, отримані результати свідчать про те, що самки мишей більш чутливі до розвитку запалення та ОС на тлі споживання маргарину. Нещодавнє дослідження стверджує, що за умов естропаузи рівень АФК у жировій тканині самок знижується, але водночас зростає у печінці [258]. У нашому випадку, самки показали значно вищий рівень ПЛ у печінці після споживання маргарину *ad libitum* ніж контрольні тварини (рис. 5.1 А), незважаючи на активацію деяких компонентів антиоксидантного захисту (рис. 5.2 В, Г). Ми вважаємо, що постійне споживання маргарину могло викликати ефект естропаузи у самок, що може пояснити відмінність рівня ПЛ між статями. Також ми спостерігали збільшення приросту маси тіла у самок, які споживали маргарин *ad libitum* (рис. 3.1 Г), що теж може бути пов'язано зі зниженням рівня естрогену [259].

Додавання ВВР та режим харчування ГЧД позитивно впливають на печінку самок. Зокрема, ГЧД проявляє антиоксидантні властивості шляхом активації ферментів антиоксидантного захисту (рис. 5.2 А, В, Г). У печінці самців дослідні види харчування збільшили активність каталази (рис. 5.2 Б), проте ВВР та ГЧД зменшили активність GST (рис. 5.2 Г). Також після періодичного голодування у печінці самців було менше низькомолекулярних тіолів (табл. 5.1),

що може свідчити про порушення балансу між окисленим та відновленим глутатіоном.

5.2.2. Вплив маргарину, відвару ромашки та голодування через день на активність глутатіон-залежних ферментів у різних органах дослідних мишей

У підрозділі 5.1 ми дійшли висновку, що у тварин під впливом дослідного харчування вміст ПЛ змінювався не лише у печінці, а й в інших органах. Щоб переконатися, що в них дійсно виник ОС, а ВВР та ГЧД захищають від дії АФК, ми визначили також активності глутатіон-залежних ферментів у цих органах.

У нирках самців та самок після споживання маргарину *ad libitum* активність ГП та GST не показали достовірної різниці порівняно до відповідних контрольних груп (рис. 5.3). Це підтверджує наявність ОС у нирках, адже рівень ПЛ у цих органах був високим (рис. 5.1 Б).

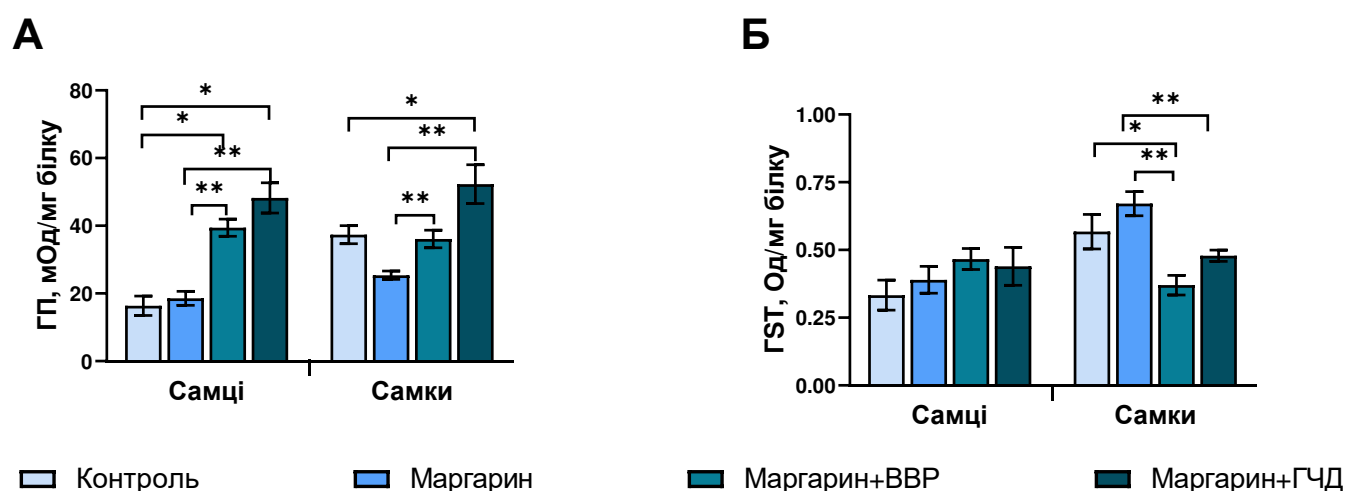


Рис. 5.3. Активність глутатіонпероксидази, ГП (А) та глутатіон-S-трансферази, GST (Б) у нирках дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Отримані дані відповідають попереднім дослідженням [22, 235]. Як видно з рис. 5.3 А активність ГП у самців після ВВР зросла вдвічі, порівняно до контрольної групи та групи, яка споживала маргарин без відвару. Після ГЧД активність цього ферменту була вищою від контрольної групи та від групи, яка споживала маргарин постійно, у три рази.

У нирках самок активність ГП після вживання ВВР була на 42% вищою порівняно до групи, яка споживала маргарин без відвару. Після застосування режиму ГЧД активності цього ферменту в них була на 40% вищою, ніж у тварин контрольної групи, та у два рази – ніж після споживання маргарину *ad libitum*.

Активність GST у нирках самців після споживання ВВР та ГЧД не змінилася (рис. 5.3 Б). Проте у самок ВВР викликав зниження активності цього ферменту на 36% порівняно з контролем, та на 45% – порівняно до тварин, що споживали їжу без відвару. Застосування ГЧД знизило активність GST у нирках самок на 29% порівняно до групи, яка споживала маргарин постійно.

Отже, у нирках самців та самок після споживання ВВР та ГЧД активізувалась одна із перших ланок антиоксидантного захисту, що підтверджується відсутністю змін рівня ПЛ (рис. 5.1 Б). Отримані результати відповідають попереднім дослідженням, адже відомо, що ромашка загалом [22], та апігенін зокрема [236, 260, 261], підвищують активність ГП та знижують рівень маркерів ОС при пошкодженні нирок. Отримані результати після застосування ГЧД відповідають дослідженню Cadenas et al. (1994), в якому теж спостерігали підвищення активності ГП при вуглеводневому обмеженні [238]. Проте інші дослідження стверджують, що періодичне голодування знижує активність антиоксидантних ферментів через зменшення кількості субстрату [237, 262].

Зміна активності ГП та GST в серці мишей проілюстровано на рис. 5.4. У самців усіх дослідних груп активність ГП була вищою, ніж у контрольної (рис. 5.4 А). Активність цього ферменту була у три рази вищою після споживання маргарину *ad libitum* та після вживання ВВР, а також в два з половиною рази вищою – після застосування ГЧД. Активність GST у серці самців була в межах контрольних значень (рис. 5.4 Б).

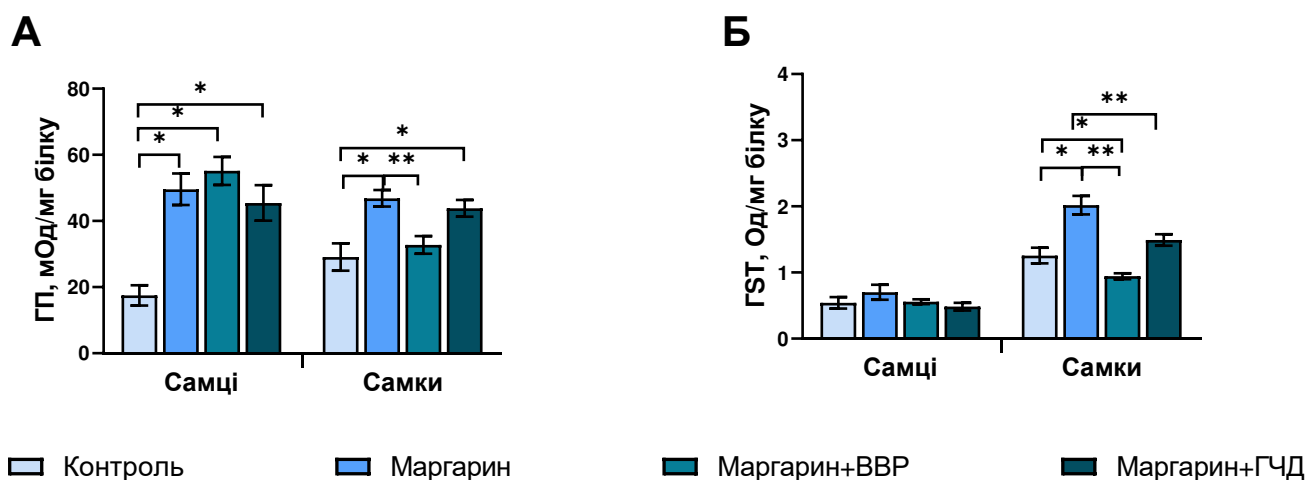


Рис. 5.4. Активність глутатіонпероксидази, ГП (А) та глутатіон-S-трансферази, GST (Б) у серці дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

У самок, що споживали маргарин *ad libitum*, активність ГП була вищою, ніж в контрольній групі, на 61% (рис. 5.4 А). Після додавання до їжі ВВР активність ферменту в серці була на 30% меншою, ніж після споживання маргарину без ВВР. Після періодичного голодування тварини мали на 51% вищу активність ГП, ніж контрольна група. Активність GST у серці самок, що споживали маргарин *ad libitum*, була на 66% вищою, ніж у контрольній групі. Додавання до харчування збагаченого маргарином ВВР викликало зниження активності цього ферменту на 23% порівняно до контролю, та на 53% – порівняно до групи, яка споживала маргарин без відвару. Застосування ГЧД теж зменшило активність GST на 26% порівняно до групи, що споживала маргарин постійно.

Отже, як у самців, так і в самок, у серці після споживання маргарину *ad libitum* збільшилась активність антиоксидантних ферментів, що пояснює відсутність зміни рівня ПЛ в цьому органі (рис. 5.1 Г). У самців, яким додавали ВВР та застосовували ГЧД, навпаки був вищим вміст ПЛ у серці на фоні високої

активності ГП, що свідчить про розвиток ОС. Періодичне голодування проявило антиоксидантну дію в серці самок, збільшивши активність ГП.

Результати, які були отримані у серці мишей, що споживали маргарин *ad libitum*, не узгоджуються з попередніми дослідженнями [235, 263]. Noeman et al. (2011) стверджують, що у серці щурів з ожирінням вміст МДА був високим на фоні зниженої активності глутатіон-залежних ферментів [235]. Проте у нашому експерименті ні у самців, ні у самок не розвинулось ожиріння, що може пояснювати відмінність активності ферментів. Gujjala et al. (2022) теж виявили розвиток ОС у цьому органі через інгибування ГП та GST у серці щурів після споживання їжі з високим вмістом жиру [263].

Відомо, що накопичення ТАГ у міокарді може бути причиною розвитку ОС. Через підвищене навантаження на міокард, в ньому збільшується утворення вільних радикалів, що й викликає ОС [235]. Gujjala et al. (2022) спостерігали збільшення вмісту ТАГ у серці дослідних тварин [263]. У нашому ж випадку вміст ТАГ був навпаки знижений. Також у дослідженні Gujjala et al. (2022) [263] до складу ВКЇ входив смалець, а в нашому дослідженні джерелом ліпідів був маргарин.

Ми виявили, що додавання ВВР до їжі, збагаченої маргарином, активує систему детоксикації H_2O_2 за допомогою ГП у серці самців мишей. Цей фермент є одним з перших захисних антиоксидантних ферментів, який регулює рівень АФК. Він здатний знешкоджувати не лише H_2O_2 , але й гідропероксиди, що утворюються в результаті окислення ненасичених ЖК [264]. З огляду на те, що у серці самців також був високий рівень ПЛ, ми дійшли висновку, що, незважаючи на високу активність ГП, антиоксидантна система серця самців не справлялася зі своєю функцією. Активність ГП після застосування ГЧД корелює з результатами, описаними Mladenovic Djordjevic et al. (2021) у серці щурів, яким на 50% обмежували кількість калорій, отриманих з їжею [26].

Доведено, що тривале інтервальне голодування активує систему антиоксидантного захисту і захищає серце від ішемічного пошкодження [265, 266, 267]. Проте ми виявили, що у самців навпаки розвивається ОС при періодичному

голодуванні, адже рівень ПЛ у серці все ж таки лишався підвищеним. Також вищий вміст ПЛ на цій дієті у самців ми спостерігали у жировій тканині (рис. 5.1 В). Отже у серці мишей обох статей маргарин активував систему антиоксидантного захисту, а додавання ВВР та застосування ГЧД навпаки викликали ОС у самців.

Відомо, що споживання їжі, до складу якої входить високий відсоток ліпідів та вуглеводів, може знижувати активність антиоксидантних ферментів та збільшуючи вміст ПЛ у корі головного мозку [250]. Ми не спостерігали змін активностей ГП та GST у тварин після споживання маргарину *ad libitum* (рис. 5.5), проте рівень ПЛ у тварин обох статей був підвищений (рис. 5.1 Д). Це може свідчити про розвиток окисних пошкоджень кори головного мозку. Масієцзук et al. (2022) теж не спостерігали змін активності ГП у корі головного мозку щурів після споживання їжі з високим вмістом ліпідів. Науковці пояснюють це слабшим антиоксидантним захистом кори головного мозку [251].

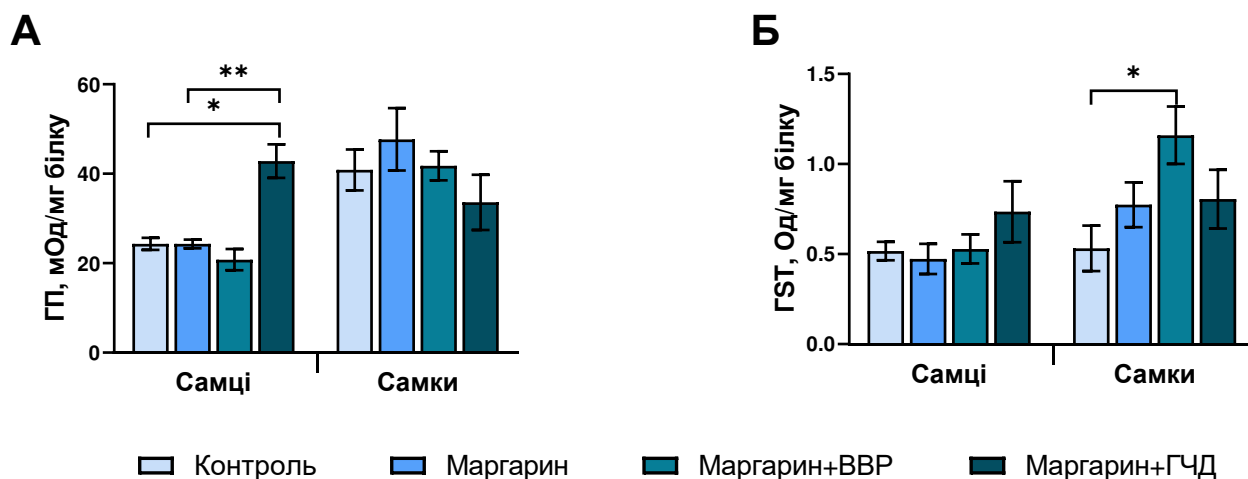


Рис. 5.5. Активність глутатіонпероксидази, ГП (А) та глутатіон-S-трансферази, GST (Б) у корі головного мозку дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Хронічна гіперглікемія, інсулінорезистентність, дисліпідемія та запалення є основними факторами порушення окисно-відновного балансу в мозку. Збільшення рівня АФК в клітинах мозку може бути пов'язаним з надлишком глюкози та жирних кислот [268]. Крім того, відомо, що довготривале споживання їжі з високим відсотком ліпідів викликає ОС і нейрозапалення в мозку [269]. Це може бути пов'язано із порушенням роботи мітохондрій, результатом чого є продукція надлишку АФК.

Мітохондрії забезпечують генерацію більшої частини АТФ, необхідної в мозку для виконання різних функцій нейронів [175]. Протягом нормального клітинного дихання кисень споживається мітохондріями, а на кінцевій стадії окисного фосфорилування він відновлюється до води. За нормальних умов електрон-транспортний ланцюг мітохондрій продукує менше 2% кисню з утворенням АФК, але після їх пошкодження кількість вільних радикалів зростає [175].

Відомо, що додавання ромашки до раціону знижує рівень окислення ліпідів у мозку щурів із церебральною ішемією [253]. Jabri et al. (2022) стверджують, що споживання ВВР на фоні їжі з високим вмістом ліпідів знижує рівень МДА, та підвищує активність ГП у мозку щурів [23]. У нашому дослідженні споживання ВВР та маргарину не мало впливу на глутатіон-залежні ферменти кори головного мозку дослідних мишей.

Лише активність GST у самок була удвічі вищою, ніж у контрольної групи (рис. 5.5 Б). Це може бути пов'язано із зростанням вмісту глутатіону, який має антиоксидантні властивості. Як описували Jabri et al. (2022), вміст глутатіону був вищим у мозку щурів після споживання ВВР [23]. Отримані нами результати відповідають відсутності змін рівня ПЛ у корі головного мозку тварин після споживання їжі з відваром (рис. 5.1 Д).

Отже, ВВР нівелює негативний вплив маргарину на кору головного мозку мишей. Як відомо, ГЧД теж збільшує активність ГП та GST у корі головного мозку, чим і забезпечує антиоксидантний ефект [163]. У нашому дослідженні самці, до яких застосовували ГЧД, мали на 76% вищу активність ГП, ніж у

контрольних тварин та мишей, які споживали маргарин *ad libitum* (рис. 5.5 А). У межах дослідних груп самок достовірних відмінностей активності цих ферментів не спостерігали. Активність GST після періодичного голодування мала тенденцію до зростання у корі головного мозку мишей обох статей, але достовірної відмінності не було виявлено (рис. 5.5 А). Як можна помітити, кора головного мозку мишей реагує на ГЧД по-різному. В самців такий режим харчування активував захисні механізми мозку, а в самок ні, що підтверджує вищий рівень ПЛ у тварин цієї статі (рис. 5.1 Д).

Отже, ми виявили, що дослідні види харчування мають органоспецифічний вплив, а також по-різному діють на самців та самок тварин. Органи самок більш чутливі до споживання маргарину *ad libitum*, зокрема ознаки ОС проявлялися в печінці, нирках та корі головного мозку, а у самців – лише в нирках та корі. Ця їжа активувала антиоксидантну систему серця тварин обох статей. Відвар ромашки та ГЧД теж мали різний ефект на самців та самок мишей. У самок ці добавки до харчування проявили захисну дію на фоні їжі з маргарином, знижуючи ОС у дослідних органах.

Проте у серці самців ВВР та ГЧД, навпаки, підвищили маркери ОС. Можливо, це пов'язано із розвитком запальних процесів у організмі самців, адже ми спостерігали високий вміст лейкоцитів на дієті з ГЧД (рис. 4.1 А), а також збільшення кількості моноцитів у крові після споживання ВВР (рис. 4.1 Г). У плазмі крові самців ми спостерігали тенденцію до зростання рівня прозапального цитокіну ІЛ-1 β (рис. 4.2 В), що теж підвищує вірогідність розвитку запалення у серці. Відомо, що підвищення рівня ІЛ-1 β в плазмі крові є одним із маркерів ССЗ [270].

Загалом, було виявлено, що організм самців залишається більш захищеним від розвитку ОС, який може виникнути від споживання маргарин-вмісної їжі. Незважаючи на те, що дослідні види харчування мали тканинспецифічний вплив, на рис. 5.6 зображено їх загальний вплив на організм самців мишей.

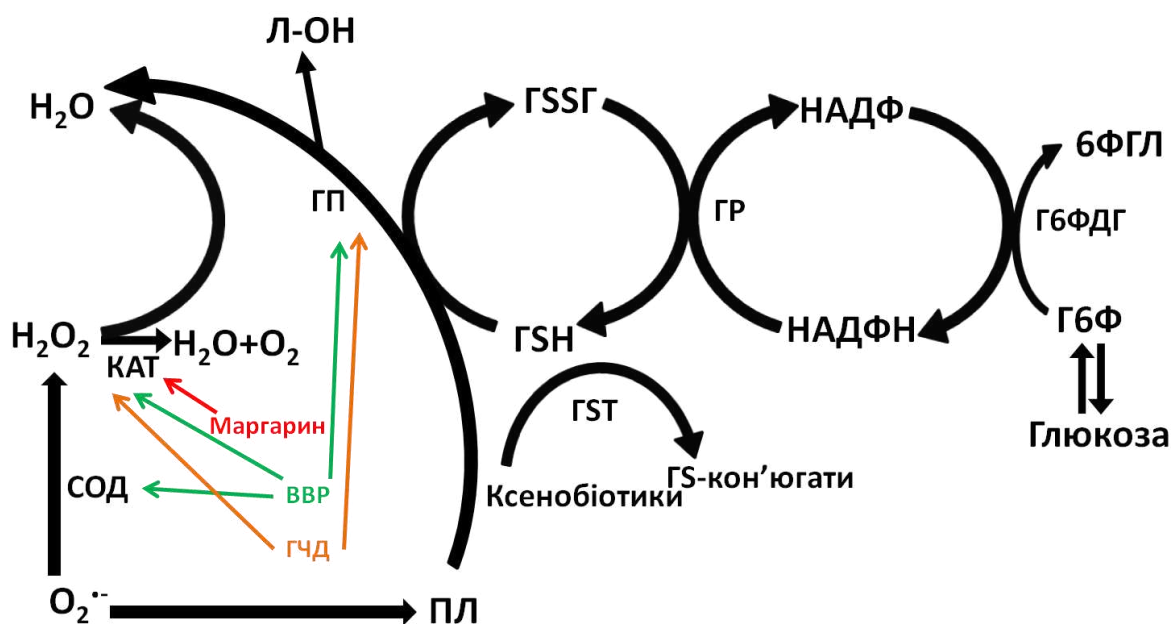


Рис. 5.6. Узагальнююча схема впливу харчування з додаванням маргарину на систему антиоксидантного захисту в організмі самців мишей. Червоним кольором позначено вплив споживання маргарину *ad libitum*, зеленим – вплив харчування з маргарином та водним відваром ромашки (ВВР), помаранчевим – вплив голодування через день на тлі харчування з маргарином (ГЧД). 6ФГЛ – 6-фосфоглюконолактон; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; ГП – глутатіонпероксидаза; ГР – глутатіонредуктаза; GS-кон’югати – сполуки ксенобіотиків з глутатіоном; GST – глутатіон-S-трансфераза; GSH (GSSG) – глутатіон відновлений (окислений); КАТ – каталаза; Л-ОН – жирні спирти; НАДФ (НАДФН) – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат окислений (відновлений); ПЛ – пероксиди ліпідів; СОД – супероксиддисмутаза.

Було виявлено, що їжа з маргарином підвищила активність каталази, що підсилило детоксикацію АФК ($O_2^{\bullet-}$) та захищало від утворення ПЛ (окрім жирової тканини та кори головного мозку). Споживання маргарину разом з ВВР або ГЧД теж, в цілому, підвищувало активність антиоксидантних ферментів першої лінії захисту – СОД, каталази та ГП (рис. 5.6). Проте, в жировій тканині та серці самців на цих режимах харчування інтенсифікувався ОС.

Рис. 5.7 ілюструє загальний вплив дослідних режимів харчування на організм самок мишей. Було виявлено, що споживання маргарину *ad libitum* інтенсифікує ОС у більшості органів (окрім жирової тканини та серця). Додавання до їжі з маргарином ВВР та застосування ГЧД запобігало окисленню ліпідів та формуванню ПЛ у самок. Це реалізувалося двома шляхами. За умов споживання ВВР організм тварин продовжував підтримувати нормальний баланс між утворенням та детоксикацією АФК. У результаті чого, не утворювалось надлишку ПЛ, та не було необхідності в підвищенні активності антиоксидантних ферментів. Активність GST була нижчою, що свідчить про те, що знешкоджувати ксенобіотики не було потреби. За умов застосування ГЧД у самок збільшувалась активність СОД та ГП, які знешкодили надлишок АФК та детоксикували ПЛ.

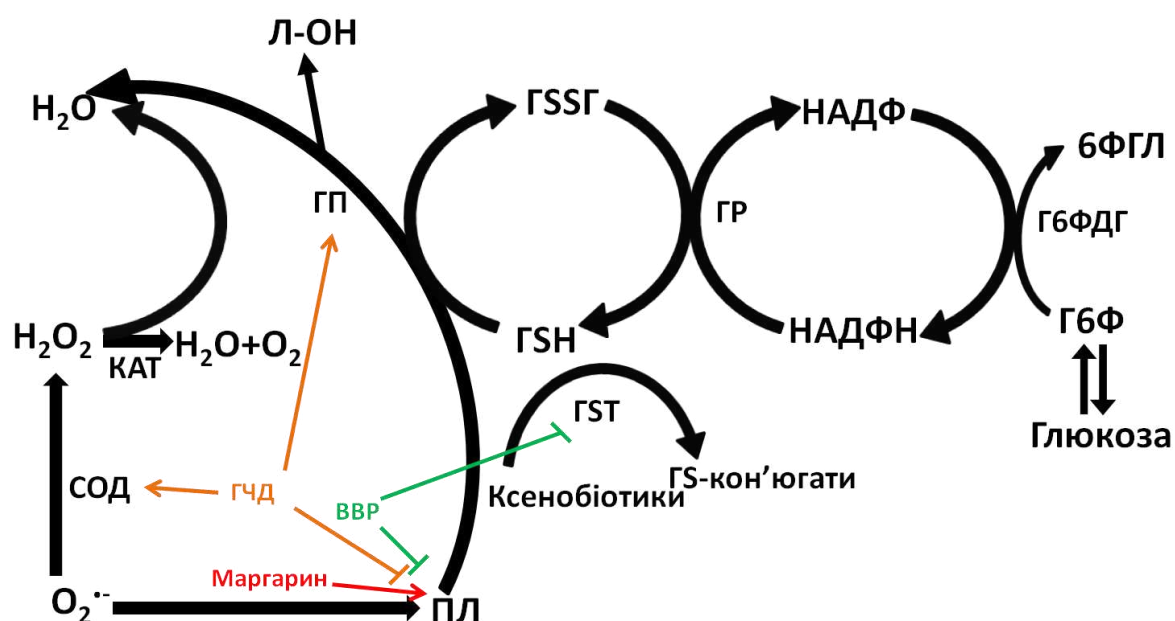


Рис. 5.7. Узагальнююча схема впливу харчування з додаванням маргарину на систему антиоксидантного захисту в організмі самок мишей. Червоним кольором позначено вплив споживання маргарину *ad libitum*, зеленим – вплив харчування з маргарином та водним відваром ромашки (ВВР), помаранчевим – вплив голодування через день на тлі харчування з маргарином (ГЧД). 6ФГЛ – 6-фосфоглюконолактон; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Г6ФДГ – глюкозо-6-

фосфатдегідрогеназа; ГП – глутатіонпероксидаза; ГР – глутатіонредуктаза; GS-кон'югати – сполуки ксенобіотиків з глутатіоном; GST – глутатіон-S-трансфераза; GSH (GSSG) – глутатіон відновлений (окислений); КАТ – каталаза; Л-ОН – жирні спирти; НАДФ (НАДФН) – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат окислений (відновлений); ПЛ – пероксиди ліпідів; СОД – супероксиддисмутаза.

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ МАРГАРИН-ВМІСНОЇ ЇЖИ ОКРЕМО ТА В ПОЄДНАННІ З ВІДВАРОМ РОМАШКИ ТА ПЕРІОДИЧНИМ ГОЛОДУВАННЯМ НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МИШЕЙ

6.1. Зміни рівня головних метаболітів у плазмі крові дослідних тварин

Рівень вільної глюкози у плазмі крові експериментальних тварин проілюстровано на рис. 6.1 А. Після споживання маргарину *ad libitum* вміст глюкози достовірно не змінився ні в самців, ні в самок. У плазмі самців, які споживали ВВР, рівень глюкози теж був у межах контрольних значень. Лише після ГЧД її вміст був на 37% вищим, ніж у контрольної групи. Додавання ВВР до харчування самок значно знизило рівень глюкози порівняно до контрольної групи, та групи, яка споживала маргарин *ad libitum*, на 42% та 36% відповідно.

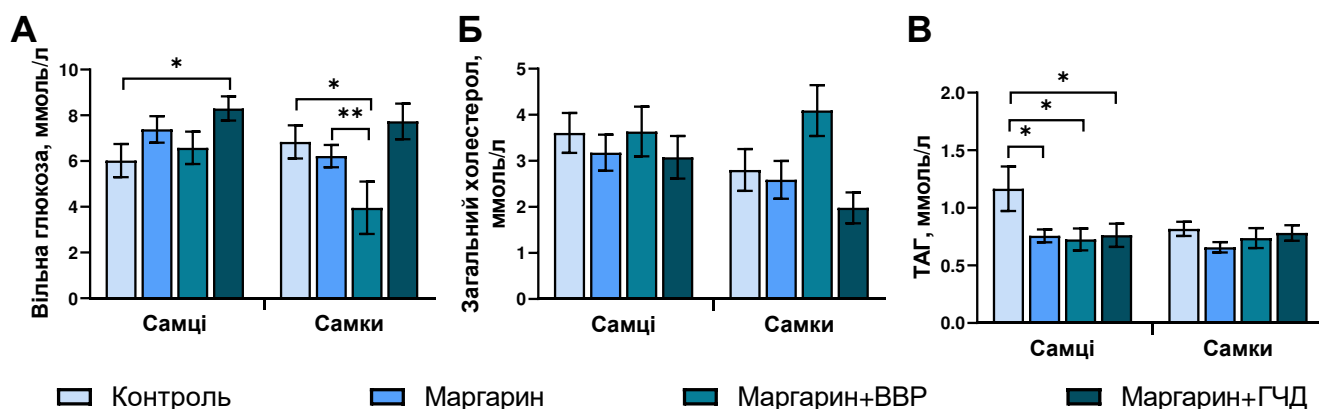


Рис. 6.1. Вміст вільної глюкози (А), загального холестеролу (Б) та триацилгліцеридів, ТАГ (В) у плазмі крові дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$.

Достовірних змін вмісту загального холестеролу у плазмі крові дослідних самців не було виявлено (рис 6.1 Б).

Вміст ТАГ у плазмі крові дослідних тварин зображено на рис. 6.1 В. Їх вміст у самців був нижчий на 35% після споживання маргарину *ad libitum*, на 38% – після споживання ВВР та на 35% – після застосування ГЧД порівняно до контрольної групи. У самок достовірних змін цього показника не спостерігали.

Результати, отримані у плазмі крові після додавання маргарину *ad libitum*, частково узгоджуються з попередніми дослідженням. Зокрема, після споживання їжі з високим вмістом жиру та фруктози теж спостерігали відсутність змін рівня глюкози та холестеролу в плазмі крові мишей [183]. Проте у роботі Bayliak et al. (2022) було виявлено вищий вміст ТАГ у плазмі. В нашому ж дослідженні цей показник або був нижчий (у самців), або не змінювався (у самок) [183].

Існують різні твердження стосовно кількості ТАГ у плазмі крові після споживання ВКІ. Більшість робіт стверджує, що рівень цього показника зростає [183, 222, 271], але відомі також дослідження, які спостерігали відсутність змін рівня ТАГ [98], або навпаки його зниження через дисліпідемію [272, 273]. Проте у дослідженні Kim et al. (2021) вміст ТАГ у плазмі крові був нижчим на фоні високого рівня загального холестеролу, а також ІЛ-1 β та низької активності ПОН [272].

У плазмі крові дослідних тварин не було виявлено змін вмісту загального холестеролу (рис. 6.1 Б) та ІЛ-1 β (рис. 4.2 В), проте активність ПОН на режимах харчування з додаванням маргарину мала тенденцію до зниження у самців, та була достовірно нижчою у самок (рис. 4.2 Б). Тому, ми не можемо стверджувати про наявність дисліпідемії у мишей після споживання маргарину *ad libitum*. Проте низька активність ПОН разом з іншими маркерами може свідчити про розвиток ОС в організмі, що підтверджується високим рівнем ПЛ та інгибуванням ферментів антиоксидантного захисту в різних органах.

Нижчий рівень вільної глюкози у плазмі крові самок мишей під впливом ВВР підтверджує експеримент на щурах з індукованим діабетом [157]. Гіпоглікемічний ефект ВВР проявляється через високий вміст поліфенольних сполук. Зокрема, одні з його компонентів – кверцетин та лютеолін – здатні інгибувати глікогенфосфорилазу, що призводить до зменшення деградації

глікогену [156]. Тому, можна припустити, що зниження рівня глюкози внаслідок споживання ВВР зумовлене пригніченням розпаду глікогену. Було виявлено, що ромашковий чай здатний знижувати рівень глюкози, холестеролу та ТАГ у плазмі крові пацієнтів із цукровим діабетом, проте не впливає на ІМТ [274]. У нашому випадку ВВР викликав зниження рівня вільної глюкози лише у самок, а вмісту ТАГ лише у самців, що можна пояснити відсутністю цукрового діабету в піддослідних мишей. Ефект на вміст ТАГ у плазмі крові самців радше зумовлений дією маргарину, адже рівень цього показника був нижчим у всіх дослідних групах самців.

Відомо, що періодичне голодування покращує метаболізм глюкози та ліпідів у пацієнтів з МС. Зокрема, знижує вміст глюкози натще, рівень загального холестеролу та ТАГ [275]. У нашому випадку самці на режимі ГЧД мали вищий вміст глюкози в плазмі крові. Також самці за умов застосування ГЧД мали підвищений рівень лейкоцитів (рис. 4.1 А) та тенденції до зменшення активності ПОН (рис. 4.2 Б) і збільшення кількості ІЛ-1 β (рис. 4.2 В) порівняно до контрольних груп. Це може свідчити про розвиток системного запалення у самців після періодичного голодування на фоні їжі з маргарином. Також такі ефекти могли виникнути, як наслідок пошкоджень, що виникли у серці тварин під дією АФК. Це підтверджує високий рівень ПЛ (рис. 5.1 Г) та відсутність змін активності GST (рис. 5.4 Б) у цьому органі.

6.2. Метаболічні зміни в печінці дослідних тварин

Dhibi et al. (2011) показали, що споживання маргарину з вищим вмістом ТНЖК може бути прямим джерелом ОС для організму. Також дослідники показали, що ТНЖК можуть викликати порушення метаболізму печінки, що надалі призводить до НАЖХП [227]. У нашому експерименті лише самки, які споживали маргарин *ad libitum*, показали наявність ОС у печінці. На рис. 6.2 зображено зміни рівня основних метаболітів печінки тварин після споживання маргарину окремо та в поєднанні з ВВР та ГЧД. Кількість глюкози у гепатоцитах

мишей, які перебували на експериментальному харчуванні різного типу, достовірних змін не мала. Лише у самок після ГЧД рівень глюкози був вищим на 31%, ніж у контрольної групи (рис. 6.2 А).

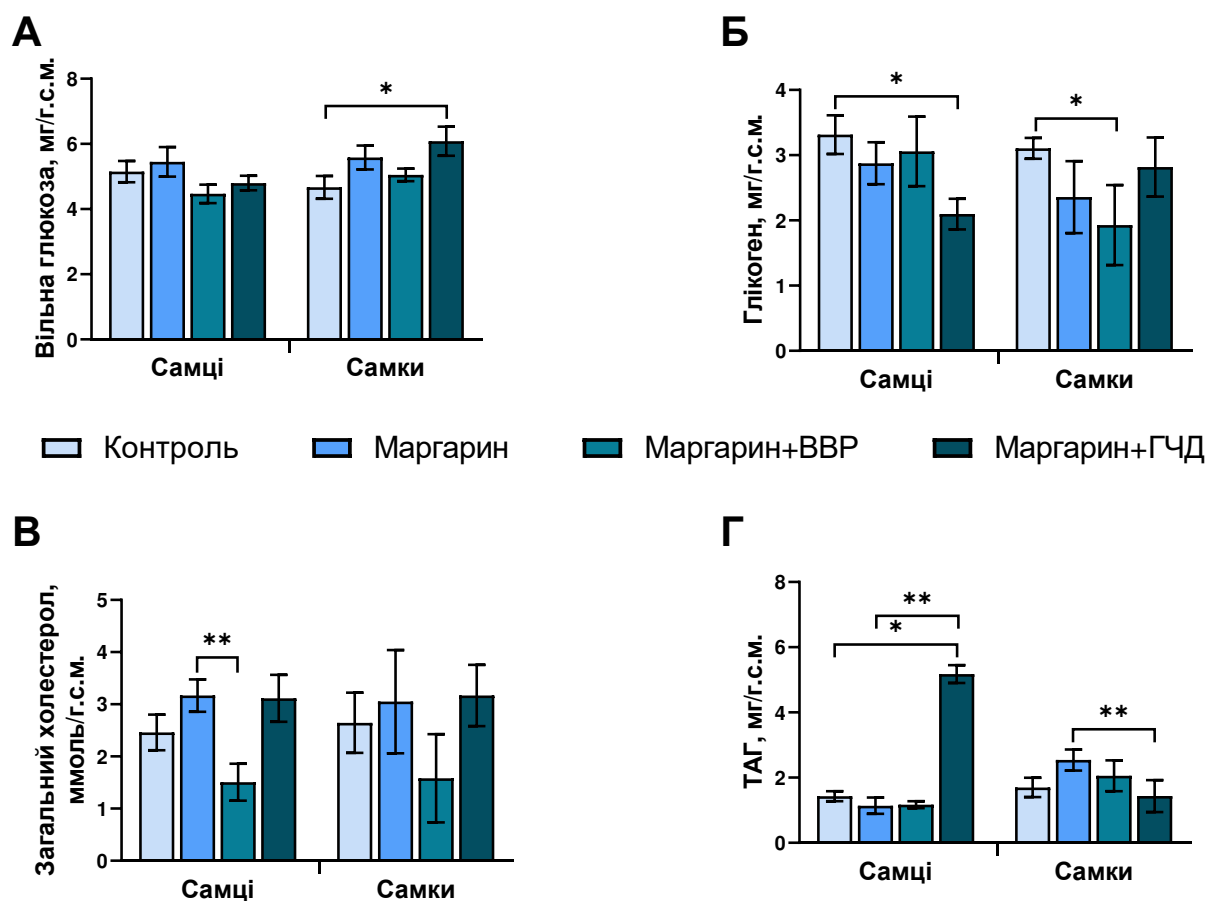


Рис. 6.2. Вміст вільної глюкози (А), глікогену (Б), загального холестеролу (В) та триацилгліцеридів, ТАГ (Г) у печінці дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=5-6$.

Вміст глікогену в печінці дослідних мишей наведено на рис. 6.2 Б. У самців лише після споживання їжі через день цей показник був на 37% нижчий,

ніж у тварин контрольної групи. Самки, які пили ВВР, мали на 38% нижчий рівень глікогену, ніж контрольна група.

На рис. 6.2 В зображено вміст загального холестеролу в гепатоцитах тварин. У самців спостерігали тенденцію до зростання цього показника після споживання маргарину *ad libitum* та застосування ГЧД порівняно до контролю. Після додавання ВВР вміст холестеролу був на 52% нижчим, ніж при споживанні маргарину без відвару. У самок, через високу варіативність отриманих даних, достовірних змін не спостерігали, хоча відвар ромашки викликав тенденцію до зниження рівня холестеролу.

Рівень ТАГ у печінці дослідних тварин наведено на рис. 6.2 Г. У самців, які споживали маргарин *ad libitum*, та у тих, які споживали ВВР, їх вміст був у межах контрольних значень. Проте після ГЧД рівень ТАГ збільшився у три з половиною рази порівняно до контрольної групи, та у чотири з половиною рази – порівняно до групи, яка споживала маргарин *ad libitum*. У печінці самок, які споживали маргарин *ad libitum*, спостерігали тенденцію до збільшення рівня ТАГ. Після застосування ГЧД цей показник був на 44% нижчим, ніж у самок, що їли маргарин постійно.

Рис. 6.3 А ілюструє вплив експериментального харчування на активність ФФК. У печінці самців, які споживали маргарин з ВВР, активність ферменту була на 30% вищою, ніж у контрольної групи. У печінці самок, яким до їжі додавали маргарин *ad libitum*, активність ФФК була на 59% вищою, ніж у контрольної групи. Також на раціоні з відваром ромашки активність ферменту була вищою на 43%, ніж на контрольному.

Вплив експериментальних видів харчування на активність ПК представлено на рис. 6.3 Б. У печінці самців, які споживали маргарин *ad libitum*, активність цього ферменту була на 22% вищою, ніж у контрольної групи. Після споживання ВВР активність ПК була вищою на 35% порівняно до тварин, які споживали базову їжу. У самців, яких годували через день, активність ферменту була вищою на 23%, ніж у контрольної групи. У гепатоцитах самок лише після

споживання маргарину *ad libitum* активність ПК була на 28% вищою, ніж у контрольної групи.

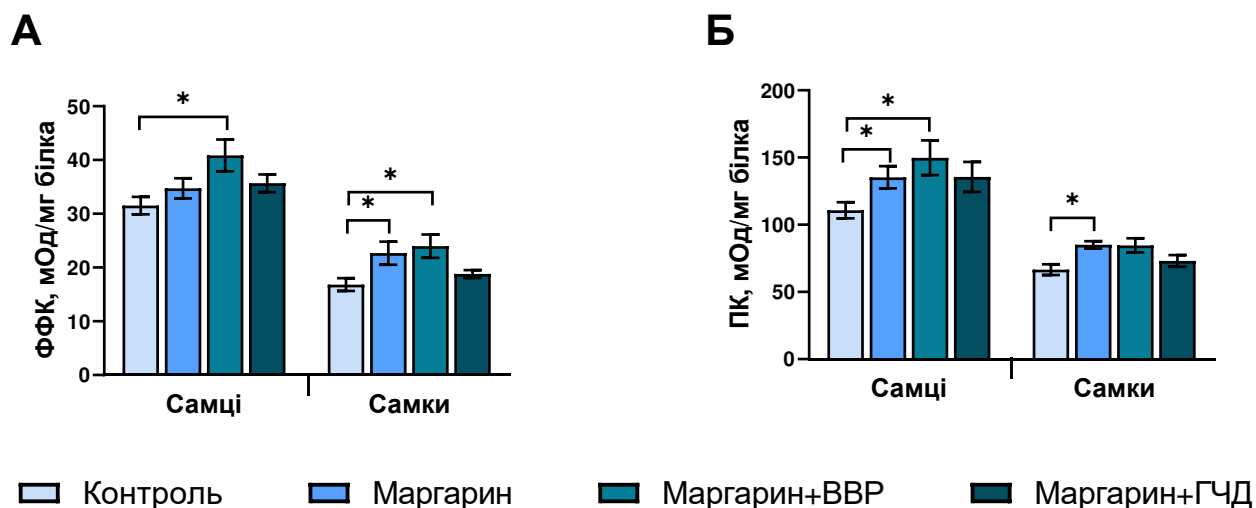


Рис. 6.3. Активність фосфофруктокінази, ФФК (А) та піруваткінази, ПК (Б) в печінці дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

Підвищення активності ФФК та ПК свідчить, що споживання маргарину *ad libitum* збільшує інтенсивність гліколізу в печінці. Це підтверджується попереднім дослідженням, яке показало, що, порівняно з мишами контрольної групи, у печінці тварин, які споживали їжу з високим вмістом ліпідів, рівень мРНК гліколітичних ферментів був вищим [276]. Це може бути пов'язано з гіперінсулінемією при інсулінорезистентності [277]. Також Liu et al. (2018) спостерігали зниження рівня глікогену при розвитку жирової хвороби печінки [276]. У нашому дослідженні тварини не мали достовірних змін рівня глікогену та ТАГ у гепатоцитах після споживання маргарину *ad libitum*, але у самок ми помітили тенденцію до зниження рівня глікогену (рис. 6.2 Б) та зростання рівня ТАГ (рис. 6.2 Г).

Рівень глікогену може знижуватись в результаті глікогенолізу під впливом глікогенфосфорилази. Активність останньої може підвищуватись під дією кортизолу, як відповідь на стрес, травму, або при цукровому діабеті [278]. Gomez-Muñoz et al. (1991) помітили, що ненасичені ЖК можуть підсилювати розпад глікогену в гепатоцитах [278]. До складу маргарину теж входять ненасичені ЖК. Це могло викликати тенденцію до зниження рівня глікогену в нашому експерименті. Зниження вмісту глікогену могло сприяти виникненню тенденції до збільшення рівня глюкози у печінці самок (рис. 6.2 А), що натомість стало причиною збільшення активності ферментів гліколізу (рис. 6.3). Також було виявлено, що додавання маргарину до їжі знижує активність ГбФДГ (рис. 5.2 Д) у самок мишей, що свідчить про пригнічення роботи ПФШ. Окрім цього, у печінці самок спостерігалася інтенсифікація ОС. Це може свідчити про ранню стадію розвитку метаболічних порушень у печінці самок за умов споживання маргарину протягом чотирьох місяців.

Споживання ВВР теж підсилювало гліколіз у печінці дослідних тварин шляхом підвищення активності ФФК та ПК (рис. 6.3). Як і після споживання маргарину без ВВР, самки мали нижчий рівень глікогену в печінці (рис. 6.2 Б). Також ми помітили, що після споживання ВВР, вміст загального холестеролу в гепатоцитах значно знизився (рис. 6.2 В), проте рівні глюкози та ТАГ були в межах контрольних значень (рис. 6.2 А, 6.2 Г).

У плазмі крові самок ми спостерігали нижчий рівень глюкози, ніж в інших груп тварин (рис. 6.1 А). Це підтверджує дослідження на моделі кролів з діабетом, де було виявлено, що олія ромашки знижує рівень глюкози та загального холестеролу в крові чим запобігає розвитку діабетичних ускладнень [279]. Завдяки зниженню рівня глюкози в крові, ВВР призводить до зменшення АФК, і забезпечує підтримання балансу між АФК і антиоксидантною системою [279].

У нашому випадку ВВР підвищував активність таких антиоксидантних ферментів, як СОД (рис. 5.2 А) і каталаза (рис. 5.2 Б), у печінці самців. В той же час, він не вплинув на вміст ПЛ, адже їжа з маргарином окремо теж не мала значного впливу на рівень ПЛ у гепатоцитах самців (рис. 5.1 А).

Самки, яким до їжі з маргарином додавали ВВР, показали покращення балансу між утворенням та детоксикацією АФК. Отже, у них на фоні нижчого рівня глюкози в крові (рис. 6.1 А), рівень ПЛ (рис. 5.1 А) та антиоксидантних ферментів (рис. 5.2) був у межах контрольних значень. Це підтверджує захисний ефект ВВР при ОС.

Після застосування ГЧД активність ФФК та ПК була в межах контрольних значень (рис. 6.3), що свідчить про нормальний перебіг гліколізу. За умов голодування запаси глікогену, що зберігаються в печінці, поступово виснажуються, щоб підтримати фізіологічний рівень глюкози в крові. Зниження кількості глікогену викликає зміну метаболічної активності печінки, що призводить до перетворення накопичених ТАГ у глюкозу шляхом глюконеогенезу [280].

Ми теж спостерігали зниження рівня глікогену в печінці самців, але не у самок (рис. 6.2 Б). За таких умов самці, які харчувалися через день, мали вищий рівень глюкози (рис. 6.1 А) та нижчий рівень ТАГ (рис. 6.1 В) в плазмі, ніж контрольна група. Це може свідчити про те, що активується процес катаболізму ТАГ в плазмі, а продукти їх розпаду використовуються для синтезу глюкози.

Ці результати, разом із підвищеним рівнем ТАГ у печінці (рис. 6.2 Г), свідчать про порушення роботи гепатоцитів, і можуть бути ознакою інсулінорезистентності та НАЖХП [276]. Негативний вплив періодичного голодування спостерігали раніше [281]. Дослідження Cerqueira et al. (2011) виявили, що періодичне голодування призводить до порушення толерантності до глюкози, та значно збільшує швидкість вивільнення АФК.

Науковці стверджують, що довготривалі цикли годування/голодування можуть бути фактором ризику вікового ожиріння та інсулінорезистентності, що призводить до діабету [281]. Можливо, такі зміни у самців пов'язані з більшим споживанням їжі в дні годування, та низькою здатністю переносити велику кількість маргарину в раціоні. З огляду на те, що ми не досліджували вплив харчування на рівень інсуліну, ми не можемо стверджувати про розвиток інсулінорезистентності у тварин. Ми передбачаємо, що самці на режимі ГЧД

використовували глікоген для енергетичних потреб у дні голодування, що призвело до компенсаторної відповіді у вигляді більшого накопичення ТАГ. На рис. 6.4 наведено узагальнюючу схему впливу дослідних видів харчування на енергетичний метаболізм печінки самців мишей.

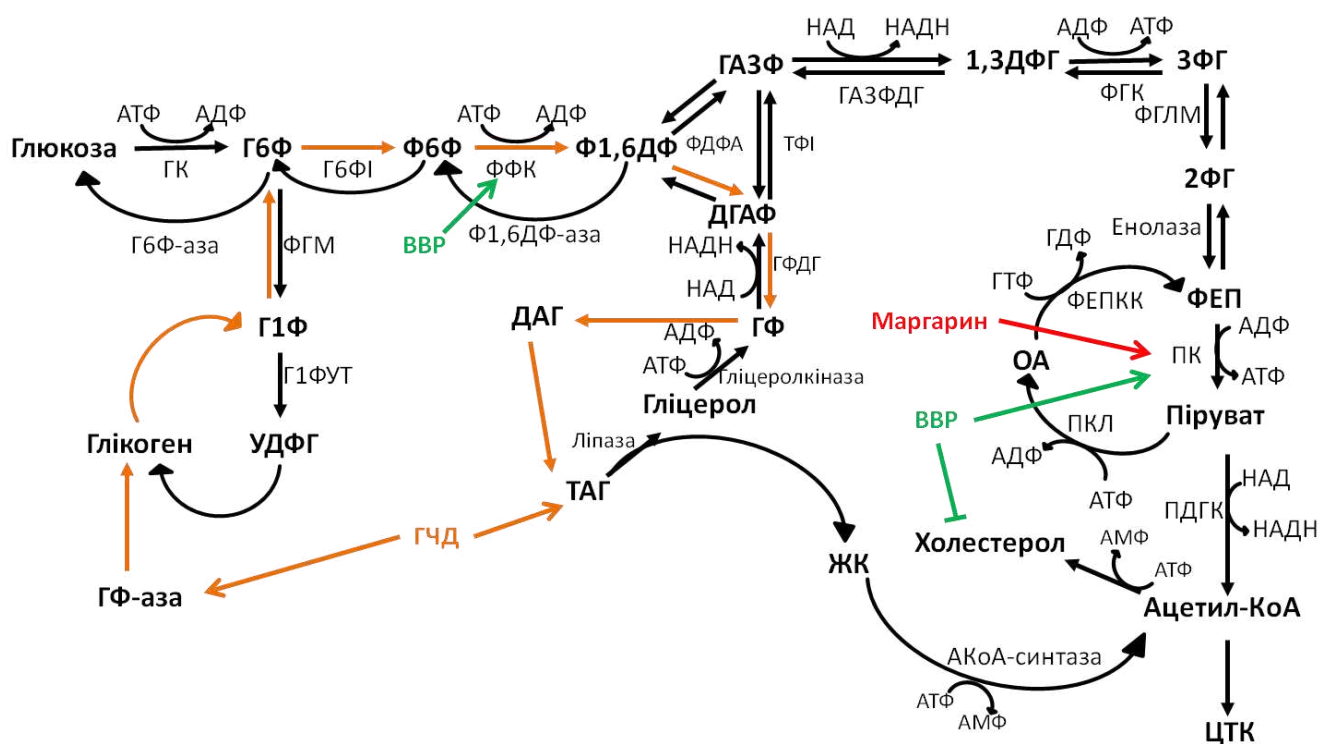


Рис. 6.4. Схема впливу дослідних дієт на метаболічні процеси у печінці самців. Червоним кольором вказано вплив їжі з маргарином *ad libitum*, зеленим – харчування з додаванням маргарину та відваром ромашки (ВВР), помаранчевим – ефект голодування через день на тлі маргарин-вмісної їжі (ГЧД). 1,3ДФГ – 1,3-дифосфогліцерат; 2ФГ – 2-фосфогліцерат; 3ФГ – 3-фосфогліцерат; АДФ – аденозиндифосфат; АКоА-синтаза – ацетил-КоА-синтаза; АТФ – аденозинтрифосфат; Г1Ф – глюкозо-1-фосфат; Г1ФУТ – глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза; Ф1,6ДФ-аза – фруктозо-1,6-дифосфатаза; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Г6Ф-аза – глюкозо-6-фосфатаза; Г6ФІ – глюкозо-6-фосфатізомераза; ГАЗФ – гліцеральдегід-3-фосфат; ГАЗФДГ – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; ГДФ – гуанозиндифосфат; ГК – гексокіназа; ГТФ – гуанозинтрифосфат; ГФ – гліцерол-3-фосфат; ГФ-аза – глікогенфосфорилаза;

ГФДГ – гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа; ДАГ – диацилгліцериди; ДГАФ – дигідроксиацетонфосфат; ЖК – жирні кислоти; НАД (НАДН) – нікотинамідаденіндинуклеотид окислений (відновлений); ОА – оксалоацетат; ПДГК – піруватдегідрогеназний комплекс; ПК – піруваткіназа; ПКЛ – піруваткарбоксилаза; ТАГ – триацилгліцериди; ТФІ – тріозофосфатізомераза; УДФГ – УДФ-глюкоза; Ф1,6ДФ – фруктозо-1,6-дифосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; ФГК – фосфогліцераткіназа; ФГЛМ – фосфогліцеромутаза; ФГМ – фосфоглюкомутаза; ФДФА – фруктозо-1,6-дифосфатаальдолаза; ФЕП – фосфоенолпіруват; ФЕПКК – фосфоенолпіруваткарбоксикіназа; ФФК – фосфофруктокіназа; ЦТК – цикл трикарбонових кислот.

Рис. 6.5 демонструє зміни метаболізму, які відбулися у самок дослідних мишей після споживання раціонів з маргарином, ВВР та ГЧД. Маргарин *ad libitum* інтенсифікував гліколіз у гепатоцитах самок. Також такий режим харчування викликав тенденції до зниження рівня глікогену та збільшення рівня глюкози та ТАГ у печінці цих тварин (на рис. 6.5 позначено червоними штриховими лініями). Це може свідчити про початкову стадію розвитку МС.

Споживання ВВР інтенсифікувало початкову стадію гліколізу, що могло сприяти глюкогенолізу. Про це свідчить нижчий рівень глікогену в гепатоцитах самок після харчування з додаванням ВВР. Також було виявлено тенденцію до зниження рівня холестеролу в печінці цих тварин (на рис. 6.5 позначено зеленими штриховими лініями). Після застосування ГЧД спостерігали вищий рівень глюкози в печінці самок, проте інтенсивність гліколізу не зросла, та не спостерігалось накопичення ТАГ, а також зміни рівня глікогену. Загалом отримані результати свідчать про протекторний ефект ВВР та ГЧД у печінці самок за умов споживання маргарину.

УДФГ – УДФ-глюкоза; Ф1,6ДФ – фруктозо-1,6-дифосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; ФГК – фосфогліцераткіназа; ФГЛМ – фосфогліцеромутаза; ФГМ – фосфоглюкомутаза; ФДФА – фруктозо-1,6-дифосфатаальдолаза; ФЕП – фосфоенолпіруват; ФЕПКК – фосфоенолпіруваткарбоксикіназа; ФФК – фосфوفруктокіназа; ЦТК – цикл трикарбонових кислот.

6.3. Вплив дослідного харчування на рівень триацилгліцеридів у різних органах мишей

Споживання їжі з високим вмістом жиру може викликати підвищене накопичення ліпідів у різних органах. Таке накопичення здатне порушувати баланс між ліпогенезом та ліполізом, що веде до підвищеного окислення ліпідів [235]. На рис. 6.6 А представлено вміст ТАГ у нирках дослідних тварин. Споживання маргарину *ad libitum*, а також додавання ВВР значно не вплинуло на рівень запасних ліпідів у цьому органі. Після ГЧД лише у самців рівень ТАГ був на 42% нижчий, ніж у тварин, які споживали маргарин постійно.

У серці тварин достовірні зміни спостерігали лише у самок (рис. 6.6 Б). Рівень ТАГ після споживання маргарину *ad libitum* у них був на 41% меншим, ніж у контрольної групи. Після додавання ВВР цей показник у самок повернувся до рівня контрольних значень, та був на 60% вищим, ніж у групи, що споживала маргарин без ВВР.

Отримані результати свідчать, що збільшення рівня ПЛ в органах тварин після споживання маргарину не пов'язано із накопиченням ліпідів. Як ми встановили, у нирках самок після споживання маргарину *ad libitum* вміст ПЛ був високим, проте рівень ТАГ не змінився. Також ми не спостерігали збільшення рівня ТАГ у серці. Це може свідчити про те, що ці органи менше реагують на споживання ВКІ, а пошкодження та порушення метаболізму в них виникають пізніше, ніж у печінці.

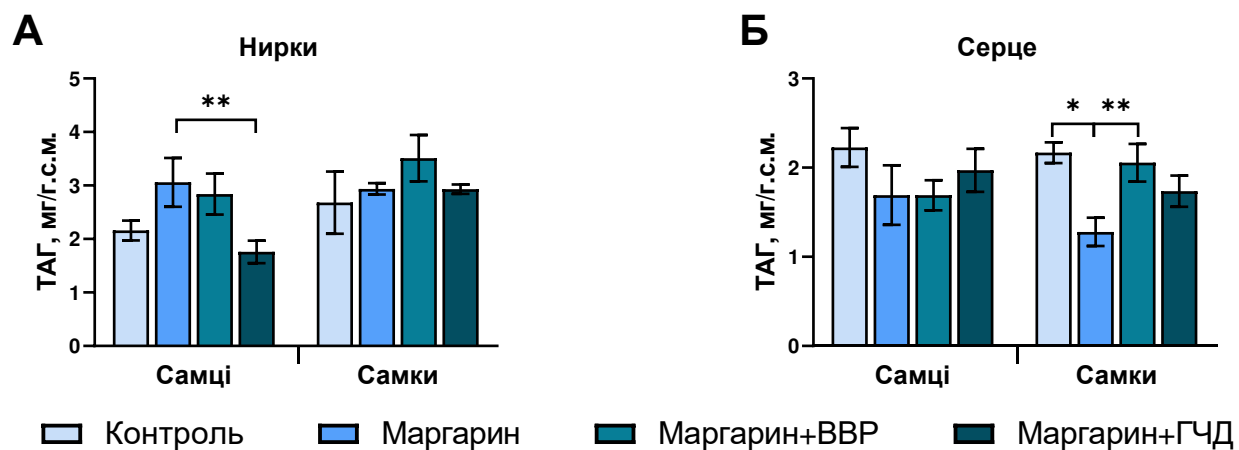


Рис. 6.6. Вміст триацилгліцеридів (ТАГ) у нирках (А) та серці (Б) дослідних мишей. ВВР – водний відвар ромашки; ГЧД – голодування через день. *Показник достовірно відрізняється від контрольної групи, $p \leq 0,05$. **Показник достовірно відрізняється від групи, що споживала маргарин *ad libitum*, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=6$.

РОЗДІЛ 7. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ЕКСПЕРИМЕНТУ З ДОДАВАННЯМ МАРГАРИНУ, ВІДВАРУ РОМАШКИ ТА ЗАСТОСУВАННЯМ ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ

Як відомо, споживання ВКЇ викликає розвиток порушень метаболізму різного ступеня, що надалі призводить до ожиріння, інсулінорезистентності, цукрового діабету та ССЗ [1, 2, 6, 41]. За розвитку цих станів у органах та тканинах на біохімічному рівні можна спостерігати розвиток запалення, ОС, а також порушення процесів анаболізму та катаболізму запасних метаболітів. У цій роботі ми хотіли дослідити, чи їжа збагачена маргарином викликатиме порушення в організмі мишей. Відомо, що споживання їжі з високим вмістом поліфенолів, зокрема ВВР [15, 22], та застосування періодичного голодування [27, 29, 158] можуть знижувати рівень запалення та ОС, а також покращувати метаболізм глюкози. Тому, ми вирішили застосувати ВВР та ГЧД як потенційні компоненти харчування, що зможуть запобігти або пом'якшити розвиток порушень, отриманих в результаті довготривалого споживання маргарину.

Результати, які ми отримали, свідчать про те, що самці та самки мишей по різному реагують на споживання дослідного харчування (рис. 7.1). Ми виявили, що після споживання маргарину *ad libitum* приріст маси тіла був вищим лише у самок. Не зважаючи на те, що маргарин знизив інтенсивність споживання їжі у тварин обох статей, при чому самки їли менше, ніж самці. Останні отримували більше калорій від їжі, ніж контрольна група. Самки загалом споживали стільки ж енергії, як і контрольні тварини. Проте вони отримували більше калорій від маргарину, ніж самці. Отже, самки надавали більшу перевагу маргаринові, ніж самці. Також у них спостерігали нижче споживання води, ніж в контрольній групі. Не зважаючи на сильніший приріст маси у самок, ІМТ та індекс ожиріння Лі були у межах фізіологічних значень, що свідчить про відсутність видимих ознак ожиріння. Проте, результати біохімічних досліджень показали низку метаболічних порушень. На рис. 7.1 зміни викликані їжею з маргарином *ad libitum*, позначені рожевим кольором.

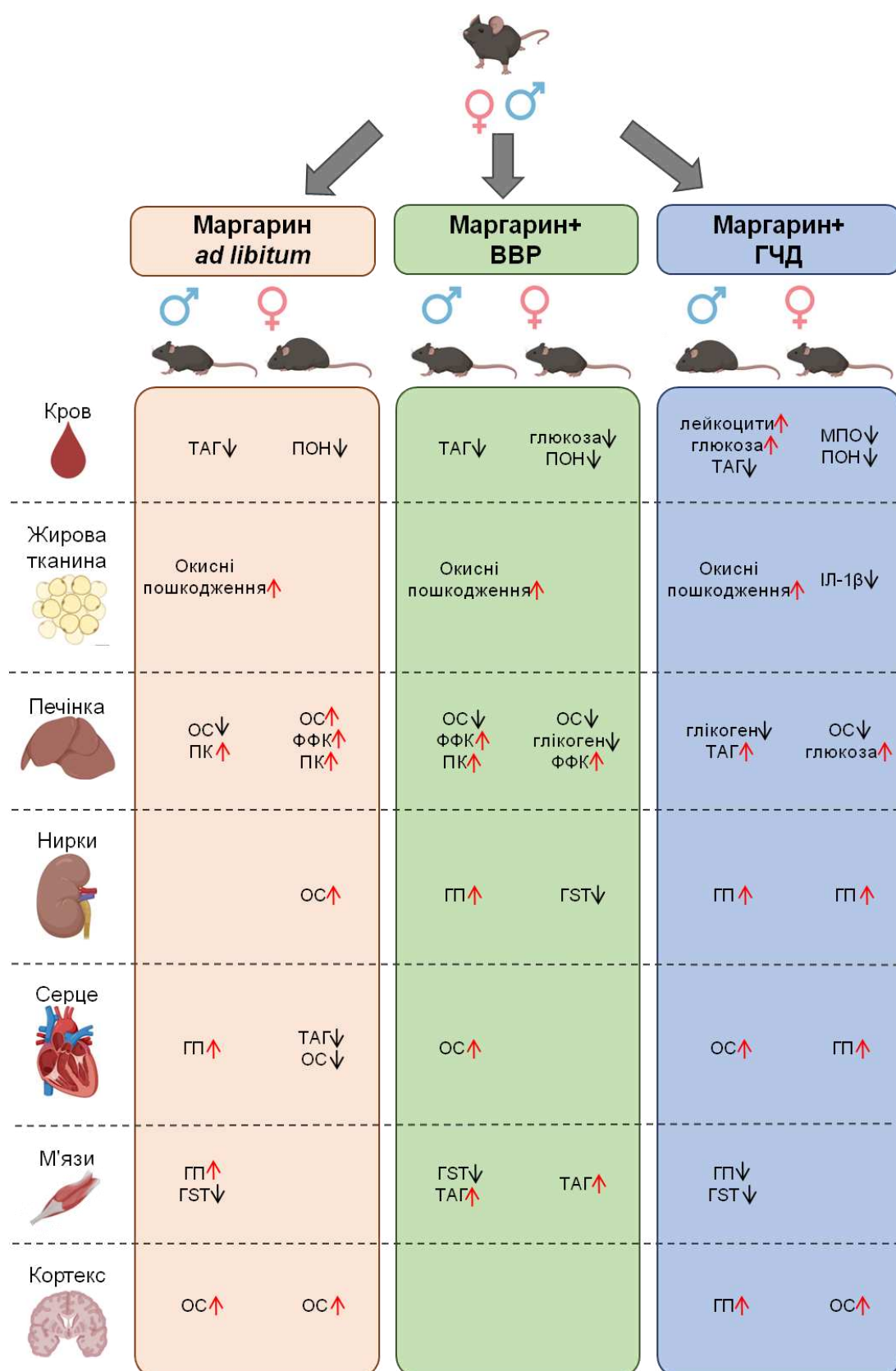


Рис. 7.1. Вплив їжі з додаванням маргарину, ВВР та ГЧД на біохімічні зміни в крові, жировій тканині, печінці, нирках, серці та корі головного мозку дослідних тварин. Рожевим кольором позначено зміни, які відбулися в організмі

тварин, які споживали маргарин *ad libitum*, зеленим – після додаванням відвару ромашки (маргарин+ВВР), блакитним – після споживання їжі через день (маргарин+ГЧД). ГП – глутатіонпероксидаза; GST – глутатіон-S-трансфераза; ІЛ-1 β – інтерлейкін-1 β ; МПО – мієлопероксидаза; ОС – оксидативний стресс; ПК – піруваткіназа; ПОН – параоксоназа; ТАГ – триацилгліцериди; ФФК – фосфофруктокіназа. ↑ – позначає достовірне зростання показника на відповідному виді харчування. ↓ – позначає достовірне зниження показника на відповідному виді харчування.

У плазмі крові самців рівень ТАГ був нижчим, ніж в контрольній групі, що свідчить про порушення ліпідного обміну. Також самці мали незначне підвищення рівня паличкоядерих нейтрофілів. При цьому активність МПО була в межах контрольних значень, що може свідчити про міграцію цих клітин до сайту запалення в тканині чи органі.

На рис. 7.2 червоним кольором зображено механізм впливу маргарину в організмі самців. Хоча у тварин не спостерігали збільшення маси тіла, у жировій тканині самців рівень ПЛ був вищий, що є маркером ОС в адипоцитах. Як стверджує Furukawa et al. (2017), ОС у жировій тканині може виникати на ранніх стадіях МС, та бути причиною утворення прозапальних цитокінів [240].

У нашому випадку була помітна тенденція до збільшення рівня ІЛ-1 β у жировій тканині самців (на рис. 7.2 позначено червоною штриховою стрілкою). Це може підтверджувати наявність запальних процесів на ранній стадії. У печінці самців маргарин знизив інтенсивність ОС шляхом підвищення активності каталази. Також ця їжа інтенсифікувала гліколіз шляхом збільшення активності ПК в гепатоцитах. Це забезпечило відсутність помітних змін вмісту глюкози в плазмі крові та гепатоцитах.

Активність ГП у серці самців була вищою, щоб підтримати баланс між утворенням та утилізацією АФК, що підтверджує відсутність зростання рівня ПЛ. Було виявлено, що довготривале споживання маргарину підвищило інтенсивність ОС у корі головного мозку самців.

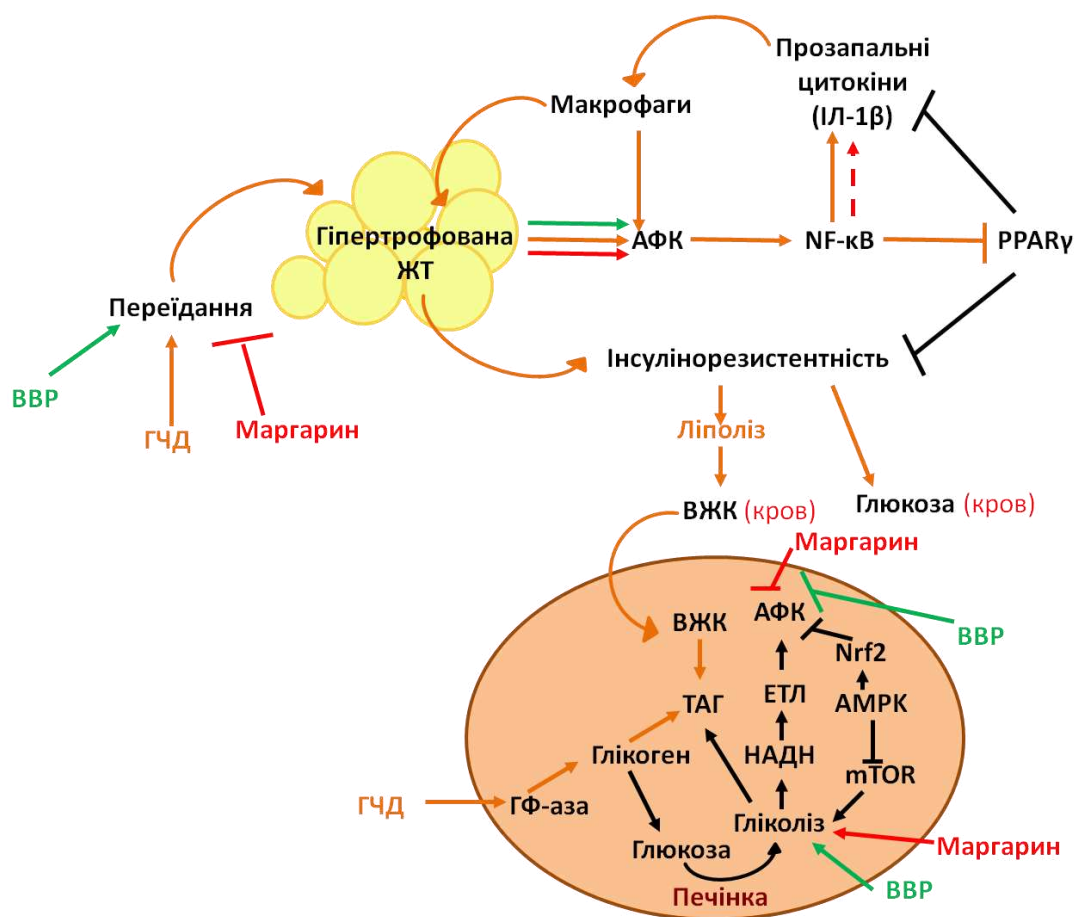


Рис. 7.2. Потенційний механізм впливу маргарину окремо (позначено червоним кольором), на фоні відвару ромашки (BBP, зеленим кольором) та за умов періодичного голодування (ГЧД, помаранчевим кольором) на розвиток метаболічних порушень в організмі самців дослідних мишей. АФК – активні форми кисню; ВЖК – вільні жирні кислоти; ГФ-аза – глікогенфосфорилаза; ЖТ – жирова тканина; ЕТЛ – електрон-транспортний ланцюг мітохондрій; ІЛ-1β – інтерлейкін-1β; НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений; ТАГ – триацилгліцериди; AMPK – АМФ-залежна протеїнкіназа; mTOR – механістична мішень для рапаміцину; NF-κB – ядерний фактор-κB; Nrf2 – ядерний фактор еритроїдного походження 2; PPARγ – рецептор, який активований проліфератором пероксисом γ.

Водний відвар квітів ромашки лікарської на тлі харчування з маргарином не вплинув на зміну маси тіла самців мишей. Такий вид харчування підвищив

інтенсивність споживання їжі тваринами. Після вживання ВВР вона була такою ж, як в контрольній групі. Проте кількість калорій, які вони отримали, була вищою у порівнянні як з контролем, так і з групою, яка споживала маргарин без відвару. Це пояснюється тим, що на відміну від самців, яким додавали маргарин *ad libitum*, самці, які пили ВВР, почали споживати більше базового корму. Також ВВР знижував середнє споживання води тваринами обох статей, що, вірогідно, пов'язане із споживанням маргарину.

На рис. 7.1 зеленим кольором позначено біохімічні зміни у плазмі крові, жировій тканині та різних органах мишей, які протягом чотирьох місяців споживали маргарин з ВВР. У плазмі крові самців, як і після споживання маргарину *ad libitum*, рівень ТАГ був нижчим від контрольної групи. Проте після додавання ВВР у плазмі крові спостерігали тенденцію до зростання рівня ІЛ-1 β . Також у крові був вищий рівень моноцитів, що може підтверджувати наявність певних запальних процесів, які призвели до пошкодження клітин. Зеленим кольором на рис. 7.2 позначено механізм дії ВВР у організмі самців на фоні споживання маргарину. У жировій тканині самців, які і після споживання маргарину без ВВР, був вищий рівень ПЛ. Проте, на відміну від групи, яка їла маргарин *ad libitum*, рівень ІЛ-1 β був у межах контрольних значень. Це може свідчити про слабе пом'якшення запальних процесів у результаті дії ВВР.

Печінка самців прореагувала так само, як і у групи тварин, які споживали маргарин без ВВР – зменшенням інтенсивності ОС та підвищеною активністю гліколітичних ферментів. У нирках після споживання ВВР активність ГП була вищою, що зумовлювало антиоксидантний ефект. Не зважаючи на те, що в серці теж була висока активність ГП, у ньому спостерігали ОС, адже рівень ПЛ залишився високим. Отже, ВВР має слабкий захисний вплив на організм самців, але викликає розвиток ОС у серці. Такі ефекти можуть бути пов'язані з тим, що вживання маргарину окремо не викликало відчутних змін у метаболізмі самців.

Режим ГЧД для самців був більш шкідливим, ніж споживання маргарину *ad libitum*. У них спостерігали більший приріст маси тіла, ніж у самок, хоча індекси ожиріння лишалися в межах норми. Ми виявили, що тварини цієї групи

мали схильність до переїдання у дні, коли вони мали доступ до їжі. Але загалом як самці, так і самки, споживали менше їжі, ніж контрольні тварини. У такий спосіб організм самців компенсував відсутність надходження достатньої кількості калорій у дні голодування, що зумовило накопичення запасних жирів у печінці.

Зміни, які виникли в плазмі крові, жировій тканині та різних органах мишей на режимі ГЧД, позначено блакитним кольором на рис. 7.1. На рис. 7.2 помаранчевим кольором зображено узагальнюючу схему впливу ГЧД на організм самців мишей. Як було згадано вище, тварини споживали більше їжі у дні, коли мали до неї доступ. Це зумовило гіпертрофію жирової тканини. Адипоцити почали виробляти більше АФК завдяки стимуляції окислення глюкози через мітохондріальне дихання. Високий рівень АФК викликав активацію фактора транскрипції NF- κ B. Останній зумовив вироблення прозапальних цитокінів. Зокрема, у плазмі крові самців була помітна тенденція до зростання рівня ІЛ-1 β . У крові самців був виявлений лейкоцитоз, що теж свідчить про розвиток запалення в організмі. Активація NF- κ B інгибувала PPAR γ . Останній запобігає утворенню прозапальних цитокінів та підвищує чутливість клітини до інсуліну. В гіпертрофованих адипоцитах погіршувалась передача сигналу інсуліну. Це зумовило підвищення рівня глюкози у плазмі крові самців. Також у плазмі крові спостерігали зниження рівня ТАГ. Можливо, це пов'язано з тим, що гліцерол (який утворюється під час катаболізму ТАГ) використовується для синтезу глюкози шляхом глюконеогенезу.

Резистентність до інсуліну могла інтенсифікувати ліполіз [15]. Вільні жирні кислоти, які утворилися в результаті цього процесу, транслокувалися в печінку. В гепатоцитах самців був нижчий рівень глікогену та високий вміст ТАГ, хоча інтенсивність гліколізу була така сама, як і в контрольній групі. Такі зміни можуть бути пов'язані з тим, що за умов періодичного голодування метаболізм у печінці переключається на синтез запасних ТАГ, ймовірно використовуючи для цього глікоген та вільні жирні кислоти, що транслокувалися з крові.

Високий рівень глюкози в крові, а також зниження рівня глікогену на фоні збільшення рівня ТАГ у печінці є одними із ознак інсулінорезистентності та

НАЖХП [276, 282]. У печінці самців, за умов ГЧД, не було виявлено ОС. Висока активність каталази у гепатоцитах цих тварин свідчить про те, що підвищення активності цього ферменту достатньо, щоб нейтралізувати АФК. Ми не можемо стверджувати про розвиток цих патологій у самців після ГЧД, але такі результати свідчать про порушення обміну речовин за цієї дієти.

У нирках самців ГЧД частково активував антиоксидантну систему, підвищуючи активність ГП. Також ми виявили, що ця дієта викликала розвиток ОС у серці. Відомо, що інсулінорезистентність може бути однією із ознак ССЗ, зокрема серцевої недостатності [283]. Тому ми вважаємо, що порушення, які були виявлені у плазмі крові та печінці, можуть пояснювати зростання інтенсивності ОС у серці. У корі головного мозку не було виявлено ОС, на відміну від групи, яка споживала маргарин постійно. Це може бути пояснено вищою активністю ГП. Отже, можливо, ГЧД на фоні споживання їжі з маргарином у самців викликає появу слабких ознак МС, але нирки та кора головного мозку залишаються захищеними від дії такого режиму харчування.

У самок мишей, які протягом чотирьох місяців споживали маргарин *ad libitum*, були виявлені сильніші порушення, ніж у самців. Зміни біохімічних показників у організмі самок мишей за цього типу харчування проілюстровані на рис. 7.1, та позначені рожевим кольором. У плазмі крові активність ПОН була нижчою, що свідчить про розвиток ОС в організмі. Це підтверджують результати отримані у печінці, де був підвищений рівень ПЛ на фоні відсутніх змін, або підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту. Це говорить про сильний ОС у печінці.

Є вірогідність, що споживання маргарину знизило рівень естрогену в самок мишей, що пояснює відмінність рівня ПЛ між статями. Рис. 7.3 ілюструє потенційний механізм впливу дослідних видів харчування на організм самок. Зміни, які виникли внаслідок споживання маргарину *ad libitum*, позначені червоним кольором. Споживання їжі з маргарином збільшило масу тіла самок, що могло бути причиною гіпертрофії жирової тканини. Проте, ані в плазмі крові, ані

в адипоцитах самок, не було виявлено підвищеного рівня прозапального цитокіну ІЛ-1 β .

У печінці самок спостерігали тенденцію до зростання рівня глюкози і ТАГ на тлі тенденції до зниження рівня глікогену. Можливо, вживання маргарину підвищило активність глікогенфосфорилази (активує глікогеноліз), що і зумовило такий ефект. Також було виявлено підвищену активність гліколітичних ферментів (ФФК та ПК) у гепатоцитах самок. Разом з ОС це свідчить про порушення нормального функціонування печінки.

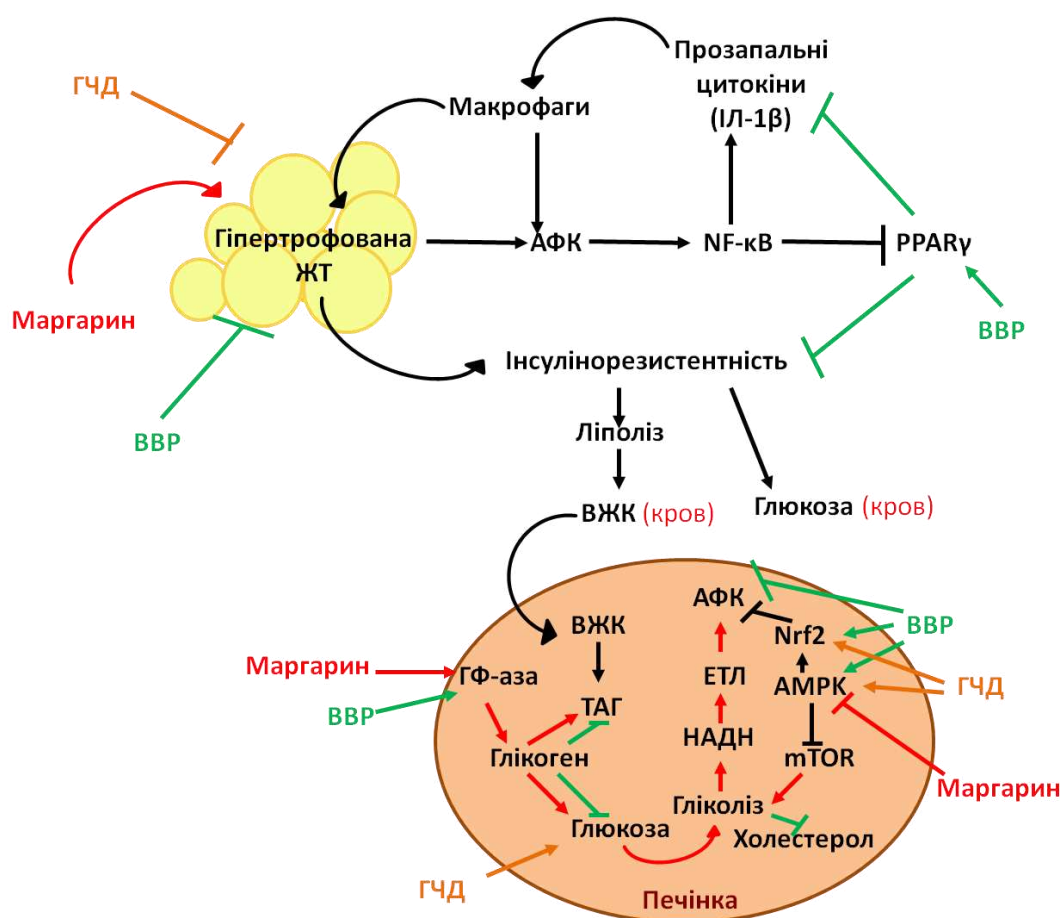


Рис. 7.3. Потенційний механізм впливу харчування з маргарином *ad libitum*, на тлі споживання відвару ромашки (ВВР) та голодування через день (ГЧД) на метаболізм самок мишей. Червоними стрілками позначено ефект маргарину; зеленими – споживання ВВР на тлі їжі з маргарином; помаранчевими – ГЧД на тлі споживання їжі з маргарином. АФК – активні форми кисню; ВЖК –

вільні жирні кислоти; ГФ-аза – глікогенфосфорилаза; ЖТ – жирова тканина; ЕТЛ – електрон-транспортний ланцюг мітохондрій; ІЛ-1 β – інтерлейкін-1 β ; НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений; ТАГ – триацилгліцериди; AMPK – АМФ-залежна протеїнкіназа; mTOR – механістична мішень для рапаміцину; NF- κ B – ядерний фактор- κ B; Nrf2 – ядерний фактор еритроїдного походження 2; PPAR γ – рецептор, який активований проліфератором пероксисом γ .

Висока активність гліколітичних ферментів може бути пов'язана з інгибуванням AMPK. В результаті цього активується шлях mTOR, який посилює інтенсивність гліколізу [284]. Результатом цього є утворення великої кількості НАДН, яка може поступати до електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, і там брати участь у генеруванні надлишку АФК.

Окрім цього, ОС також спостерігали у нирках та корі головного мозку самок. Серце тварин залишалось захищеним від дії маргарину. Зокрема, у нього була нижча інтенсивність ОС та рівень ТАГ. Отже, самки сильніше реагують на довготривале споживання ТНЖК, ніж самці.

Споживання ВВР разом з маргарином виявило протекторний ефект в організмі самок. На рис. 7.1 зеленим кольором позначено зміни, які виникли в організмі цих тварин за умов споживання ВВР. Рис. 7.3 ілюструє потенційний механізм дії ВВР (зміни позначені зеленим кольором). Споживання ВВР з маргарином запобігало гіпертрофії жирової тканини. Відвар ромашки вірогідно активував PPAR γ , що запобігало розвитку запалення та покращило чутливість клітин до інсуліну. Це запобігло збільшенню рівня глюкози в плазмі крові та ліполізу в адипоцитах.

У гепатоцитах ВВР стимулював глікогеноліз, що могло бути причиною зростання активності ФФК. Також ВВР запобігав накопиченню ТАГ, збільшенню рівня глюкози та холестеролу в печінці. Відвар ромашки захищав гепатоцити від інтенсифікації ОС. Це могло бути обумовлено кількома причинами: зниженням генерації АФК, активацією регулятора фактора транскрипції Nrf2 (посилює

експресію антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів) та активацією AMPK (інгибує mTOR, що запобігає посиленню гліколізу).

У нирках самок ВВР знизив активність GST. Це викликало тенденцію до зростання ПЛ у цих органах. Проте, рівень ПЛ все одно був нижчим, ніж за харчування без відвару, що теж може свідчити про протекторний вплив ВВР. Показники у серці та корі головного мозку самок мишей були в межах контрольних значень. Отже, ВВР проявляє антиоксидантні властивості у самок мишей та може пом'якшити негативну дію, яку викликає їжа з маргарином *ad libitum*.

На відміну від самців, у самок мишей ГЧД проявило захисний ефект. Блакитним кольором на рис. 7.1 проілюстровано зміни, які виникли в мишей після споживання ГЧД. Потенційний механізм впливу ГЧД в організмі самок мишей показано помаранчевим кольором на рис. 7.3. Цей режим харчування знизив приріст маси тіла самок. У плазмі крові цих тварин спостерігали нижчу активність МПО, а також відсутність змін рівня ІЛ-1 β , що свідчить про відсутність системного запалення.

Проте, у плазмі крові був нижчий рівень ПОН, що говорить про наявність порушення балансу між продукцією та детоксикацією АФК в організмі. Відсутність запальних процесів також підтверджується зниженням рівня ІЛ-1 β в жировій тканині самок. Після ГЧД печінка самок була захищена від розвитку ОС. Це, вірогідно, пов'язано з активацією Nrf2 та AMPK. Проте, в гепатоцитах був вищим рівень глюкози, хоча рівень глікогену, ТАГ і холестеролу був у межах контрольних значень.

Як в нирках, так і в серці самок спостерігали часткову активацію антиоксидантної системи, що проявлялось у підвищеній активності ГП. У корі головного мозку, як і при споживанні маргарину постійно, в самок розвивався ОС. Отже, застосування періодичного голодування на тлі споживання маргарину запобігало утворенню запалення, а також ОС у печінці, нирках та серці самок, проте кора головного мозку лишилася чутливою до розвитку ОС.

РОЗДІЛ 8. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КАЛОРІЙНОГО ОБМЕЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що у тварин та людей в результаті старіння змінюється швидкість енергетичного метаболізму та окисно-відновних процесів. Загалом, вікові метаболічні зміни можуть включати: зменшення припливу крові до органів, що може вплинути на доставку кисню та поживних речовин до них, а також зміни метаболізму глюкози, та посилення ОС [163, 170, 285]. Хоча старіння впливає на всі органи і тканини, деякі з них вважають більш вразливими. Зокрема, метаболічні ознаки старіння добре вивчені у мозку та серцево-судинній системі [36, 37, 38], проте печінка та нирки залишаються недостатньо дослідженими, адже відомо, що вони повільніше реагують на вікові зміни [39, 40].

У нашій роботі було досліджено вплив КО на мишей середнього та старшого віку як такого режиму харчування, що потенційно може зменшити розвиток вікових порушень. Ingram & de Cabo (2017) виявили, що застосування КО протягом більше ніж одного місяця було достатнім для досягнення відмінності між когнітивними показниками та іншими фізіологічними параметрами між контрольною групою та групою з КО [286]. У нашому дослідженні КО тривало 2/3 життя дослідних тварин. Миші середнього віку перебували на режимі КО протягом шести місяців, а старшого віку – протягом дванадцяти.

8.1. Вплив калорійного обмеження на зміну інтенсивності оксидативного стресу в мишей різного віку

Як відомо, помірне КО може викликати зменшення інтенсивності ОС. Обмежене споживання калорій фактично діє як стресовий фактор низького рівня, що індукує механізм захисту від АФК, а також підвищує стійкість до стресу [287]. Результати визначення ПЛ та ферментів антиоксидантного захисту в печінці дослідних тварин наведено у табл. 8.1. Рівень ПЛ у всіх експериментальних груп

був практично однаковим, лише у групі мишей середнього віку з КО спостерігали тенденцію до вищого рівня цього показника.

Таблиця 8.1.

Вплив калорійного обмеження (КО) на параметри оксидативного стресу печінки мишей різного віку.

Показник	Миші середнього віку, 9 міс.		Миші старшого віку, 18 міс.	
	Контроль	КО	Контроль	КО
ПЛ, мкмоль екв.ГПК/г.с.м.	463±85	702±153	539±175	583 ± 210
СОД, Од/мг білку	122±11	98,7±20,1	76,6±20,7	67,4±3,6
Каталаза, Од/мг білку	280±67	166±11	187±19	277±125
ГП, мОд/мг білку	375±31	363±33	305±20	303±29
ГST, Од/мг білку	3,66±0,38	4,26±0,56	3,20±0,33	2,62±0,36
Г6ФДГ, мОд/мг білку	5,60±0,41	7,52±0,41*	7,72±1,26 [#]	3,58±1,05 ^{*,#}

Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$. *Показник достовірно відрізняється від відповідної контрольної групи, $p \leq 0,05$. #Показник достовірно відрізняється між різними віковими групами в межах одного виду харчування, $p \leq 0,05$.

Активність антиоксидантних ферментів, таких як СОД, каталаза, ГП та ГST, не мала статистичної відмінності, не зважаючи на те, що активність СОД контрольної групи мишей середнього віку була вищою (табл. 8.1). Лише активність Г6ФДГ була достовірно вищою на 34% у печінці мишей середнього віку, які перебували на КО, порівняно до відповідної контрольної групи. У мишей старшого віку, які перебували на КО, активність цього ферменту була на 54% нижчою, ніж у контрольної групи. Також було виявлено, що у контрольних мишей старшого віку активність Г6ФДГ була вищою на 38%, ніж у мишей середнього віку, а після застосування КО активність цього ферменту була на 52% нижчою, ніж у групи мишей середнього віку на КО. Відсутність змін рівня ПЛ та

активності СОД у печінці узгоджуються з Stankovic et al. (2013). Ці науковці також не виявили змін рівня МДА та активності СОД у печінці щурів, до яких застосовували КО [287]. Активність Г6ФДГ у мишей старшого віку може підвищуватись у відповідь на ОС, який виникає протягом старіння, через посилене вироблення НАДФН [170, 285].

Нирки тварин середнього віку виявились більш чутливими до дії КО. Після застосування такого обмеження в харчуванні рівень ПЛ у тварин середнього віку був на 63% нижчим, ніж у контрольної групи (рис. 8.1 А). У тварин старшого віку такої відмінності не було виявлено, хоча тварини, яким застосовували КО, мали в три рази вищий рівень ПЛ, ніж відповідна група тварин середнього віку (рис. 8.1 А). Активність ГП та GST не показали достовірної різниці ані після застосування КО, ані між різними віковими групами (рис. 8.1 Б, В).

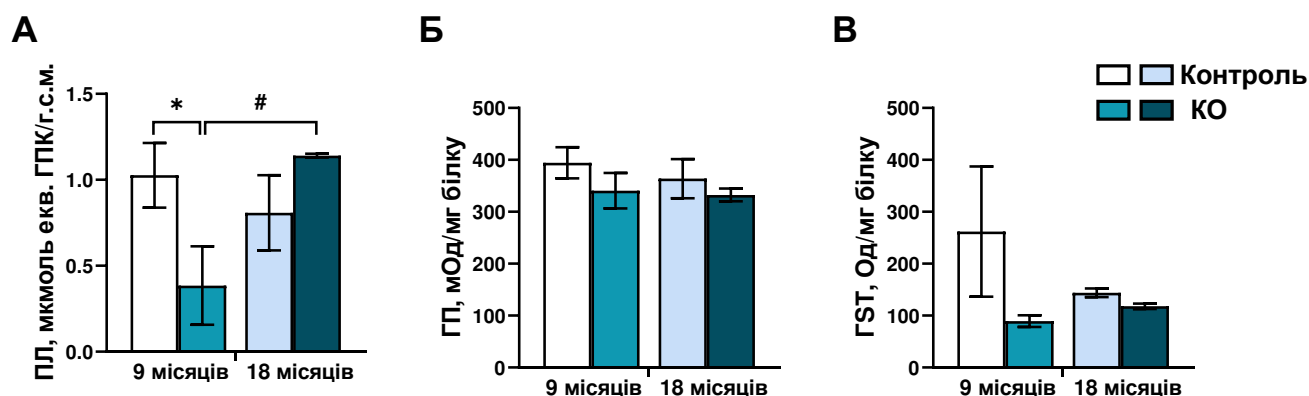


Рис. 8.1. Вміст пероксидів ліпідів, ПЛ (А), активність глутатіонпероксидази, ГП (Б) та глутатіон-S-ансферази, GST (В) у нирках мишей різного віку, яких піддавали впливу калорійного обмеження (КО). *Показник достовірно відрізняється від відповідної контрольної групи, $p \leq 0,05$. #Показник достовірно відрізняється між різними віковими групами в межах одного виду харчування, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$.

Подібно до печінки (табл. 8.1), у нирках мишей з віком спостерігали тенденцію до зниження активності ГП та GST (рис. 8.1 Б, В), що свідчить про виснаження системи антиоксидантного захисту в обох органах.

Табл. 8.2 ілюструє зміну рівня ПЛ та активність глутатіон-залежних ферментів у корі головного мозку дослідних тварин. Як було виявлено в результаті обрахунків статистичного аналізу, ці параметри не мали статистичної відмінності між контрольною та дослідною групою, а також між тваринами різного віку. При цьому рівень ПЛ у контрольній групі мишей середнього віку був удвічі вищим, ніж при КО.

Таблиця 8.2.

Вплив калорійного обмеження (КО) на параметри оксидативного стресу кори головного мозку мишей різного віку.

Показник	Миші середнього віку, 9 міс.		Миші старшого віку, 18 міс.	
	Контроль	КО	Контроль	КО
ПЛ, нмоль екв.ГПК/г.с.м.	529±101	241±123	324±75	328±57
ГП, мОд/мг білку	177±16	185±15	193±16	201±12
GST, мОд/мг білку	652±58	734±122	646±114	722±85

Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$.

Як видно з табл. 8.2, у корі головного мозку з віком спостерігали тенденцію до збільшення активності антиоксидантного ферменту ГП. Це забезпечило нижчий рівень ПЛ у тварин старшого віку, ніж у дев'ятимісячних. Отже, порівняно з печінкою та нирками, кора головного мозку більш захищена від дії АФК завдяки активації системи антиоксидантного захисту. Печінка була більш вразливою до процесів старіння, що підтверджується вищою активністю Г6ФДГ та тенденцією до зниження активності інших антиоксидантних ферментів на тлі вищого рівня ПЛ (табл. 8.1).

Загалом наші результати свідчать про те, що у мишей середнього віку, які перебували на КО, інтенсивність ОС була меншою, ніж у мишей контрольної групи. Завдяки КО у тварин зменшилась кількість пошкоджень, які виникли внаслідок дії АФК, завдяки чому не було потреби в посиленні активності антиоксидантних ферментів. Подібні результати були отримані раніше у мишей, які перебували на режимі харчування ГЧД. Вони демонстрували нижчу інтенсивність ОС без активації антиоксидантного захисту [28]. Не виключено, що КО сприяла загальному зниженню генерації АФК, тому не було необхідності збільшувати потенціал відповідних систем захисту. Раніше було показано зниження утворення АФК без активації або навіть зниження активності антиоксидантних ферментів у різних тканинах мишей у відповідь на обмеження доступу до їжі [288].

8.2. Вплив калорійного обмеження на рівень субстратів гліколізу та активність гліколітичних ферментів

Декілька досліджень показали, що КО може позитивно впливати на метаболізм окремих органів та організму загалом [33, 289]. Зокрема, КО може покращувати утилізацію глюкози, та зменшувати інтенсивність ОС у мозку та печінці [33, 35, 290]. Наше дослідження неповністю відповідає попереднім. Після застосування КО рівень вільної глюкози у плазмі крові обох вікових груп був більшим. Проте, лише у тварин середнього віку було виявлено достовірну різницю, рівень цього показника був у два з половиною рази вищим, ніж у відповідної контрольної групи (рис. 8.2 А). Відповідно до Ayala et al. (2010), миші, в плазмі крові яких рівень глюкози перевищує 10 ммоль/л, мають гіперглікемію [291]. Отже, у нашому випадку, гіперглікемічними були тварини після КО, а також тварини старшого віку контрольної групи. У своєму огляді Regan et al. (2020) зазначають, що КО, окрім подовження тривалості життя, може значно послаблювати інсулінову сигналізацію [292].

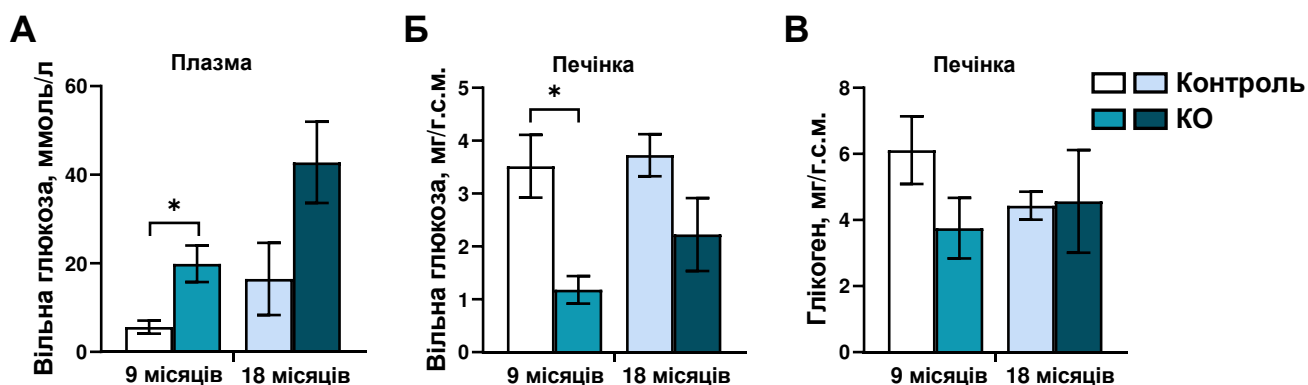


Рис. 8.2. Вміст вільної глюкози у плазмі крові (А) та печінці (Б), а також вміст глікогену в печінці (В) мишей різного віку, яких піддавали калорійному обмеженню (КО). *Показник достовірно відрізняється від відповідної контрольної групи, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$.

У печінці тварин після застосування КО, навпаки, рівень глюкози був нижчим, але статистично вагома відмінність була виявлена також лише у мишей середнього віку. Рівень глюкози у цих мишей був у три рази нижчим, ніж у контрольній групі (рис. 8.2 Б). Миші середнього віку, які перебували на КО, мали нижчий вміст глікогену в печінці, але статистичної відмінності не було виявлено (рис. 8.2 В). У мишей старшого віку цей показник був у межах контрольних значень. Також ми виявили, що рівень глікогену в печінці контрольних тварин з віком мав тенденцію до зниження.

В результаті того, що вміст субстратів гліколізу в печінці мишей після КО був нижчим, у них також спостерігали слабшу інтенсивність перебігу самого гліколізу. Було виявлено, що у мишей середнього віку активність ФФК та ПК був нижчим від контрольної групи на 59% та 69% відповідно (рис. 8.3 А та Б відповідно). У мишей старшого віку спостерігали тенденцію до зниження активності ФФК після застосування КО. Цей показник був на 77% вищим у вісімнадцятимісячних тварин, ніж у мишей середнього віку після КО (рис. 8.3 А).

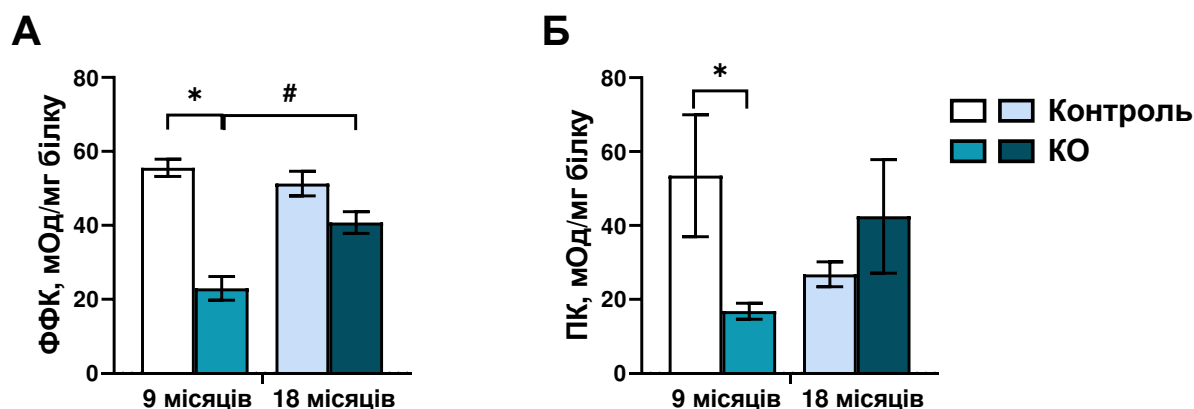


Рис. 8.3. Активність фосфогруктокінази (ФФК) та піруваткінази (ПК) у печінці мишей різного віку, яких піддавали калорійному обмеженню (КО). *Показник достовірно відрізняється від відповідної контрольної групи, $p \leq 0,05$. #Показник достовірно відрізняється між різними віковими групами в межах одного виду харчування, $p \leq 0,05$. Дані представлені як $M \pm SEM$, $n=3-6$.

Нижча активність гліколітичних ферментів, зокрема ФФК, може бути пояснена вищою активністю АМРК у печінці мишей, до яких застосовували КО. Як відомо, АМРК інгибує mTOR, який активує гліколіз [284]. Вищий рівень глюкози в крові мишей після КО узгоджується із нижчою активністю ФФК в печінці. Це свідчить про послаблення інсулінової сигналізації у цих тварин [170].

З одного боку, глюкоза може транспортуватися з гепатоцитів у кров, про що свідчить нижчий рівень глюкози в печінці (рис. 8.2 Б), а з іншого боку, Г6Ф, який утворюється шляхом глюконеогенезу, може бути задіяний у ПФШ. Це підтверджується вищою активністю Г6ФДГ у печінці мишей середнього віку на КО (табл. 8.1). Також ми спостерігали тенденцію до зниження активності ПК у гепатоцитах мишей з віком.

Відомо, що зниження активності ФФК і ПК дозволяє перенаправляти Г6Ф на ПФШ, який є джерелом НАДФН. Натомість, останній є коферментом для ферментів, пов'язаних з антиоксидантним захистом [170]. У нашому дослідженні

активність Г6ФДГ була вищою у мишей старшого віку (табл. 8.1), що підтверджує підсилення інтенсивності ПФШ.

Отже, було виявлено, що КО має ефективніший вплив за умов його застосування мишам середнього віку. На рис. 8.4 синім кольором представлено потенційний механізм дії КО на мишей дев'ятимісячного (середнього) віку. Під час дослідження було виявлено, що КО може підвищувати активність AMPK. Остання інгибує mTOR, що запобігає інтенсифікації гліколізу. Також AMPK активує Nrf2, який підвищує активність антиоксидантних ферментів, чим забезпечує детоксикацію АФК. Підвищення активності Г6ФДГ за умов КО сприяє залученню глюкози до ПФШ. Це може бути причиною нижчого рівня глюкози та глікогену в мишей середнього віку, до яких застосовували КО.

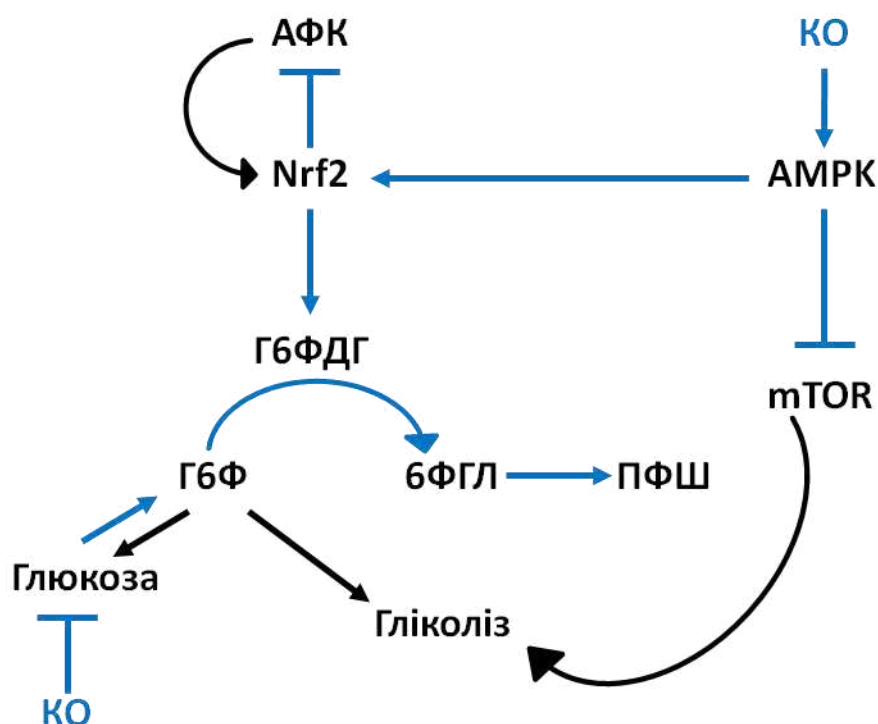


Рис. 8.4. Потенційний механізм впливу калорійного обмеження (КО) тривалістю 6 міс. на метаболізм мишей середнього віку. 6ФГЛ – 6-фосфоглюколактон; АФК – активні форми кисню; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; ПФШ – пентозофосфатний шлях;

AMPK – АМФ-залежна протеїнкіназа; mTOR – механістична мішень для рапаміцину; Nrf2 – ядерний фактор еритроїдного походження 2.

ВИСНОВКИ

1. Додавання маргарину до харчування мишей знижує інтенсивність споживання їжі та води, але не зменшує кількості спожитих калорій, при цьому організм самців та самок мишей по-різному реагує на таке харчування.

2. Споживання маргарину *ad libitum* протягом чотирьох місяців викликає слабкі запальні процеси у самців, сприяє розвитку оксидативного стресу в жировій тканині та корі головного мозку, водночас знижуючи його інтенсивність у печінці, нирках та серці. У самок маргарин збільшує приріст маси тіла, інтенсивність оксидативного стресу та збільшує активність гліколітичних ферментів.

3. Додавання відвару ромашки до харчування з маргарином запобігає інтенсифікації оксидативного стресу в самців, але не проявляє значного захисного ефекту для серця. У самок відвар ромашки знижує рівень глюкози в крові, активує антиоксидантний захист у печінці, нирках та корі головного мозку.

4. Голодування через день на фоні споживання маргарину негативно впливає на самців мишей, викликаючи ознаки метаболічного синдрому, збільшення приросту маси тіла, запалення та інтенсифікацію оксидативного стресу в жировій тканині та серці, а також підвищує рівень глюкози в крові та знижує рівень глікогену в печінці.

5. Споживання маргарину через день протягом чотирьох місяців позитивно впливає на самок. Такий режим харчування знижує приріст маси тіла та інтенсивність оксидативного стресу в печінці, збільшує активність антиоксидантних ферментів у нирках та серці, але не запобігає розвитку оксидативного стресу в корі головного мозку.

6. Старіння не посилює оксидативний стрес та не знижує інтенсивність гліколізу в групі мишей старшого віку порівняно з групою середнього віку. Калорійне обмеження на 30% демонструє захисну дію в печінці, нирках та корі головного мозку тільки у мишей середнього віку, що вказує на вікову залежність ефективності цієї стратегії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Bayliak, M. (2020). Metabolic syndrome, obesity, and Drosophila. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 7(4), 7-18. <https://doi.org/10.15330/jpnu.7.4.7-18>.
- [2] Hurza, V., Vatashchuk, M., & Bayliak, M. (2021). Pathogenesis and Biomarkers of Metabolic Syndrome. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 8(4), 7-19. <https://doi.org/10.15330/jpnu.8.4.7-19>.
- [3] Samson, S. L., & Garber, A. J. (2014). Metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 43(1), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.009>.
- [4] Santos-Marcos, J. A., Perez-Jimenez, F., & Camargo, A. (2019). The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*, 70, 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.017>.
- [5] Calder, P. C. (2015). Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 39, 18S-32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>.
- [6] Valenzuela, C. A., Baker, E. J., Miles, E. A., & Calder, P. C. (2019). Eighteen-carbon trans fatty acids and inflammation in the context of atherosclerosis. *Progress in lipid research*, 76, 101009. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101009>.
- [7] Emken, E. A. (1984). Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. *Annual review of nutrition*, 4(1), 339-376. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.04.070184.002011>.
- [8] Satta, V., Scherma, M., Piscitelli, F., Usai, P., Castelli, M. P., Bisogno, T., et al. (2018). Limited access to a high fat diet alters endocannabinoid tone in female rats. *Frontiers in neuroscience*, 12, 40. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00040>.
- [9] Zhu, W., Niu, X., Wang, M., Li, Z., Jiang, H. K., Li, C., et al. (2019). Endoplasmic reticulum stress may be involved in insulin resistance and lipid metabolism disorders of the white adipose tissues induced by high-fat diet containing

industrial trans-fatty acids. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 12, 1625-1638. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S218336>.

[10] Oteng, A. B., Loregger, A., van Weeghel, M., Zelcer, N., & Kersten, S. (2019). Industrial trans fatty acids stimulate SREBP2-mediated cholesterologenesis and promote non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular nutrition & food research*, 63(19), 1900385. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900385>.

[11] Monguchi, T., Hara, T., Hasokawa, M., Nakajima, H., Mori, K., Toh, R., et al. (2017). Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. *Journal of cardiology*, 70(2), 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.12.012>.

[12] Ganguly, R., & Pierce, G. N. (2015). The toxicity of dietary trans fats. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.004>.

[13] Stevenson, R. J., Francis, H. M., Attuquayefio, T., Gupta, D., Yeomans, M. R., Oaten, M. J., & Davidson, T. (2020). Hippocampal-dependent appetitive control is impaired by experimental exposure to a Western-style diet. *Royal Society open science*, 7(2), 191338. <https://doi.org/10.1098/rsos.191338>.

[14] Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., & Srivastava, M. K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 82. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79103>.

[15] Bayliak, M. M., Dmytriv, T. R., Melnychuk, A. V., Strilets, N. V., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2021). Chamomile as a potential remedy for obesity and metabolic syndrome. *EXCLI journal*, 20, 1261-1286. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4013>.

[16] El Mihyaoui, A., Esteves da Silva, J. C., Charfi, S., Candela Castillo, M. E., Lamarti, A., & Arnao, M. B. (2022). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): a review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. *Life*, 12(4), 479. <https://doi.org/10.3390/life12040479>.

[17] McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological*

Evaluation of Natural Product Derivatives, 20(7), 519-530.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1900>.

[18] Miguel, F. G., Cavaleiro, A. H., Spinola, N. F., Ribeiro, D. L., Barcelos, G. R. M., Antunes, L. M. G., et al. (2015). Validation of a RP-HPLC-DAD method for chamomile (*Matricaria recutita*) preparations and assessment of the marker, apigenin-7-glucoside, safety and anti-inflammatory effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 828437. <https://doi.org/10.1155/2015/828437>.

[19] Yang, M., Jiang, Z. H., Li, C. G., Zhu, Y. J., Li, Z., Tang, Y. Z., & Ni, C. L. (2018). Apigenin prevents metabolic syndrome in high-fructose diet-fed mice by Keap1-Nrf2 pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 105, 1283-1290. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.108>.

[20] Lv, Y., Gao, X., Luo, Y., Fan, W., Shen, T., Ding, C., et al. (2019). Apigenin ameliorates HFD-induced NAFLD through regulation of the XO/NLRP3 pathways. *The Journal of nutritional biochemistry*, 71, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.015>.

[21] Qiao, Y., Zhang, Z., Zhai, Y., Yan, X., Zhou, W., Liu, H., et al. (2022). Apigenin alleviates obesity-associated metabolic syndrome by regulating the composition of the gut microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 12, 805827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.805827>.

[22] Jabri, M. A., Sakly, M., Marzouki, L., & Sebai, H. (2017). Chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract inhibits in vitro intestinal glucose absorption and attenuates high fat diet-induced lipotoxicity and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 87, 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.043>.

[23] Jabri, M. A., Rtibi, K., & Sebai, H. (2022). Chamomile decoction mitigates high fat diet-induced anxiety-like behavior, neuroinflammation and cerebral ROS overload. *Nutritional Neuroscience*, 25(7), 1350-1361. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1859727>.

[24] Most, J., & Redman, L. M. (2020). Impact of calorie restriction on energy metabolism in humans. *Experimental gerontology*, 133, 110875. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110875>.

[25] Kanikowska, D., Kanikowska, A., Swora-Cwynar, E., Grzymisławski, M., Sato, M., Bręborowicz, A., et al. (2021). Moderate caloric restriction partially improved oxidative stress markers in obese humans. *Antioxidants*, *10*(7), 1018. <https://doi.org/10.3390/antiox10071018>.

[26] Mladenovic Djordjevic, A., Loncarevic-Vasiljkovic, N., & Gonos, E. S. (2021). Dietary restriction and oxidative stress: friends or enemies? *Antioxidants & Redox Signaling*, *34*(5), 421-438. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7959>.

[27] Sorochnyńska, O. M., Bayliak, M. M., Gospodaryov, D. V., Vasylyk, Y. V., Kuzniak, O. V., Pankiv, T. M., et al. (2019). Every-other-day feeding decreases glycolytic and mitochondrial energy-producing potentials in the brain and liver of young mice. *Frontiers in Physiology*, *10*, 1432. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01432>.

[28] Kuzniak, O. V., Sorochnyńska, O. M., Bayliak, M. M., Klonovskyi, A. Y., Vasylyk, Y. V., Semchyshyn, H. M., et al. (2022). Feeding to satiation induces mild oxidative/carbonyl stress in the brain of young mice. *EXCLI journal*, *21*, 77-92. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4347>.

[29] Park, J., Seo, Y. G., Paek, Y. J., Song, H. J., Park, K. H., & Noh, H. M. (2020). Effect of alternate-day fasting on obesity and cardiometabolic risk: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism*, *111*, 154336. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154336>.

[30] Cai, H., Qin, Y. L., Shi, Z. Y., Chen, J. H., Zeng, M. J., Zhou, W., et al. (2019). Effects of alternate-day fasting on body weight and dyslipidaemia in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled trial. *BMC gastroenterology*, *19*, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1132-8>.

[31] Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* *328*(5976), 321-326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>.

[32] L'ópez-Lluch, G., & Navas, P. (2016). Calorie restriction as an intervention in ageing. *The Journal of physiology*, *594*(8), 2043-2060. <https://doi.org/10.1113/JP270543>.

[33] Walsh, M. E., Shi, Y., & Van Remmen, H. (2014). The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.037>.

[34] Caristia, S., De Vito, M., Sarro, A., Leone, A., Pecere, A., Zibetti, A., et al. (2020). Is caloric restriction associated with better healthy aging outcomes? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, 12(8), 2290. <https://doi.org/10.3390/nu12082290>.

[35] Wang, L., Derous, D., Huang, X., Mitchell, S.E., Douglas, A., Lusseau, D., et al. (2023). The effects of graded levels of calorie restriction: XIX. Impact of graded calorie restriction on protein expression in the liver. *The Journals of Gerontology: Series A*, 78(7), 1125-1134. <https://doi.org/10.1093/gerona/glad017>.

[36] Ori, A., Toyama, B. H., Harris, M. S., Bock, T., Iskar, M., Bork, P., et al. (2015). Integrated transcriptome and proteome analyses reveal organ-specific proteome deterioration in old rats. *Cell systems*, 1(3), 224-237. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.012>.

[37] Paneni, F., Diaz Cañestro, C., Libby, P., Lüscher, T. F., & Camici, G. G. (2017). The aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(15), 1952-1967. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.064>.

[38] Garaschuk, O., Semchyshyn, H. M., & Lushchak, V. I. (2018). Healthy brain aging: interplay between reactive species, inflammation and energy supply. *Ageing research reviews*, 43, 26-45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.02.003>.

[39] Colantoni, A., Idilman, R., de Maria, N., Duffner, L. A., Van Thiel, D.H., Witte, P. L., & Kovacs, E. J. (2001). Evidence of oxidative injury during aging of the liver in a mouse model. *Journal of the American Aging Association*, 24, 51-57. <https://doi.org/10.1007/s11357-001-0007-3>.

[40] Dybiec, J., Szlagor, M., Młynarska, E., Rysz, J., & Franczyk, B. (2022). Structural and functional changes in aging kidneys. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15435. <https://doi.org/10.3390/ijms232315435>.

[41] Vatashchuk, M. V., Bayliak, M. M., Hurza, V. V., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2022). Metabolic syndrome: lessons from rodent and drosophila models. *BioMed Research International*, 2022(1), 5850507. <https://doi.org/10.1155/2022/5850507>.

[42] Belhayara, M. I., Mellouk, Z., Hamdaoui, M. S., Bachaoui, M., Kheroua, O., & Malaisse, W. J. (2020). The metabolic syndrome: emerging novel insights regarding the relationship between the homeostasis model assessment of insulin resistance and other key predictive markers in young adults of Western Algeria. *Nutrients*, 12(3), 727. <https://doi.org/10.3390/nu12030727>.

[43] Saklayen, M. G. (2018) The global epidemic of the metabolic syndrome. *Current hypertension reports*, 20(2), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>.

[44] Zhu L., Yang W. J., Spence C. B., Bhimla A., & Ma G. X. (2021). Lean yet unhealthy: Asian American adults had higher risks for metabolic syndrome than Non-Hispanic White adults with the same body mass index: evidence from NHANES 2011-2016. *Healthcare*, 9(11), 1518. <https://doi.org/10.3390/healthcare9111518>.

[45] McCracken E., Monaghan M., & Sreenivasan S. (2018) Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology*, 36(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>.

[46] Son, D. H., Ha, H. S., Park, H. M., Kim, H. Y., & Lee, Y. J. (2022). New markers in metabolic syndrome. *Advances in Clinical Chemistry*, 110, 37-71. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2022.06.002>.

[47] Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic syndrome: updates on pathophysiology and management in 2021. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 786. <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>.

[48] Bovolini, A., Garcia, J., Andrade, M. A., & Duarte, J. A. (2021). Metabolic syndrome pathophysiology and predisposing factors. *International journal of sports medicine*, 42(03), 199-214. <https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>.

[49] Vrdoljak, J., Kumric, M., Vilovic, M., Martinovic, D., Rogosic, V., Borovac, J. A., et al. (2022) Can Fasting Curb the Metabolic Syndrome Epidemic? *Nutrients*, 14(3), 456. <https://doi.org/10.3390/nu14030456>.

[50] Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of medical science*, 9(2), 191-200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>.

[51] Flak, J. N., & Myers Jr, M. G. (2016). Minireview: CNS mechanisms of leptin action. *Molecular Endocrinology*, 30(1), 3-12. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1232>.

[52] Padmalayam, I., & Suto, M. (2013). Role of adiponectin in the metabolic syndrome: current perspectives on its modulation as a treatment strategy. *Current pharmaceutical design*, 19(32), 5755-5763. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990360>.

[53] Blanco, C. L., McGill-Vargas, L. L., Gastaldelli, A., Seidner, S. R., McCurnin, D. C., Leland, M. M., et al. (2015). Peripheral insulin resistance and impaired insulin signaling contribute to abnormal glucose metabolism in preterm baboons. *Endocrinology*, 156(3), 813-823. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1757>.

[54] Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1), a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>.

[55] Masenga, S. K., Kabwe, L. S., Chakulya, M., & Kirabo A. (2023). Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7898. <https://doi.org/10.3390/ijms24097898>.

[56] Garg, M. K., Dutta, M. K., & Brar, K. S. (2012). Inflammatory markers in metabolic syndrome. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 32, 131-137. <https://doi.org/10.1007/s13410-012-0080-4>.

[57] Abdel-Moneim, A., Mahmoud, B., Sultan, E. A., & Mahmoud, R. (2020). Association of erythrocytes indices and interleukin-1 beta with metabolic syndrome components. *University of Toronto Medical Journal*, 97(1), 6-13.

[58] Maedler, K., Dharmadhikari, G., Schumann, D. M., & Størling, J. (2009). Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert opinion on biological therapy*, 9(9), 1177-1188. <https://doi.org/10.1517/14712590903136688>.

[59] Mohammadi, M., Gozashti, M. H., Aghadavood, M., Mehdizadeh, M. R., & Hayatbakhsh, M. M. (2017). Clinical significance of serum IL-6 and TNF- α levels in patients with metabolic syndrome. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 6(1), 74-79. PMCID: PMC5643447. PMID: [29090232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29090232/).

[60] Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., & Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 389(6651), 610-614. <https://doi.org/10.1038/39335>.

[61] Volanakis, J. E. (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular immunology*, 38(2-3), 189-197. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00042-6).

[62] Teoh, H., Quan, A., Lovren, F., Wang, G., Targari, S., Szmitko, P. E., et al. (2008). Impaired endothelial function in C-reactive protein overexpressing mice. *Atherosclerosis*, 201(2), 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.034>.

[63] Fröhlich, M., Imhof, A., Berg, G., Hutchinson, W. L., Pepys, M. B., Boeing, H. E. I. N., et al. (2000). Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes care*, 23(12), 1835-1839. <https://doi.org/10.2337/diacare.23.12.1835>.

[64] Čolak, E., & Pap, D. (2021). The Role of Oxidative Stress in the Development of Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders. *Journal of Medical Biochemistry*, 40(1), 1-9. <https://doi.org/10.5937/jomb0-24652>.

[65] Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI journal*, 20, 956-967. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>.

[66] Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. *Canadian journal of cardiology*, 36(5), 659-670. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>.

[67] DeVallance, E., Li, Y., Jurczak, M. J., Cifuentes-Pagano, E., & Pagano, P. J. (2019). The role of NADPH oxidases in the etiology of obesity and metabolic syndrome: contribution of individual isoforms and cell biology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 31(10), 687-709. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7674>.

[68] Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.

[69] Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox biology*, 37, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.

[70] Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A., Cindric, M., Mouthuy, P. A., & Zarkovic, N. (2019). Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*, 8(8), 793. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>.

[71] Baba, S. P., & Bhatnagar, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. *Current opinion in toxicology*, 7, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>.

[72] Tomin, T., Schittmayer, M., Honeder, S., Heininger, C., & Birner-Gruenberger, R. (2019). Irreversible oxidative post-translational modifications in heart disease. *Expert review of proteomics*, 16(8), 681-693. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1645602>.

[73] Zhang, H., Xu, R., & Wang, Z. (2021). Contribution of Oxidative Stress to HIF-1-Mediated Profibrotic Changes during the Kidney Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 6114132. <https://doi.org/10.1155/2021/6114132>.

[74] Rizwan, S., ReddySekhar, P., & MalikAsrar, B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*, 20(7). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.

[75] Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*, 13(10), 423-444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>.

[76] Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>.

[77] Bekkouche, L., Bouchenak, M., Malaisse, W. J., & Yahia, D. A. (2014). The Mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in Algerian metabolic syndrome patients. *Hormone and metabolic research*, 46(04), 274-282. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363657>.

[78] Sakhaei, F., Keshvari, M., Asgary, S., Salehizadeh, L., Rastqar, A., & Samsam-Shariat, S. Z. (2020). Enzymatic antioxidant system and endothelial function in patients with metabolic syndrome. *ARYA atherosclerosis*, 16(2), 94-101. <https://doi.org/10.22122/arya.v16i2.1813>.

[79] Dziegielewska-Gęsiak, S., Wyszomirska, K., Fatyga, E., Wysocka, E., & Muc-Wierzoń, M. (2021). The role of oxidant-antioxidant markers and resistin in metabolic syndrome elderly individuals. *Science Progress*, 104(2), 00368504211006510. <https://doi.org/10.1177/0036850421100651>.

[80] Zhu, J., Wu, F., Yue, S., Chen, C., Song, S., Wang, H., & Zhao, M. (2019). Functions of reactive oxygen species in apoptosis and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *FEMS Microbiology Letters*, 366(23), fnaa015. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa015>.

[81] Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.

[82] Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., et al. (2014). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 378-400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>.

[83] Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., et al. (2020). NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic

potential. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 227.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>.

[84] Arnold, P. K., & Finley, L. W. (2023). Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 299(2), 102838.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102838>.

[85] Srikanth, K. K., & Orrick, J. A. (2022). Biochemistry, polyol or sorbitol pathways. PMID: 35015406.

[86] Chaudhuri, J., Bains, Y., Guha, S., Kahn, A., Hall, D., Bose, N., et al. (2018). The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell metabolism*, 28(3), 337-352.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.014>.

[87] Jubaidi, F. F., Zainalabidin, S., Taib, I. S., Abdul Hamid, Z., Mohamad Anuar, N. N., Jalil, J., et al. (2022). The role of PKC-MAPK signalling pathways in the development of hyperglycemia-induced cardiovascular complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8582. <https://doi.org/10.3390/ijms23158582>.

[88] Andersen, A. J. C., & Williams, P. N. (2016). *Margarine*. Elsevier.

[89] Silva, T. J., Barrera-Arellano, D., & Ribeiro, A. P. B. (2021). Margarines: Historical approach, technological aspects, nutritional profile, and global trends. *Food Research International*, 147, 110486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110486>

[90] Kadhum, A. A. H., & Shamma, M. N. (2017). Edible lipids modification processes: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(1), 48-58.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.848834>.

[91] Oteng, A. B., & Kersten, S. (2020). Mechanisms of action of trans fatty acids. *Advances in Nutrition*, 11(3), 697-708. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz125>.

[92] Chardigny, J. M., Destailats, F., Malpuech-Brugère, C., Moulin, J., Bauman, D. E., Lock, A. L., et al. (2008). Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *The American journal of clinical nutrition*, 87(3), 558-566.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.558>.

[93] Mohammadi, F., Dikpati, A., Bertrand, N., & Rudkowska, I. (2023). Encapsulation of conjugated linoleic acid and ruminant trans fatty acids to study the prevention of metabolic syndrome – a review. *Nutrition Reviews*, 82(2), 262-276. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuad047>.

[94] Pipoyan, D., Stepanyan, S., Stepanyan, S., Beglaryan, M., Costantini, L., Molinari, R., & Merendino, N. (2021). The effect of trans fatty acids on human health: regulation and consumption patterns. *Foods*, 10(10), 2452. <https://doi.org/10.3390/foods10102452>.

[95] Laake, I., Pedersen, J. I., Selmer, R., Kirkhus, B., Lindman, A. S., Tverdal, A., & Veierød, M. B. (2012). A prospective study of intake of trans-fatty acids from ruminant fat, partially hydrogenated vegetable oils, and marine oils and mortality from CVD. *British Journal of Nutrition*, 108(4), 743-754. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005897>.

[96] Calder, P. C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., et al. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, 106(S3), S1-S78. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005460>.

[97] Jacome-Sosa, M. M., Borthwick, F., Mangat, R., Uwiera, R., Reaney, M. J., Shen, J., et al. (2014). Diets enriched in trans-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(7), 692-701. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.02.011>.

[98] Zhao, X., Shen, C., Zhu, H., Wang, C., Liu, X., Sun, X., et al. (2016). Trans-fatty acids aggravate obesity, insulin resistance and hepatic steatosis in C57BL/6 mice, possibly by suppressing the IRS1 dependent pathway. *Molecules*, 21(6), 705. <https://doi.org/10.3390/molecules21060705>.

[99] Hua, Y., Fan, R., Zhao, L., Tong, C., Qian, X., Zhang, M., et al. (2020). Trans-fatty acids alter the gut microbiota in high-fat-diet-induced obese rats. *British Journal of Nutrition*, 124(12), 1251-1263. <https://doi.org/10.1017/S0007114520001841>.

[100] Chajès, V., Biessy, C., Ferrari, P., Romieu, I., Freisling, H., Huybrechts, I., et al. (2015). Plasma elaidic acid level as biomarker of industrial trans

fatty acids and risk of weight change: report from the EPIC study. *PloS one*, 10(2), e0118206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118206>.

[101] Ge, Y., Liu, W., Tao, H., Zhang, Y., Liu, L., Liu, Z., et al. (2019). Effect of industrial trans-fatty acids-enriched diet on gut microbiota of C57BL/6 mice. *European journal of nutrition*, 58, 2625-2638. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1810-2>.

[102] Guggisberg, D., Burton-Pimentel, K. J., Walther, B., Badertscher, R., Blaser, C., Portmann, R., et al. (2022). Molecular effects of the consumption of margarine and butter varying in trans fat composition: a parallel human intervention study. *Lipids in health and disease*, 21(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01675-1>.

[103] Hosseinpour-Niazi, S., Mirmiran, P., Hosseini-Esfahani, F., & Azizi, F. (2016). Is the metabolic syndrome inversely associates with butter, non-hydrogenated-and hydrogenated-vegetable oils consumption: Tehran lipid and glucose study. *Diabetes research and clinical practice*, 112, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.11.008>.

[104] Abd-Rabo, F. H., Elshaghabee, F. M., Sakr, S. S., El-Arabi, N. I., & El-Maaty, S. A. (2020). Different dietary fats impact on biochemical and histological parameters and gene expression of lipogenesis-related genes in rats. *Food bioscience*, 34, 100540. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100540>.

[105] Wang, N., Guo, J., Liu, F., Wang, M., Li, C., Jia, L., et al. (2017). Depot-specific inflammation with decreased expression of ATM2 in white adipose tissues induced by high-margarine/lard intake. *PLoS One*, 12(11), e0188007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188007>.

[106] Bahceci, M., Tuzcu, A., Akkus, M., Yaldiz, M., & Ozbay, A. (1999). The effect of high-fat diet on the development of obesity and serum leptin level in rats. *Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 4, 128-132. <https://doi.org/10.1007/BF03339728>.

[107] Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella, D., Fitó, M., Ros, E., & Predimed Investigators. (2015). Benefits of the Mediterranean

diet: insights from the PREDIMED study. *Progress in cardiovascular diseases*, 58(1), 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2015.04.003>.

[108] Sohrab, G., Ebrahimof, S., Hosseinpour-Niazi, S., Yuzbashian, E., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2018). Association of dietary intakes of total polyphenol and its subclasses with the risk of metabolic syndrome: Tehran lipid and glucose study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(6), 274-281. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0140>.

[109] Finicelli, M., Squillaro, T., Di Cristo, F., Di Salle, A., Melone, M. A. B., Galderisi, U., & Peluso, G. (2019). Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5807-5826. <https://doi.org/10.1002/jcp.27506>.

[110] Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., et al. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1397>.

[111] Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

[112] Macready, A. L., Kennedy, O. B., Ellis, J. A., Williams, C. M., Spencer, J. P., & Butler, L. T. (2009). Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes & nutrition*, 4, 227-242. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0135-4>.

[113] Wang, L., Lee, I. M., Zhang, S. M., Blumberg, J. B., Buring, J. E., & Sesso, H. D. (2009). Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *The American journal of clinical nutrition*, 89(3), 905-912. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26913>.

[114] Cassidy, A., O'Reilly, É. J., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J. P., et al. (2011). Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *The American journal of clinical nutrition*, 93(2), 338-347. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.006783>.

[115] Gouveia, H. J., Urquiza-Martínez, M. V., Manhães-de-Castro, R., Costa-de-Santana, B. J., Villarreal, J. P., Mercado-Camargo, R., et al. (2022). Effects of the treatment with flavonoids on metabolic syndrome components in humans: A systematic review focusing on mechanisms of action. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8344. <https://doi.org/10.3390/ijms23158344>.

[116] Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kürbitz, C., Settler, U., Plachta-Danielzik, S., et al. (2009). Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British journal of nutrition*, 102(7), 1065-1074. <https://doi.org/10.1017/S0007114509359127>.

[117] Yari, Z., Movahedian, M., Imani, H., Alavian, S. M., Hedayati, M., & Hekmatdoost, A. (2020). The effect of hesperidin supplementation on metabolic profiles in patients with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *European journal of nutrition*, 59, 2569-2577. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02105-2>.

[118] Hurza, V. , Vatachchuk, M. , & Bayliak, M. (2023). A Margarine-Supplemented Diet Alone and in Combination with Chamomile Decoction Decreases Food Intake but Has a Mild Effect on Body Mass in Mice. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University. Biology*, 10, 45-55. <https://doi.org/10.15330/jpnubio.10.45-55>.

[119] Ma, D., He, J., & He, D. (2020). Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B pathway in in-vitro and in-vivo models. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 84(2), 402-410. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1682511>.

[120] Akram, W., Tagde, P., Ahmed, S., Arora, S., Emran, T. B., Babalghith, A. O., et al. (2023). Guaiazulene and related compounds: A review of current perspective on biomedical applications. *Life Sciences*, 316, 121389. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121389>.

- [121] Fang, D., Wang, H., Li, M., & Wei, W. (2019). α -bisabolol enhances radiotherapy-induced apoptosis in endometrial cancer cells by reducing the effect of XIAP on inhibiting caspase-3. *Bioscience Reports*, 39(6), BSR20190696. <https://doi.org/10.1042/BSR20190696>.
- [122] Qadir, M., Maurya, A. K., Agnihotri, V. K., & Shah, W. A. (2021). Volatile composition, antibacterial and antioxidant activities of *artemisia tournefortiana* Reichb. from Kashmir, India. *Natural product research*, 35(1), 152-156. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1613990>.
- [123] Qin, Y. G., Yang, Z. K., Song, D. L., Wang, Q., Gu, S. H., Li, W. H., et al (2020). Bioactivities of synthetic salicylate-substituted carboxyl (E)- β -Farnesene derivatives as ecofriendly agrochemicals and their binding mechanism with potential targets in aphid olfactory system. *Pest management science*, 76(7), 2465-2472. <https://doi.org/10.1002/ps.5787>.
- [124] Molnar, M., Mendešević, N., Šubarić, D., Banjari, I., & Jokić, S. (2017). Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions. *Chemistry Central Journal*, 11, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0308-y>.
- [125] Akram, W., Ahmed, S., Rihan, M., Arora, S., Khalid, M., Ahmad, S., et al. (2023). An updated comprehensive review of the therapeutic properties of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *International Journal of Food Properties*, 27(1), 133-164. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2293661>.
- [126] Telange, D. R., Patil, A. T., Pethe, A. M., Fegade, H., Anand, S., & Dave, V. S. (2017). Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108, 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.009>.
- [127] Guan, F., Wang, Q., Bao, Y., & Chao, Y. (2021). Anti-rheumatic effect of quercetin and recent developments in nano formulation. *RSC advances*, 11(13), 7280-7293. <https://doi.org/10.1039/D0RA08817J>.

- [128] Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K., Ameer, N., Chughtai, F. R. S., & Abid, U. (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: A review. *Polymer Bulletin*, 80(1), 241-262. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04091-8>.
- [129] Ding, L., Jin, D., & Chen, X. (2010). Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR γ transcriptional activity in adipocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(10), 941-947. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.07.009>.
- [130] Guimarães, R., Calhelha, R. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M., Carvalho, A. M., João, M., et al. (2016). Wild Roman chamomile extracts and phenolic compounds: enzymatic assays and molecular modelling studies with VEGFR-2 tyrosine kinase. *Food & function*, 7(1), 79-83. <https://doi.org/10.1039/C5FO00586H>.
- [131] Gendrisch, F., Esser, P. R., Schempp, C. M., & Wölflle, U. (2021). Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation. *Biofactors*, 47(2), 170-180. <https://doi.org/10.1002/biof.1699>.
- [132] Kempuraj, D., Thangavel, R., Kempuraj, D. D., Ahmed, M. E., Selvakumar, G. P., Raikwar, S. P., et al. (2021). Neuroprotective effects of flavone luteolin in neuroinflammation and neurotrauma. *Biofactors*, 47(2), 190-197. <https://doi.org/10.1002/biof.1687>.
- [133] Gao, W., Wang, C., Yu, L., Sheng, T., Wu, Z., Wang, X., et al. (2019). Chlorogenic acid attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice through MAPK/ERK/JNK pathway. *BioMed Research International*, 2019(1), 6769789. <https://doi.org/10.1155/2019/6769789>.
- [134] Bhandarkar, N. S., Brown, L., & Panchal, S. K. (2019). Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. *Nutrition research*, 62, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.002>.
- [135] Malik, J. A., Ahmed, S., Mir, A., Shinde, M., Bender, O., Alshammari, F., et al. (2022). The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine

effectiveness: New opportunities to new challenges. *Journal of infection and Public Health*, 15(2), 228-240. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.12.014>.

[136] Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., & Wąsik, T. J. (2018). Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *BioMed research international*, 2018(1), 7413504. <https://doi.org/10.1155/2018/7413504>.

[137] Feng, X., Yu, W., Li, X., Zhou, F., Zhang, W., Shen, Q., et al. (2017). Apigenin, a modulator of PPAR γ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation. *Biochemical pharmacology*, 136, 136-149. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.014>.

[138] Gentile, D., Fornai, M., Colucci, R., Pellegrini, C., Tirota, E., Benvenuti, L., et al. (2018). The flavonoid compound apigenin prevents colonic inflammation and motor dysfunctions associated with high fat diet-induced obesity. *PLoS One*, 13(4), e0195502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195502>.

[139] Weidner, C., Wowro, S. J., Rousseau, M., Freiwald, A., Kodelja, V., Abdel-Aziz, H., et al. (2013). 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*, 8(11), e80335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080335>.

[140] Najla, O. A., Olfat, A. K., Kholoud, S. R., Enas, N. D., & Hanan, S. A. (2012). Hypoglycemic and biochemical effects of *Matricaria chamomilla* leave extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Health Sci*, 2(5), 43-48. <https://doi.org/10.5923/j.health.20120205.01>.

[141] Dubois, V., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P., & Staels, B. (2017). Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, 127(4), 1202-1214. <https://doi.org/10.1172/JCI88894>.

[142] Wang, W., Yue, R. F., Jin, Z., He, L. M., Shen, R., Du, D., & Tang, Y. Z. (2020). Efficiency comparison of apigenin-7-O-glucoside and trolox in

antioxidative stress and anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(11), 1645-1656. <https://doi.org/10.1111/jphp.13347>.

[143] Slocum, S. L., Skoko, J. J., Wakabayashi, N., Aja, S., Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Chartoumpekis, D. V. (2016). Keap1/Nrf2 pathway activation leads to a repressed hepatic gluconeogenic and lipogenic program in mice on a high-fat diet. *Archives of biochemistry and biophysics*, 591, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.040>.

[144] Klotz, L. O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., & Monsalve, M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox biology*, 6, 51-72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>.

[145] Lu J., Meng Z., Cheng B., Liu M., Tao S., Guan S. (2019). Apigenin reduces the excessive accumulation of lipids induced by palmitic acid via the AMPK signaling pathway in HepG2 cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(4), 2965-2971. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7905>.

[146] Zang M., Xu S., Maitland-Toolan K., Zuccollo A., Hou X., Jiang B. et al. (2006). Polyphenols stimulate amp-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic ldl receptor-deficient mice. *Diabetes*, 55(8), 2180-2191. <https://doi.org/10.2337/db05-1188>.

[147] Jung U. J., Cho Y. Y., Choi M. S. (2016). Apigenin ameliorates dyslipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance by modulating metabolic and transcriptional profiles in the liver of high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition*, 8(5), 305. <https://doi.org/10.3390/nu8050305>.

[148] Feng X., Weng D., Zhou F., Owen Y. D., Qin H., Zhao J. et al. (2016). Activation of PPAR γ by a natural flavonoid modulator, apigenin ameliorates obesity-related inflammation via regulation of macrophage polarization. *EBioMedicine*, 9, 61-76. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.017>.

[149] Bumke-Vogt C., Osterhoff M A., Borchert A., Guzman-Perez V., Sarem Z., Birkenfeld A. L. et al. (2014). The flavones apigenin and luteolin induce FOXO1 translocation but inhibit gluconeogenic and lipogenic gene expression in human cells. *PLoS One*, 9(8), e104321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104321>

- [150] Gómez-Zorita S., Lasa A., Abendaño N., Fernández-Quintela A., Mosqueda-Solís A., Garcia-Sobreviela M. P. et al. (2017). Phenolic compounds apigenin, hesperidin and kaempferol reduce in vitro lipid accumulation in human adipocytes. *Journal of Translational Medicine*, 15, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1343-0>.
- [151] Aranaz P., Navarro-Herrera D., Zabala M., Miguéliz I., Romo-Hualde A., López-Yoldi M. & González-Navarro, C. J. (2019). Phenolic compounds inhibit 3T3-L1 adipogenesis depending on the stage of differentiation and their binding affinity to PPAR γ . *Molecules*, 24(6), 1045. <https://doi.org/10.3390/molecules24061045>.
- [152] Su T., Huang C., Yang C., Jiang T., Su J., Chen M. et al. (2020). Apigenin inhibits STAT3/CD36 signaling axis and reduces visceral obesity. *Pharmacological Research*, 152, 104586. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104586>.
- [153] Wu L., Guo T., Deng R., Liu L., Yu Y. (2021). Apigenin ameliorates insulin resistance and lipid accumulation by endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c/SREBP-2 pathway in palmitate-induced HepG2 Cells and high-fat diet-fed mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 377(1), 146-156. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000162>.
- [154] Sebai, H., Jabri, M. A., Souli, A., Hosni, K., Rtibi, K., Tebourbi, O., et al. (2015). Chemical composition, antioxidant properties and hepatoprotective effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract against alcohol-induced oxidative stress in rat. *Gen Physiol Biophys*, 34(3), 263-75. https://doi.org/10.4149/gpb_2014039.
- [155] Cemek, M., Kağa, S., Şimşek, N., Büyükokuroğlu, M. E., & Konuk, M. (2008). Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of natural medicines*, 62, 284-293. <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0228-1>.
- [156] Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A. A., & Nash, R. J. (2008). Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 8206-8211. <https://doi.org/10.1021/jf8014365>.

- [157] Khan, S. S., Najam, R., Anser, H., Riaz, B., & Alam, N. (2014). Chamomile tea: herbal hypoglycemic alternative for conventional medicine. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(5), 1509-1514. PMID: 25176245.
- [158] Sorochnytska, O. M., Bayliak, M. M., Vasylyk, Y., Kuzniak, O. V., Drohomiretska, I. Z., Klonovskyi, A. Y., et al. (2019). Intermittent fasting causes metabolic stress and leucopenia in young mice. *Ukrainian Biochemical Journal*, 91, (1), 53-64. <https://doi.org/10.15407/ubj91.01.053>.
- [159] Xie, K., Neff, F., Markert, A., Rozman, J., Aguilar-Pimentel, J. A., Amarie, O. V., et al. (2017). Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nature communications*, 8(1), 155. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00178-3>.
- [160] Mattson, M. P., Longo, V. D., & Harvie, M. (2017). Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing research reviews*, 39, 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>.
- [161] Gratuze, M., Julien, J., Morin, F., Marette, A., & Planel, E. (2017). Differential effects of voluntary treadmill exercise and caloric restriction on tau pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease-like tau pathology fed with Western diet. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 79, 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.001>.
- [162] Razavi, R., Parvaresh, A., Abbasi, B., Yaghoobloo, K., Hassanzadeh, A., Mohammadifard, N., et al. (2020). The alternate-day fasting diet is a more effective approach than a calorie restriction diet on weight loss and hs-CRP levels. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 91(3-4), 242–250. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000623>.
- [163] Bayliak, M. M., Sorochnytska, O. M., Kuzniak, O. V., Gospodaryov, D. V., Demianchuk, I., Vasylyk, Y. V., et al. (2021). Middle age as a turning point in mouse cerebral cortex energy and redox metabolism: modulation by every-other-day fasting. *Experimental Gerontology*, 145, 111182. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111182>.

- [164] Di Francesco A., Deighan A. G., Litichevskiy L. et al. (2024). Dietary restriction impacts health and lifespan of genetically diverse mice. *Nature*, 634, 684-692. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08026-3>.
- [165] Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E. A., Gill, S., et al. (2012). Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell metabolism*, 15(6), 848-860. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.019>.
- [166] Sherman, H., Genzer, Y., Cohen, R., Chapnik, N., Madar, Z., & Froy, O. (2012). Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *The FASEB Journal*, 26(8), 3493-3502. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208868>.
- [167] Świątkiewicz, I., Woźniak, A., & Taub, P. R. (2021). Time-restricted eating and metabolic syndrome: current status and future perspectives. *Nutrients*, 13(1), 221. <https://doi.org/10.3390/nu13010221>.
- [168] Li, H., Pan, Y., Liu, L., Li, Y., Huang, X., Zhong, Y., et al. (2019). Effects of high-fat diet on muscle textural properties, antioxidant status and autophagy of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Aquaculture*, 511, 734228. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734228>.
- [169] Munhoz, A. C., Vilas-Boas, E. A., Panveloski-Costa, A. C., Leite, J. S. M., Lucena, C. F., Riva, P., et al. (2020). Intermittent fasting for twelve weeks leads to increases in fat mass and hyperinsulinemia in young female Wistar rats. *Nutrients*, 12(4), 1029. <https://doi.org/10.3390/nu12041029>.
- [170] Vatashchuk, M. V., Hurza, V. V., Stefanyshyn, N., Bayliak, M. M., Gospodaryov, D. V., Garaschuk, O., & Lushchak, V. I. (2024). Impact of caloric restriction on oxidative stress and key glycolytic enzymes in the cerebral cortex, liver and kidney of old and middle-aged mice. *Neuropharmacology*, 247, 109859. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109859>.
- [171] Lushchak, V. I. (2015). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 87(6), 11-18. <https://doi.org/10.15407/ubj87.06.011>.

- [172] Bayliak, M. M., Mosiichuk, N. M., Soroachynska, O. M., Kuzniak, O. V., Sishchuk, L. O., Hrushchenko, A. O., et al. (2021). Middle aged turn point in parameters of oxidative stress and glucose catabolism in mouse cerebellum during lifespan: minor effects of every-other-day fasting. *Biogerontology*, 22(3), 315-328. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09918-x>.
- [173] García-Flores, L. A., Green, C. L., Mitchell, S. E., Promislow, D. E., Lusseau, D., Douglas, A., & Speakman, J. R. (2021). The effects of graded calorie restriction XVII: Multitissue metabolomics reveals synthesis of carnitine and NAD, and tRNA charging as key pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(31), e2101977118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101977118>.
- [174] Xie, D., Huang, J., Zhang, Q., Zhao, S., Xue, H., Yu, Q. Q., et al. (2022). Comprehensive evaluation of caloric restriction-induced changes in the metabolome profile of mice. *Nutrition & Metabolism*, 19(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00674-4>.
- [175] Bayliak, M. M., Gospodaryov, D. V., & Lushchak, V. I. (2023). Homeostasis of carbohydrates and reactive oxygen species is critically changed in the brain of middle-aged mice: Molecular mechanisms and functional reasons. *BBA advances*, 3, 100077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100077>.
- [176] Mandarim-de-Lacerda, C. A., Del Sol, M., Vásquez, B., & Aguila, M. B. (2021). Mice as an animal model for the study of adipose tissue and obesity. *Int J Morphol*, 39(6), 1521-1528. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022021000601521>.
- [177] Olmedillas del Moral, M., Fröhlich, N., Figarella, K., Mojtahedi, N., & Garaschuk, O. (2020). Effect of caloric restriction on the in vivo functional properties of aging microglia. *Frontiers in immunology*, 11, 750. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00750>.
- [178] Houwen, B. (2002). Blood film preparation and staining procedures. *Clinics in laboratory medicine*, 22(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(03\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(03)00064-7).

- [179] Taler-Verčič, A., Goličnik, M., & Bavec, A. (2020). The structure and function of paraoxonase-1 and its comparison to paraoxonase-2 and -3. *Molecules*, 25(24), 5980. <https://doi.org/10.3390/molecules25245980>.
- [180] Vatashchuk, M., Hurza, V., & Bayliak, M. (2022). Adapting of spectrophotometric assay of paraoxonase activity with 4-nitrophenylacetate for murine plasma and liver. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 9(4), 6-14. <https://doi.org/10.15330/jpnu.9.4.6-14>.
- [181] Mohanty, B. R., Sahoo, P. K., Mahapatra, K. D., & Saha, J. N. (2007). Innate immune responses in families of Indian major carp, *Labeo rohita*, differing in their resistance to *Edwardsiella tarda* infection. *Current Science*, 92(9), 1270-1274.
- [182] Yadav, M. K., Pradhan, P. K., Sood, N., Chaudhary, D. K., Verma, D. K., Debnath, C., et al. (2014). Innate immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* infected with oomycete pathogen *Aphanomyces invadans*. *Fish & shellfish immunology*, 39(2), 524-531. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.005>.
- [183] Bayliak, M. M., Vatashchuk, M. V., Gospodaryov, D. V., Hurza, V. V., Demianchuk, I., Ivanochko, M. V., et al. (2022). High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1866(12), 130226. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130226>.
- [184] Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., & Storey, K. B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(3), 271-280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X).
- [185] Lushchak, V. I., Semchyshyn, H. M., & Lushchak, O. V. (2011). The classic methods to measure oxidative damage: lipid peroxides, thiobarbituric-acid reactive substances, and protein carbonyls. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 420-431. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch32>.
- [186] Lushchak, V., Semchyshyn, H., Mandryk, S., & Lushchak, O. (2005). Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

under respiratory conditions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 441(1), 35-40.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.06.010>

[187] Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. Academic press, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

[188] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

[189] Arita, S., Ogawa, T., Murakami, Y., Kinoshita, Y., Okazaki, M., & Inagaki-Ohara, K. (2019). Dietary fat-accelerating leptin signaling promotes protumorigenic gastric environment in mice. *Nutrients*, 11(9), 2127. <https://doi.org/10.3390/nu11092127>.

[190] Liu, B., Page, A. J., Hutchison, A. T., Wittert, G. A., & Heilbronn, L. K. (2019). Intermittent fasting increases energy expenditure and promotes adipose tissue browning in mice. *Nutrition*, 66, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.03.015>.

[191] Preguiça, I., Alves, A., Nunes, S., Fernandes, R., Gomes, P., Viana, S. D., & Reis, F. (2020). Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—a guide to a translational perspective. *Obesity Reviews*, 21(12), e13081. <https://doi.org/10.1111/obr.13081>.

[192] Zhou, X., Li, Z., Qi, M., Zhao, P., Duan, Y., Yang, G., & Yuan, L. (2020). Brown adipose tissue-derived exosomes mitigate the metabolic syndrome in high fat diet mice. *Theranostics*, 10(18), 8197-8210. <https://doi.org/10.7150/thno.43968>.

[193] Janoschek, R., Handwerk, M., Hucklenbruch-Rother, E., Schmitz, L., Bae-Gartz, I., Kasper, P., et al. (2023). Heterogeneous effects of individual high-fat diet compositions on phenotype, metabolic outcome, and hepatic proteome signature in BL/6 male mice. *Nutrition & Metabolism*, 20(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12986-023-00729-0>.

[194] Pettersson, U. S., Waldén, T. B., Carlsson, P. O., Jansson, L., & Phillipson, M. (2012). Female mice are protected against high-fat diet induced

metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046057>.

[195] Casimiro, I., Stull, N. D., Tersey, S. A., & Mirmira, R. G. (2021). Phenotypic sexual dimorphism in response to dietary fat manipulation in C57BL/6J mice. *Journal of Diabetes and its Complications*, 35(2), 107795. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107795>.

[196] Fan, R., Kim, J., You, M., Giraud, D., Toney, A. M., Shin, S. H., et al. (2020). α -Linolenic acid-enriched butter attenuated high fat diet-induced insulin resistance and inflammation by promoting bioconversion of n-3 PUFA and subsequent oxylipin formation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 76, 108285. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108285>.

[197] Varady, K. A. (2016). Impact of intermittent fasting on glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 19(4), 300-302. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000291>.

[198] Hall, K. D., & Chung, S. T. (2018). Low-carbohydrate diets for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 21(4), 308-312. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000470>.

[199] Harris, L., Hamilton, S., Azevedo, L. B., Olajide, J., De Brún, C., Waller, G., et al. (2018). Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults: a systematic review and meta-analysis. *JBIM Evidence Synthesis*, 16(2), 507-547. <https://doi.org/10.11124/JBISRIR-2016-003248>.

[200] Namavar, M. R., Raminfard, S., Jahromi, Z. V., & Azari, H. (2012). Effects of high-fat diet on the numerical density and number of neuronal cells and the volume of the mouse hypothalamus: a stereological study. *Anatomy & cell biology*, 45(3), 178-184. <https://doi.org/10.5115/acb.2012.45.3.178>.

[201] Bastías-Pérez, M., Serra, D., & Herrero, L. (2020). Dietary options for rodents in the study of obesity. *Nutrients*, 12(11), 3234. <https://doi.org/10.3390/nu12113234>.

[202] Ahmadi, F., Karimipannah, K., & Balali, M. (2024). Investigation of the effect of chamomile flower powder (CFP) on performance traits, lipid profile and

morphology jejunum of Japanese quail from 7 to 35 days of age. *Archives of Razi Institute*, 79(4). <https://doi.org/10.32592/ARI.2024.79.4.769>.

[203] Nakandakari, S. C. B. R., Munoz, V. R., Kuga, G. K., Gaspar, R. C., Sant'Ana, M. R., Pavan, I. C. B., et al. (2019). Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.016>.

[204] Muthuramalingam, K., Singh, V., Choi, C., Choi, S. I., Kim, Y. M., Unno, T., & Cho, M. (2020). Dietary intervention using (1, 3)/(1, 6)- β -glucan, a fungus-derived soluble prebiotic ameliorates high-fat diet-induced metabolic distress and alters beneficially the gut microbiota in mice model. *European Journal of Nutrition*, 59, 2617-2629. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02110-5>

[205] Joslin, P. M. N., Bell, R. K., & Swoap, S. J. (2017). Obese mice on a high-fat alternate-day fasting regimen lose weight and improve glucose tolerance. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(5), 1036-1045. <https://doi.org/10.1111/jpn.12546>.

[206] Henderson, C. G., Turner, D. L., & Swoap, S. J. (2021). Health effects of alternate day fasting versus pair-fed caloric restriction in diet-induced obese C57Bl/6J male mice. *Frontiers in physiology*, 12, 641532. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.641532>.

[207] Zhao, Q., Hou, D., Fu, Y., Xue, Y., Guan, X., & Shen, Q. (2021). Adzuki bean alleviates obesity and insulin resistance induced by a high-fat diet and modulates gut microbiota in mice. *Nutrients*, 13(9), 3240. <https://doi.org/10.3390/nu13093240>.

[208] Hou, M., Venier, N., Sugar, L., Musquera, M., Pollak, M., Kiss, A., et al. (2010). Protective effect of metformin in CD1 mice placed on a high carbohydrate-high fat diet. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(3), 537-542. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.152>.

[209] Su, H., Wang, W. J., Zheng, G. D., Yin, Z. P., Li, J. E., Chen, L. L., & Zhang, Q. F. (2022). The anti-obesity and gut microbiota modulating effects of

taxifolin in C57BL/6J mice fed with a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(4), 1598-1608. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11496>.

[210] Frank, C. L. (1988). Diet selection by a heteromyid rodent: role of net metabolic water production. *Ecology*, 69(6), 1943-1951. <https://doi.org/10.2307/1941171>.

[211] Nishi, H., Goda, Y., Okino, R., Iwai, R., Maezawa, R., Ito, K., et al. (2024). Metabolic Effects of Short-Term High-Fat Intake Vary Depending on Dietary Amino Acid Composition. *Current Developments in Nutrition*, 103768. <https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2024.103768>.

[212] Santos, E. W., de Oliveira, D. C., Hastreiter, A., da Silva, G. B., de Oliveira Beltran, J. S., Tsujita, M., et al. (2016). Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(2), 138-145. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>.

[213] Pini, M., Rhodes, D. H., & Fantuzzi, G. (2011). Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL-6 KO mice. *Cytokine*, 56(3), 708-716. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.015>.

[214] Curi, R., Levada-Pires, A. C., Silva, E. D., Poma, S. D. O., Zambonato, R. F., Domenech, P., et al. (2020). The critical role of cell metabolism for essential neutrophil functions. *Cell Physiol Biochem*, 54(4), 629-647. <https://doi.org/10.33594/000000245>.

[215] Lieshchova, M., Yefimov, V., & Brygadyrenko, V. (2023). Influence of Inula helenium rhizomes and Matricaria chamomilla inflorescences on the biochemical and physiological parameters in male rats fed a high-fat diet. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 74(4), 447-458. <https://doi.org/10.32394/rpzh.2023.0281>.

[216] Sadik, C. D., Kim, N. D., & Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology*, 32(10), 452-460. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.008>.

- [217] Nourshargh, S., Renshaw, S. A., & Imhof, B. A. (2016). Reverse migration of neutrophils: where, when, how, and why?. *Trends in immunology*, 37(5), 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.03.006>.
- [218] Hickman, D. L. (2017). Evaluation of the neutrophil: lymphocyte ratio as an indicator of chronic distress in the laboratory mouse. *Lab animal*, 46(7), 303-307. <https://doi.org/10.1038/labanimal.1298>.
- [219] Yona, S., & Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology*, 17(1), 53-59. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283324f80>.
- [220] Benson, T. W., Weintraub, N. L., Kim, H. W., Seigler, N., Kumar, S., Pye, J., et al. (2018). A single high-fat meal provokes pathological erythrocyte remodeling and increases myeloperoxidase levels: implications for acute coronary syndrome. *Laboratory Investigation*, 98(10), 1300-1310. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0038-3>.
- [221] Quetglas-Llabrés, M. M., Monserrat-Mesquida, M., Bouzas, C., Mateos, D., Ugarriza, L., Gómez, C., et al. (2023). Oxidative stress and inflammatory biomarkers are related to high intake of ultra-processed food in old adults with metabolic syndrome. *Antioxidants*, 12(8), 1532. <https://doi.org/10.3390/antiox12081532>.
- [222] Grujić-Milanović, J. D., Miloradović, Z. Z., Mihailović-Stanojević, N. D., Banjac, V. V., Vidosavljević, S., Ivanov, M. S., et al. (2021). Excessive consumption of unsaturated fatty acids leads to oxidative and inflammatory instability in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111691. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111691>.
- [223] Wang, Q., Xie, Z., Zhang, W., Zhou, J., Wu, Y., Zhang, M., et al. (2014). Myeloperoxidase deletion prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 63(12), 4172-4185. <https://doi.org/10.2337/db14-0026>.
- [224] Zhang, T., Yan, T., Du, J., Wang, S., & Yang, H. (2015). Apigenin attenuates heart injury in lipopolysaccharide-induced endotoxemic model by suppressing sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling

pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 233, 46-55.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.021>.

[225] McGillicuddy, F. C., Harford, K. A., Reynolds, C. M., Oliver, E., Claessens, M., Mills, K. H., & Roche, H. M. (2011). Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes*, 60(6), 1688-1698.
<https://doi.org/10.2337/db10-1278>.

[226] Niu, S. L., Mitchell, D. C., & Litman, B. J. (2005). Trans fatty acid derived phospholipids show increased membrane cholesterol and reduced receptor activation as compared to their cis analogs. *Biochemistry*, 44(11), 4458-4465.
<https://doi.org/10.1021/bi048319>.

[227] Dhibi, M., Brahmi, F., Mnari, A., Houas, Z., Chargui, I., Bchir, L., et al. (2011). The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutrition & metabolism*, 8, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-65>.

[228] Abubakar, A. M., Dibal, N. I., Attah, M. O. O., & Chiroma, S. M. (2022). Exploring the antioxidant effects of Aloe vera: Potential role in controlling liver function and lipid profile in high fat and fructose diet (HFFD) fed mice. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 4, 100150.
<https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100150>.

[229] Ismail, Y., Fahmy, D. M., Ghattas, M. H., Ahmed, M. M., Zehry, W., Saleh, S. M., & Abo-Elmatty, D. M. (2022). Integrating experimental model, LC-MS/MS chemical analysis, and systems biology approach to investigate the possible antidiabetic effect and mechanisms of *Matricaria aurea* (Golden Chamomile) in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 924478.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.924478>.

[230] Mérian, J., Ghezali, L., Trenteseaux, C., Duparc, T., Beuzelin, D., Bouguetoch, V., et al. (2023). Intermittent fasting resolves dyslipidemia and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice in a diet-dependent manner, irrespective of sex. *Cells*, 12(4), 533. <https://doi.org/10.3390/cells12040533>.

- [231] Saravanan, S., & Pari, L. (2016). Protective effect of thymol on high fat diet induced diabetic nephropathy in C57BL/6J mice. *Chemico-biological interactions*, 245, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.033>.
- [232] Sagadevan, A., & Ramalingam, S. (2016). Effect of bergenin on the kidney of C57BL/6J mice with high fat-diet induced oxidative stress. *International Letters of Natural Sciences*, 54, 58-65. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.54.58>
- [233] Wypych, A., Ożgo, M., Bernaciak, M., Herosimczyk, A., Barszcz, M., Gawin, K., et al. (2024). Effect of feeding high fat diets differing in fatty acid composition on oxidative stress markers and protein expression profiles in mouse kidney. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 33(2), 170-184. <https://doi.org/10.22358/jafs/175920/2024>.
- [234] Escasany, E., Izquierdo-Lahuerta, A., & Medina-Gómez, G. (2018). Kidney Damage in Obese Subjects: Oxidative Stress and Inflammation. *Obesity*, Academic Press, 135-162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812504-5.00007-6>.
- [235] Noeman, S. A., Hamooda, H. E., & Baalash, A. A. (2011). Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & metabolic syndrome*, 3(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>.
- [236] Alsawaf, S., Alnuaimi, F., Afzal, S., Thomas, R. M., Chelakkot, A. L., Ramadan, W. S., et al. (2022). Plant flavonoids on oxidative stress-mediated kidney inflammation. *Biology*, 11(12), 1717. <https://doi.org/10.3390/biology11121717>.
- [237] Aydin, C., Ince, E., Koparan, S., Cangul, I. T., Naziroglu, M., & Ak, F. (2007). Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 25(2), 129-137. <https://doi.org/10.1002/cbf.1279>.
- [238] Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., & Barja, G. (1994). Caloric and carbohydrate restriction in the kidney: effects on free radical

metabolism. *Experimental gerontology*, 29(1), 77-88. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(94\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0531-5565(94)90064-7).

[239] De Farias, J. M., Bom, K. F., Tromm, C. B., Luciano, T. F., Marques, S. O., Tuon, T., et al. (2013). Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Hormone and metabolic research*, 45(03), 190-196. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323740>.

[240] Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., et al. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 114(12), 1752-1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>.

[241] Sohet, F. M., Neyrinck, A. M., Dewulf, E. M., Bindels, L. B., Portois, L., Malaisse, W. J., et al. (2009). Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *British journal of nutrition*, 102(3), 462-469. <https://doi.org/10.1017/S0007114508191243>.

[242] Pakiet, A., Jakubiak, A., Mierzejewska, P., Zwara, A., Liakh, I., Sledzinski, T., & Mika, A. (2020). The effect of a high-fat diet on the fatty acid composition in the hearts of mice. *Nutrients*, 12(3), 824. <https://doi.org/10.3390/nu12030824>.

[243] Emelyanova, L., Boukatina, A., Myers, C., Oyarzo, J., Lustgarten, J., Shi, Y., & Jahangir, A. (2019). High calories but not fat content of lard-based diet contribute to impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in C57BL/6J mice heart. *PLoS One*, 14(7), e0217045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217045>.

[244] Li, X., Becker, K. A., & Zhang, Y. (2010). Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(1), 41-48. <https://doi.org/10.1159/000315104>.

[245] Abosharaf, H. A., Farag, A. M., Abdel Allem, A. A. H., El-Sayed, I. E., Akela, M. A., Tousson, E., & Kandil, E. H. (2024). Chamomile Extract Reduces Cardiac Toxicity in Female Mice with Ehrlich Solid Carcinoma. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12013-024-01476-6>.

[246] Dong, T. A., Sandesara, P. B., Dhindsa, D. S., Mehta, A., Arneson, L. C., Dollar, A. L., et al. (2020). Intermittent fasting: a heart healthy dietary pattern?. *The American journal of medicine*, 133(8), 901-907. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.03.030>.

[247] Garza-González, S., Nieblas, B., Solbes-Gochicoa, M. M., Altamirano, J., & García, N. (2022). Intermittent fasting as possible treatment for heart failure. *Current vascular pharmacology*, 20(3), 260-271. <https://doi.org/10.2174/1570161120666220610151915>.

[248] Azevedo, F. R. D., Ikeoka, D., & Caramelli, B. (2013). Effects of intermittent fasting on metabolism in men. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 59, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.ramb.2012.09.003>.

[249] Pase, C. S., Roversi, K., Trevizol, F., Roversi, K., Kuhn, F. T., Schuster, A. J., et al. (2013). Influence of perinatal trans fat on behavioral responses and brain oxidative status of adolescent rats acutely exposed to stress. *Neuroscience*, 247, 242-252. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.053>.

[250] Demianchuk, O., Vatashchuk, M., Gospodaryov, D., Hurza, V., Ivanochko, M., Derkachov, V., et al. (2024). 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1868(1), 130521. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130521>.

[251] Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2018). Redox balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 6940515. <https://doi.org/10.1155/2018/6940515>.

[252] Solinas, G., & Karin, M. (2010). JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction, *The FASEB Journal*, 24(8), 2596-2611. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151340>.

[253] Rizvi, M. R., Al-Mansour, M., Al-Rukban, M., Jarallah, N., Al-Baradie, R. S., Tohami, K., et al. (2016). Role of natural herbs-Matricaria recutita and Artemisia absinthium on infarct volume, hemispheric swelling and functional impairments following focal cerebral ischemia in rats. *J. Entomol. Zool. Stud*, 4(5), 738-747.

[254] Agbonifo-Chijiokwu, E., Nwangwa, K. E., Oyovwi, M. O., Ben-Azu, B., Naiho, A. O., Emojevwe, V., et al. (2023). Underlying biochemical effects of intermittent fasting, exercise and honey on streptozotocin-induced liver damage in rats. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 22(1), 515-527. <https://doi.org/10.1007/s40200-022-01173-2>.

[255] Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., & Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1-2), 21-26. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00206-8).

[256] Gospodaryov, D. V. (2015). Underinvestigated roles of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University. Series of social and human sciences*, 2(1), 26-38. <https://doi.org/10.15330/jpnu.2.1.25-37>.

[257] Alvarez, B., & Salinas, G. (2022). Basic concepts of thiol chemistry and biology. *Redox Chemistry and Biology of Thiols*. Academic Press, 1-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90219-9.00026-1>.

[258] Ávila, B. M., Zanini, B. M., Luduvico, K. P., Hense, J. D., Garcia, D. N., Proszek, J., et al. (2023). Effect of calorie restriction on redox status during chemically induced estropause in female mice. *GeroScience*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00979-z>.

[259] Estrada-Camarena, E. M., López-Rubalcava, C., Ramírez-Rodríguez, G. B., Pulido, D., Cervantes-Anaya, N., Azpilcueta-Morales, G., et al. (2020). Aqueous extract of pomegranate enriched in ellagitannins prevents anxiety-like behavior and metabolic changes induced by cafeteria diet in an animal model of

menopause. *Neurochemistry International*, 141, 104876.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104876>.

[260] Ali, A. A. M., Mansour, A. B., & Attia, S. A. (2021). The potential protective role of apigenin against oxidative damage induced by nickel oxide nanoparticles in liver and kidney of male Wistar rat, *Rattus norvegicus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 27577-27592. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12632-3>.

[261] Hussein, M. M., Althagafi, H. A., Alharthi, F., Albrakati, A., Alsharif, K. F., Theyab, A., et al. (2022). Apigenin attenuates molecular, biochemical, and histopathological changes associated with renal impairments induced by gentamicin exposure in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(43), 65276-65288. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20235-9>.

[262] Gong, X., Shang, F., Obin, M., Palmer, H., Scrofano, M. M., Jahngen-Hodge, J., et al. (1997). Antioxidant enzyme activities in lens, liver and kidney of calorie restricted Emory mice. *Mechanisms of ageing and development*, 99(3), 181-192. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(97\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(97)00102-4).

[263] Gujjala, S., Putakala, M., Bongu, S. B. R., Ramaswamy, R., & Desireddy, S. (2022). Preventive effect of *Caralluma fimbriata* against high-fat diet induced injury to heart by modulation of tissue lipids, oxidative stress and histological changes in Wistar rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128(2), 474-482. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1693601>.

[264] Zadam, M. H., Ahmida, M., Djaber, N., Ounacer, L. S., Sekiou, O., Taibi, F., et al. (2023). In-vivo anti-inflammatory effects of Roman Chamomile (*Chamaemelum nobile*) aqueous extracts collected from the National Park of El-Kala (North-East, Algeria). *Cellular and Molecular Biology*, 69(9), 245-254. <https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.9.38>.

[265] Mattson, M. P., & Wan, R. (2005). Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(3), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.12.007>.

[266] Castello, L., Froio, T., Maina, M., Cavallini, G., Biasi, F., Leonarduzzi, G., et al. (2010). Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF- κ B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.003>.

[267] Chausse, B., Vieira-Lara, M. A., Sanchez, A. B., Medeiros, M. H., & Kowaltowski, A. J. (2015). Intermittent fasting results in tissue-specific changes in bioenergetics and redox state. *PLoS One*, 10(3), e0120413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120413>.

[268] El Azab, E. F., & Abdulmalek, S. (2022). Amelioration of Age-Related Multiple Neuronal Impairments and Inflammation in High-Fat Diet-Fed Rats: The Prospective Multitargets of Geraniol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 4812993. <https://doi.org/10.1155/2022/4812993>.

[269] Wang, H., Wang, B., Yin, H., Zhang, G., Yu, L., Kong, X., et al. (2017). Reduced neurotrophic factor level is the early event before the functional neuronal deficiency in high-fat diet induced obese mice. *Metabolic brain disease*, 32, 247-257. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9905-z>.

[270] Van Tassell, B. W., Toldo, S., Mezzaroma, E., & Abbate, A. (2013). Targeting interleukin-1 in heart disease. *Circulation*, 128(17), 1910-1923. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003199>.

[271] Abo-Raya, S. H., Salama, N. A., Mohammed, S. E., Fayed, A. H. M., & Abdulhamid, A. A. (2020). Biochemical effect of palm oil fractions on rats. *Plant Archives*, 20(1), 1277-1290. e-ISSN:2581-6063 (online),ISSN:0972-5210.

[272] Kim, Y. J., Yoon, D. S., & Jung, U. J. (2021). Efficacy of nobiletin in improving hypercholesterolemia and nonalcoholic fatty liver disease in high-cholesterol diet-fed mice. *Nutrition Research and Practice*, 15(4), 431-443. <https://doi.org/10.4162/nrp.2021.15.4.431>.

[273] Motta, B. P., Pinheiro, C. G., Figueiredo, I. D., Cardoso, F. N., Oliveira, J. O., Machado, R. T. A., et al. (2022). Combined effects of lycopene and metformin on decreasing oxidative stress by triggering endogenous antioxidant defenses

in diet-induced obese mice. *Molecules*, 27(23), 8503.
<https://doi.org/10.3390/molecules27238503>.

[274] Rafrat, M., Zemestani, M., & Asghari-Jafarabadi, M. (2015). Effectiveness of chamomile tea on glycemic control and serum lipid profile in patients with type 2 diabetes. *Journal of endocrinological investigation*, 38, 163-170.
<https://doi.org/10.1007/s40618-014-0170-x>.

[275] Yuan, X., Wang, J., Yang, S., Gao, M., Cao, L., Li, X., et al. (2022). Effect of intermittent fasting diet on glucose and lipid metabolism and insulin resistance in patients with impaired glucose and lipid metabolism: a systematic review and meta-analysis. *International journal of endocrinology*, 2022(1), 6999907.
<https://doi.org/10.1155/2022/6999907>.

[276] Liu, J., Jiang, S., Zhao, Y., Sun, Q., Zhang, J., Shen, D., et al. (2018). Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) regulates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-fibrosis progression by determining hepatic glucose/fatty acid preference under high-fat diet conditions. *The Journal of pathology*, 246(3), 277-288.
<https://doi.org/10.1002/path.5131>.

[277] Lu, Q., Tian, X., Wu, H., Huang, J., Li, M., Mei, Z., et al. (2021). Metabolic changes of hepatocytes in NAFLD. *Frontiers in physiology*, 12, 710420.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.710420>.

[278] Gomez-Muñoz, A., Hales, P., & Brindley, D. N. (1991). Unsaturated fatty acids activate glycogen phosphorylase in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, 276(1), 209-215. <https://doi.org/10.1042/bj2760209>.

[279] Fazili, A., Gholami, S., Sheikhpour, M., & Pousti, P. (2020). Therapeutic effects of in vivo-differentiated stem cell and *Matricaria chamomilla* L. Oil in diabetic rabbit. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19, 453-460.
<https://doi.org/10.1007/s40200-020-00530-3>.

[280] Maya, R., & Laeto, A. B. (2024) Effects of intermittent fasting on the liver. *INSPIRE*, 417-424. ISBN: 978-623-399-184-1.

[281] Cerqueira, F. M., da Cunha, F. M., da Silva, C. C. C., Chausse, B., Romano, R. L., Garcia, C. C., et al. (2011). Long-term intermittent feeding, but not

caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1454-1460. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.006>.

[282] Allende, D. S., Gawrieh, S., Cummings, O. W., Belt, P., Wilson, L., Van Natta, M., et al. (2021). Glycogenosis is common in nonalcoholic fatty liver disease and is independently associated with ballooning, but lower steatosis and lower fibrosis. *Liver International*, 41(5), 996-1011. <https://doi.org/10.1111/liv.14773>.

[283] Ritchie, R. H. (2009). Evidence for a causal role of oxidative stress in the myocardial complications of insulin resistance. *Heart, Lung and Circulation*, 18(1), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2008.11.003>.

[284] Fan, H., Wu, Y., Yu, S., Li, X., Wang, A., Wang, S., et al. (2020). Critical role of mTOR in regulating aerobic glycolysis in carcinogenesis. *International journal of oncology*, 58(1), 9-19. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5152>.

[285] Lushchak, V. I., Duszenko, M., Gospodaryov, D. V., & Garaschuk, O. (2021). Oxidative stress and energy metabolism in the brain: Midlife as a turning point. *Antioxidants*, 10(11), 1715. <https://doi.org/10.3390/antiox10111715>.

[286] Ingram, D. K., & de Cabo, R. (2017). Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing research reviews*, 39, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.05.008>.

[287] Stankovic, M., Mladenovic, D., Ninkovic, M., Vucevic, D., Tomasevic, T., & Radosavljevic, T. (2013). Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys*, 32(2), 277-83. https://doi.org/10.4149/gpb_2013027.

[288] Rathod, P., Hemnani, T., & Parihar, M. S. (2011). Dietary restriction lowers endogenous levels of oxidative stress in different brain regions of adult mice. *Cellular and Molecular Biology*, 57(2), 1575-80.

[289] Barger, J. L., Vann, J. M., Cray, N. L., Pugh, T. D., Mastaloudis, A., Hester, S. N., et al. (2017). Identification of tissue-specific transcriptional markers of caloric restriction in the mouse and their use to evaluate caloric restriction mimetics. *Aging Cell*, 16(4), 750-760. <https://doi.org/10.1111/accel.12608>.

- [290] Gillette-Guyonnet, S., & Vellas, B. (2008). Caloric restriction and brain function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(6), 686-692. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328313968f>.
- [291] Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., et al. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease models & mechanisms*, 3(9-10), 525-534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>.
- [292] Regan, J. C., Froy, H., Walling, C. A., Moatt, J. P., & Nussey, D. H. (2020). Dietary restriction and insulin-like signalling pathways as adaptive plasticity: A synthesis and re-evaluation. *Functional Ecology*, 34(1), 107-128. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13418>.

ДОДАТКИ

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

Наукові праці, в яких опубліковані наукові результати дисертації:

Видання, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Vatashchuk M., Hurza V., Stefanyshyn N., Bayliak M., Gospodaryov D., Garaschuk O., Lushchak V. Impact of caloric restriction on oxidative stress and key glycolytic enzymes in the cerebral cortex, liver and kidney of old and middle-aged mice. *Neuropharmacology*. 2024. № 247. 109859. ISSN: 0028-3908.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109859>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85184921348&origin=resultslist>

Фахові видання України (категорія Б):

1. Hurza V., Vatashchuk M., Bayliak M. Pathogenesis and biomarkers of metabolic syndrome. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*. 2021. № 8(4). P. 7-19.

DOI: <https://doi.org/10.15330/jpnu.8.4.7-19>

URL: <https://journals.pnu.edu.ua/index.php/jpnu/article/view/6136>

2. Hurza V., Vatashchuk M., Bayliak M. A margarine-supplemented diet alone and in combination with chamomile decoction decreases food intake but has a mild effect on body mass in mice. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*. 2023. № 10. P. 45-55.

DOI: <https://doi.org/10.15330/jpnubio.10.45-55>

URL: <https://journals.pnu.edu.ua/index.php/jpnubio/article/view/7625>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М., Луцшак В.І. Вплив маргарину на масу тіла та інтенсивність споживання корму у мишей // XIX

Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція молодих вчених «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 3-4 грудня 2020 рік). – С. 52.

URL: https://www.inenbiol.com/images/stories/konfer/2020/AB_2020_22_4conf.pdf

2. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М., Лушак В.І. Вплив різних типів дієт на масу тіла й інтенсивність споживання їжі у мишей // *XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 19-21 квітня 2021 рік). – С. 205.

URL: <https://sci.ldubgd.edu.ua/bitstream/123456789/8700/1/6.pdf>

3. Гурза В.В., Ватащук М.В., Дем'янчук О.І. Вплив маргарину на вміст пероксидів ліпідів у різних органах мишей // *XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених* (м. Львів, 19 травня 2022 рік). – С. 35.

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

4. Hurza V.V., Vataashchuk M.V., Bayliak M.M. Effects of margarine on activity of antioxidant enzymes in the mouse liver // *The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation* (Kyiv, June 15-17, 2022). – P. 35.

URL: <http://imbg.org.ua/docs/2022/Proceedings%20of%20All-Ukrainian%20Conference%20of%20Molecular%20and%20Cell%20Biology.pdf>

5. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М. Вплив маргарин-вмісної їжі на деякі біохімічні показники у печінці та плазми крові мишей // *VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології»* (м. Дніпро, 6-7 жовтня 2022 рік). – С. 170.

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

6. Гурза В.В., Ватащук М.В., Байляк М.М. Вплив маргарину та водного відвару ромашки на антиоксидантну систему печінки мишей // *92 науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю*

«Інновації в медицині та фармації» (м. Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023 рік). – С. 14.

URL: <https://www.scribd.com/document/714930730/Матеріали-92-конференції-Інновації-в-медицині-та-фармації-с-48-53-2023pdf>

7. Hurza V.V., Vatashchuk M.V., Bayliak M.M., Lushchak V.I. Influence of margarine diet alone and on the background of feeding every other day on the antioxidant system of mouse liver and heart // *48-th FEBS Congress “Mining biochemistry for human health and well being”* (Milan, Italy, 29 June – 3 July 2024). – P. 443.

URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/2211-5463.13837>



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
 імейл office@pnu.edu.ua, сайт https://pnu.edu.ua, код ЄДРПОУ 02125266

31.01.2025 № 03.04-29/05

На № _____ від _____

Довідка
 про впровадження результатів дисертаційного дослідження
Гурзи Вікторії Володимирівни на тему
«Корекція дістою спричинених віком та споживанням маргарину
метаболічних порушень у мишей: енергетичний обмін та оксидативний
стрес»
 представленого на здобуття наукового ступеня доктора філософії
 за спеціальністю 091 Біологія

Матеріали наукового дослідження Гурзи Вікторії 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 і практичних занять із загального курсу «Біологічно активні природні речовини» (результати досліджень включені в тему «Біологічно активні речовини рослинного походження: феноли» – 2 год лекційних і 2 год практичних); «Моделі біохімічних досліджень» (результати досліджень включені в тему «Лабораторні миші як модельний об'єкт» – 2 год лекційних і 2 год практичних); «Патофізіологія ожиріння» (результати досліджень включені в тему «Біохімічні та молекулярні механізми розвитку ожиріння» – 2 год лекційних і 2 год практичних).

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

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

Перший проректор

Валентина ЯКУБІВ

Завідувачка кафедри біохімії та біотехнології

Марія БАЙЛЯК

