

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., Vatashchuk 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>