КАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ІВАНОЧКО МАР'ЯН ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 678.048:613.25:599.323.41]:635.356(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ
ВПЛИВ ПРЕПАРАТІВ БРОКОЛІ НА АНТИОКСИДАНТНІ ТА ЕНЕРГЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ МИШЕЙ ПРИ СПОЖИВАННІ КАФЕТЕРІЙНОЇ ЇЖІ

Спеціальність 091 Біологія
Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____М.В. Іваночко

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

Івано-Франківськ – 2026

АНОТАЦІЯ

Іваночко М.В. Вплив препаратів броколі на антиоксидантні та енергетичні параметри мишей при споживанні кафетерійної їжі. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Карпатський національний університет імені Василя Стефаника, Міністерство освіти і науки України, Івано-Франківськ, 2026.

Дисертація присвячена вивченню впливу споживання препаратів броколі (*Brassica oleracea var. italica*) на розвиток спричинених кафетерійною їжею метаболічних порушень та оксидативного стресу у лабораторних мишей *Mus musculus*. Здатність броколі чи її сполук (зокрема ізотіоціанату сульфорафану) усувати порушення обміну речовин та супутні до них захворювання у модельних організмів та пацієнтів досліджувалася й раніше. Проте більшість цих робіт не стандартизовані та уніфіковані, і саме вплив препаратів паростків і проростків броколі на масу тіла, накопичення запасних ліпідів, гіперглікемію у крові, обмін речовин, оксидативний стрес і запалення вивчені недостатньо. Метою роботи було встановити вплив споживання препаратів броколі на обмін речовин і антиоксидантну систему у лабораторних мишей, які споживали кафетерійну їжу.

Робота складалася з чотирьох частин. У першій частині ми визначали вміст біологічно активних природних сполук у препаратах броколі. Для дослідження було обрано рослинний матеріал без насінини (паростки) і пророщене насіння (проростки) броколі сорту Калабрезе. Спиртова екстракція забезпечувала більше вивільнення поліфенольних сполук і флавоноїдів, проте водна екстракція забезпечувала більшу антиоксидантну активність проростків броколі.

У другій частині роботи ми визначали вплив споживання паростків броколі та кафетерійної їжі на параметри тіла, показники крові, печінки і кори головного мозку десятимісячних самців мишей лінії C57BL/6J. Впродовж 14 тижнів миші були поділені на групи, які споживали: базову їжу, базову їжу з 5% вмістом паростків броколі, кафетерійну їжу та кафетерійну їжу з 5% вмістом паростків

броколі. Додавання паростків броколі до кафетерійної їжі не перешкоджало зростанню маси тіла мишей та накопиченню вісцерального жиру. Проте споживання кафетерійної їжі сприяло накопиченню триацилгліцеролів та вищому рівню карбонільних груп білків у печінці мишей, тоді як споживання кафетерійної чи базової їжі з паростками броколі знижувало відповідні показники. Це свідчить про вибірковий захисний вплив додавання паростків броколі проти накопичення ліпідів та оксидативного стресу. При споживанні паростків броколі активність глютатіон-S-трансферази та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 у корі головного мозку мишей була вищою, що свідчило про покращену здатність знешкоджувати ксенобіотики та інші шкідливі сполуки.

У третій частині роботи ми вивчали вплив споживання кафетерійної їжі з різним вмістом проростків броколі, щоб встановити наявність залежних від дози ефектів на організм восьмимісячних самців лінії C57BL/6J. Миші були поділені на шість груп і впродовж 20 тижнів споживали: базову їжу, кафетерійну їжу, кафетерійну їжу з 2,5, 5 та 10% вмістом проростків броколі і базову їжу з 5% вмістом проростків броколі. Кількість спожитої їжі та рівень триацилгліцеролів у плазмі крові мишей знижувалися зі зростанням вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі. Проте додавання проростків броколі не запобігало зростанню рівня глюкози в крові при споживанні кафетерійної їжі. Активність параоксонази була нижчою при споживанні кафетерійної їжі, а додавання проростків броколі до кафетерійної їжі нормалізувало цей показник, що також свідчило про позитивний вплив споживання броколі. Проростки броколі не викликали залежних від дози ефектів у корі головного мозку мишей, проте активність глютатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 була вищою при споживанні 10% проростків броколі у кафетерійній їжі та 5% проростків броколі у базовій їжі.

У четвертій частині роботи ми визначали вплив споживання кафетерійної їжі та проростків броколі на параметри тіла, показники крові, печінки і кори головного мозку восьмимісячних самців лінії C57BL/6J. Впродовж 16 тижнів мишей годували базовою їжею, базовою їжею з 5% паростками броколі,

кафетерійною їжею та кафетерійною їжею з 5% проростками броколі. Проростки броколі не протидіяли зростанню маси тіла та вісцерального жиру у мишей, які споживали кафетерійну їжу. Проте споживання кафетерійної їжі з проростками броколі сприяло зниженню накопичення триацилгліцеролів та глікогену у печінці мишей. Це свідчить про здатність проростків броколі протидіяти накопиченню запасних сполук у печінці мишей внаслідок споживання кафетерійної їжі та порушення обміну речовин. Додавання проростків броколі до кафетерійної їжі усувало зростання активності гліколітичних ферментів, що розглядається як протидія розвиткові ожиріння. При споживанні проростків броколі активність глютатіонпероксидази та глютатіон-S-трансферази була вищою у печінці мишей, що свідчить про їх сприятливий вплив на антиоксидантний захист і знешкодження ксенобіотиків. При споживанні кафетерійної їжі ми встановили вищі рівні відносної транскрипції іРНК факторів запалення, а при споживанні проростків броколі – вищі рівні регуляторів обміну вуглеводів і білків знешкодження ксенобіотиків у печінці мишей. Кафетерійна їжа негативно вплинула на функціонування антиоксидантних та допоміжних ферментів у корі головного мозку мишей – їх активність була нижчою порівняно з групою базової їжі, а споживання проростків броколі разом з кафетерійною їжею не усувало цієї проблеми.

Як загальний підсумок, можна сказати, що препарати броколі знижували окремі маркери оксидативного стресу та ожиріння у мишей. Додавання препаратів броколі сприяло покращенню вибіркових параметрів антиоксидантної системи, протизапальним процесам та регуляції обміну речовин у мишей при споживанні кафетерійної їжі.

Ключові слова: антиоксидантний захист, біологічно активні природні речовини, вуглеводи, кафетерійна їжа, ліпіди, метаболічні порушення, миші, мозок, ожиріння, оксидативний стрес, печінка, паростки броколі, проростки броколі, сульфорафан, функціональна їжа.

ABSTRACT

Ivanochko M.V. Influence of broccoli preparations on antioxidant and energetic parameters of cafeteria diet-fed mice. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the speciality 091 Biology – Vasyl Stefanyk Carpathian National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2026.

This dissertation is devoted to the study of the effect of the consumption of broccoli preparations *(Brassica oleracea var. italica*) on the development of cafeteria diet-induced metabolic disorders and oxidative stress in laboratory mice, *Mus musculus*. The ability of broccoli or its compounds (e.g., isothiocyanate sulforaphane) to attenuate the metabolic disorders and related diseases in model organisms and patients has been studied before. However, most of these studies are not standardised and unified, and the effect of broccoli preparations (green sprouts and sprouted seeds) on body mass, lipid accumulation, blood hyperglycaemia, metabolism, oxidative stress, and inflammation in obesity is not well investigated. This study aimed to determine the effect of consuming broccoli preparations on the metabolism and the antioxidant system in laboratory mice that consumed cafeteria diet.

The study consisted of four parts. In the first part, the content of biologically active natural compounds in broccoli preparations was determined. For the study, seedless green sprouts and sprouted seeds of Calabrese broccoli were selected. Ethanol extracts had greater release of polyphenolic compounds and flavonoids, but water extraction resulted in greater antioxidant activity of broccoli sprouts.

In the second part of the study, we determined the effect of broccoli green sprouts and cafeteria diet consumption on body, blood, liver, and cerebral cortex parameters in ten-month-old male C57BL/6J mice. For 14 weeks, the mice were divided into groups and fed the basal diet, the basal diet with 5% broccoli green sprouts, the cafeteria diet, and the cafeteria diet with 5% broccoli green sprouts. The addition of broccoli green sprouts did not prevent mice from gaining body mass and accumulating visceral adipose tissue. However, consumption of a cafeteria diet promoted the accumulation of

triacylglycerols and higher levels of protein carbonyl groups in the liver of mice, whereas consumption of cafeteria or basal diet with broccoli green sprouts decreased these parameters. This indicates the selective protective effect of broccoli sprouts against lipid accumulation and oxidative stress. The activity of glutathione S-transferase and NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 in the cerebral cortex of mice was higher in mice fed broccoli green sprouts, indicating an improved ability to detoxify xenobiotics and other harmful compounds.

In the third part of the experiment, we studied the effect of consumption of a cafeteria diet with different content of broccoli sprouts to determine the presence of dose-dependent effects on the organism of eight-month-old male C57BL/6J mice. For 20 weeks, mice were divided into six groups: basal diet, cafeteria diet, cafeteria diet with 2.5, 5, 10% of broccoli sprouts, and basal diet with 5% of broccoli sprouts. Feed intake and triacylglycerol level in blood plasma were decreased as the broccoli sprout content was increased in a cafeteria diet. However, the addition of broccoli sprouts did not prevent an increase in blood glucose level in cafeteria diet-fed groups. Paraoxonase activity was lower in the cafeteria diet group and the addition of broccoli sprouts normalised this parameter, indicating a positive effect of broccoli consumption. Broccoli sprouts did not cause dose-dependent effects in the cerebral cortex of mice, but the activity of glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 was higher in mice fed 10% broccoli sprouts in a cafeteria diet and 5% broccoli sprouts in the basal diet.

In the fourth part of the experiment, we determined the effect of the consumption of a cafeteria diet and broccoli sprouts on the body, blood, liver, and cerebral cortex parameters of eight-month-old male C57BL/6J mice. For 16 weeks, mice were fed a basal diet, a basal diet with 5% broccoli sprouts, a cafeteria diet, and a cafeteria diet with 5% broccoli sprouts. Broccoli sprouts were not able to eliminate the mass gain and adiposity development in mice fed a cafeteria diet. However, consumption of a cafeteria diet with broccoli sprouts contributed to the lower accumulation of triacylglycerols and glycogen in the liver of mice. This indicates the ability of broccoli sprouts to counteract the accumulation of reserve compounds in the liver of mice due to the consumption of a

cafeteria diet and metabolic disorders. The addition of broccoli sprouts to the cafeteria diet eliminated the increase in glycolytic enzyme activity, which is considered to counteract the development of obesity. In broccoli sprouts-fed groups, the activity of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase was higher in the liver of mice, indicating a beneficial effect on antioxidant protection and xenobiotic detoxification. We determined a higher level of the relative transcript of inflammatory factors in cafeteria diet-fed groups, and broccoli sprout consumption caused the higher level of carbohydrate metabolism regulators and xenobiotic detoxification proteins in the liver of mice. Cafeteria diet negatively affected the functioning of antioxidant and auxiliary enzymes in the cerebral cortex of mice, as their activity was lower compared to the basal diet group, and the addition of broccoli sprouts did not eliminate this problem.

As a general conclusion, broccoli preparations decreased certain markers of oxidative stress and obesity in mice. Supplementation with broccoli preparations promoted selective parameters of the antioxidant system, anti-inflammatory processes, and metabolic regulation in cafeteria diet-fed mice.

Key words: antioxidant defence, biologically active natural substances, brain, broccoli microgreen, broccoli sprouts, cafeteria diet, carbohydrates, functional food, lipids, liver, metabolic disorders, mice, obesity, oxidative stress, sulforaphane.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Ivanochko M., Bayliak M., Lushchak V. Potential of isothiocyanate sulforaphane from broccoli to combat obesity and type 2 diabetes: involvement of NRF2 regulatory pathway. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2024. 96: 6. Q4

DOI: https://doi.org/10.15407/ubj96.06.017

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/85213384541?origin=resultslist

2. Ivanochko M., Fediv K., Shvadchak V., Bayliak M., Lushchak V. Nutritional analysis of aqueous and ethanol broccoli sprout extracts. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2025. Q2

DOI: https://doi.org/10.1007/s13562-025-00974-9

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105003850390?origin=resultslist

3. Ivanochko M., Dmytriv T., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Metabolic effects of broccoli sprouts in mice with cafeteria diet-induced obesity. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2025. 97: 6. Q4

DOI: https://doi.org/10.15407/ubj97.06.065

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105026672297?origin=resultslist

Статті у наукових фахових виданнях України категорії Б:

4. Ivanochko M., Demianchuk O., Bayliak M., Lushchak V. Consumption of broccoli sprouts increased the activity of glutathione-dependent antioxidant enzymes in murine liver. *Biotechnologia Acta*. 2023. 16: 2. P. 26-29.

DOI: https://doi.org/10.15407/biotech16.02.026

URL: https://biotechnology.kiev.ua/index.php/en/journal-archive-en/2023-en/2023-no2-en/consumption-of-broccoli-sprouts-increased-the-activity-of-glutathione-dependent-antioxidant-enzymes-in-murine-liver-m-v-ivanochko-o-i-demianchuk-m-m-bayliak-v-i-lushchak

5. Derkachov V., Ivanochko M., Bayliak M. The effect of broccoli sprouts on oxidative stress markers in mice fed with cafeteria diet. *Biotechnologia Acta*. 2023. 16: 2. P. 18-20.

DOI: https://doi.org/10.15407/biotech16.02.018

URL: https://biotechnology.kiev.ua/index.php/en/journal-archive-en/2023-en/2023-no2-en/the-effect-of-broccoli-sprouts-on-oxidative-stress-markers-in-mice-fed-with-cafeteria-diet-vp-derkachov-mv-ivanochko-mm-bayliak

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Іваночко М.В. Проростки броколі сповільнюють розвиток ожиріння у мишей на кафетерійній дієті // *92-а науково-практична конференція студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023). – С. 165.

URL: https://surl.li/xanofy

7. Лабич І., Іваночко М. Паростки броколі не коригують експериментально індуковане ожиріння у мишей. // *92-а науково-практична конференція студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023). – С. 16.

URL: https://surl.li/xanofy

8. Деркачов В., Березовський В., Іваночко М., Байляк М. Вплив паростків броколі на поведінку мишей та на маркери запалення // *III міжнародна науково практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 163-164.

URL:https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf

9. Іваночко М., Лущак В. Вплив споживання кафетерійної дієти та паростків броколі на біохімічні показники крові мишей // *III міжнародна науково практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 184-186.

URL:https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf

10. Ткачик А., Балацький В., Іваночко М., Байляк М. Біохімічні показники крові мишей за споживання кафетерійної дієти та паростків броколі // *III міжнародна науково практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 374-376.

URL:https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf

11. Іваночко М., Лущак В. Антиоксидантні властивості екстрактів паростків та проростків броколі // *X Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології»* (м. Харків, 10-11 травня 2023). – С. 180-181.

URL: https://tfp.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2023/05/zbirnik-konferencija-tfp-2023.pdf

12. Іваночко М., Дем'янчук О., Лущак В. Споживання проростків броколі збільшує активність глютатіон-залежних ферментів у печінці мишей // *Шоста міжнародна конференція молодих учених «Харківський Природничий Форум»* (м. Харків, 18-19 травня 2023). – С. 422-424.

URL: https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/909ba3b5-ca28-4195-9abc-4892d466753c/content

13. Василишин О., Іваночко М. Модуляція окремих гематологічних показників за умови споживання «кафетерійної дієти» та проростків броколі // *93а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 28-30 березня 2024). – С. 62.

URL:https://drive.google.com/drive/folders/1NrIhc3s3dzW0gz4JjyXvb4bq8og1BD47

14. Іваночко М., Байляк М. Проростки броколі запобігають зростанню активності ферментів катаболізму глюкози та фруктози у печінці мишей на тлі кафетерійної їжі // *93а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 28-30 березня 2024). – С. 64.

URL:https://drive.google.com/drive/folders/1NrIhc3s3dzW0gz4JjyXvb4bq8og1BD47

15. Іваночко М., Байляк М., Лущак В. Проростки броколі не запобігають збільшенню вмісту глікогену та триацилгліцеролів у печінці мишей при споживанні кафетерійної їжі // *XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 18-20 квітня 2024 р.). – С. 59-60.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024_.pdf

16. Іваночко М., Байляк М. Паростки броколі не коригують розвиток ожиріння у мишей при споживанні кафетерійної їжі // *94а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 27-29 березня 2025). – С. 48.

URL: https://surl.li/ykbfre

17. Яцків І., Лабич І., Іваночко М. Вплив споживання паростків броколі і кафетерійної їжі на гематологічні та деякі біохімічні показники крові мишей // *94а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 27-29 березня 2025). – С. 53.

URL: https://surl.li/ykbfre

18. Іваночко М., Байляк М., Лущак В. Споживання паростків броколі запобігає збільшенню вмісту триацилгліцеридів у печінці, але не маси тіла мишей за споживання кафетерійної їжі // *XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – С. 63-65.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2025/06/pimb-tezi-2025-A5.pdf

19. Яцків І., Іваночко М., Байляк М. Паростки броколі стимулюють антиоксидантний захист і детоксикаційні процеси у мозку мишей за споживання кафетерійної їжі // *XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – С. 79-80.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2025/06/pimb-tezi-2025-A5.pdf

20. Ivanochko M., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Consumption of broccoli sprouts with cafeteria diet modulates activities of glutathione-related enzymes in the murine brain // *XXIII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених* (м. Львів, 15-16 травня 2025 р.). – С. 42.

URL: https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2025/2/AB_2025_27_2.pdf

21. Ivanochko M., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Consumption of a cafeteria diet with green broccoli sprouts affects xenobiotic detoxification rather than oxidative stress markers in murine liver // *XlX All-Ukrainian Conference of Young Scientists* (м. Київ, 20-21 травня 2025 р.). – С. 33.

URL:https://kbb.cnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/28/2026/03/zbirnyk_tez_khikh_vseukrainskoi_konferentsii_molodykh_vchenykh_imbh_2025.pdf

22. Yatskiv I., Ivanochko M., Bayliak M., Lushchak V. Green broccoli sprouts decrease hepatic triacylglycerol level but do not prevent adipose tissue accumulation in mice on a cafeteria diet // *XlX All-Ukrainian Conference of Young Scientists* (м. Київ, 20-21 травня 2025 р.). – С. 14.

URL:https://kbb.cnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/28/2026/03/zbirnyk_tez_khikh_vseukrainskoi_konferentsii_molodykh_vchenykh_imbh_2025.pdf

23. Ivanochko M., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Addition of broccoli sprouts does not eliminate cafeteria diet-induced suppression of antioxidant enzyme activity in murine brain // Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках» (м. Київ, 28–29 жовтня 2025 р.). – С. 8.

URL: https://fz.kiev.ua/index.php?list1=414

24. Іваночко М., Господарьов Д., Лущак В. Вплив споживання проростків броколі на маркери запалення та детоксикацію ксенобіотиків у печінці мишей, які споживали кафетерійну їжу // Матеріали XX Міжнародної наукової конференції «Чаргаффські читання» (м. Чернівці, 27 – 30 жовтня 2025 р.). – С. 179.

URL:https://archer.chnu.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/13087/CHARGAFF%20READINGS-2025.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Зміст

Перелік умовних скорочень 17
Вступ 19
Розділ 1. Огляд літератури 25
1.1 Загальна характеристика ожиріння 25
1.2 Кафетерійна їжа як причина ожиріння 28
1.3 Зв'язок ожиріння з оксидативним стресом 29
1.4 Захисна дія Nrf2 при оксидативному стресі 31
1.5 Роль Nrf2 в обміні речовин та розвитку ожиріння 34
1.6 Використання броколі та її сполуки сульфорафану проти метаболічних порушень та ожиріння 38
1.7 Використання мишей для дослідження метаболічних порушень 41
Розділ 2. Матеріали та методи дослідження 44
2.1 Вирощування препаратів броколі 44
2.2 Визначення вмісту сполук у препаратах броколі 44
2.2.1 Визначення вмісту пігментів 45
2.2.2 Визначення вмісту крохмалю 45
2.2.3 Визначення вмісту проліну 46
2.2.4 Визначення вмісту вітаміну B_1 46
2.2.5 Визначення вмісту аскорбінової кислоти 47
2.2.6 Визначення вмісту вітаміну Р 47
2.3 Приготування водних і спиртових екстрактів броколі 48
2.3.1 Визначення вмісту загального білку 48
2.3.2 Визначення вмісту фруктози 49
2.3.3 Визначення загального вмісту поліфенольних сполук 49
2.3.4 Визначення вмісту флавоноїдів 49
2.4 Визначення загальної антиоксидантної активності препаратів броколі 50
2.5 Визначення вмісту сульфорафану у проростках броколі 51

2.6 Утримання лабораторних мишей 53
2.6.1 Опис дослідних груп експерименту зі споживанням паростків броколі 54
2.6.2 Опис дослідних груп експерименту з різним вмістом проростків броколі 55
2.6.3 Опис дослідних груп експерименту зі споживанням проростків броколі 57
2.7 Тест «Відкрите поле» для визначення поведінки мишей 58
2.8 Глюкозотолерантний тест та визначення рівня глюкози в крові мишей 59
2.9 Забір органів та тканин мишей 60
2.10 Визначення гематологічних параметрів крові мишей 61
2.11 Визначення біохімічних параметрів плазми крові мишей 61
2.12 Визначення вмісту пероксидів ліпідів у печінці та корі головного мозку мишей 63
2.13 Визначення вмісту карбонільних груп білків у печінці мишей 64
2.14 Визначення активності антиоксидантних та допоміжних до них ферментів у печінці та корі головного мозку мишей 64
2.15 Визначення вмісту триацилгліцеролів, глюкози і глікогену у печінці мишей 68
2.16 Визначення активності гліколітичних ферментів у печінці мишей 69
2.17 Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі зразків печінки мишей 70
2.18 Гістологія зрізів печінки мишей 71
2.19 Статистичний аналіз та візуалізація даних 72
Розділ 3. Результати та їх обговорення 73
3.1 Вміст сполук та загальна антиоксидантна активність препаратів броколі 73
3.1.1 Вміст пігментів у препаратах броколі 73
3.1.2 Вміст крохмалю, проліну та вітаміну B_1 у препаратах броколі 75
3.1.3 Вміст загального білку, фруктози, поліфенольних сполук та флавоноїдів у препаратах броколі 76
3.1.4 Загальна антиоксидантна активність препаратів броколі 79
3.1.5 Вміст сульфорафану у проростках броколі 83

3.2 Вплив споживання паростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей 85
3.2.1 Споживання їжі та рідини мишами 85
3.2.2 Маса тіла та тканин мишей 87
3.2.3 Гематологічні та біохімічні параметри крові мишей 89
3.2.4 Маркери оксидативного стресу у печінці та корі головного мозку мишей 92
3.2.5 Активність ферментів антиоксидантного захисту у печінці мишей 93
3.2.6 Вміст триацилгліцеролів і глікогену в печінці мишей 95
3.2.7 Активність ферментів антиоксидантного захисту у корі головного мозку мишей 97
3.3 Вплив різного вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей 98
3.3.1 Споживання їжі та рідини мишами 98
3.3.2 Маса тіла та органів мишей 100
3.3.3 Гематологічні та біохімічні показники крові мишей 103
3.3.4 Активність ферментів антиоксидантного захисту у корі головного мозку мишей 107
3.4 Вплив споживання проростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей 109
3.4.1 Споживання їжі та води мишами 109
3.4.2 Маса тіла та органів мишей 112
3.4.3 Тест «Відкрите поле» 115
3.4.4 Гематологічні та біохімічні параметри крові мишей 116
3.4.5 Маркери оксидативного стресу у печінці та корі головного мозку мишей 119
3.4.6 Активність антиоксидантних ферментів у печінці мишей 119
3.4.7 Вміст триацилгліцеролів та глікогену у печінці мишей 126
3.4.8 Активність гліколітичних ферментів та фруктокінази у печінці мишей 128

3.3.9 Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі зразків печінки мишей 132
3.4.10 Гістологія зразків печінки мишей 135
3.4.11 Активність ферментів антиоксидантного захисту у корі головного мозку мишей 138
Розділ 4. Узагальнення 141
4.1 Вміст сполук та загальна антиоксидантна активність препаратів броколі 141
4.2 Вплив споживання паростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей 142
4.3 Вплив споживання різного вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей 145
4.4 Вплив споживання проростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей 147
4.5 Узагальнення впливу споживання препаратів броколі на мишей 151
Висновки 154
Список використаних джерел 155
Додатки 187

Перелік умовних скорочень

$ABTS^{\bullet+}$ – 2,2′-азино-біс(3-етиленбензтіазолін-6-сульфонату) катіон-радикал

ARE – елемент антиоксидантної відповіді

BSA – бичачий сироватковий альбумін

DCPIP – 2,6-дихлорфеноліндофенол

GSH – відновлений глютатіон

GSSG – окислений глютатіон

IL-1β – інтерлейкін-1-бета

IL-6 – інтерлейкін 6

Keap1 – Kelch-подібний ECH-асоційований білок 1

Nrf2 – пов'язаний з фактором 2 ядерний фактор еритроїд 2

TNF-α – фактор некрозу пухлин альфа

АФК – активні форми кисню

БАПР – біологічно активні природні речовини

ВКЇ – висококалорійна їжа

ВЕП – водний екстракт паростків броколі

ВЕПР – водний екстракт проростків броколі

ВЖК – вільні жирні кислоти

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

ГST – глютатіон-S-трансфераза

ГК – гексокіназа

ГП – глютатіонпероксидаза

ГР – глютатіонредуктаза

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕТЛ – електроннотранспортний ланцюг

ЗАА – загальна антиоксидантна активність

іРНК – інформаційна рибонуклеїнова кислота

КФБ – калій-фосфатний буфер

МПО – мієлопероксидаза

НАДН/НАД$^+$ – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений/окислений

НАДФН/НАДФ$^+$ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений/окислений

НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки

НХО1 – НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктаза 1

ОС – оксидативний стрес

ПК – піруваткіназа

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПОН – параоксоназа

ПФШ – пентозофосфатний шлях

СОД – супероксиддисмутаза

СЕП – спиртовий екстракт паростків броколі

СЕПР – спиртовий екстракт проростків броколі

СФН – сульфорафан

ТАГ – триацилгліцероли

ТХО – трихлороцтова кислота

ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид

ФК – фруктокіназа

ФФК – фосфофруктокіназа

ХДНБ – 1-хлоро-2,4-динітробензол

Вступ

Актуальність теми. Біологічно активні харчові компоненти розглядаються як засоби профілактики та усунення порушень обміну речовин, зокрема ожиріння [1–3]. Ожиріння супроводжується порушенням метаболізму, надлишковим накопиченням ліпідів з ураженням різних тканин і органів, оксидативним стресом, запаленням та можливістю виникнення серцево-судинних захворювань та цукрового діабету [4–6]. Наслідком цього є ускладнена життєдіяльність, збільшені ризики для здоров'я та зростання смертності, особливо у так званих розвинених країнах [4,7].

Їжа західного типу, або кафетерійна їжа, – це швидкі, доступні, висококалорійні продукти харчування людини, які містять багато вуглеводів та жирів для забезпечення енергетичних потреб людського організму. Проте кафетерійна їжа бідна на корисні сполуки, вітаміни і клітковину, а її надмірне споживання може викликати розвиток метаболічних порушень у дорослих та дітей [8,9]. Цю їжу використовують також для моделювання ожиріння у лабораторних тварин і перевірки ефективності лікарських засобів чи режимів харчування для його усунення [10,11].

Броколі є популярним овочем завдяки добре вивченій користі для здоров'я [7,12]. Триденні проростки броколі містять різноманітні біологічно активні природні речовини, які мають антиоксидантні, протизапальні та протиракові властивості [13,14]. Серед цих сполук ізотіоціанат сульфорафан (СФН) вважається перспективним для лікування багатьох захворювань, зокрема ожиріння [15].

Сульфорафан є активатором залежного від NF-E2 фактору-2 (Nrf2). Транскрипційний фактор Nrf2 є важливим регулятором окисно-відновного гомеостазу клітин завдяки здатності регулювати експресію антиоксидантних та інших захисних білків [7]. Також Nrf2 регулює обмін вуглеводів та ліпідів, тому він розглядається як мішень для стратегій проти порушень обміну речовин [16,17]. Броколі та СФН застосовувалися у дослідженнях усунення метаболічних

порушень. Проте тип рослинного матеріалу і джерело СФН не завжди були уніфіковані, а використання комерційно доступних очищених препаратів СФН є дискусійним через сумнівну ефективність, невстановлені побічні ефекти чи протипоказання [18–20]. Натомість, паростки та проростки броколі є простим, доступним і надійним джерелом сульфорафану та інших корисних сполук. Визначення складу препаратів броколі, як і впливу споживання цієї рослинної добавки на профілактику та усунення моделі ожиріння у лабораторної миші є перспективним напрямком досліджень.

Зв'язок цієї роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу проводили з 2022 до 2025 р. на кафедрі біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника як частину наукової тематики кафедри. Робота фінансувалася у рамках проєкту Міністерства науки та освіти України «Корекція метаболічного синдрому збагаченими сульфорафаном препаратами з проростків броколі» (№ держреєстрації – 0122U000894, з 1 січня 2022 по 31 грудня 2024 року). Дисертант був співвиконавцем проєкту та проводив частину досліджень.

Мета і завдання дослідження. *Метою* роботи було встановити вплив споживання препаратів броколі *Brassica oleracea var. italica* на обмін речовин і антиоксидантну систему у лабораторних мишей *Mus musculus*, які споживали кафетерійну їжу.

Завдання роботи:

1. Визначити вміст біологічно активних природних речовин та параметри загальної антиоксидантної активності у препаратах броколі.

2. Дослідити вплив паростків броколі на параметри лабораторних мишей при споживанні кафетерійної їжі.

3. Дослідити вплив проростків броколі на параметри лабораторних мишей при споживанні кафетерійної їжі.

Об'єкт дослідження – параметри тіла, антиоксидантна система, обмін речовин, транскрипція генів у лабораторних мишей *Mus musculus*.

Предмет дослідження – фізіологічні показники, поведінка мишей, показники обміну речовин, антиоксидантного захисту і запалення, відносний рівень транскрипту іРНК генів, гістологічні зрізи печінки лабораторних мишей, які споживали базову або кафетерійну їжу з, або без додавання зразків броколі.

Методи дослідження включали *фізіологічні* (визначення споживання їжі та рідини, визначення маси тіла мишей, оцінка поведінки мишей у тесті «Відкрите поле»), *гістологічні* (виготовлення і аналіз зрізів печінки мишей), *біохімічні* (визначення вмісту біологічно активних природних сполук у зразках броколі, метаболітів у крові та печінці мишей (глюкози, глікогену, триацилгліцеролів, холестеролу і загального білку), активності антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів у печінці та корі головного мозку мишей (супероксиддисмутази, каталази, глютатіонпероксидази, глютатіон-S-трансферази, глютатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1), активностей ключових ферментів шляхів катаболізму глюкози і фруктози у печінці мишей (гексокінази, фосфофруктокінази, піруваткінази, фруктокінази), активностей ферментів плазми крові (параоксонази та мієлопероксидази), маркерів оксидативного стресу у печінці та корі головного мозку мишей (рівнів пероксидів ліпідів, карбонільних груп білків)), *молекулярно-біологічні* методи (оцінка транскриптів генів методом полімеразної ланцюгової реакції у печінці мишей, нативний гель-електрофорез білків у печінці мишей) та методи *математичної статистики*.

Наукова новизна отриманих результатів. У цій роботі вперше показано, що споживання мишами проростків та паростків броколі вплинуло на окремі показники обміну речовин та оксидативного стресу при споживанні кафетерійної їжі. Споживання кафетерійної їжі не викликало значного збільшення маси тіла мишей, проте сприяло зростанню маси вісцеральної жирової тканини у тілі мишей, накопиченню триацилгліцеролів та розвитку запальних процесів у печінці мишей. Паростки і проростки броколі усували накопичення триацилгліцеролів у печінці мишей. Проростки броколі усували накопичення глікогену у печінці, стимулювали залежні від глютатіону антиоксидантні ферменти у печінці та корі

головного мозку мишей. Також проростки броколі сприяли детоксикації ксенобіотиків та протизапальним процесам при споживанні разом з базовою чи кафетерійною їжею. Споживання кафетерійної їжі підвищувало активність гліколітичних ферментів, а додавання проростків броколі нормалізувало ці параметри до показників групи з базової їжею. При збільшенні вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі було виявлено зниження споживання їжі мишами і зниження рівня триацилгліцеролів у плазмі крові мишей. Це дослідження демонструє вибірковий вплив споживання препаратів броколі на ознаки розвитку ожиріння, проте свідчить про стимулювання антиоксидантних, протизапальних та детоксикаційних систем організму миші.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати показують, що споживання препаратів броколі вибірково впливає на фізіологічні параметри, обмін речовин та антиоксидантний захист у мишей при споживанні кафетерійної їжі. Споживання саме проростків броколі покращувало захисні параметри печінки мишей проти оксидативного стресу і запалення, які виникали при порушенні обміну речовин внаслідок споживання кафетерійної їжі. Отримані нами дані разом з літературними дозволяють запропонувати проростки броколі як перспективні препарати для зменшення негативної дії їжі західного типу на здоров’я тварин та людей.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційне дослідження виконане під керівництвом професора кафедри біохімії та біотехнології, доктора біологічних наук Володимира Лущака. Дисертант самостійно здійснив пошук та аналіз наукової літератури за тематикою дисертаційного дослідження, виконав експериментальну частину роботи, здійснив статистичний аналіз даних, перевірку та візуалізацію отриманих результатів, сформулював головні положення і написав усі розділи дисертації. Планування експериментів, аналіз даних та обговорення отриманих результатів, приготування рукописів статей до публікації проводилось з науковим керівником Володимиром Лущаком за консультативної допомоги професора, доктора біологічних наук Марії Байляк. Технічну допомогу у виконанні експериментальної частини роботи надавали студенти та працівники

кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника. Співучасть у виконанні цієї роботи студентів та співробітників кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника висвітлена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на конференціях: 92-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2023), III міжнародній науково практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 2023), X Міжнародній науково-практична конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (Харків, 2023), Шостій міжнародній конференції молодих учених «Харківський Природничий Форум» (Харків, 2023), 93-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2024), XX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2024), 94-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2025), XXI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2025), XXIII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Львів, 2025), XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists (Київ, 2025), Школі-воркшопі «Сучасні методи в нейронауках» (Київ, 2025), XX Міжнародній науковій конференції «Чаргаффські читання» (Чернівці, 2025), щорічних звітних наукових конференціях Карпатського національного університету ім. Василя Стефаника.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковані 24 праці, зокрема три статті – у міжнародних наукових виданнях, які індексуються наукометричними базами даних Scopus та Web of Science та відносяться до другого і четвертого квартилів (Q2 і Q4) відповідно до класифікації SCImago Journal, дві статті опубліковані в науковому фаховому виданні категорії «Б», та 19 тез доповідей наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та їх обговорення, узагальнення, висновки, список використаних джерел. Кількість сторінок – 216. Кількість рисунків – 45.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1 Загальна характеристика ожиріння

Ожиріння – це захворювання тварин і людей внаслідок накопичення надлишкового вмісту ліпідів у вигляді підшкірних і внутрішніх (вісцеральних) жирових відкладень і з несприятливим впливом на організм. Причиною цього стану є порушення балансу між кількістю спожитих і витрачених калорій разом з іншими чинниками, такими як спадковість, фізіологія та харчова поведінка [4,21]. Розвиток ожиріння також пов'язують з дисбалансом у складі кишкової мікробіоти при недоїданні звичайної їжі або переїданні висококалорійної їжі (ВКЇ) [22–24]. Іншими менш поширеними причинами розвитку ожиріння є порушення сну, хронічний емоційний стрес, вживання ліків, генетичні передумови, хвороби або травми [5,25,26]. Надлишок енергії внаслідок переїдання, проблеми з її розподілом і використанням, розростання вісцеральної жирової тканини, відкладання холестеролу на стінках кровоносних судин, оксидативний стрес (ОС) і запалення прискорюють розвиток гіперглікемії, дисліпідемії, атеросклерозу та інших ризиків для здоров'я [7]. Механізм виникнення метаболічних порушень та ожиріння внаслідок споживання ВКЇ схематично зображено на Рис. 1.1. Прояви та ризики від ожиріння не лише ускладнюють життєдіяльність та погіршують здоров'я, але й можуть збільшити смертність населення.

Жирова тканина є частиною нормальної життєдіяльності організму. Вона поділяється на буру та білу. Адипоцити бурої жирової тканини містять багато мітохондрій, на внутрішній мембрані яких є багато роз'єднувального білку 1 (Uncoupling protein 1, UCP-1), що відповідає за термогенез через розсіювання надлишку отриманої чи виробленої енергії у вигляді тепла [29]. Біла жирова тканина містить адипоцити з запасними речовинами, попередники цих клітин, фібробласти та макрофаги, що мають функції відмінні від накопичення ліпідів [30–32].

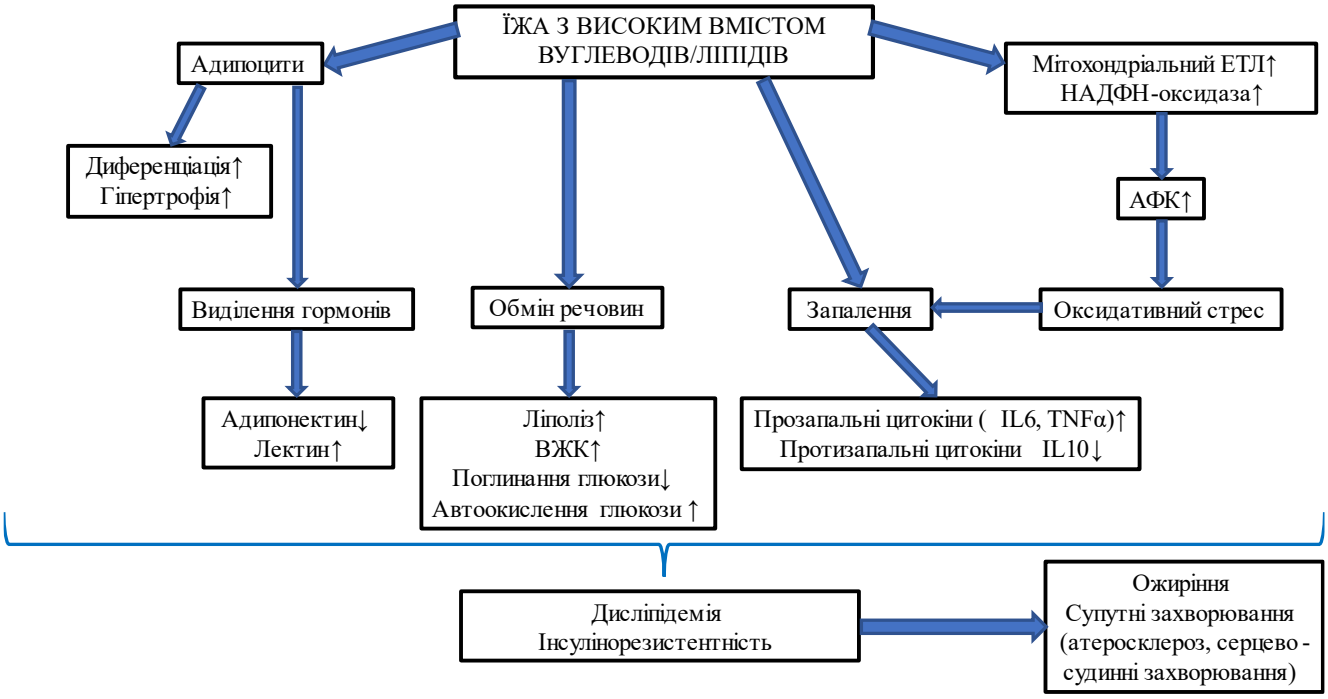


Рис. 1.1. Механізм виникнення ожиріння. Прийняті скорочення: *ЕТЛ – електроннотранспортний ланцюг, АФК – активні форми кисню, ВЖК – вільні жирні кислоти.* Пояснення в тексті.

Жирова тканина діє не лишень як біологічний резервуар енергії для критичних станів, таких як хвороба, стрес, голодування або виживання [4,33,34]. Вона також продукує різні регуляторні молекули (адипонектин та лептин), прозапальні цитокіни та інтерлейкіни, що є важливою частиною ендокринної системи [35–37]. Утворення цих гормонів змінюється при ожирінні. Адипонектин є важливим гормоном та біомаркером, зв'язком жирової тканини з іншими органами для обміну інформацією про енергетичний стан організму [35,38,39]. Він також протидіє запаленню і атеросклерозу [40,41]. Було встановлено, що адипонектин регулює адипогенез, проте його секреція в кров знижується при накопиченні жирової тканини [38]. Лептин є одним з гормонів апетиту, споживання їжі, регуляції маси тіла, ліполізу та прозапальної імунної відповіді [42–44]. Менший вміст лептину був зафіксований при голодуванні, а більший вміст – при ожирінні [45–47]. Гормони, які продукуються іншими органами, теж впливають на розвиток ожиріння. Грелін (гормон відчуття голоду), кортизол

(гормон стресу), естроген (гормон жіночої репродуктивної системи) є важливими факторами, що сприяють ожирінню [48–50].

При збільшенні розмірів адипоцитів порушується синтез адипонектину та адипонектинових рецепторів. Внаслідок цього порушується чутливість до гормону інсуліну з подальшим зменшенням надходження не тільки глюкози, а й вільних жирних кислот (ВЖК) і уповільненням ліпогенезу [51]. Зменшення чутливості до інсуліну зменшує рівень основного регульованого інсуліном переносника глюкози GLUT4 та активує чутливу до гормону ліпазу в адипоцитах [52]. У жировій тканині стимулюється ліполіз з вивільненням ВЖК у кров. Останні поглинаються печінкою та м'язами, що супроводжується зниженням чутливості цих тканин до інсуліну. Це призводить до зростання рівня глюкози в крові [53]. Надлишок ВЖК в печінці стимулює синтез і накопичення триацилгліцеролів (ТАГ), що погіршує функцію печінки і призводить до розвитку так званої неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП). Порушення біосинтезу ліпідів у печінці викликає атерогенну дисліпідемію у крові і атеросклероз судин. Окрім того, нечутлива до інсуліну та реального рівня глюкози в крові печінка активує глюконеогенез з вивільненням глюкози в кров, що також сприяє розвитку гіперглікемії [3,53,54].

Адипоцити пацієнтів з ожирінням мають менше інсулінових рецепторів на мембрані клітин та більше бета-3 адренергічних рецепторів, що збільшує швидкість ліполізу з вивільненням ВЖК порівняно з показниками у здорових людей [30]. Ця ситуація має кілька наслідків: збільшення утворення активних форм кисню (АФК), сприяння інсулінорезистентності, надмірне утворення прозапального цитокіну інтерлейкіну 6 (IL-6) та фактору некрозу пухлин (TNF-α), а також індукція апоптозу в бета-клітинах підшлункової залози. Разом ці ефекти класифікуються як ліпотоксичність. Остання спричиняє як анатомічні, так і функціональні пошкодження різних клітин. Дисфункція жирової тканини, а також ліпотоксичність, є двома механізмами, які пояснюють виникнення запалення, оксидативного стресу, інсулінорезистентності та прогресування захворювань [55,56].

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) охарактеризувала ожиріння як епідемію у 1997 році через стрімке зростання випадків захворювання та діагностування цього стану [27]. На сьогоднішній день у світі налічується ~1,9 млрд людей з ожирінням, а за даними ВООЗ ~2,8 млн пацієнтів помирають щороку від наслідків цієї недуги [4,7]. В Україні, зокрема, згідно з даними Державної служби статистики, у 2020 році 39,7% дорослих мали надмірну масу тіла, 16% – ожиріння, а 0,7% – екстремальне ожиріння [6]. За відсутності стратегій боротьби, попередження та усунення припускається, що кількість пацієнтів з ожирінням у світі зросте вже до 2050 року, ускладнивши роботу системи охорони здоров'я та медичного страхування [28]. Ожиріння в дітей та дорослих є загрозою здоров'ю та рівню життя уже в глобальному масштабі.

Надлишок отриманих з їжею калорій вважається найпоширенішою причиною розвитку ожиріння, тоді як генетичні передумови, хвороби та стрес діагностуються рідко. Постійне висококалорійне харчування, наприклад, кафетерійна їжа, шкодить здоров'ю людини і доступне для більшості населення розвинутих країн.

1.2 Кафетерійна їжа як причина ожиріння

Сучасний стиль життя значно вплинув на розповсюдження метаболічних порушень та ожиріння [8]. Багато людей веде малорухомий спосіб життя під час офісної роботи і пасивний відпочинок на дозвіллі. Культура споживання та тип їжі також зазнали істотних змін. Швидкозасвоювані, недорогі та висококалорійні продукти харчування були названі кафетерійною їжею, або їжею західного типу харчування [57]. Це солодкі, смачні, поживні продукти харчування з привабливою текстурою, такі як шоколад, різні солодощі, газовані напої, чипси, жирне, надто обсмажене м'ясо, картопля фрі або інші типи так званих фаст-фудів [9]. Однак такі страви бідні на мінерали, вітаміни, клітковину та інші корисні сполуки та інгредієнти, такі як фрукти, овочі, зелень тощо [58]. Мізерний вміст корисних сполук у цій їжі є також важливим фактором при переїданні, що продовжується

до отримання потрібної кількості вітамінів та мікроелементів. При цьому різноманітність жирів у кафетерійній їжі, на відміну від їжі з одним типом жиру, дозволяла лабораторним тваринам споживати більше їжі без відчуття переїдання [59]. Окрім цього, кафетерійна їжа має привабливі смакові та гедоністичні властивості, її споживання викликає оросенсорну реакцію та стимуляцію системи винагороди мозку подібним чином, як це роблять наркотичні речовини [60].

Кафетерійна їжа є зручною моделлю розвитку ожиріння у лабораторних тварин. Вона не лише сприяє збільшенню маси тіла та ожирінню, а й викликає розвиток симптомів метаболічного синдрому, цукрового діабету II типу, жирового захворювання печінки та інших порушень обміну речовин [11,61]. Окрім цього, було підтверджено, що кафетерійна їжа провокує переїдання у гризунів, аналогічно до поведінки людей, які споживають цю їжу [62]. Як підсумок, кафетерійна їжа є важливим інструментом для виникнення метаболічних порушень у гризунів, що добре імітує ожиріння людей [10].

Для дослідів з харчовим розвитком ожиріння є комерційно доступна ВКЇ, яку розробляють для застосування лише на лабораторних тваринах (наприклад, гризуни). Така їжа може містити багато жирів чи вуглеводів або один ключовий компонент (наприклад, лише фруктозу чи смалець). Проте застосування кафетерійної їжі людини для мишей уможливлює екстраполяцію як ризиків, так і інших результатів між цими двома організмами. Кафетерійна їжа також небезпечна через високий вміст шкідливих сполук, наприклад, різних вуглеводів і трансжирів, які є в складі продукту. Кінцеві продукти глікації (Advanced glycation end-products, AGEs) утворюються у кафетерійній їжі мимоволі під час приготування чи обробки. Перелічені шкідливі сполуки сприяють порушенню обміну речовин і розвитку оксидативного стресу.

1.3 Зв’язок ожиріння з оксидативним стресом

Оксидативний стрес (ОС) виникає внаслідок підвищення стаціонарного рівня активних форм кисню в клітині. Крім тимчасового або довготривалого

підвищення утворення, сповільнена елімінація АФК є також причиною виникнення ОС. Активні форми кисню порушують клітинні метаболічні та сигнальні шляхи, спричиняють окислювальні модифікації макромолекул організму і загибель клітин через некроз або апоптоз [63]. Дослідження різних вчених підтверджують, що ожиріння супроводжується розвитком ОС, проте досі точаться дискусії, чи оксидативний стрес є наслідком ожиріння, чи його причиною [4,36,64]. Цей стрес розвивається не лише в жировій тканині, а й у багатьох інших органах, таких як печінка, м'язи, серце, нирки та мозок, де порушується обмін речовин [65–67].

У тваринних моделях ожиріння, яке викликали їжею, спостерігалася активація систем, що беруть участь в утворенні АФК, і зростання рівня окислених біомолекул. Як відповідь клітини, була встановлена модуляція систем антиоксидантного захисту [66–68]. Вищі рівні маркерів ОС є сигналом про надпродукцію АФК чи проблему їх утилізації, і вони були встановлені у крові дітей та дорослих пацієнтів з ожирінням [64,69,70]. Цими маркерами є зростання вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів, карбонільних груп білків, рівня окислених ліпопротеїнів низької або дуже низької щільності у плазмі крові, малонового диальдегіду, продуктів окислювального пошкодження ДНК, а також кінцевих продуктів глікації [71–73].

Ключовим місцем для утворення АФК під час нормального метаболізму є мітохондріальний електроннотранспортний ланцюг (ЕТЛ), НАДФН-оксидаза та ксантиноксидоредуктаза [74–76]. При функціонуванні ЕТЛ активні форми кисню є побічними продуктами нормального метаболізму кисню. Вони елімінуються мітохондріальними антиоксидантними ферментами (наприклад, Mn-вмісною супероксиддисмутазою) та низькомолекулярними антиоксидантами, присутніми у мітохондріях (тіоредоксин, глютатіон) [67,77]. Надлишок енергетичних молекул ацетил-КоА внаслідок катаболізму глюкози або ліпідів може перевантажити комплекси ЕТЛ, що спричиняє інтенсифікацію утворення АФК при ожирінні [78–80].

Зв’язана з плазматичною мембраною НАДФН-оксидаза (NOX) також є джерелом АФК у жировій тканині, хоча її основна роль – це знищення патогенів імунними клітинами [76,81,82]. Було встановлено, що вищий вміст глюкози та ВЖК стимулює утворення АФК через залежну від протеїнкінази С активацію NOX [83]. Вищий рівень транскрипту генів субодиниць НАДФН-оксидази спостерігалася у тваринних моделях з генетичним або індукованим їжею ожирінням [68,71,84]. Зокрема, у мишей з ожирінням спостерігався вищий рівень транскрипту інформаційної рибонуклеїнової кислоти (іРНК) ізоформи NOX4 у жировій тканині, але не в печінці чи м’язах [71]. Водночас у трансгенних мишей та щурів із вимкненими генами ізоформ NOX2 або NOX4 було зменшене запалення жирової тканини та уповільнений розвиток інсулінорезистентності при споживанні ВКЇ [81,85,86].

Ксантиноксидаза також може бути джерелом АФК в адипоцитах. Цей фермент відновлює нікотинамідаденіндинуклеотид окислений ($НАД^+$) до нікотинамідаденіндинуклеотиду відновленого (НАДН), що спряжено з метаболізмом пуринів, каталізуючи перетворення гіпоксантину на ксантин, а останнього на сечову кислоту з одночасним утворенням супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\bullet-}$) та пероксиду водню H_2O_2 [87,88]. У людей з ожирінням спостерігалася вища активність ксантиноксидази в сироватці крові і вищий рівень сечової кислоти та ксантину [87,89].

Ожиріння та оксидативний стрес часто вивчаються разом, особливо під час застосування ліків та добавок, які також демонструють антиоксидантну здатність через вміст антиоксидантів чи сполук, що сприятливо впливають на захисні системи організму [4,90,91].

1.4 Захисна дія Nrf2 при оксидативному стресі

Однією з захисних систем клітини проти оксидативного стресу є пов'язаний з фактором 2 ядерний фактор еритроїд 2 (Nuclear factor, erythroid 2 like 2, Nrf2). Він є транскрипційним фактором, що належить до підродини факторів cap «n»

collar (CNC) лейцинової застібки базового регіону (bZIP) [92]. Також Nrf2 залучений у детоксифікацію ксенобіотиків [93]. За нормальних умов білок Nrf2 постійно синтезується у цитоплазмі (Рис. 1.2).

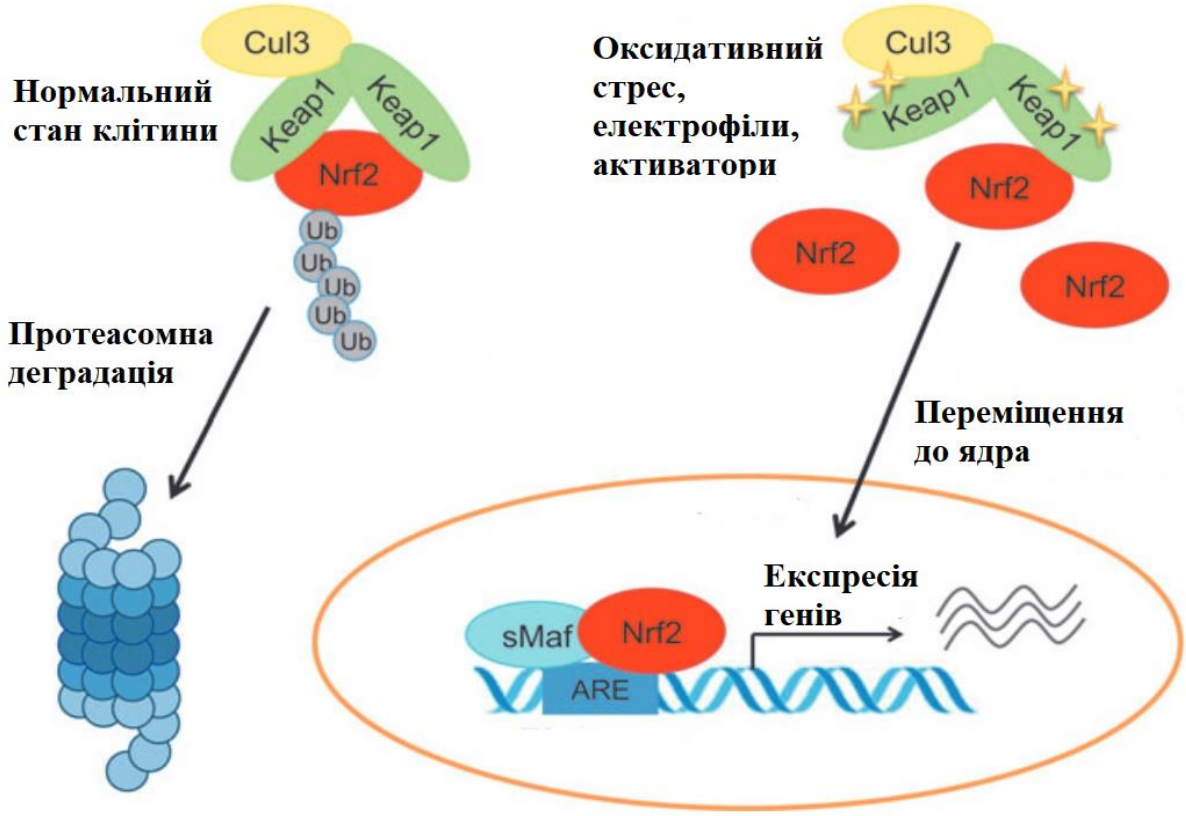


Рис. 1.2. Активація та дія Nrf2. Модифіковано з джерел [7,94]. За нестресових умов Keap1 захоплює Nrf2, останній убіквітинується ферментом убіквітинлігазою Cul3 і далі розщеплюється протеасомою. В умовах оксидативного стресу, під дією електрофілів чи активаторів Keap1 інактивується, що призводить до вивільнення та переміщення Nrf2 до ядра. Nrf2 гетеродимеризується з малими білками Maf, зв'язується з ділянкою ДНК, названою ARE (Antioxidant Response Element), і активує транскрипцію своїх цільових генів.

Подальший захисний потенціал Nrf2 стримується Kelch-подібним ECH-асоційованим білком 1 (Keap1) і убіквітин лігазою cullin 3, внаслідок чого настає протеасомна деградація Nrf2 (Рис. 1.2) [94,95]. Цистеїнові залишки Keap1 чутливі до дії оксидантів, АФК та електрофілів, що є частиною відповіді клітини на

оксидативний стрес. При окисній модифікації Keap1 Nrf2 уникає захоплення і стає можливою транслокація останнього до ядра [7,96]. Білок Nrf2 зв'язується з спеціальною ділянкою ДНК, яка названа «елементом антиоксидантної відповіді» (Antioxidant Response Element, ARE), оскільки координує відповідь клітини для забезпечення захисних дій чи детоксифікації ксенобіотиків [97,98].

Білок Nrf2 регулює експресію генів чиї білкові продукти беруть участь в утилізації АФК, наслідків їх руйнівної дії, детоксикації ксенобіотиків та подоланні оксидативного стресу. Мішенями Nrf2 є супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, залежні від глютатіону ферменти глютатіонпероксидаза (ГП) та глютатіон-S-трансфераза (GST), ферменти тіоредоксинредуктаза і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г6ФДГ). Фермент ГП знешкоджує пероксид водню з використанням трипептиду глютатіону (GSH). Глютатіон-S-трансфераза належить до ферментів другої фази детоксикації ксенобіотиків [99,100]. Вона нейтралізує ліпофільні неполярні ксенобіотики шляхом перетворення останніх у водорозчинну форму, яку легше видалити з клітини [101,102]. Тіоредоксинредуктаза відновлює окислений тіоредоксин. Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа відновлює нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$), необхідний для відновлення глютатіону глютатіонредуктазою (ГР). Мішенню Nrf2 також є НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктаза 1 (НХО1) [103]. Фермент НХО1 є багатофункціональним: він каталізує реакцію детоксикації хінонів і підтримує відновлену форму деяких антиоксидантів [104,105].

Антиоксидантний захист сприяє знешкодженню АФК. Проте стан цієї системи був визнаний двояким під час ожиріння. Була можлива як протидія клітини оксидативному стресу, так і відсутність його розвитку та захисної відповіді (стаціонарний рівень маркерів ОС чи антиоксидантних ферментів) [67,107,108]. Деякі дослідження свідчать і про зниження потенціалу антиоксидантної системи при ожирінні [64,71,107]. Такі розбіжності пов'язані з різною просторово-часовою динамікою досліджень. Неоднозначну роль Nrf2 також приписують при регуляції обміну речовин і її порушеннях.

1.5 Роль Nrf2 в обміні речовин та розвитку ожиріння

Шлях Nrf2 є важливим для відновлення гомеостазу клітин та тканин шляхом послаблення інтенсивності ОС. Це робить Nrf2 мішенню для лікування метаболічної дисфункції при порушеннях обміну речовин та ожирінні, які супроводжуються ОС [16,17]. Білок Nrf2 також є одним з регуляторів експресії низки генів, білкові продукти експресії яких беруть участь у важливих метаболічних шляхах. Зокрема, Nrf2 збільшує експресію генів ферментів вуглеводного обміну – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ), ключового ферменту пентозофосфатного шляху (ПФШ), а також 6-фосфоглюконатдегідрогенази, транскетолази та трансальдолази 1. Зростання активності Г6ФДГ та 6-фосфоглюконатдегідрогенази є також компонентом відповіді на ОС. Ці ферменти каталізують реакції вуглеводного обміну, під час яких відбувається відновлення $НАДФ^+$ до НАДФН (нікотинаденіндинуклеотидфосфату відновленого). Кофермент НАДФН використовується для відновлення глютатіону, основного клітинного низькомолекулярного антиоксиданту, а також білку тіоредоксину [100]. У дослідженні з восьмитижневими самцями мишей C57BL/6 з вимкненим геном Keap1 рівень НАДФН у печінці був вищим від такого у «дикого» типу [109].

Дослідження мишей з генетичними маніпуляціями над Nrf2 чи Keap1 продемонстрували, що Nrf2 регулює гліколіз через зростання активності ключових гліколітичних ферментів [110]. Зокрема, миші з дефіцитом Keap1 мали вищу активність гексокінази та піруваткінази, а також вищий рівень АТФ. Окрім того, вестерн-блот показав вищі рівні гліколітичних ферментів, а саме: гексокінази 1, глюкозофосфатізомерази 1, 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-біфосфатази 2, фруктозобісфосфатальдолази А, енолази 1 та енолази 4 у мишей з вимкненим Keap1 [110]. У іншому дослідженні надмірна продукція білку Nrf2 пригнічувала експресію GLUT4, основного транспортера глюкози в залежних від інсуліну тканинах [111]. Білок Nrf2 також змінює активність ферментів

пентозофосфатного шляху (зокрема Г6ФДГ) та впливає на інші ферменти, що каталізують утворення НАДФН [112].

Вплив Nrf2 на накопичення глікогену вважається тканинно-специфічним. Миші з вимкненим Keap1 і активованим Nrf2 показали нижчий рівень глікогену в м'язах [113]. У іншому дослідженні рівень глікогену в печінці мишей був навпаки вищим [114].

За зупинки експресії гену Keap1 білок Nrf2 виявився важливим регулятором вуглеводного та ліпідного обміну через репресію глюконеогенезу та ліпогенезу [7,17,115]. Гіпоморфні миші (*keap1-hypo*, обидва алелі Keap1 є гіпоморфними) мали нижчий рівень ТАГ у гепатоцитах та нижчий рівень глюкози в крові натщесерце, а також активований шлях АМФ-активованої протеїнкінази (AMP-activated protein kinase, AMPK), що відповідає за регуляцію запасів енергії в клітинах і сигналізує про її нестачу [116]. В іншому дослідженні повідомлялося, що інактивація Nrf2 у мишей зменшила масу жирової тканини, сприяла утворенню малих адипоцитів та захищала від збільшення маси тіла та ожиріння, які викликали їжею з високим вмістом жирів [117].

Активація шляху Nrf2 уповільнювала зростання маси тіла та захищала від розвитку ожиріння у Keap1-гіпоморфних мишей, яких годували їжею з високим вмістом жирів [118,119]. Це могло бути пов'язано з пригніченням як ліпогенезу, так і глюконеогенезу, регуляцією метаболізму глікогену та захистом від оксидативного пошкодження [116,120].

При ожирінні часто діагностується неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП). У мишей з дефіцитом Nrf2 спостерігався прискорений розвиток цього захворювання [121]. Активація Nrf2 через опосередковане p62 інгибування Keap1 захищала клітини печінки мишей від ОС та ліпотоксичності [122]. У дослідженні на ліподистрофічних мишах активація Nrf2 запобігала розвитку інсулінорезистентності. Цей ефект був пов'язаний з інгибуванням синтази жирних кислот та ацетил-КоА-карбоксилази в печінці [123]. Активація Nrf2 у мишей дикого типу (wild type, WT), які споживали висококалорійну їжу, запобігала

збільшенню маси тіла, підвищенню рівня глюкози в крові, лептину, IL-6, TNF-α, а також розвитку ОС [124].

У дослідженні з мишами *ob/ob* (лінія мутантних мишей, які переїдають через нестачу лептину), яких годували висококалорійною їжею протягом 16 тижнів, підвищений рівень Nrf2 у ядрі супроводжувався підвищенням рівнів відносного транскрипту іРНК генів антиоксидантних ферментів, таких як СОД та ГП [125]. Однак цей ефект не супроводжувався ліполізом і Nrf2 відігравав роль індуктора антиоксидантного захисту, але не репресору розвитку ожиріння [125]. Натомість, в іншому дослідженні на мишах було виявлене зниження рівнів транскрипту іРНК та ДНК-зв'язуючої активності Nrf2 у жировій тканині при 12-тижневому споживанні ВКЇ [126]. Також 12-тижневе споживання ВКЇ не впливало на рівні відносного транскрипту іРНК Nrf2 та його цільових генів HXO1 та гемоксигенази 1 (Heme oxygenase, HO-1) у мишей з вимкненим Nrf2 [127].

Деякі дослідження повідомляють про суперечливу роль Nrf2 в ожирінні та захисті від АФК, так як активація сигналювання Nrf2-ARE може призвести як до корисних, так і до шкідливих наслідків залежно від умов [128]. Суперечки щодо впливу Nrf2 на ожиріння можливі через усі гени, експресія яких регулюється цим біоадаптером, та різноманітні функції їхніх відповідних білків у обміні речовин [112,129]. Білок Nrf2 продемонстрував захисну дію проти АФК та запалення, але тривала активація може призвести до відновлювального стресу, який продовжуватиме прогресування захворювання [130]. Розвинений відновлювальний стрес може зрештою призводити до розвитку оксидативного стресу [98].

У мишей лінії *ob/ob* з дефіцитом лептину та ожирінням вища активність Nrf2 призводила до розвитку інсулінорезистентності, накопичення ліпідів та стеатозу печінки [131]. З іншого боку, дефіцит Nrf2 знижував накопичення ліпідів у мишей *ob/ob* та з ожирінням [132]. Загалом, кілька досліджень повідомляли, що дефіцит Nrf2 призводив до втрати або запобігання набору маси тіла у мишей [17,117,133]. Зокрема, після 12 тижнів споживання висококалорійної їжі миші з вимкненим Nrf2 набирали на 15% більшу масу порівняно з початковою, тоді як

миші дикого типу набирали на 75% більше маси порівняно з початковою. Таким чином, у цьому дослідженні дефіцит Nrf2 запобігав розвитку викликаного дієтою ожиріння [117]. В іншому дослідженні, де мишей годували висококалорійним кормом протягом 90 днів, миші з вимкненим Nrf2 набрали меншу масу тіла, ніж тварини дикого типу [133]. Однак активація Nrf2 у мишей з зупинкою експресії Keap1 також призвела до втрати маси тіла [131].

Після 36 днів висококалорійного харчування миші з зупинкою експресії Keap1 з розблокуванням Nrf2 продемонстрували меншу масу тіла та менше накопичення жиру, ніж миші дикого типу [131]. Додаткове дослідження з мишами та зупинкою експресії Keap1 показало, що Nrf2 не впливає на ожиріння [134].

Активація Nrf2 служить для клітинного захисту від ОС при ожирінні. Антиоксидантна здатність жирової тканини виснажується через розростання та збільшення кількості адипоцитів [30]. Водночас тривала активація Nrf2 порушує окисно-відновний гомеостаз [135]. Безперервна активація Nrf2 в умовах стресу може збільшити накопичення ліпідів, що призводить до інтенсифікації пероксидного окислення ліпідів, пошкодження тканин і запалення [135]. Тому були запропоновані стратегії контролю активності Nrf2 дозуванням і тривалістю застосування його активаторів [135]. У кількох оглядових дослідженнях було проаналізовано роль активаторів Nrf2 як контролерів захисту та усунення ожиріння та пов’язаних з ним захворювань шляхом зниження продукції АФК, накопичення ліпідів та вивільнення прозапальних цитокінів [127,136,137].

Можна припустити, що відмінності в експериментальному дизайні, такі як типи жирів у раціоні, тривалість впливу ВКЇ, стать та генотип мишей, були відповідальними за розбіжності щодо ролі Nrf2 в ожирінні. Підсумовуючи, можна сказати, що періодична активація Nrf2 його активаторами знижує загальну масу тіла та вміст жирової тканини при споживанні ВКЇ, тоді як дефіцит Nrf2 призводить до різних, часто суперечливих результатів.

Генетичні маніпуляції лабораторних тварин є дієвим, але обмеженим способом дослідження впливу Nrf2 на ожиріння. Однак наявні в продуктах харчування активатори Nrf2 є засобами, які можна застосувати і з тваринними

моделями ожиріння, і з пацієнтами, які страждають від цього метаболічного порушення. Одним із таких засобів є капуста броколі, а саме її паростки чи проростки з певними корисними сполуками в них.

1.6 Використання броколі та її сполуки сульфорафану проти метаболічних порушень та ожиріння

Капуста броколі (*Brassica oleracea var. italica*, назву ввів Джозеф Джейкоб Пленк у 1794 р.) – це дуже популярний овоч, який відомий своїми поживними речовинами та багатьма корисними властивостями для здоров'я [7,12,13]. Кілька сортів броколі широко використовуються у сільському господарстві і в лабораторних дослідженнях, а сорт броколі Калабрезе є одним з найбільш поширених [138–140].

Існує багато робіт з суцвіттями, листям, стеблами або мікрозеленню капусти броколі, але дослідники звертають серйозну увагу на пророщене насіння, зокрема триденні проростки броколі, як харчову добавку або сировину для виробництва ліків [18]. Проростки броколі є джерелом поліфенольних сполук, вітамінів та інших корисних сполук та антиоксидантів [13]. На противагу дозрілим рослинам, проростки броколі містять більше ізотіоціанату сульфорафану (СФН, 1-ізотіоціанат-4-метилсульфонілбутан), структурну формулу якого зображено на Рис. 1.3 [15]. Ця сполука є продуктом гідролізу попередника СФН глюкорафаніну (1-S-[(1E)-5-(метилсульфоніл)-N-(сульфонатоокси)пентанімідоіл]-1-тіо-β-D-глюкопіраноза) під дією ферменту мирозинази при активному рості і поділі клітин рослини чи при пошкодженні рослини шкідниками (комахами) [7]. Сульфорафан також утворюється з глюкорафаніну мікробіотою кишківника людини чи гризунів за під дією ферменту мирозинази [141,142]. Найвищі рівні СФН та його попередника глюкорафаніну були виявлені в насінні броколі та триденних паростках [15]. Цей факт викликав великий інтерес до використання проростків броколі для профілактики та послаблення захворювань як функціонального продукту харчування [14,143]. Вчені розглядають здатність

СФН протидіяти раковим, нейродегенеративним чи метаболічним захворюванням [144].

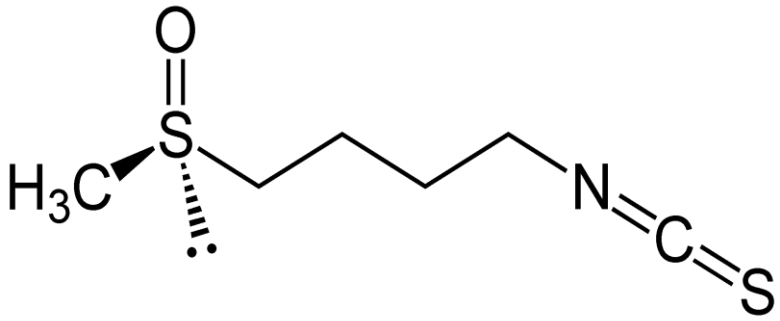


Рис.1.3. **Структурна формула сульфорафану**.

Ізотіоціанат СФН є фармакологічним активатором транскрипційного фактору Nrf2. Цей фактор відповідає за відповідь систем організму на оксидативний стрес [93,94]. Цистеїнові залишки Keap1 чутливі до дії АФК та електрофілів, що є частиною відповіді на ОС. Сульфорафан модифікує Keap1, і внаслідок цього Nrf2 не піддається протеолізу, що забезпечує транслокацію Nrf2 до ядра [7,96]. Там Nrf2 зв'язується зі спеціальною ділянкою ДНК – ARE, яка є у регуляторних ділянках генів, що кодують ферменти захисту від АФК чи детоксифікації ксенобіотиків.

Клінічні чи тваринні дослідження СФН при ожирінні проводилися переважно з використанням напівочищених, комерційно доступних чи неуніфікованих препаратів з броколі, які детально були описані в нашій оглядовій роботі [7]. Проте застосування СФН досі має недоліки, такі як проблема перетворення і стабілізації цієї сполуки, надійного постачальника, оптимальної дози, побічних ефектів та протипоказань [145]. Як рішення, проростки броколі розглядаються як перспективна рослинна харчова добавка через переваги в доступності, простоті вирощування та приготування, можливості варіантів споживання, довірі поряд з синтетичними неперевіреними лікарськими препаратами тощо [18]. Також споживання проростків броколі надає корисну дію багатьох активних сполук для тваринного чи людського організму [12]. Вплив

споживання проростків броколі на ожиріння та активність антиоксидантних і гліколітичних ферментів мало вивчений, але є перспективним напрямком досліджень.

Корисні компоненти броколі роблять її цінним ресурсом у лікуванні захворювань, які пов'язані з оксидативним стресом та запаленням, таких як рак, діабет 2 типу, серцево-судинні захворювання та ожиріння [19,20]. Незважаючи на відомі переваги для здоров'я зрілих рослин броколі, зростає зацікавлення до розуміння динаміки поживних та біохімічних властивостей рослин броколі на різних стадіях розвитку [146,147]. Проростки броколі, тобто пророщене насіння, висіяні у воді, без ґрунту, і вирощені як мікрозелень протягом декількох днів, є особливо цінними завдяки високій концентрації певних біологічно активних сполук порівняно з такими у зрілих рослинах та інших овочах родини *Brassicaceae* [12,146]. Багато досліджень показали, що вміст біологічно активних природних речовин (БАПР) у проростках капусти броколі суттєво варіює залежно від умов вирощування, сорту рослини, періоду дозрівання та деяких інших факторів навколишнього середовища [20,148,149]. Також інгредієнтом страв часто є паростки броколі або молоді рослини, зібрані без насінини, тоді як корисними властивостями пророщеного насіння і їх використанням люди можуть знехтувати.

Порівняльний аналіз антиоксидантних властивостей, вмісту поліфенолів, вуглеводів та СФН у броколі та інших капустяних рослин показав варіювання цих параметрів залежно від фази розвитку рослин. Зокрема, пророщене насіння броколі мало вищі рівні загальних вуглеводів, зокрема фруктози, але нижчі рівні глюкози та загальних фенолів порівняно з мікрозеленню та паростками без насінини [147,150]. Антиоксидантна активність проростків, мікрозелені та вміст сульфорафану змінювалися залежно від використаного методу вирощування [147,150]. Окрім того, умови екстракції або очищення, включаючи використаний розчинник, можуть впливати на вміст біологічно активних речовин та антиоксидантну активність екстрактів броколі [151–153].

Хімічний склад препаратів броколі як харчової добавки також важливий для розуміння та інтерпретації результатів, які отримані в клінічних дослідженнях на людях чи модельних організмах, наприклад, мишах.

1.7 Використання мишей для дослідження метаболічних порушень

Гризуни, зокрема миші, мають переваги у вивченні впливу їжі на розвиток ожиріння та інших метаболічних розладів. Зумовлені їжею зміни у мишей можуть бути очевидними протягом кількох тижнів дослідження, тоді як у людей цей процес може тривати місяцями або й роками, з необхідним відбором та моніторингом пацієнтів, впливом кількох різних факторів одночасно та, звичайно, обсягу та вартості роботи [4,167].

Лабораторна миша (*Mus musculus*, назву ввів Карл Лінней у 1758 р.) є популярним модельним організмом у сучасній біомедичній науці. Миша має переваги у використанні завдяки подібності фізіології, метаболізму та сигнальних шляхів до відповідних у людини, які дозволяють застосовувати цей модельний організм для досліджень у таких галузях, як генетика, нейробіологія, імунологія, онкологія та багато інших.

Лабораторні миші зазвичай належать до стандартизованих інбредних ліній (штамів), виведених на основі стабільності або чіткості прояву специфічних та шкідливих мутацій. В наш час використовуються виведені за допомогою селекції моделі та генетично модифіковані лінії мишей, які схильні до розвитку ожиріння [167]. Багатьма дослідженнями встановлено, що за споживання дієти західного типу у мишей порушувався метаболізм та проявлялися ознаки ожиріння [168–172].

Лінія лабораторних мишей C57BL/6J схильна до розвитку метаболічного синдрому, ожиріння, гіперглікемії та дисліпідемії при годуванні висококалорійною їжею. Ці миші демонструють порушення обміну речовин, які подібні до людських проявів метаболічного синдрому та ожиріння [173].

На жаль, миші, як модельні організми, також мають певні недоліки, зокрема, очікуваний фенотип не завжди проявляється, а створення і обслуговування певної моделі є дорогим і працемістким. Ці недоліки, зазвичай, роблять мишей доступними тільки для великих і добре фінансованих наукових колективів. Також у людини є специфічні ознаки ожиріння, такі як обхват талії і кінцівок, які важко визначати у мишей. Як рішення, вчені визначають зміну маси тварин та накопичення вісцерального жиру [168].

Дослідження впливу споживання препаратів броколі мишами, особливо під час споживання кафетерійної їжі, може надати важливі знання та краще розуміння змін маси тіла, харчової поведінки, накопичення жирової тканини, регуляції метаболічних та захисних механізмів у органах мишей, а також потенційних ризиків та переваг цього харчового додатку.

Печінка – це важливий орган на перехресті біохімічних процесів організму, у якому знешкоджуються шкідливі речовини з кишківника та кровоносного русла і продукуються корисні сполуки для різних частин організму [67,154,155].

Печінка реагує на різні зумовлені харчуванням стани, включаючи тип їжі та захворювання, які та може спричинити. Неалкогольна жирова хвороба печінки є основним ризиком для печінки при порушенні метаболізму та ожирінні. Вона характеризується надмірним аномальним накопиченням жирів з руйнуванням гепатоцитів [156]. Причинами НАЖХП є надлишковий синтез ліпідів *de novo*, накопичення жирних кислот з крові та інсулінорезистентність клітин [156–158]. Саме тому печінка та процеси в ній часто є об’єктами дослідження при моделюванні ожиріння, цукрового діабету ІІ типу та пов’язаних з ними захворювань. Окрім того, отримані в печінці модельних організмів параметри використовуються вченими для дослідження і опису розвитку ожиріння, оскільки це захворювання не завжди супроводжується фізіологічними змінами маси тіла, а прихованим накопиченням ліпідів [159,160].

Накопичення жиру в печінці не залежить від індексу маси тіла та загального ожиріння, але характеризується деякими ознаками інсулінорезистентності у людей з нормальною та надмірною масою тіла. Порушення метаболізму

ліпопротеїнів (дисліпідемія) знижує рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) і підвищує рівень ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), загального холестерину і триацилгліцеролів [161]. Підвищена продукція ЛПНЩ у печінці пов'язана з інсулінорезистентністю, а висока швидкість обміну триацилгліцеролів часто перевищує здатність до секреції. Порушення виведення триацилгліцеролів і недостатнє збільшення мітохондріального β-окислення вільних жирних кислот можуть погіршити цей стан, що може призвести до підвищення рівня пероксидів ліпідів у гепатоцитах, мітохондріальної дисфункції і утворення прозапальних цитокінів [161].

Оксидативний стрес і запалення у мозку можуть відігравати важливу роль у порушенні енергетичного гомеостазу. Ці процеси можуть негативно впливати на регуляцію апетиту і маси тіла, що може сприяти розвитку ожиріння та ускладнює його усунення [162]. Причиною порушення регуляції апетиту і маси тіла є дія прозапальних цитокінів (IL-6, TNF-α), які здатні долати гематоенцефалічний бар'єр мозку і негативно впливати на нейрони та гліальні клітини [163].

Головний мозок відіграє центральну роль в інтеграції сигналів про енергетичний статус організму, тому запалення та оксидативний стрес в мозку розглядається як ризик розвитку порушення цього балансу [164,165]. Було встановлено, що вживання ВКЇ викликає запалення мозку у щурів, а рівні експресії генів, що кодують TNF-α та IL-6, зростають у медіобазальному гіпоталамусі (МВН), який є ключовим центром контролю енергетичного балансу; ці зміни також супроводжувалися розвитком запалення і ОС в печінці та білій жировій тканині [166].

Розділ 2. Матеріали та методи дослідження

2.1 Вирощування препаратів броколі

Препарати броколі (*Brassica oleracea var. italica*, сорт Калабрезе) виростили згідно попереднього опису [13]. Насіння придбали у компанії “SemyaSvet” (Одеса, Україна). Насінини були посаджені на вологий субстрат з медичної вати у прозорих пластикових контейнерах і вирощувалися при 12-годинному циклі світло-темрява (6:00/18:00), температурі +25°C та відносній вологості повітря 50-60%. Триденні проростки були зібрані як ціле пророщене насіння, а п’ятиденні паростки були зрізані з субстрату ножицями і зібрані окремо для перевірки і порівняння вмісту сполук, антиоксидантної активності і здатності обидвох типів препаратів усувати розвиток ожиріння. Світлини зібраних паростків та проростків містяться у Додатку Б. На препаратах не були виявлені видимі бактеріальні та грибкові захворювання. Увесь зібраний рослинний матеріал зберігався у морозильній камері при -20°C і використовувався для біохімічного аналізу та приготування дослідної їжі для мишей.

2.2 Визначення вмісту сполук у препаратах броколі

Вміст біологічно активних природних речовин (БАПР), серед яких пігменти, крохмаль, пролін, вітаміни, фруктоза, поліфенольні сполуки, флавоноїди, визначали у зразках паростків і проростків броколі за попередньо описаними методиками [13]. Для визначень використовували водну і спиртову екстракцію рослинних зразків, а також інші специфічні типи гомогенізації (для пігментів, крохмалю, проліну, вітамінів).

2.2.1 Визначення вмісту пігментів

Вміст пігментів визначали у паростках та проростках броколі згідно модифікованої процедури [174,175]. Рослинний матеріал гомогенізували в ступці вручну у 96% етанолі (1:10, міліграм рослинного матеріалу: мікролітрів спирту) з додаванням чотирьох міліграмів $CaCO_3$, щоб уникнути феофітинізації хлорофілу. Гомогенати були розведені вдвічі спиртом і 2 мл суміші центрифугували у пластикових мікропробірках 5 хв при 5000×g, +4°C з використанням центрифуги Eppendorf 5415R (Eppendorf AG, Німеччина). Супернатанти були зібрані в окремі скляні пробірки, закриті фольгою, і відповідний об'єм спирту був доданий до осаду для подальшої екстракції пігментів з наступними центрифугуваннями. Остаточний супернатант був розведений вдвічі спиртом. Поглинання світла реєстрували у скляній кюветі при довжині світлових хвиль 664 and 648 нм для визначення хлорофілу *a* і *b*, відповідно, і при 470 нм для каротиноїдів за допомогою спектрофотометра Ulab 102U (Ulab Scientific Instruments, Китай). Вміст цих сполук був обчислений за формулою і розрахований як мікрограми на грам сирої маси (мкг/гсм) [176]. Вміст антоціанів визначали за поглинанням світла при 530 нм у попередньому супернатанті, в який додали 1% HCl (вказано кінцеву концентрацію), за коефіцієнтом поглинання 30 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$ і розраховували як наномоль на грам сирої маси (нмоль/гсм) [175].

2.2.2 Визначення вмісту крохмалю

Зразки броколі гомогенізували у дистильованій воді (1:10, грам рослинного матеріалу: мілілітр H_2O). Отримані гомогенати перенесли у скляні пробірки, які закривали кришечками з фольги і нагрівали протягом 30 хв на киплячій водяній бані. Після охолодження до кімнатної температури проби центрифугували 10 хв при 5000×g, +20°C. Супернатанти збирали в окремі пробірки та їх об'єм доводили до 1 мл щоб усунути похибку від випаровування зразків. У кожний зразок додавали по 250 мкл розчину Люголя та дистильованої води. Поглинання світла

отриманим забарвленим комплексом з крохмалю та йоду визначали при довжині хвилі 600 нм у пластиковій кюветі. Розчин крохмалю (0,25 мг/мл) використовувався для побудови калібрувального графіку. Вміст крохмалю був обчислений за допомогою коефіцієнту рівняння лінійної регресії (калібрувального графіку) та виражений у міліграмах на грам сирої маси [13].

2.2.3 Визначення вмісту проліну

Визначення вмісту проліну у препаратах броколі проводили згідно модифікованої процедури описаної у роботі Бейтса та колег [177]. Рослинний матеріал гомогенізували на льоді у середовищі для гомогенізації, яке містило (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, pH 7,0), 0,5 мМ етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) та 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) у співвідношенні 1:10 (1 мг рослинного матеріалу: мкл середовища для гомогенізації). Гомогенати центрифугували у пластикових пробірках при 11300×g, 15 хв, +4°C. Отриманий супернатант змішували з 30% трихлороцтвою кислотою (ТХО) у співвідношенні 2 до 1 (1 мл супернатанту: 0,5 мл кислоти) для осадження білків. Проби центрифугували 5 хв при 4600×g, +20°C. Тоді 200 мкл супернатанту переносили у скляні пробірки і додавали 300 мкл води, 500 мкл 0,5% нінгідрину та 500 мкл крижаної оцтової кислоти. Пробірки з пробами покривали кришечками з фольги та інкубували на киплячій водяній бані протягом 100 хв і далі охолоджували до кімнатної температури. Поглинання світла визначали у скляній кюветі при довжині хвилі 512 нм. Вміст проліну розраховували з допомогою калібрувального графіку і виражали у мг/гсм.

2.2.4 Визначення вмісту вітаміну B_1

Вміст вітаміну B_1 визначали за зв’язуванням з сульфаніловою (4-амінобензенсульфаніловою) кислотою при pH 12,0 з утворенням жовтого

комплексу та поглинанням світла при 490 нм [178]. Наважку броколі (1 г) гомогенізували у 3 мл дистильованої води і фільтрували. Для приготування реактиву, до 0,2 мл 1 М HCl додавали 0,2 мл 0,4% $NaNO_2$ і суміш інкубували на льоді протягом 5 хв. Після інкубації 0,4 мл 2% сечовини додавали до суміші з подальшою інкубацією 3 хв при кімнатній температурі (+20°С). Далі до суміші додавали 0,5 мл 50 мМ сульфанілової кислоти та інкубували 3 хв при +20°С. Після інкубації до суміші додавали 0,35 мл рослинного фільтрату і 0,5 мл 30% NaOH та інкубували 15 хв при +20°С. Поглинання світла визначали у скляній кюветі при 490 нм. Для побудови калібрувального графіку використовували стандартний розчин вітаміну B_1 (гідрохлорид тіаміну, 1 мг/мл). Вміст вітаміну B_1 подавали у мг/гсм.

2.2.5 Визначення вмісту аскорбінової кислоти

Аскорбінову кислоту (вітамін С) визначали титриметричним методом з 2,6-дихлорфеноліндофенолом. Наважку броколі (1 г) гомогенізували у 10 мл 2% HCl. Далі 2 мл профільтрованого гомогенату змішували з 0,5 мл 10% HCl. Суміш титрували 0,001 н розчином натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу (DCPIP) до появи стабільного протягом 30 секунд рожевого забарвлення. Титрування повторювали ще чотири рази з кожним зразком броколі. Вміст аскорбінової кислоти обчислювали у міліграмах на 100 г рослинного матеріалу [13].

2.2.6 Визначення вмісту вітаміну Р

Вітамін Р визначали титриметричним методом Левенталя [13]. Наважку броколі (0,025 г) подрібнювали та заливали 10 мл кип’яченої води. Далі проби нагрівали на киплячій водяній бані протягом 5 хв, тоді охолоджували і фільтрували. Для цього 2,5 мл фільтрату змішували з 25 мл води та 2,5 мл 0,1% розчину індигокарміну. Зразки титрували 0,1 н $KMnO_4$ до появи зелено-жовтого забарвлення. Для титрування контрольної проби використовували дистильовану

воду. Титрування повторювали ще чотири рази з кожним зразком броколі. Вміст вітаміну Р обчислювали у відсотках еквівалентів рутину.

2.3 Приготування водних і спиртових екстрактів броколі

Для подальших визначень водні і спиртові екстракти паростків і проростків броколі готували за модифікованим описом з роботи Лі та колег [12]. Чотири рослинні екстракти назвали відповідно: водний екстракт паростків (ВЕП), спиртовий екстракт паростків (СЕП), водний екстракт проростків (ВЕПР) та спиртовий екстракт проростків (СЕПР). Зразки броколі гомогенізували у ступці з товкачиком у співвідношенні 1:10 (г рослинного матеріалу до мл розчинника). Для спиртової екстракції використовувався 70% етанол, гомогенат переносили у закриті кришечками з фольги скляні колби. Колби встановлювали на орбітальний шейкер при 250 об/хв на 24 години при кімнатній температурі (+20°C). Для водної екстракції, до зразків броколі додавали киплячу дистильовану воду, гомогенат переносили у скляні колби з кришечками та інкубували на киплячій водяній бані протягом 15 хв з регулярним збовтуванням. Всі отримані гомогенати центрифугували при 9500×g, 10 хв, +20°C. Отримані супернатанти використовували для визначення вмісту загального білку, фруктози, поліфенольних сполук, флавоноїдів та загальної антиоксидантної активності (ЗАА).

2.3.1 Визначення вмісту загального білку

Визначали вміст загального білку методом Бредфорда при 595 нм з барвником кумасі яскраво-синім та з використанням стандартного розчину бичачого сироваткового альбуміну (Bovine serum albumin, BSA) [179]. Вміст білку обчислювали у мг/гсм.

2.3.2 Визначення вмісту фруктози

Визначення вмісту фруктози проводили методом Селіванова [180]. Відбирали 1 мл розведеного екстракту броколі і змішували з 1,5 мл реактиву Селіванова (0,5% резорцин в 20% HCl). Пробірки з сумішшю закривали кришками, переміщували на водяну баню та інкубували при +80°С протягом 8 хв, після цього охолоджували до кімнатної температури. Поглинання світла визначали при 490 нм. Стандартний розчин фруктози використали для побудови калібрувального графіку. Вміст фруктози обчислювали у мг/гсм.

2.3.3 Визначення загального вмісту поліфенольних сполук

Вміст поліфенольних сполук визначали за допомогою методу Фоліна-Чикольтеу [181,182]. До 0,1 мл екстракту додавали 1 мл реактиву Фоліна-Чикольтеу (попередньо розведений 1:10, мл реактиву: мл дистильованої води) та інкубували суміш 8 хв при +20°С. Після інкубації, додавали 800 мкл 7,5% Na_2CO_3. Поглинання світла визначали при 765 нм. Розчин галової кислоти використовували як стандарт для побудови калібрувальної кривої. Вміст поліфенольних сполук обчислювали у міліграмах еквівалентів галової кислоти на грам сирої маси (мг екв ГК/гсм).

2.3.4 Визначення вмісту флавоноїдів

Вміст флавоноїдів визначали методом з використанням $AlCl_3$ [182]. Метод базується на здатності $AlCl_3$ утворювати стійкий помаранчевий комплекс з С-4 кетогрупою, а також з С-3 чи С-5 гідроксильними групами флавоноїдів. Утворений комплекс поглинає світло при 510 нм. Для побудови калібрувального графіку використовували розчин кверцетину в 96% етиловому спирті (вміст кверцетину в пробах калібрувального графіку від 2,5 до 50,0 мкг/мл). Вміст

флавоноїдів обчислювали у міліграмах еквівалентів кверцетину на грам сирої маси (мг екв кверцетину/гсм).

2.4 Визначення загальної антиоксидантної активності препаратів броколі

Загальну антиоксидантну активність паростків і проростків броколі визначали у водних і спиртових екстракціях броколі трьома різними методами. Перший метод базується на відновленні 2,2′-азино-біс(3-етиленбензтіазолін-6-сульфонату) катіон-радикалу ($ABTS^{\bullet+}$) зеленого кольору [183]. При відновленні під дією антиоксидантів $ABTS^{\bullet+}$ стає безбарвним, що свідчить антиоксидантну дію сполук у досліджуваному зразку [183]. Проби містили 150 мкл 345 мМ ацетатного буферу (pH 5,8), 15 мкл 0,9 мМ $ABTS^{\bullet+}$ та 10 мкл рослинного екстракту [182]. Втрату забарвлення суміші визначали після 15 хв інкубації за поглинанням світла при 414 нм з використанням мікропланшетного спектрофотометру Biosan HiPo Microplate Photometer MPP-96 (Biosan, Латвія). Розчин тролоксу, водорозчинного аналогу вітаміну Е, використовували для побудови калібрувального графіку. Загальну антиоксидантну активність обчислювали у мікромоль еквівалентів тролоксу на грам сирої маси (мг екв тролоксу/гсм).

Другим методом антиоксидантну здатність екстрактів броколі визначали за відновленням йонів заліза (Fe^{3+} до Fe^{2+}) у сполуці гексаціаноферату калію, який разом з хлоридом заліза утворює забарвлений синій комплекс. Водні екстракти розводили в 20 разів, а спиртові в 100. До 0,2 мл розведеного екстракту додавали 0,5 мл 200 мМ КФБ (pH 6,6) і 0,5 мл 1% [K3Fe(CN)6]. Проби інкубували при +50°С протягом 30 хв. Після інкубації додавали 0,5 мл 10% ТХО. Тоді відбирали 0,5 мл суміші, додавали 1 мл дистильованої води і 0,1 мл 0,1% $FeCl_3$. Перемішані проби інкубували при температурі +25°С протягом 10 хв. Поглинання світла визначали при 700 нм [182]. Аскорбінову кислоту використовували як стандартний розчин для побудови калібрувального графіку. Загальну

антиоксидантну активність обчислювали у міліграмах еквівалентів аскорбінової кислоти на грам сирої маси (мг екв АК/гсм).

Антиоксидантну активність визначали фосфомолібденовим методом за описаною раніше методикою [182]. Вона базується на взаємодії молібдату амонію з фосфат-йонами, які при кислому pH утворюють комплекс фосфомолібдатної кислоти. У присутності відновлюваного агенту (антиоксиданту) Mo (VI) відновлюється до Mo (V) з утворенням синьо-зеленого комплексу. Всі екстракти розводили в 10 разів. Робоча суміш містила (вказано кінцеві концентрації): 0,6 М H_2SO_4, 28 мМ KH_2PO_4, 4 мМ $(NH_4)_2MoO_4$ та 200 мкл рослинного екстракту. Суміш інкубували протягом 90 хв при температурі +95°C на водяній бані. Поглинання світла визначали у скляній кюветі при 695 нм [182]. Аскорбінову кислоту використовували як стандартний розчин для побудови калібрувального графіку. Загальну антиоксидантну активність обчислювали у міліграмах еквівалентів аскорбінової кислоти на грам сирої маси (мг екв АК/гсм).

2.5 Визначення вмісту сульфорафану у проростках броколі

Вміст сульфорафану (СФН) визначали за допомогою розробленого і описаного у нашій попередній роботі флюоресцентного методу [13]. Вміст СФН та його попередника глюкорафаніну у триденних проростках броколі відносно невисокий, чого недостатньо для спектрофотометричного визначення (мілімоль) [13,184,185]. Ці сполуки містять ізотіоціанатну групу (-NCS), яка є малопоширеною серед природних сполук і була використана для розробки флюорисцентного методу визначення вмісту СФН.

Ми приготували сольватохромний флюоресцентний барвник, який містить активну аміногрупу як частину π-кон'югованої системи, 6-аміно-4′-диметиламіно-3-гідроксифлавон (6AF). Флюорисцентні барвники цього типу демонструють емісію через перенесення протону у збудженому стані між 3-гідрокси та 4-кето групами [186]. Одна зі смуг відповідає флуоресценції нормального збудженого стану, а інша зміщена до червоного кольору та відповідає флюоресценції

фототаутомера. Співвідношення інтенсивності смуг сильно залежить від полярності середовища та замісників у ядрі барвника. При взаємодії з ізотіоціанатом 6-аміногрупа перетворюється на менш електронодонорну тіосечовину, що зменшує електронну густину на 4-кетогрупі та сприяє переносу протону, що відображається у зміні форми спектру випромінювання. Барвник приготували за допомогою гідролізу HCl відповідного ацетаміду, який синтезували згідно з описаними раніше протоколами [187]. Потім дієвість барвника тестували з дослідними зразками проростків броколі та чистим сульфорафаном (LGC Standards, Німеччина) для перевірки оптимального часу інкубації та вибору розчинника для оптимального зчитування змін флуоресценції. Спектри поглинання та випромінювання барвників реєстрували відповідно на спектрофотометрі DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., США) та флюорометрі Shimadzu Rf-5301PC (Shimadzu Corp., Японія) у 10-мм кварцовій кюветі за кімнатної температури. Вихідні розчини барвників (100 мМ) готували в етанолі. Спектри емісії флюоресценції записували з використанням збудження при 380 нм та діапазону емісії від 420 до 650 нм. Щілини збудження та емісії становили 3 нм. Всі спектри скоригували на комбінаційне розсіювання та фон з використанням чистих розчинників як холостої проби.

Проростки броколі гомогенізували у співвідношенні 1:10 в 96% етанолі (мг: мкл) з додаванням чотирьох міліграмів $CaCO_3$ для нейтралізації кислого середовища. Гомогенати центрифугували протягом 10–20 хв при 16,000×g при +25°C і супернатанти використовували для подальшого аналізу. Тоді 200 мкл супернатанту висушували та повторно розчиняли у 50 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО). До зразку додавали 50 мкл 10 мМ розчину барвника 6AF (розведеного у ДМСО) та отриману суміш інкубували при +40°C протягом 15 хвилин для повного зв’язування всього ізотіоціанату в розчині. Тоді 10 мкл суміші додавали до кювети з 1,4-диоксаном для запису спектру емісії. Розчинення в 1,4-диоксані дозволяє отримати більшу різницю в емісії вільного барвника та кон’югату барвник-сульфорафан. Як сигнал використовували співвідношення інтенсивності флюоресценції при 560 нм та 470 нм. Вміст визначали за калібруванням,

записаним з використанням набору розчинів комерційного сульфорафану в ДМСО замість екстракту броколі [13].

2.6 Утримання лабораторних мишей

Лабораторних мишей лінії C57BL/6J отримали від професора Нани Войтенко (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, Київ, Україна). Мишей розводили в умовах віварію кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Миші перебували в умовах контрольованого середовища з 12-годинним циклом світло/темрява (освітлення: 06:00–18:00), при температурі +22 ± 2°C та відносній вологості повітря 50–60%. Для вентиляції забезпечували обмін повітря в кімнаті утримання 10–15 циклів на годину.

Тварин розміщували в стандартних поліпропіленових клітках розміром 365 × 207 × 140 мм, які обладнані металевими сітчастими кришками. Наповнювачем у клітках був стерильний тирсовий гранульований підстил, який змінювали двічі на тиждень. Групове утримання (по 2-5 тварин у клітці) враховувало соціальні потреби мишей, що сприяло мінімізації стресу від ізоляції. Усім групам тварин надавали безперешкодний доступ до води та стандартного гранульованого корму. Їжу та воду надавали *ad libitum*.

Тварин утримували відповідно до стандартів гуманного поводження з лабораторними тваринами та рекомендацій Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту і Ради Європи щодо захисту тварин, які використовуються для наукових цілей. Досліди були схвалені біоетичною комісією Карпатського університету і затверджені під номером PNU-2023-M-010 та PNU-2023-M-011.

Для здійснення дослідження проводили три експерименти. Перший (підбірковий) проводили для розробки оптимального раціону мишей з кафетерійної їжі і з застосуванням паростків броколі. Другий був проведений для встановлення залежного від дози впливу різного вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі на фізіологічні показники тіла та крові мишей і вибору

оптимального вмісту проростків броколі в кафетерійній їжі. Третій експеримент (основний) проводили як продовження попереднього і з детальнішим аналізом показників печінки та кори головного мозку мишей.

2.6.1 Опис дослідних груп експерименту зі споживанням паростків броколі

Для цього досліду кількість тварин у кожній групі обрали за допомогою онлайн-калькулятора оцінки розміру вибірки тварин для експериментів (https://wnarifin.github.io/ssc/ssanimal.html).

Усі миші споживали стандартну їжу для гризунів (гранульований корм компанії “Резон-1”, Україна). Їжа містила 21,8% білків, 4,8% жирів, 69,5% вуглеводів та 3,9% клітковини. Енергетична цінність їжі була 330 ккал на 100 г продукту. Доступ до їжі та води мишам був необмежений.

Схема експерименту зображена на Рис. 2.1. Самців мишей, віком 10 місяців, випадковим чином розділяли на чотири групи (по 6-9 мишей на групу, по 2-5 мишей на клітку). Перша група (названа Базовою Їжею, або БЇ) продовжувала споживати стандартну їжу для гризунів (гранульована їжа компанії “Резон-1”). Друга група (названа Базовою Їжею з 5% Паростками Броколі, або БЇ5ПБ) продовжувала споживали стандартну їжу для гризунів з 5% паростків броколі.

Третю і четверту групи переводили на «кафетерійній раціон» і мишам надавали вибір між споживанням або стандартної їжі, або змінної кафетерійної їжі (енергетична цінність 400 ккал на 100 г). Кафетерійну їжу подавали мишам у окремій посудині та замінювали щодня. Детальний склад та калорійність кафетерійної їжі наведені у таблиці (Додаток В). Також дві групи з кафетерійною їжею споживали напій Pepsi Cola (замість води) – день через день. Після восьми тижнів експерименту перша (БЇ) та третя (КЇ) групи продовжували споживати відповідний раціон без змін. Друга група (названа БЇ5ПБ) і четверта група (названа КЇ5ПБ) почали споживати базову і кафетерійну їжу відповідно, з додаванням 5% паростків броколі (від загального вмісту, г/г). Експеримент тривав

ще шість тижнів до завершення. Цей термін був обраним достатнім для розвитку метаболічних змін у мишей за споживання висококалорійної кафетерійної їжі згідно джерел [188–190]. Вміст паростків броколі базувався на дослідженнях інших авторів [191,192].

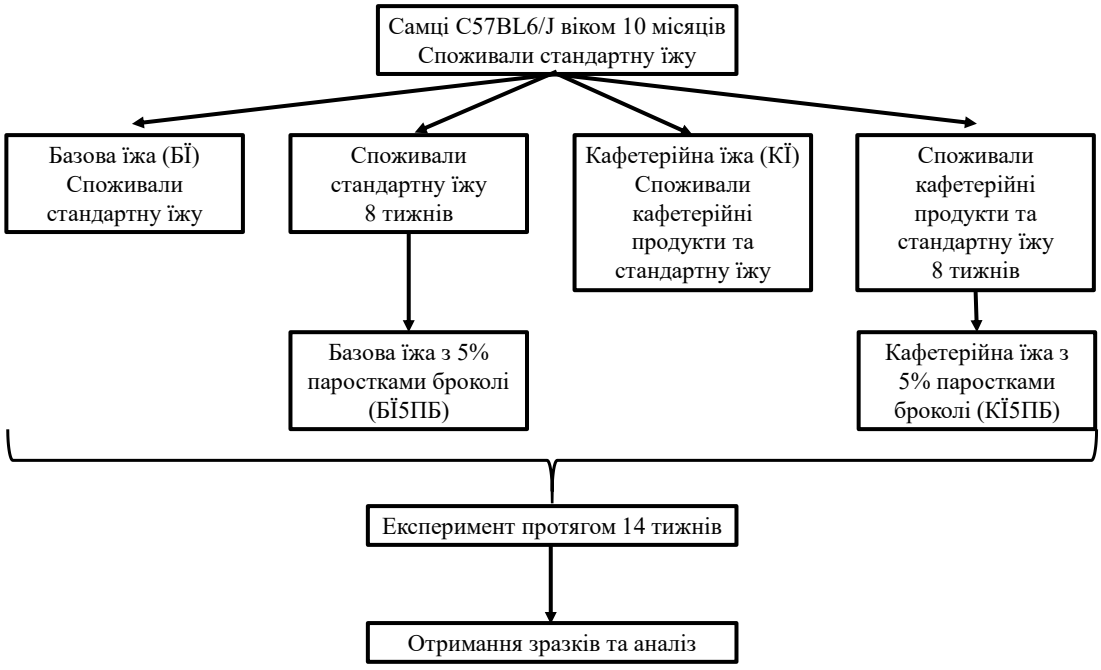


Рис. 2.1. **Схема експерименту з споживанням мишами кафетерійної їжі та паростків броколі**.

Заміна води (або Pepsi-Cola) та корму здійснювалася кожного другого дня – під час заміни фіксувалася кількість спожитої їжі та рідини. Масу мишей реєстрували кожні два тижні.

2.6.2 Опис дослідних груп експерименту з різним вмістом проростків броколі

Усі миші споживали стандартну їжу для гризунів (гранульований корм компанії “Vita”, Україна), що містить 20% білків, 4,8% жирів, 70% вуглеводів, 4,7% клітковини і енергетичну цінність 310 ккал на 100 г. Доступ до їжі та води

був необмежений. Для цього експерименту було виготовлено 5 видів гранульованого корму для мишей з розробленими параметрами за допомогою борошна з гранульованої їжі компанії “Vita” і гранулятора комбікормів ГКМ-150 компанії ТМС (Україна).

Самців мишей восьмимісячного віку випадковим чином розділяли на шість груп по 5-6 мишей у групі, що зображено на Рис. 2.2. Перша група була контрольною, названа Базовою їжею (БЇ), і споживала стандартну їжу (компанії “Vita”). Друга група споживала стандартну їжу з додаванням 5% (від складу корму, за масою, 50 г/кг корму) триденних подрібнених проростків броколі (БЇ5ПБ).

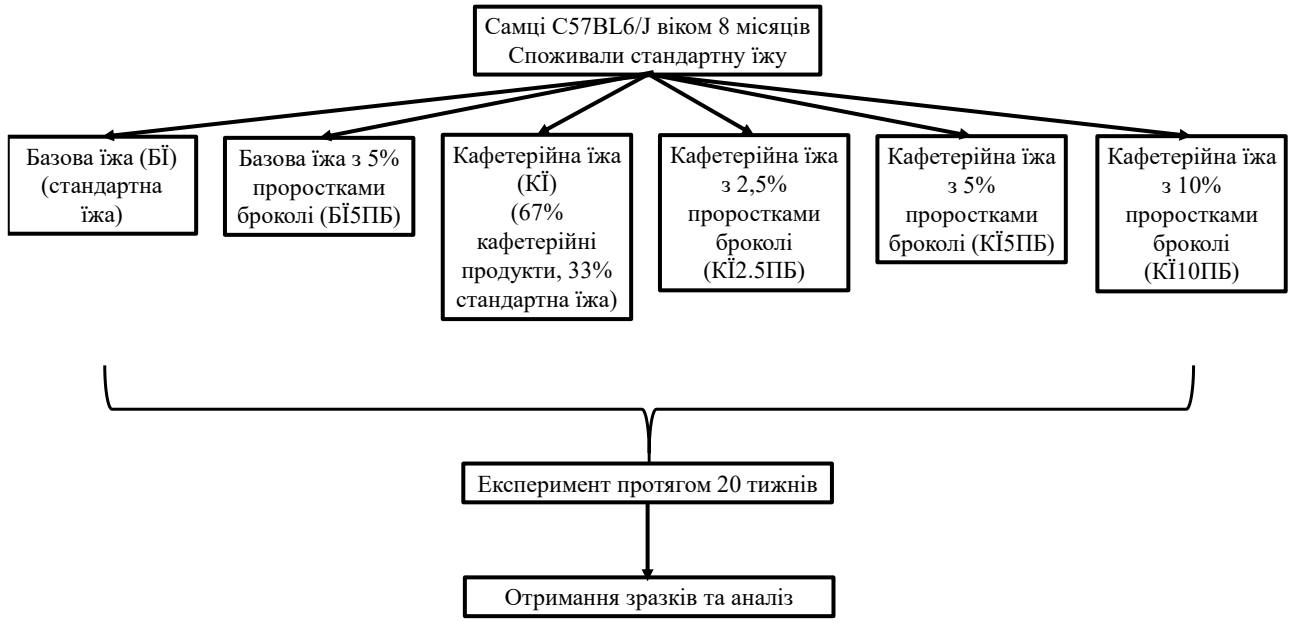


Рис. 2.2. **Схема експерименту з споживанням мишами кафетерійної їжі та різного вмісту проростків броколі**.

Третя група споживала кафетерійну їжу (КЇ), що містила 19,3% білків, 22,6% жирів, 49,39% вуглеводів і енергетичну цінність 459 ккал на 100 г [193]. Ця їжа складалася на 28% з молочного шоколаду, 11% шоколадного крекеру та 28% арахісу у шоколадній глазурі, 10% казеїну і на 23% з стандартної їжі (Додаток Г).

Четверта група споживала кафетерійну їжу з 2,5% вмістом (від складу їжі за масою, 25 г/кг їжі) проростків броколі (КЇ2,5ПБ). П'ята група споживала кафетерійну їжу з 5% вмістом (від складу їжі, за масою, 50 г/кг корму) проростків броколі (КЇ5ПБ). Шоста група споживала кафетерійну їжу з 10% вмістом (від складу їжі, за масою, 100 г/кг корму) проростків броколі (КЇ10ПБ). Доступ до їжі та води був необмеженим.

Кількість спожитої їжі та води реєстрували кожного другого дня. Масу мишей реєстрували щотижня. Експеримент тривав 20 тижнів. Вміст броколі 5% та 10% підібрали за літературними даними [194,195].

2.6.3 Опис дослідних груп експерименту зі споживанням проростків броколі

Для цього експерименту оцінку розміру вибірки проводили в програмі R-project (Університет Окленду, США) за допомогою функції pwr.anova.test, реалізованої в пакеті pwr і встановленої для чотирьох груп, з потужністю 0,8, рівнем значущості 0,05 і розміром ефекту 1,25 (сильний ефект). Крім того, розмір вибірки оцінювався за допомогою калькулятора розміру вибірки Робіна Рістла (Віденський медичний університет, Австрія https://homepage.univie.ac.at/robin.ristl/samplesize.php?test=anova) для чотирьох груп з нерівними розмірами вибірки, з відмінностями від контролю 50% і стандартним відхиленням 13-20%).

Усі миші споживали стандартну їжу для гризунів (компанії "Vita"), що містив 20% білків, 4,8% жирів, 70% вуглеводів, 4,7% клітковини і енергетичну цінність 310 ккал на 100 г. Доступ до їжі та води був необмежений.

Експеримент проводили за зображеною на Рис. 2.3 схемою. Самців мишей восьмимісячного віку випадковим чином розділяли на чотири групи по 8-9 мишей у групі. Перша група була контрольною та споживала стандартну їжу (гранульована їжа "Vita") і названа Базовою їжею (БЇ). Друга група споживала

стандартну їжу з додаванням 5% (від складу корму, за масою, 50 г/кг корму) триденних подрібнених проростків броколі (БЇ5ПБ).

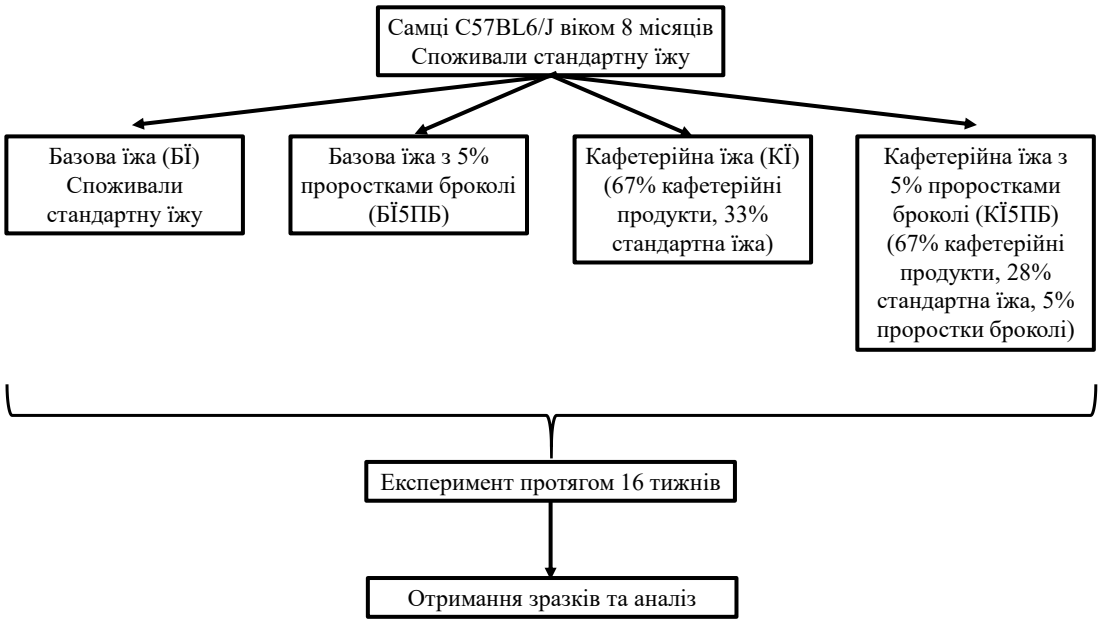


Рис. 2.3. **Схема експерименту зі споживанням мишами кафетерійної їжі та проростків броколі**.

Третя група споживала кафетерійну їжу (КЇ), що містила 19,3% білків, 22,6% жирів, 49,39% вуглеводів і енергетичну цінність 459 ккал на 100 г [193]. Ця їжа складалася на 28% з молочного шоколаду, 11% шоколадного крекеру та 28% арахісу у шоколадній глазурі, 10% казеїну і на 23% зі стандартної їжі (Додаток Г). Четверта група споживала кафетерійну їжу з 5% вмістом (від складу корму, за масою, 50 г/кг корму) триденних подрібнених проростків броколі (КЇ5ПБ) [192,194]. Вміст кафетерійних продуктів був незмінним, вміст стандартного корму був зменшеним відповідно. Доступ до їжі та води був необмеженим.

Кількість спожитої їжі та води реєстрували кожного другого дня. Масу мишей реєстрували щотижня. Експеримент тривав 16 тижнів.

2.7 Тест «Відкрите поле» для визначення поведінки мишей

Тест «Відкрите поле» проводили в полівінілхлоридній камері (40 × 40 см), яка розділена на 16 квадратів розміром 10 × 10 см. Мишу розміщували в центрі камери і вмикали відеокамеру. Експериментатор залишав приміщення, де проводився тест. Миша протягом 10 хв мала можливість вільно досліджувати камеру. Далі отримані відео аналізували за допомогою програмного забезпечення ToxTrac (версія 2.98), (https://sourceforge.net/projects/toxtrac/), яке використовується для реєстрації рухової та тривожно-подібної активності. У даному тесті ми визначали загальну пройдену відстань за десять хвилин запису та середню швидкість мишей (https://sourceforge.net/projects/toxtrac/) [196,197].

2.8 Глюкозотолерантний тест та визначення рівня глюкози в крові мишей

Тест толерантності до глюкози проводили з використанням модифікованої процедури [198]. Її здійснювали після тесту «Відкрите поле» і перед евтаназією мишей (забору тканин і органів). Мишей залишали для голодування на 6 годин з 7:00 до 13:00. О 8:00 масу мишей визначали для обчислення навантаження глюкозою (2 мг глюкози на 1 г маси тіла мишей).

Перед процедурою гаваження, кінчик хвостика миші змащували кремом для місцевої анестезії. Після лагідного надрізу хвостика ножицями на 1-2 мм, 2 мкл крові відбирали за допомогою автоматичної піпетки і переносили до центрифужної пробірки, що містила 98 мкл дистильованої води. Розчин етилового спирту (70%) використовували як антисептик для обробки хвоста і усунення інфекційного зараження.

Процедуру гаваження проводили використовуючи прямий металевий наконечник шприца для гаваження для внесення обрахованого об’єму 40% розчину глюкози. Забір крові повторювали через 15, 30, 60 та 120 хв від часу першого забору у відповідні пробірки.

Рівень глюкози в крові визначали за допомогою непрямого глюкозооксидазного методу із застосуванням діагностичного набору компанії «РЕАГЕНТ» (Україна). Поглинання світла визначали при 510 нм у пластиковій кюветі [67]. Для побудови калібрувального графіку використовували стандартний розчин глюкози. Рівень глюкози обчислювали у мілімоль на літр (ммоль/л).

2.9 Забір органів та тканин мишей

Перед забором органів та тканин миші голодували 8 годин. Для анестезії мишей обережно брали з кліток та поміщали у спеціальну камеру. Камера була прозорою, розміром 0,5 л для вільного розташування мишей, щоб уникнути травмування миші і руки дослідника. У камеру з мишою, заповнену повітрям поступово подавали 100% вуглекислий газ. Камеру заповнювали газом до повної втрати свідомості твариною (відсутність рефлексів) [199].

Після анестезування вуглекислим газом, у мишей відбирали кров з ретроорбітального синусу за допомогою просоченого гепарином стерильного капіляру. Пробірки для збору крові містили 20 мкл гепарину на дні (для уникнення зсідання крові) [200,201]. Пробірку з відібраною кров'ю миттєво збовтували і переносили на лід. Плазму крові отримували і відбирали після центрифугування при 4300×g, 10 хв, +4°C використовуючи центрифугу Eppendorf Minispin (Eppendorf AG, Німеччина). Зразки плазми були заморожені і зберігалися у морозильній камері при -80°C для біохімічних досліджень.

Після розриву шийного відділу хребта лінійкою вимірювали довжину миші від кінчика носа до анального отвору. Препарували печінку, вісцеральну жирову тканину та кору головного мозку мишей. Печінку та жирову тканину зважували на алюмінієвій фользі і реєстрували масу цих зразків. Усі відібрані зразки поміщали в мікроцентрифужні пластикові пробірки, заморожували в рідкому азоті та поміщали на зберігання у морозильній камері при температурі -80°C для подальшого біохімічного аналізу [67].

2.10 Визначення гематологічних параметрів крові мишей

Усі гематологічні показники визначали в день забору тканин. Рівень загального гемоглобіну у крові визначали спектрофотометричним методом при 540 нм з використанням реактиву Драбкіна. Рівень гемоглобіну обчислювали у ммоль/л [202].

Для визначення гематокриту стерильні капіляри заповнювали щойно взятою кров'ю за допомогою шприца. Кінці капілярів запаювали та центрифугували при 2000×g протягом 15 хвилин при +25°C. Висоту стовпчика еритроцитів (мм) та висоту стовпчика крові (мм) вимірювали лінійкою. Їх співвідношення множили на 100%, а отримане значення аналізували [202].

Для підрахунку кількості клітин крові, свіжі зразки розводили в 200 разів у 3% NaCl для підрахунку еритроцитів або в 40 разів у 5% оцтовій кислоті (підфарбованій метиленовим синім) для підрахунку лейкоцитів. Кількість еритроцитів та лейкоцитів підраховували за допомогою камери Горяєва під світловим мікроскопом [202].

2.11 Визначення біохімічних параметрів плазми крові мишей

Для визначення рівня триацилгліцеролів (ТАГ) у плазмі крові використовували діагностичний набір компанії «РЕАГЕНТ» (Україна) за інструкцією виробника [202]. Додавали 400 мкл суміші ферментів до 30 мкл плазми, проби інкубували протягом 15 хвилин при +37°C. Об'єм доводили до 1 мл та визначали поглинання світла за допомогою спектрофотометра при 540 нм. Для побудови калібрувального графіку використовували стандартний розчин ТАГ. Концентрацію ТАГ обчислювали у ммоль/л [67].

Рівень холестеролу визначали за допомогою відповідного діагностичного набору компанії «РЕАГЕНТ» (Україна). Додавали 250 мкл суміші ферментів до 3 мкл плазми в 96-комірковому мікропланшеті [202]. Змішані зразки інкубували протягом 10 хвилин при +37°C. Поглинання світла визначали при 540 нм за

допомогою мікропланшетного спектрофотометра Biosan. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини холестеролу. Рівень холестеролу обчислювали у ммоль/л.

Рівень загального білку визначали методом Бредфорда з використанням реактиву кумасі яскраво-синього та BSA як стандартного розчину білку [179]. Поглинання світла визначали при 595 нм. Рівень білку обчислювали у міліграмах на мілілітр плазми (мг/мл).

Для визначення активності параоксонази (ПОН) плазму розводили у 10 разів (10 мкл плазми + 90 мкл суміші для визначення активності). 4-нітрофеніл ацетат (з вихідною концентрацією 160 мМ) був розчинений в 96% етиловому спирті. Визначення активності проводили при 405 нм. У пластикову УФ-кювету послідовно додавали наступні компоненти: 1150 мкл суміші для визначення активності (50 мМ буфер Tris-HCl (pH 7,0), 1 мМ $CaCl_2$ та H_2O), 5 мкл розведеної плазми, 70 мкл H_2O і 25 мкл 4-нітрофеніл ацетату (кінцевою концентрацією 3 мМ). Паралельно визначали активність у бланку, що містив дистильовану воду замість супернатанту. Активність ПОН обчислювали в одиницях на літр (Од/л) [203].

Активність мієлопероксидази (МПО) визначали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра. У комірку додавали 90 мкл розчину Хенкса до 10 мкл плазми (для дослідних проб). Контрольна проба містила 100 мкл розчину Хенкса. Далі додавали 35 мкл 20 мМ 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин гідрохлориду до всіх проб. Після цього додавали 135 мкл 1 М H_2O_2 і всі проби інкубували протягом 2 хв при кімнатній температурі. Зразу після інкубації 35 мкл 4 М H_2SO_4 додавали у комірки для зупинки реакції. Поглинання світла визначали при 450 нм. Активність МПО обчислювали в одиницях на літр (Од/л) [67].

Для визначення рівня інтерлейкіну-1-бета (IL-1β), плазму крові розводили у п’ять разів за допомогою фосфатно-буферного розчину (PBS) (pH 7,4). Далі додавали 100 мкл розведеної плазми до комірки мікропланшета. Проби тричі промивали 100 мкл PBS. Тоді додавали 200 мкл 4% бичачого сироваткового альбуміну (BSA, розведеного у PBS) та інкубували проби одну годину при

кімнатній температурі. Після цього проби промивали тричі 100 мкл PBS. Первинні антитіла anti-interleukin-1β (каталожний номер ab9722, Abcam, Сполучене Королівство) попередньо розводили у дистильованій воді до концентрації 100 мкг/мл. Розведені антитіла ще розводили в 4% BSA (1:100) і додали до проб з двогодинною інкубацією при кімнатній температурі. Тоді проби промивали тричі з 100 мкл PBS. Вторинні антитіла отримані з кроля (каталожний номер #7074S, CellSignaling, США) розводили у 4% BSA (1:2000) і додавали до проб. Проби тричі промивали з 100 мкл PBS. Після змиття до проб додавали 80 мкл of 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину дигідрохлориду (субстрат для пероксидази хреню чи вторинних антитіл). Проби інкубували при +37°C протягом 30 хв до появи синього забарвлення. Після інкубації додавали 100 мкл 2M H_2SO_4 для зупинки реакції. Поглинання світла визначали при 450 нм. Результати подавали як відносний рівень IL-1β нормований на середній рівень контрольної групи (БЇ).

2.12 Визначення вмісту пероксидів ліпідів у печінці та корі головного мозку мишей

Зразки гомогенізували у співвідношенні 1:10 (для кори головного мозку) або 1:20 (для печінки) (маса мкг : мкл спирту) у 96% етиловому спирті за допомогою гомогенізатора Поттера. Гомогенати центрифугували в пластикових мікропробірках впродовж 10 хв, 10000×g, +4°C. До окремих пробірок до додавали послідовно (вказані кінцеві концентрації) 0,1 мМ ксиленолу оранжевого, 25 мМ H_2SO_4, 0,25 мМ $FeSO_4 \times 7H_2O$ і 20 мкл супернатанту. Об'єм проби доводили дистильованою водою до 1,5 мл. Одночасно з дослідними пробами готувати проби для побудови калібрувального графіку, які містили розчин гідропероксиду кумену замість супернатанту. Проби інкубували протягом 60 хв при кімнатній температурі. Поглинання світла визначали при 580 нм. Вміст пероксидів ліпідів обчислювали у нмоль на грам сирої маси тканини [67,204].

2.13 Визначення вмісту карбонільних груп білків у печінці мишей

Наважку печінки (60 мг) гомогенізували у середовищі, яке містило (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ КФБ (pH 7,0) та 0,5 мМ ЕДТА у співвідношенні 1:10 (мг печінки: мкл середовища). Отримані гомогенати центрифугували при 15700×g, 15 хв, +4°C. По 250 мкл супернатанту переносили у нові пробірки (позначені як Контрольні і Дослідні). Далі додавали 250 мкл 40% ТХО. Проби центрифугували при 1250×g протягом 5 хв при +25°C. Супернатанти зливали, осади ресуспендовували додаванням 2 М HCl (для Контрольних) чи 10 мМ 2,4-динітрофенілгідразин (для Дослідних). Проби інкубували протягом однієї години при +25°C. Проби центрифугували при 2000×g протягом 5 хв. Супернатант зливали, осад заливали і розсуспендували у 1 мл суміші етанол: етилацетат (1:1, об/об). Проби центрифугували при 2000×g протягом 7 хв. Ресуспендування і центрифугування були повторені ще раз. Після цього осади заливали 1,3 мл 6 М гуанідин хлоридом. Проби збовтували та інкубували протягом 30 хв. Після цього проби центрифугували при 2000×g протягом 15 хв, супернатанти переносили до окремих пробірок, осади відкидали. Поглинання світла визначали у скляній кюветі при 370 нм спочатку у Контрольних пробах, а тоді у Дослідних. Вміст білку визначали методом Бредфорда. Вміст карбонільних груп білків обчислили у нмоль на мг білку [204].

2.14 Визначення активності антиоксидантних та пов’язаних з ними ферментів у печінці та корі головного мозку мишей

Зразки печінки гомогенізували у співвідношенні 1:20 у середовищі для гомогенізації, яке містило (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ. Гомогенати центрифугували протягом 15 хв, при 15700×g, +4°C. Супернатанти переносили в окремі пробірки та зберігали на льоді [67]. Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) до кювети послідовно додавали: 1100 мкл суміші для визначення активності ферменту (яка

містила 30 мМ Na-гліциновий буфер (pH 10,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ N,N,N′,N′-тетраметилетилендиамін (ТЕМЕД)), 125 мкл дистильованої води і 25 мкл кверцетину (розчинений у диметилформаміді, кінцева концентрація 0,05 мМ). Зміну поглинання світла реєстрували протягом хвилини у скляній кюветі при 406 нм. Наступні проби містили різний об'єм супернатанту (об'єм води був відповідно зменшеним). За допомогою комп'ютерної програми «KINETICS» було розраховано константу половинного інгібування ($К_{50}$) і побудовано криву інгібування кверцетину, де на осі абсцис відмітили об'єм супернатанту, а на осі координат зміну поглинання світла. Активність СОД обчислювали у одиницях на міліграм білку (Од/мг білку). Одна одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, який інгибує реакцію окислення кверцетину наполовину від максимального інгибування (тобто 1 одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, що міститься в $К_{50}$ мкл препарату тканини) [204].

Для визначення активності ізоформ СОД на гелі користувалися методом Бокампа і Фрідовича [205]. Для аналізу фотографій гелів використовували програму ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, США).

Для визначення активності каталази, наважку печінки гомогенізували та отримували супернатант так як описано для СОД. Зміну поглинання світла реєстрували у кварцовій кюветі при довжині хвилі 240 нм (УФ-область) у пробі об'ємом 2 мл, яка містила 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ H_2O_2 та супернатант. Коефіцієнт молярної екстинкції H_2O_2 при вказаній довжині хвилі становить 39,4 $М^{-1}см^{-1}$. Активність каталази обчислили в одиницях на міліграм білку (Од/мг білку). За одну одиницю активності каталази приймають таку кількість ферменту, яка дисмутує 1 мкмоль пероксиду водню за 1 хвилину на 1 мг білку [67,204].

Для визначення активності глютатіонпероксидази (ГП), глютатіон-S-трансферази (GST), глютатіонредуктази (ГР), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази (НХО1) заморожені зразки печінки чи кори головного мозку згомогенізували у співвідношенні 1:10 (мг тканини: мкл

середовища) у середовищі для гомогенізації, що містило 50 мМ КФБ (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА і 1 мМ ФМСФ.

Активність глютатіонпероксидази визначали непрямим методом за спряженою реакцією з глютатіонредуктазою. Визначення проводили у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,5), 0,5 мМ ЕДТА, 4 мМ NaN_3, 15 мМ GSH, 0,25 мМ НАДФН, 1 Од/мл ГР, 0,2 мМ H_2O_2 та супернатант. NaN_3 додається в суміш для інгибування каталази, яка також розкладає пероксид водню. Реакцію починали послідовним додаванням до кювети реакційної суміші, ГР, H_2O_2 та супернатанту. Оскільки реакція здатна відбуватися і без участі ферменту, паралельно проводили визначення зміни оптичної густини у холостій пробі, яка містила відповідний об'єм реакційної суміші замість супернатанту. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярної екстинкції НАДФН 6220 $M^{-1}см^{-1}$. Активність ГП обчислювали в міліодиницях на міліграм білку (мОд/мг білку). За одну одиницю активності глютатіонпероксидази приймають таку кількість ферменту, яка окислює 1 мкмоль НАДФН за 1 хвилину в 1 мг білку [67].

Для визначення активності ізоформ ГП у гелі використовували методику Ліна та колег [206]. Для аналізу фотографій гелів використовували програму ImageJ.

Метод визначення активності GST базується на здатності ферменту каталізувати реакцію кон'югації 1-хлоро-2,4-динітробензолу (ХДНБ) (субстрату GST) з відновленим глютатіоном. Визначення проводили у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містила 50 мМ КФБ (pH 7,5), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ GSH, 1 мМ ХДНБ та супернатант. Реакцію у кюветі запускали шляхом послідовного додавання реакційної суміші, супернатанту та ХДНБ. Оскільки реакція може протікати і без участі ферменту, паралельно проводили визначення зміни поглинання світла у «холостій» пробі, яка містила відповідний об'єм реакційної суміші замість супернатанту. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярної екстинкції ХДНБ 9600 $M^{-1}см^{-1}$. Активність GST обчислювали в одиницях на міліграм білку (Од/мг білку). За одну одиницю активності глютатіон-S-трансферази приймали

таку кількість ферменту, яка утворює 1 мкмоль динітрофенілтіоефіру за 1 хвилину на 1 мг білку [67].

Для визначення активності ізоформ GST на гелі використовували метод Річі та колег [207]. Для аналізу фотографій гелів використовували програму ImageJ.

Визначення активності ГР базується на визначенні швидкості спряженої реакції окислення НАДФН до $НАДФ^+$. Зміну поглинання світла реєстрували на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містила 50 мМ КФБ (pH 7,5), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ GSSG, 0,25 мМ НАДФН та супернатант. Для обчислення використовували коефіцієнт молярної екстинкції НАДФН, який при вказаній довжині хвилі становить 6220 $М^{-1}см^{-1}$. Активність ГП подавали у міліодиницях на міліграм білку (мОд/мг білку). За одну одиницю активності глютатіонредуктази приймали таку кількість ферменту, яка окислювала 1 мкмоль НАДФН за 1 хвилину на 1 мг білку [67].

Активність НАД(Ф)Н-хінон оксидоредуктази 1 визначали за відновленням дикумаролчутливого (відновлення барвника залежить тільки від активності ферменту) 2,6-дихлорфеноліндофенолу (DCPIP) при 600 нм. Суміш для визначення активності НХО1 містила (вказано кінцеві концентрації): 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,23 мг/мл BSA, 0,2 мМ НАДН, 0,01% Tween-20, 40 мкМ DCPIP. Реакцію починали додаванням у кювету суміші, супернатанту, DCPIP і через дві хвилини після реєстрації зниження рівня DCPIP додавали 10 мкМ дикумаролу для пригнічення специфічної активності НХО1. Активність НХО1 розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції 21,0 $мМ^{-1}см^{-1}$ для DCPIP [67,208]. Активність НХО1 обчислювали у міліодиницях на міліграм білку (мОд/мг білку).

Активність Г6ФДГ визначали за реакцією відновлення $НАДФ^+$ при перетворенні глюкозо-6-фосфату до 6-фосфоглюколактону. Реакційна суміш містила (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ КФБ (pH 7,5), 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,2 мМ $НАДФ^+$ та супернатант. Для розрахунків використовували коефіцієнт екстинкції для НАДФН 6220 $М^{-1}$ $см^{-1}$. Активність Г6ФДГ обчислювали у міліодиницях на міліграм білку (мОд/мг білку) [209].

2.15 Визначення вмісту триацилгліцеролів, глюкози і глікогену у печінці мишей

Для визначення вмісту триацилгліцеролів (ТАГ) наважку печінки гомогенізували у фосфатному буферному розчині (кінцева концентрація складників: 10 мМ $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 2 мМ KH_2PO_4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% Тритон Х-100) у співвідношенні 1:10 (мг тканини: мкл буферу). Одержані гомогенати нагрівали при +70°С протягом 10 хв для інактивації ендогенних ферментів, що перетворюють ТАГ або гліцерол. Змішували 100 мкл розведеного гомогенату (30 мкл гомогенату + 70 мкл буферу) з робочим розчином ферментів для визначення вмісту ТАГ (діагностичний набір компанії «РЕАГЕНТ», Україна) та інкубували 20 хв при +37°С. Об'єм доводили до 1 мл дистильованою водою. Поглинання світла визначали при 540 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартний розчин ТАГ. Вміст ТАГ обчислювали у мікрограмах ТАГ на міліграм ТАГ стандарту (мкг/мг ст) [209].

Для визначення вмісту вільної глюкози та глікогену печінку згомогенізували у співвідношенні 1:10 (мг маси : мкл об'єму) у 50 мМ КФБ (pH 7,5). Проби інкубували при +70°С протягом 5 хв і охолоджували 5 хв для інактивації ферментів. Проби центрифугували (15700×g, 15 хв, +21°С), супернатанти відбирали і зберігали на льоді. Для визначення вмісту глюкози, змішували 10 мкл супернатанту, 1 мкл 0,09% NaN_3, 89 мкл H_2O та 500 мкл робочого розчину діагностичного набору компанії «РЕАГЕНТ» (Україна). Проби інкубували протягом 20 хв при +37°С. Для визначення 500 мкл води додали до проб і поглинання світла визначали при 510 нм. Для визначення вмісту глікогену останній спочатку гідролізували до глюкози. Для цього 10 мкл супернатанту змішували з 10 мкл амілоглюкозидази (Sigma-Aldrich, США, №10115; 0,056 Од/мкл), 1 мкл 0,09% NaN_3, 79 мкл H_2O та інкубували протягом 4 годин при +37°С. Після інкубації проводили визначення вмісту глюкози. Вміст глікогену розраховували шляхом віднімання вмісту вільної глюкози від вмісту глюкози,

отриманого після інкубації з амілоглюкозидазою і обчислювали у міліграмах на грам сирої маси (мг/гсм) [209].

2.16 Визначення активності гліколітичних ферментів у печінці мишей

Для визначення активності гліколітичних ферментів та фруктокінази наважку печінки гомогенізували у співвідношенні 1:10 (мг тканини: мкл середовища) у середовищі, що містило (вказані кінцеві концентрації): 50 мМ імідазольний буфер (pH 7,5), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ дитіотрийтол, 20 мМ NaF і 150 мМ KCl. Гомогенати центрифугували (15700×g, 15 хв, +4°C), супернатанти відбирали, поміщали на лід і використовували для біохімічних аналізів.

Активність гексокінази (ГК), фосфофруктокінази (ФФК), піруваткінази (ПК) та фруктокінази (ФК) визначали у спряжених ферментативних реакціях шляхом моніторингу відновлення $НАДФ^+$ (для ГК) або окислення НАДН (для ФФК, ПК, ФК) при 340 нм. Активність ГК визначали у 1 мл реакційного середовища, яке містило: 50 мМ імідазольний буфер (pH 7,5), 10 мМ глюкозу, 2 мМ АТФ, 5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ $НАДФ^+$, 0,5 Од/мл глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 30 мкл супернатанту. Активність ГК обчислили у мОд/мг білку [209].

Активність ФФК визначали у 1 мл реакційного середовища, яке містило: 50 мМ імідазольний буфер (pH 7,5), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 5 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН, 0,5 Од/мл альдолази, 2 Од/мл гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, 0,5 Од/мл тріозо-фосфатізомерази, 5 мМ фруктозо-6-фосфату і 30 мкл супернатанту. Активність ФФК подавали у мОд/мг білку [209].

Активність ПК визначали у спряженій реакції з лактатдегідрогеназою (ЛДГ) у 1 мл реакційного середовища, яке містило: 50 мМ імідазольний буфер (pH 7,5), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 2,5 мМ АДФ, 0,16 мМ НАДН, 2,5 Од/мл ЛДГ та 5 мкл супернатанту. Активність ПК подавали у мОд/мг білку [209].

Активність ФК визначали у спряженій реакції з піруваткіназою (ПК) та лактатдегідрогеназою (ЛДГ) у 1 мл реакційного середовища, яке містило 50 мМ

імідазольний буфер (pH 7,5), 2 мМ фосфоенолпіруват (ФЕП), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 5 мМ АТФ, 0,32 мМ НАДН, 2,5 Од/мл ЛДГ, 2,5 Од/мл ПК, 1 мМ фруктозу та 2 мкл супернатанту. Активність ФК подавали у мОд/мг білку.

2.17 Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі зразків печінки мишей

Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі (RT-qPCR) з наважки печінки виділяли РНК використовуючи набір Monarch Total RNA Miniprep kit (T2010, New England Biolabs, США) згідно інструкцій виробника. Кількісне визначення виділеної РНК проводили на спектрофотометрі DeNovix® DS-11 FX+ (DeNovix Inc., США). Виділені зразки розводили для досягнення концентрації близько 300-400 нг/мкл РНК. Для синтезу кодуючої ДНК (кДНК) використовували набір ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (E6560, New England Biolabs, США), згідно інструкцій виробника (стандартний протокол) і використовували рандомізовану суміш праймерів, що входить до набору.

Шістнадцяту частину (1/16) реакції синтезу кДНК використовували для ПЛР за допомогою Luna® Universal qPCR Master Mix (E3003, New England Biolabs) і використовуючи прилад системи AriaMx (Agilent Technologies, Inc., США). Застосовували наступний протокол циклізації: 1 хв початкової денатурації при 95°C, потім 45 циклів денатурації (по 15 сек) при 95°C і розведення плюс зчитування з планшету (по 34 сек) при 60°C. Вимірювання кривих плавлення проводили з використанням стандартних налаштувань системи qPCR. Всі зчитування проводили з використанням каналів детектування флуоресценції 6-карбоксифлуоресцеїну (FAM) та 6-карбокси-X-родаміну (ROX). Сигнали флуоресценції зразків нормалізували до рівнів флуоресценції, що визначаються ROX-каналом. Відносну зміну рівня експресії іРНК розраховували методом 2-ΔΔCq, використовуючи значення Cq для експресії гену *RPL27* (кодує 60S рибосомний білок L27) як референсу [67, 210]. Олігонуклеотидні послідовності

були отримані від компанії Metabion International AG (Німеччина) і детально описані у Додатку Ґ.

2.18. Гістологія зрізів печінки мишей

Після забору печінки зразок розміром 1 см на 1 см поміщали в 10% розчин формаліну на 24 години. Далі зразок переміщали в 70% етанол і зберігали при температурі +4°С в холодильнику [67]. Для зневоднення зразки поміщали у розчини ізопропілового спирту з поступовим підвищенням концентрації: 70%, 80%, 96%, 100% при кімнатній температурі. Далі обробляли ксилолом, як органічним розчинником, та витримували у парафіні для кращого просочення тканини (1 год у ксилолі, 2 год у парафіні). Після цього переміщували проби у спеціальні блоки, заливали розплавленим парафіном, чекали коли зразки остаточно застигали і діставали з формочок.

Як клейке середовище на чисті та знежирені скельця наносили суміш яєчного білку з гліцерином за допомогою скляної палички, далі висушували над полум’ям спиртівки. Зрізи отримували на напівавтоматичному мікротомі ЕКА РМ100 (Україна), розправляли та розм’якшували у теплій воді і переміщували на предметне скельце. Протягом години висушували у термостаті. Наступним етапом було депарафінування зрізів та їх гідратація, для чого використовували ксилол як розчинник та набір спиртів, концентрація яких поступово знижувалася: 96%, 90%, 70%.

Зрізи забарвлювали шляхом фарбування гематоксилін-еозином. Цей метод базується на взаємодії двох барвників з різними клітинними структурами. Гематоксилін є основним барвником, який зв’язується з негативно зарядженими (базофільними) структурами клітин. Він взаємодіє з нуклеїновими кислотами, такими як ДНК у ядрі, і забарвлює ядра клітин у синьо-фіолетовий колір. Еозин є кислим барвником, який зв’язується з позитивно зарядженими (ацидофільними) структурами. Забарвлює в рожево-червоний колір цитоплазму клітин, колагенові волокна, еритроцити та внутрішньоклітинні білкові включення, що дозволяє чітко

розрізняти основні структурні компоненти клітин та тканин під мікроскопом. Витримували у фарбі гематоксилін Бамера протягом 4 хвилин, промивали дистильованою водою, у розчині еозину тримали 3 хвилини і теж промивали водою. Для просвітлення занурювали у ксилол.

Щоб зразки зафіксувати та зберігати тривалий час, покривні скельця приклеювали за допомогою гістологічного реагенту histokitt (ROTI®Histokitt, Carl Roth GmbH & Co. KG, Карлсруе, Німеччина). Зображення отримували за допомогою мікроскопа при загальному збільшенні 160х (збільшенні окуляра 16х, збільшення об'єктиву 10х).

2.19 Статистичний аналіз та візуалізація даних

Статистичний аналіз та візуалізація вмісту БАПР у препаратах броколі виконані з застосуванням програмного забезпечення GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, США, https://www.graphpad.com). Дані порівнювали за допомогою двостороннього Т-тесту Стюдента чи одностороннього аналізу ANOVA з тестом Тюкі. Дані представили як середнє арифметичне значення ± стандартне відхилення, кількістю біологічних повторів від три-чотири. Зразки броколі з одного контейнера приймали за один біологічний повтор. Кількість технічних повторів зазначалась в описі малюнків та методів.

Статистичний аналіз та візуалізація результатів споживання мишами кафетерійної їжі та броколі виконали з застосуванням програмного забезпечення GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, США, https://www.graphpad.com) та MS Excel. Дані порівнювали за допомогою одностороннього аналізу ANOVA з тестом Тюкі. Дані представили як середнє арифметичне значення ± стандартна похибка середнього.

Розділ 3. Результати та їх обговорення

3.1 Вміст сполук та загальна антиоксидантна активність препаратів броколі

3.1.1 Вміст пігментів у препаратах броколі

Аналіз вмісту біологічно активних природних речовин (БАПР) у рослинному матеріалі паростків та проростків броколі важливий для оцінки ефективності дії корисних сполук броколі і розуміння отриманих ефектів при споживанні цих препаратів броколі лабораторними мишами.

Хлорофіли та каротиноїди беруть участь у фотосинтезі і їх більше в зелених, фотосинтетичних частинах рослин. Ці пігменти також діють як антиоксиданти, захищаючи хлоропласти від активних форм кисню (АФК), які є побічними продуктами фотосинтезу, оскільки у хлоропластах присутній електроннотранспортний ланцюг, який може генерувати АФК [211,212].

Загальний вміст хлорофілу був у 2,7 разів вищим у паростках броколі порівняно з проростками (Рис. 3.1А). Ця різниця була переважно результатом вищого вмісту хлорофілу *a*, тоді як концентрація хлорофілу *b* суттєво не відрізнялася між проростками та паростками броколі (Рис. 3.1А). Вміст хлорофілу *a* в паростках броколі був достовірно вищим порівняно з хлорофілом *b*, тому співвідношення хлорофілу a/b було вищим (2,3 ± 0,7) (Рис. 3.1Б). Проте в проростках броколі співвідношення хлорофілу *a* до *b* було 0,6 і вміст цих пігментів між собою не відрізнявся.

Вміст каротиноїдів був у 2,9 разів вищим у паростках броколі порівняно з проростками (Рис. 3.1В). Вміст антоціанів не відрізнявся між паростками та проростками броколі (Рис. 3.1Г).

Паростки броколі мали вищий вміст хлорофілів та каротиноїдів порівняно з проростками. Паростки броколі також містили більше хлорофілу *a*, ніж хлорофілу *b*. Це типово для зелених частин рослин, оскільки хлорофіл *a* є основним

пігментом, який бере участь у фотосинтезі і відіграє ключову роль у перетворенні світлової енергії в хімічну. Хлорофіл *b* діє як допоміжний пігмент, що розширює спектр світла, який рослина може використовувати для фотосинтезу, але його вміст зазвичай нижчий, ніж хлорофілу *a* [149,174,176]. Більше співвідношення хлорофілу *a/b* в паростках броколі свідчить про більшу фотосинтетичну активність. Після переходу на автотрофне живлення паростки броколі залежать від процесу фотосинтезу і тому мають підвищену потребу в каротиноїдах, які захищають рослину від фотоокислювального пошкодження [174].

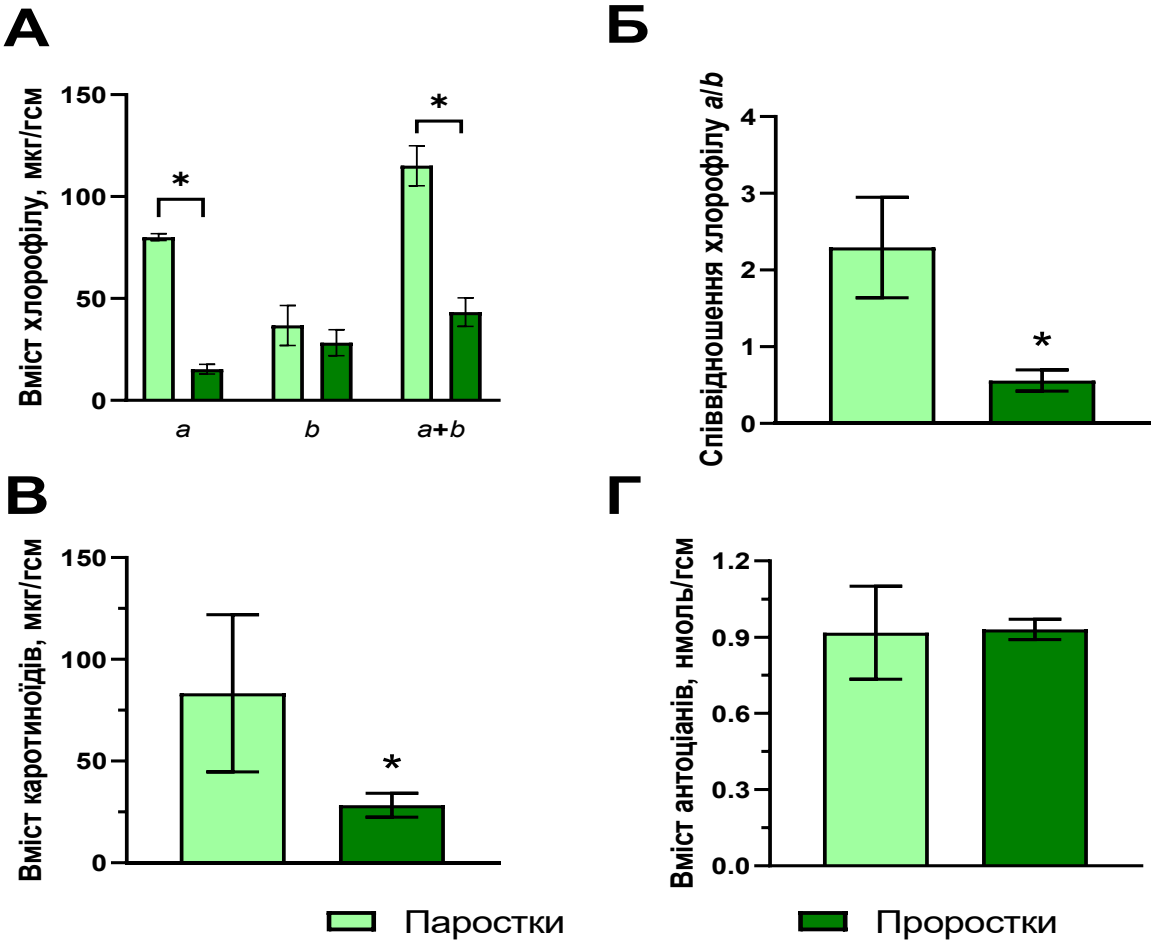


Рис. 3.1. **Вміст пігментів у препаратах броколі**. Вміст хлорофілу (А), співвідношення хлорофілу *a* до *b* (Б), вміст каротиноїдів (В) і вміст антоціанів (Г). Дані представлені як середнє арифметичне ± стандартне відхилення з трьох біологічних повторів. *Достовірно відрізняються ($P < 0,05$) між групами за t-критерієм Стюдента.

Антоціани – це група водорозчинних вакуолярних поліфенолів, які виконують функції пігментів та антиоксидантів [140,174]. Відсутність різниці вмісту антоціанів між паростками та проростками броколі дозволяє припустити, що вони рівномірно розподілені в різних частинах препаратів, на відміну від каротиноїдів або хлорофілів, яких було більше в зелених частинах броколі.

3.1.2 Вміст крохмалю, проліну та вітаміну B_1 у препаратах броколі

Вміст крохмалю, проліну та вітаміну B_1 був приблизно в три рази більшим у проростках броколі порівняно з паростками (Рис. 3.2А-В). Насіння броколі містить запаси крохмалю як джерела глюкози для проростання рослини [213]. У паростках броколі вміст крохмалю був значно меншим, ніж у проростках (Рис. 3.2А). У проростках крохмаль використовується як джерело глюкози для проростання, тому його високий вміст це комбінація дії обох факторів – і накопичення від фотосинтезу, і запасу з насіння – для росту і розвитку рослини.

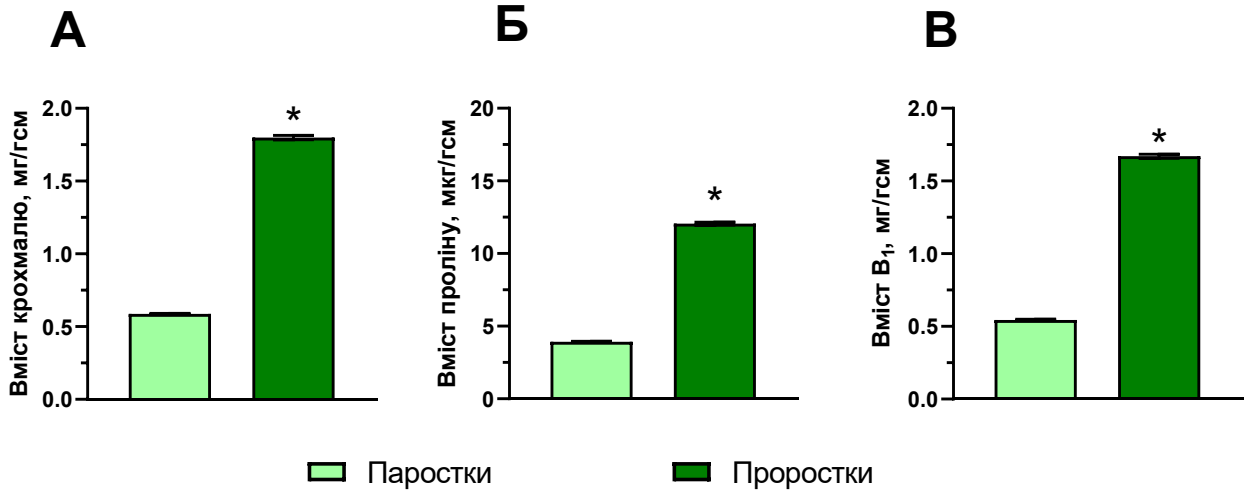


Рис. 3.2. **Вміст речовин у препаратах броколі**. Вміст крохмалю (А), вміст проліну (Б) та вміст вітаміну B_1 (В). Дані представлені як середнє арифметичне ± стандартне відхилення з шести біологічних повторів. *Достовірно відрізняються ($P < 0,05$) між групами за t-критерієм Стюдента.

Вітамін B_1 є важливим коферментом для утворення енергії, біосинтезу певних сполук та відповіді рослин на дію стресу [214]. Пролін є осмопротектором при шкідливих умовах [215]. Вищий вміст вітаміну B_1 та проліну зумовлений їх більшою потребою в насінні броколі, зокрема для енергозабезпечення, ефективного проростання та посиленої стійкості до абіотичного стресу [216,217]. Вищий вміст вітаміну B_1 в насінні броколі, ніж в зелених паростках, спостерігався й раніше [217].

Вміст вітаміну С і вітаміну Р був подібним у паростків та проростків і становив 35,2 мг на 100 г зразка броколі та 0,12 мг на 100 г відповідно. Ці дані щодо вітаміну С відповідають наведеним в літературі для проростків броколі [148].

Як проміжний підсумок, проростки броколі слід вважати цінішим продуктом, ніж паростки, оскільки вони містять вищий вміст проліну та вітаміну B_1. Джерелом цих сполук є як і корисні запаси з насінини, так і їх продукція *de novo* з обміну речовин, отримуючи енергію від фотосинтезу, попри те, що вміст пігментів у проростках є нижчим.

3.1.3 Вміст загального білку, фруктози, поліфенольних сполук та флавоноїдів у препаратах броколі

Вміст загального білку у водних екстрактах паростків (ВЕП) та проростків (ВЕПР) броколі становив ~28 мг/гсм (Рис. 3.3А). Цей показник суттєво не відрізнялася між водним (ВЕП) та спиртовим (СЕП) екстрактами паростків броколі. Спиртовий екстракт проростків (СЕПР) містив приблизно на 30% більше білку, ніж екстракт СЕП, і на 25% більший, ніж екстракт ВЕПР.

Вищий вміст білку в етанольних екстрактах з проростків броколі порівняно з водними екстрактами можна пояснити розчинністю білків у екстрактах. Раніше було показано, що при екстракції етанолом деякі білки можуть випадати в осад [218]. Проте наші результати показали, що вміст білку не відрізнявся між водними і спиртовими екстрактами. Видно, що значна кількість білків зберігалися

неосадженими у спиртовому розчині і їхня присутність була встановлена методом Бредфорда і це визначається властивостями специфічних білків препаратів броколі.

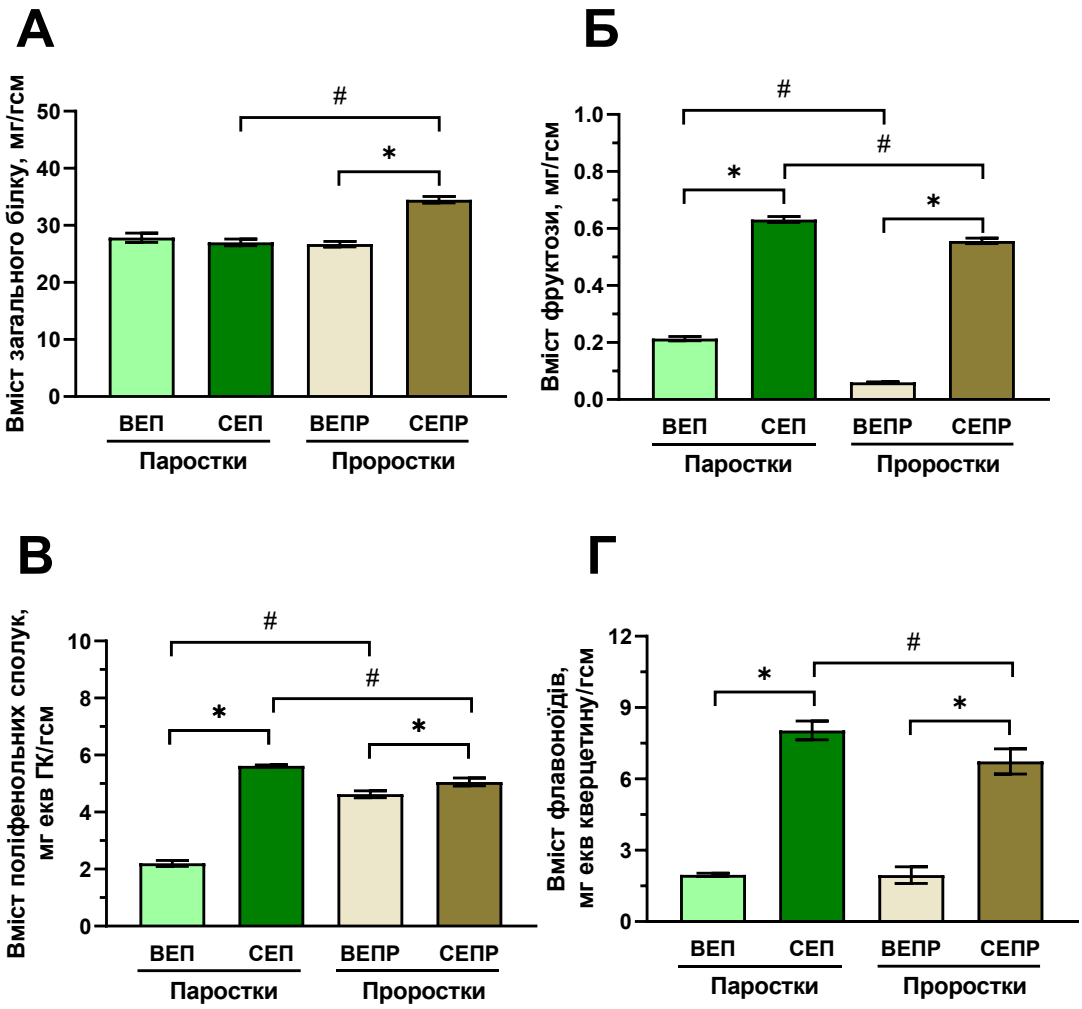


Рис. 3.3. **Вміст сполук у препаратах броколі**. Вміст загального білку (А), вміст фруктози (Б), вміст поліфенольних сполук (В) і вміст флавоноїдів (Г). Дані представлені як середнє арифметичне ± стандартне відхилення з чотирьох-шістьох біологічних повторів. *Достовірно відрізняються ($P < 0,05$) між групами водної і спиртової екстракції, #Достовірно відрізняються ($P < 0,05$) між паростками і проростками за однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA) і тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Ми встановили відмінності вмісту фруктози у зразках паростків та проростків броколі, які також залежали від методу екстракції (Рис. 3.3Б). У спиртових екстрактів броколі (СЕП та СЕПР) вміст фруктози був у три рази вищий порівняно з водними екстрактами (ВЕП та ВЕПР, відповідно). Екстракція з етанолом могла сприяти руйнуванні клітинних стінок та мембран [219]. Наслідком цієї здатності могло бути вивільнення більшої кількості зв'язаних сполук (наприклад, фруктози) порівняно з водною екстракцією. У екстракті ВЕП вміст фруктози був значно більшим порівняно з ВЕПР. У групі СЕП рівень фруктози був найбільшим серед усіх груп і на 13% більшим порівняно з показником СЕПР. Вищий вміст фруктози в зелених паростках броколі був очікуваним результатом, оскільки в зелених частинах активно відбувається фотосинтез (про що також свідчив вміст пігментів) і біосинтез простих моносахаридів, таких як фруктоза і глюкоза, тоді як у проростках вміст пігментів і фруктози був меншим.

Загальний вміст поліфенольних сполук у зразках броколі залежав від типу препарату (паростки чи проростки) та методу екстракції (водна або спиртова екстракція) (Рис. 3.3В). Зразки СЕП містили найвищий вміст поліфенольних сполук (5,62 ± 0,03 мг екв ГК/гсм), який був на 150%, 21% та 10% вищим за відповідні значення в групах ВЕП, ВЕПР та СЕПР. ВЕП продемонстрував найнижчий вміст поліфенольних сполук (2,20 ± 0,10 мг екв ГК/гсм) серед усіх екстрактів, що приблизно в два рази нижче, ніж у групі ВПР. Наші результати щодо вмісту поліфенольних сполук узгоджуються з попередніми дослідженнями різних авторів. Загалом, вміст поліфенольних сполук у зразках броколі був у діапазоні 2-8 мг екв ГК/гсм, що досить типово для літературних даних, проте описані в літературі дані та експериментальні умови проведення дослідів, такі як збирання та екстракція, не були уніфіковані [220–223].

Отримані результати показали, що екстракція етанолом забезпечує вищий вихід загальних фенольних сполук, ніж екстракція водою. Це пов'язано з тим, що багато поліфенольних сполук погано розчинні у воді, але добре розчинні в неполярних розчинниках, або в етанолі [153,224]. Етанол є амфіфільним

розчинником, оскільки може взаємодіяти з полярними і неполярними молекулами, що пояснює його універсальність. При водній екстракції проростки броколі мали у 2,1 рази вищий вміст поліфенольних сполук, ніж зелені паростки. Цей результат є аргументом на користь вибору проростків (пророщеного насіння) броколі для застосування у дослідженнях і в повсякденному харчуванні, оскільки вихід і засвоєння корисних поліфенольних сполук буде вищим, ніж при споживанні зелених паростків і дорівнюватиме даним, отриманим при спиртових екстракціях.

Флавоноїди є найпоширенішою групою фенолів у рослинах [225]. Вміст флавоноїдів у екстрактах броколі залежав від типу екстракції та зразку рослини, подібно до показників щодо вмісту фруктози та поліфенольних сполук. Вміст флавоноїдів був у три-чотири рази вищим в спиртових екстрактах, ніж у водних (Рис. 3.3Г). Достовірної різниці між значеннями ВЕП та ВЕПР не було встановлено, але СЕП мали у 1,2 рази вищий вміст флавоноїдів порівняно з СЕПР. Вміст флавоноїдів у екстрактах броколі приблизно відповідав вмісту поліфенольних сполук ($r = 0,790$). Подібні результати щодо вмісту флавоноїдів у броколі продемонстрували й інші дослідники [12,148,221,223]. Як висновок, 70% розчин етанолу забезпечує кращу екстракцію флавоноїдів, ніж гаряча вода.

3.1.4 Загальна антиоксидантна активність препаратів броколі

Загальна антиоксидантна активність (ЗАА) є показником здатності рослинного матеріалу знешкоджувати активні форми кисню (АФК). Останні утворюються як у процесах нормального метаболізму (побічні продукти, сигнальні шляхи), так і за дії стресових чинників. При споживанні рослин, наприклад броколі, антиоксидантні сполуки також виконують захисну роль у людському чи тваринному організмі. Тому визначення *in vitro* ЗАА препаратів броколі є важливим показником для оцінки ефектів споживання броколі на організм. Результати оцінки ЗАА різними методами в препаратах броколі подані на Рис. 3.4.

Одним з методів визначення ЗАА є знешкодження катіон-радикалу $ATBS^{\bullet+}$. Цей параметр відрізнявся між дослідними групами з різними препаратами броколі та різними типами екстракції. ВЕП мав на 19% меншу здатність знешкоджувати $ATBS^{\bullet+}$ порівняно з СЕП (Рис. 3.4А). Проте показники з проростками броколі були протилежні – зразок ВЕПР приблизно в 1,5 рази ефективніше знешкоджував радикал $ATBS^{\bullet+}$, ніж СЕПР. Окрім того, група ВЕПР мала найбільше значення ЗАА за цим параметром серед усіх досліджуваних груп. Це значення було приблизно в 1,4 рази більшим порівняно зі значенням ВЕП. Групи ВЕП та СЕПР продемонстрували подібну ефективність знешкодження $ATBS^{\bullet+}$. Отримані дані про антиоксидантні властивості триденних проростків броколі були подібними до даних літератури [13].

Загальну антиоксидантну здатність визначали фосфомолібдатним методом (Рис. 3.4Б) та за здатністю відновлювати залізо (Рис. 3.4В). Ці методи показали протилежні результати між собою. Значення ЗАА за фосфомолібдатним методом були вищими при спиртовій екстракції зразків броколі (Рис. 3.4Б). Зокрема, група СЕП мала приблизно в 3,2 рази вищу ЗАА порівняно з групою ВЕП. Водні та спиртові екстракти проростків броколі мали вищі значення ЗАА, ніж відповідні екстракти паростків броколі. Значення ЗАА за фосфомолібдатним методом у ВЕПР та СЕПР групах були на 120% та 15% вищими порівняно з відповідними значеннями ВЕП та СЕП.

Обидва водні екстракти броколі показали вищу здатність відновлювати йони заліза порівняно з відповідними спиртовими екстрактами (Рис. 3.4В). Також водні і спиртові екстракти проростків броколі показали вищу ЗАА порівняно з відповідними екстрактами паростків (Рис. 3.4В).

У дослідженнях інших науковців повідомлялося, що зразки броколі з найвищим вмістом поліфенольних сполук демонстрували відповідно вищу ЗАА [151,153,227]. У нашому дослідженні показники ЗАА за знешкодженням $ATBS^{\bullet+}$ та відновленням заліза не корелювали з вмістом поліфенольних сполук та флавоноїдів у екстрактах броколі (r = 0,3721 та r = -0,0913). Проте показники ЗАА

визначені фосфомолібдатним методом показали чітку кореляцію з вмістом поліфенолів (r = 0,894) та флавоноїдів (r = 0,847).

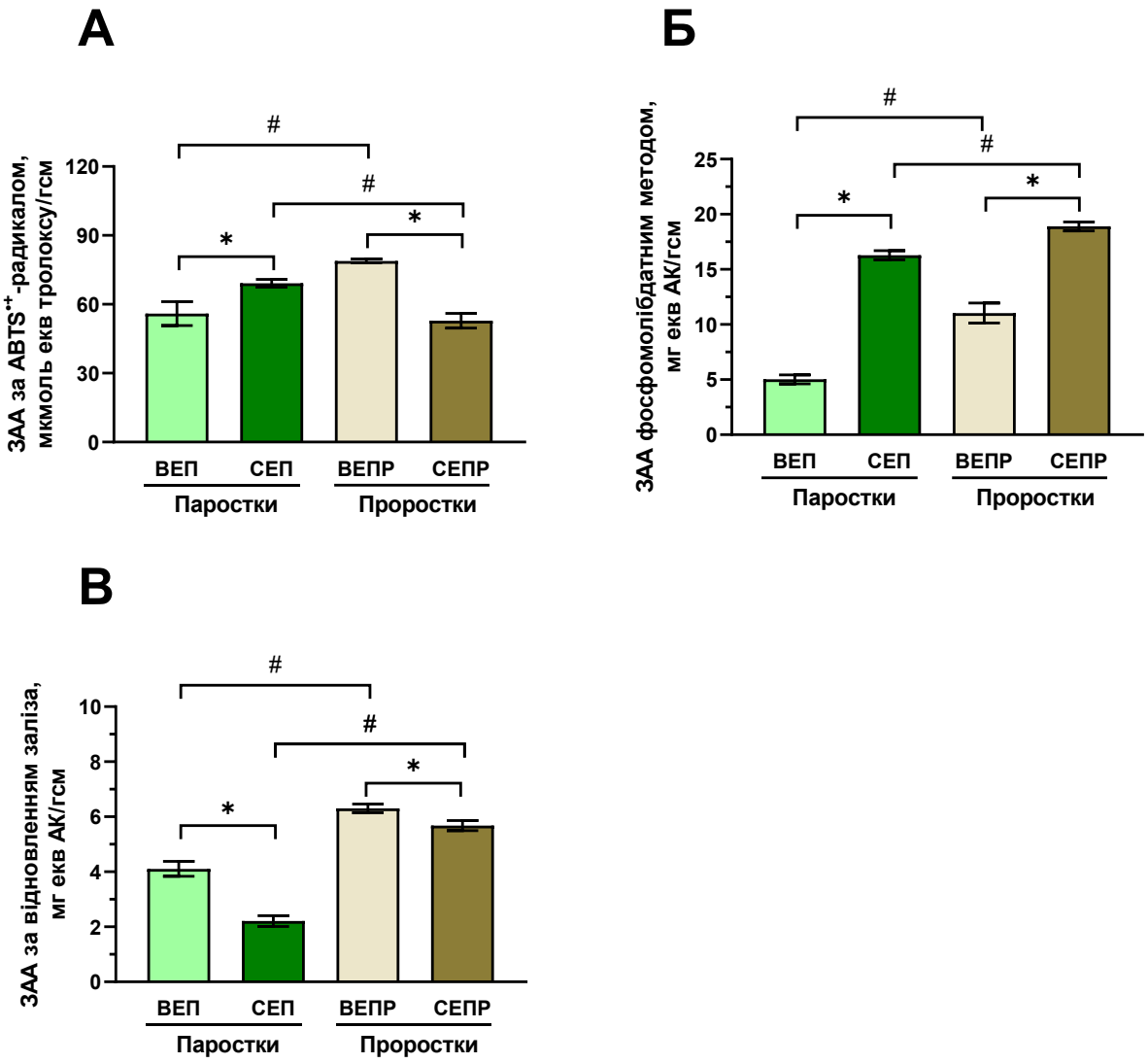


Рис. 3.4. **Загальна антиоксидантна активність (ЗАА) препаратів броколі**: за здатністю знешкоджувати радикал $ATBS^{\bullet+}$ (А), за фосфомолібдатним методом (Б) і за здатністю відновлювати йони заліза (В). Дані представлені як середнє арифметичне ± стандартне відхилення з чотирьох-шістьох біологічних повторів. *Достовірно відрізняються ($P < 0,05$) між групами водної і спиртової екстракції, #Достовірно відрізняються ($P < 0,05$) між паростками і проростками за однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA) і тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Отримані результати можна пояснити різною специфічністю та чутливістю різних методів, які використовуються для визначення ЗАА. Визначення здатності до знешкодження радикалу $ATBS^{\bullet+}$ відображає комбіновану дію всіх присутніх у досліджуваних екстрактах сполук з антиоксидантною дією, оскільки радикал $ATBS^{\bullet+}$ добре розчиняється у воді та спирті, а синій комплекс, який використовується для визначення, утворюється при взаємодії з усіма сполуками, що мають антиоксидантний потенціал [228,229]. Окрім того, $ATBS^{\bullet+}$ легко реагує з каротиноїдами, які здатні знешкоджувати радикали, але не можуть відновлювати йони заліза [230]. Фосфомолібдатний метод є більш специфічним для фенольних сполук [231]. Саме тому, ймовірно, цей метод показав найвищу кореляцію з вмістом поліфенольних сполук. Це підкреслює важливість використання декількох методів для всебічної оцінки антиоксидантної здатності рослинних екстрактів.

Загальна антиоксидантна активність може бути результатом комбінованої дії широкого спектру БАПР з антиоксидантними властивостями, які присутні в препаратах броколі, таких як поліфенольні сполуки, вітаміни (С, Е, А), каротиноїди, тіолвмісні сполуки, глюкозинолати та інші. Усі вони можуть неферментативно знешкоджувати АФК, або відновлювати окислені сполуки [152,222,223].

Наші результати демонструють, що екстракти проростків броколі мали вищу антиоксидантну здатність, ніж екстракти з паростків броколі. Проростки броколі містили більше неферментативних антиоксидантів, ніж зелені паростки. Ми припустили, що вищий вміст проліну в проростках броколі може сприяти антиоксидантній здатності зразків. Пролін є не тільки амінокислотою, як будівельним блоком для білку, але й важливою захисною молекулою з антиоксидантними властивостями [216,232]. Зокрема, потенціал проліну для нейтралізації вільних радикалів *in vitro* вже був досліджений науковцями і вищий вміст проліну у проростках броколі є перевагою перед паростками [232]. Водні екстракти броколі продемонстрували вищу антиоксидантну активність за здатністю знешкоджувати $ABTS^{\bullet+}$. Ці результати були дещо несподіваними,

оскільки спиртові рослинні екстракти зазвичай демонструють вищу антиоксидантну здатність, ніж водні, завдяки кращій екстракції неполярних гідрофобних антиоксидантів, насамперед багатьох поліфенольних сполук [153,224]. Ми встановили вищий вміст поліфенольних сполук в спиртових екстрактах порівняно з водними. Проте спиртові екстракти не мали вищу ЗАА, яку визначали трьома методами. Водні екстракти також можуть містити більше гідрофільних речовин з антиоксидантною активністю. У водних екстрактах зазвичай краще екстрагуються гідрофільні антиоксиданти, такі як вітамін С, деякі поліфенольні сполуки, та глюкозинолати, яких багато в броколі [149,152,222]. Також водні екстракти можуть містити як полярні, так і деякі неполярні антиоксиданти завдяки специфічним властивостям води як розчинника, що дозволяє виявляти широкий спектр антиоксидантів. Водні екстракти при правильних умовах можуть зберігати стабільність певних БАПР, в яких може втрачатися антиоксидантна здатність при використанні спиртових розчинників. Зокрема, водні екстракти можуть містити білки з тіоловими групами залишків цистеїну, тоді як при екстракції етанолом деякі білки можуть випадати в осад. Такі тіолвмісні білки, навіть якщо вони частково денатуровані, можуть взаємодіяти через SH-групи з АФК неферментативно і відновлювати окислені сполуки [233]. Разом комбінація низькомолекулярних і високомолекулярних сполук може забезпечити вищу антиоксидантну здатність водних екстрактів порівняно зі спиртовими.

3.1.5 Вміст сульфорафану у проростках броколі

Сульфорафан – одна з біологічно активних молекул броколі, яка привертає багато уваги в літературі. Однак, повідомлення про його вміст не узгоджуються між собою і демонструють сильну варіабельність залежно від умов вирощування, віку та методу підготовки зразків броколі [185].

Ми визначили концентрацію сульфорафану за допомогою розробленого нами флюоресцентного методу, заснованого на його реакційноздатній

ізотіоціанатній групі (-NCS), яка рідко зустрічається в інших природних сполуках [13]. Наші результати показують, що вміст сульфорафану в спиртових екстрактах проростків є відносно низьким, близько 0,2 мкмоль/г (Мал. 3.5). Однак, коли барвник додавали до рослинного матеріалу перед гомогенізацією, визначений вміст був приблизно в п’ять разів вищим.

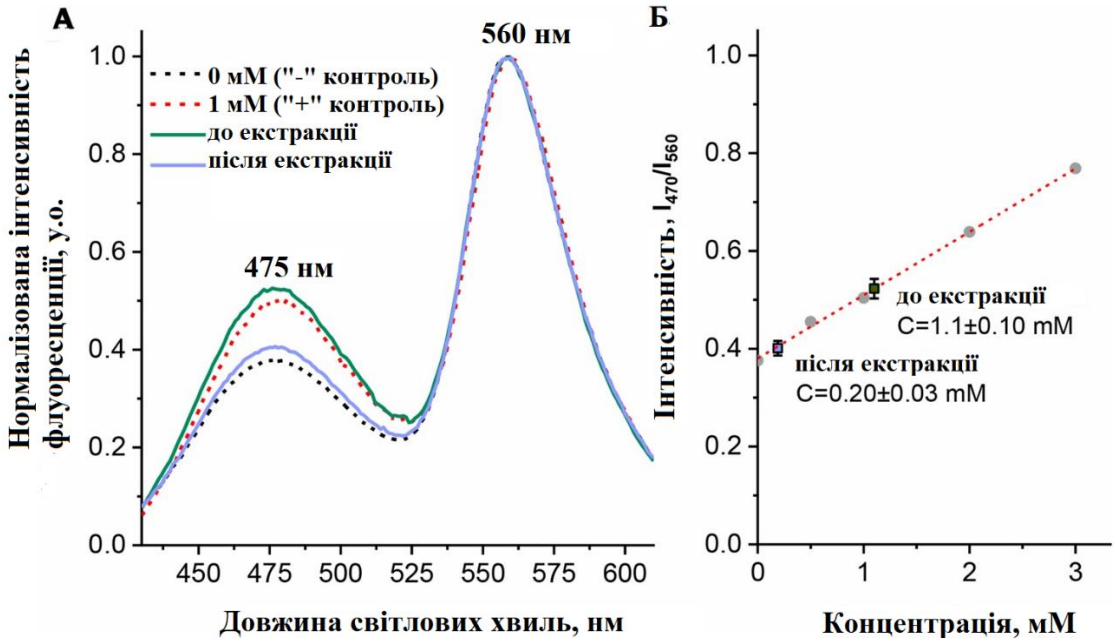


Рис. 3.5. **Вміст сульфорафану у зразках проростків броколі**. Нормалізовані спектри флюоресценції барвника 6AF (А), який інкубували з проростками броколі до (зелена лінія) і після (синя лінія) екстракції. Для порівняння наведені спектри позитивного та негативного контролю лише з барвником. Довжина хвилі збудження становила 390 нм, 1,4-диоксан використовували як розчинник. Калібрувальна крива з використанням співвідношення флюоресценції при 470 нм та 560 нм (Б). Зелені та фіолетові точки відповідають даним зі спектрів з панелі А. Смуги похибок – це стандартне відхилення з трьох повторів. Червона пунктирна лінія – лінійна відповідність точок, використаних для калібрування (показано сірим кольором).

Ми припускаємо, що СФН під час гомогенізації рослин швидко, за лічені хвилини після вивільнення після гомогенізації, взаємодіє з тіоловими групами

білків, так як це відбувається при рості рослин чи захисті від пошкодження комахами-шкідниками.

3.2 Вплив споживання паростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей

3.2.1 Споживання їжі та рідини мишами

У першому підбірковому експерименті миші споживали базову їжу або кафетерійну їжу, серед якої були різні продукти раціону людини. Харчовим додатком були паростки броколі, які додавали у кафетерійну чи базову їжу.

Миші з групи, які споживали базову їжу (БЇ) впродовж експерименту, споживали 5,04±0,13 г корму на мишу на добу (Рис. 3.6А). Миші з групи базової їжі та паростків броколі (БЇ5ПБ) споживали на 17% менше корму, ніж миші з групи БЇ. Також миші з групи БЇ5ПБ споживали більше корму, ніж миші з групи КЇ. Миші з групи кафетерійної їжі (КЇ) споживали приблизно на 36% менше їжі, ніж миші з групи БЇ (Рис. 3.6А). Миші з групи кафетерійної їжі з паростками броколі (КЇ5ПБ) споживали приблизно на 21% рази менше їжі, ніж миші з групи БЇ. Миші з групи КЇ5ПБ споживали достовірно більше їжі, ніж миші з групи КЇ. Усі миші отримували достовірно менше калорій разом з їжею порівняно з групою базової їжі (Рис. 3.6Б). Проте кількість отриманих калорій була більшою у групі КЇ5ПБ порівняно з КЇ.

Деякі подібні дослідження демонстрували, що гризуни споживали приблизно однакову кількість кафетерійної їжі, порівняно з контрольною [11,234]. Також було встановлено, що хоча лабораторні тварини споживали менше кафетерійної їжі, вони отримували стільки ж калорій з їжею, скільки й тварини, що споживали контрольну їжу [235]. Можна припустити, що миші отримували меншу кількість калорій, оскільки кафетерійна їжа так впливала на молекулярні та фізіологічні механізми відчуття ситості та апетиту, що краще забезпечувала

відчуття насичення відносно базової їжі. Це, ймовірно, і попереджувало переїдання.

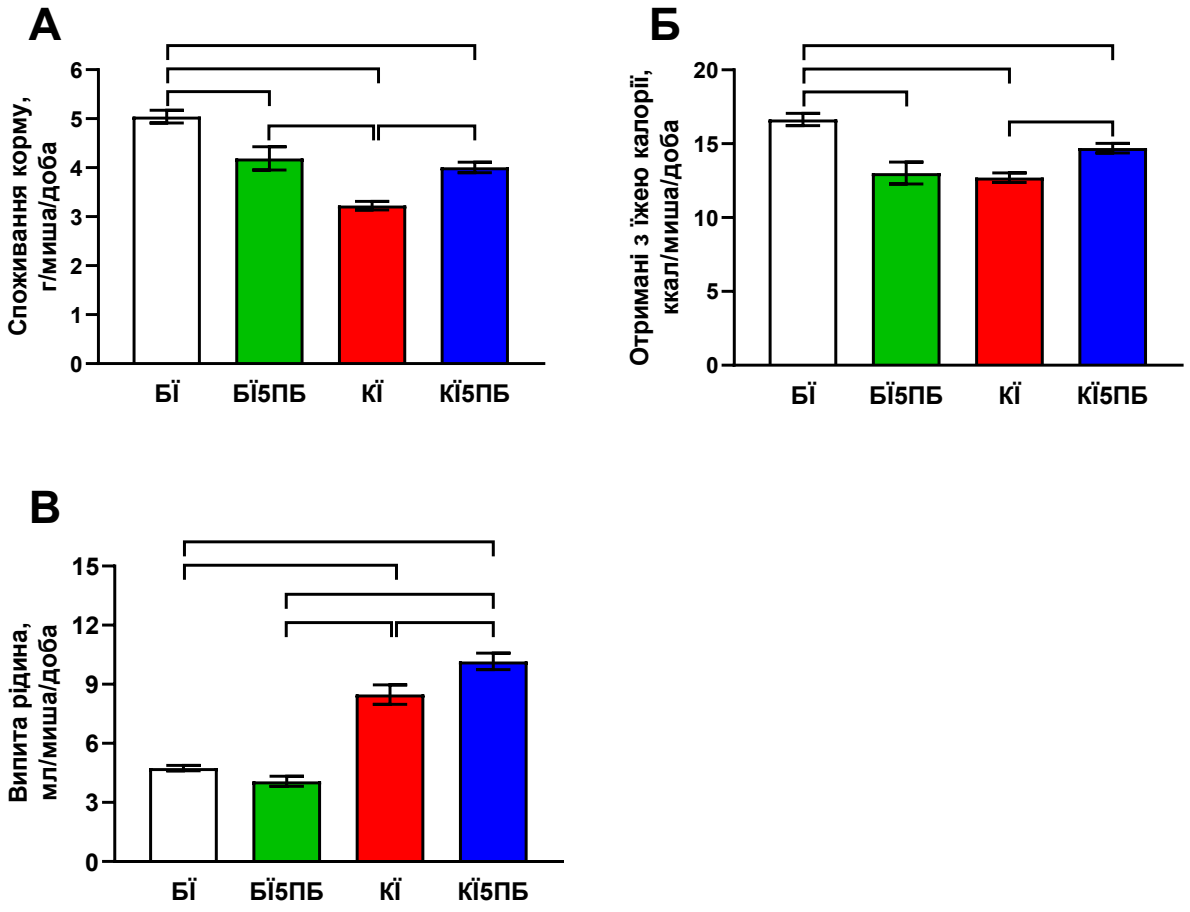


Рис. 3.6. **Параметри харчування мишей**. Споживання їжі (А), кількість отриманих калорій з їжею (Б) та споживання рідини (В) мишами, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Споживання їжі та води визначали кожного другого дня. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього від кількості визначень протягом усього експерименту (92 визначення). У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього тесту ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Додавання паростків броколі до раціону мишей зменшувало споживання корму. Це може свідчити про вплив паростків броколі на харчову поведінку, ймовірно пов'язаний зі станом енергетичних систем організму або смакових відчуттів.

Миші з групи БЇ споживали 4,74±0,13 мл рідини на мишу на добу (Рис. 3.6 В). Миші з групи БЇ5ПБ споживали у 2,1 та 2,5 разів менше рідини, ніж миші з груп КЇ та КЇ5ПБ відповідно. У групі КЇ споживали приблизно в 1,8 разів більше рідини, ніж миші з групи БЇ (Рис. 3.6 В). Миші з групи КЇ5ПБ споживали найбільше рідини з-поміж дослідних груп – 10,2±0,4 мл рідини на мишу на добу (Рис. 3.6В). Наші дані свідчать про те, що миші випивали більше рідини при споживанні кафетерійної їжі, що є логічним з прикладу людської харчової поведінки при споживанні кафетерійної їжі та солодких напоїв, які стимулюють почуття спраги. Проте було також доведено експериментально, що споживання висококалорійної їжі не впливає на кількість випитої рідини лабораторними тваринами [67].

Миші з двох груп, які мали кафетерійний раціон споживали менше їжі і більше води порівняно з мишами на базовому раціоні. Миші, які отримували базовий раціон з паростками броколі, споживали менше їжі. Згідно літературних даних, додавання броколі до кафетерійної їжі усувало переїдання і надходження великої кількості енергії. У нашому дослідженні миші споживали менше їжі і як при споживанні кафетерійної їжі, так і при споживанні такої з додаванням паростків броколі. Отже, паростки броколі окремо чи разом з кафетерійною їжею вплинули на харчові потреби мишей.

3.2.2 Маса тіла та тканин мишей

У кінці експерименту середня маса тіла мишей, що споживали базову їжу, зменшилася на 7% порівняно з початковою (Додаток Д). У групі БЇ5ПБ маса мишей залишилася незмінною. У групі КЇ кінцева маса тіла була на 7% більшою. При споживанні кафетерійної їжі з паростками броколі маса мишей була на 14%

більшою у кінці експерименту, ніж початкова. Кінцева маса мишей була найбільшою у групі КЇ5ПБ (~34 г) порівняно з рештою груп (~22-26 г) (Рис. 3.7А).

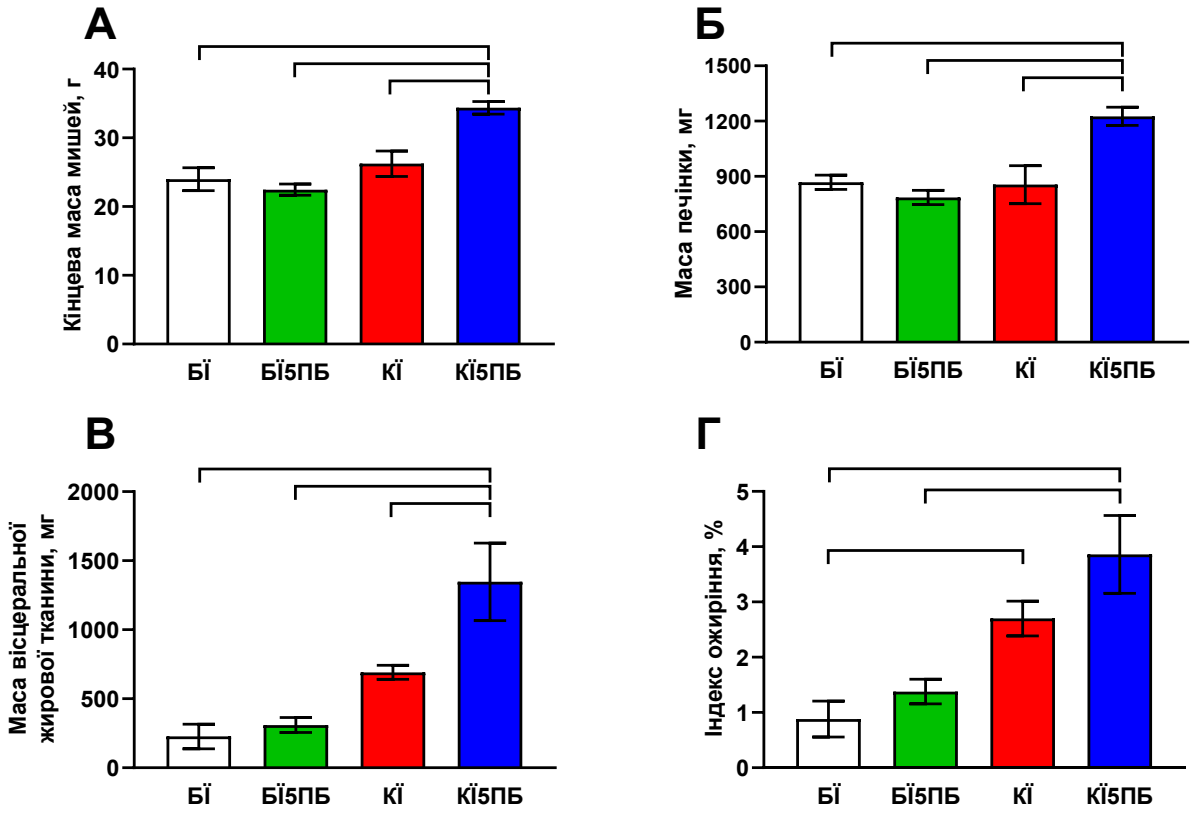


Рис. 3.7. **Параметри тіла мишей**. Кінцева маса тіла (А), маса печінки (Б), маса жирової тканини (В) та індекс ожиріння (Г) мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Як висновок, додавання паростків броколі не усувало набір маси тіла внаслідок споживання кафетерійної їжі. Навіть більше цього, ми спостерігали більшу масу тіла у мишей, що споживали кафетерійну їжу з броколі порівняно з кафетерійною їжею окремо. Початкова маса мишей була також відмінна і більша

у групі з комбінацією кафетерійної їжі та броколі, що було спричинено випадково внаслідок рандомізації при закладанні експерименту, що також помічали і пояснювали інші дослідники [236].

Маса печінки була найбільшою у мишей, які споживали кафетерійну їжу разом з паростками броколі (1226±49 мг) порівняно з рештою експериментальних груп (Рис. 3.7Б). Також при споживанні кафетерійної їжі з паростками броколі маса вісцерального жиру була найбільшою і становила 1347±280 мг (Рис. 3.7В). Індекс ожиріння був достовірно більшим у групі КЇ порівняно з БЇ, а також у групі КЇ5ПБ порівняно з групою БЇ та БЇ5ПБ (Рис. 3.7Г).

Ми визначили декілька фізіологічних показників, які сигналізували про набуття у мишей ознак ожиріння при споживанні кафетерійної їжі. Додавання паростків броколі, хоч і сприяло зменшенню споживання їжі і підтримці сталої маси тіла мишей з базовою їжею, не вплинуло на накопичення вісцерального жиру у тілі мишей на кафетерійному раціоні.

3.2.3 Гематологічні та біохімічні параметри крові мишей

Рівень гемоглобіну достовірно не відрізнявся між дослідними групами (Додаток Е). Гематокрит крові був найвищим у групі мишей БЇ5ПБ порівняно з рештою дослідних груп (Рис. 3.8А). Це може свідчити про збільшення кількості еритроцитів або їхнього розміру. Броколі є джерелом заліза, вітамінів (наприклад аскорбінової кислоти) та інших мікроелементів, які важливі для утворення еритроцитів, споживання яких могло призвести до покращення кровотворення [236]. Проте додавання паростків броколі до кафетерійної їжі не дало такого ж ефекту. Це може бути пов'язане з тим, що кафетерійна їжа, можливо, містить інші компоненти, які перешкоджають засвоєнню корисних речовин з броколі.

При споживанні кафетерійної їжі та кафетерійної їжі разом з паростками броколі кількість еритроцитів була у 1,4 та 1,6 разів більшою порівняно з базовою їжею (Рис. 3.8Б). Проте кількість еритроцитів була найменшою при споживанні базової їжі з броколі. Це є суперечливим результатом з кількох причин. По-перше,

при додаванні паростків броколі до кафетерійної їжі кількість еритроцитів була більшою, а при додаванні до базової їжі – меншою порівняно з групою БЇ. По-друге, миші з групи БЇ5ПБ мали вищий гематокрит порівняно з групою БЇ, що є взаємопротилежним ефектом. При споживанні кафетерійної їжі кількість лейкоцитів була достовірно меншою, ніж при споживанні базової їжі (Рис. 3.8В).

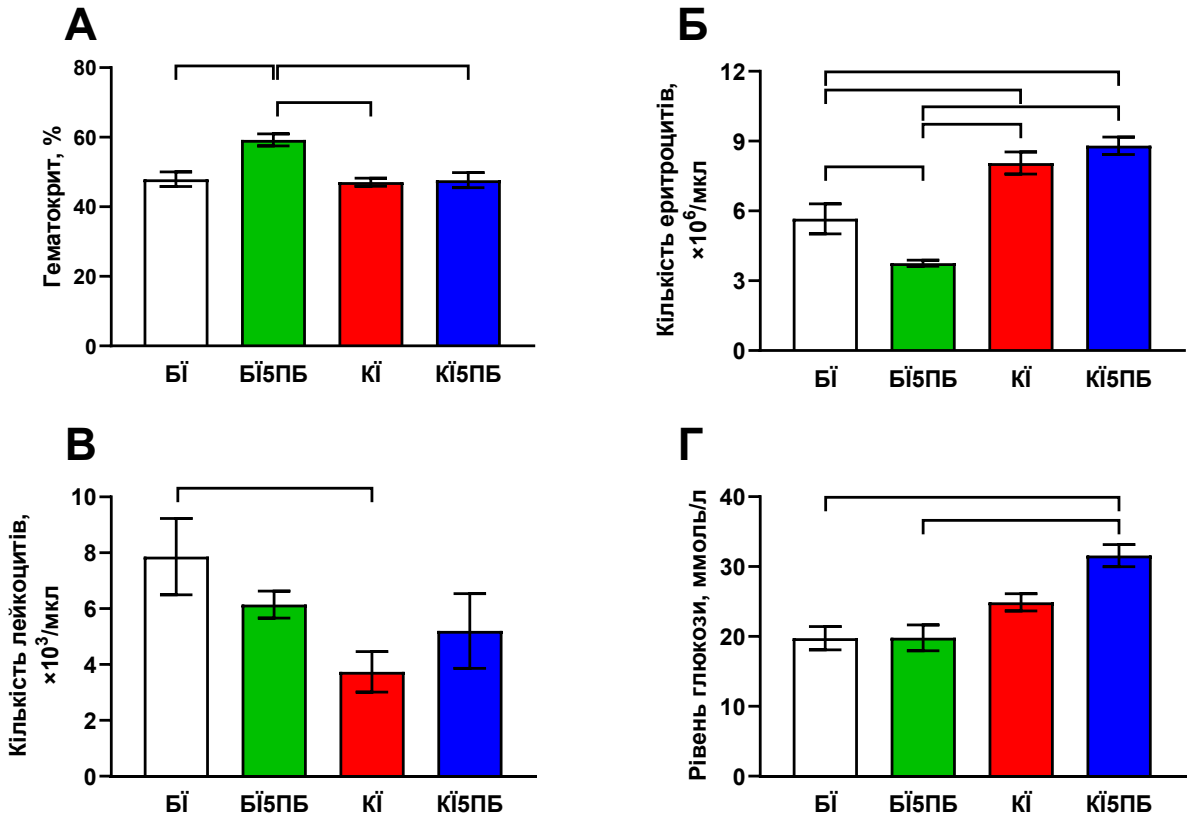


Рис. 3.8. Гематологічні параметри та рівень глюкози у крові. Гематокрит (А), кількість еритроцитів (Б), кількість лейкоцитів (В) і рівень глюкози (Г) у крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Рівень глюкози натще в крові мишей був достовірно вищим у групі КЇ5ПБ порівняно з групами БЇ та БЇ5ПБ (Рис. 3.8Г). Біохімічні показники плазми крові мишей такі як рівень триацилгліцеролів (ТАГ), холестерину, активність параоксонази та мієлопероксидази, відносний рівень інтерлейкіну IL-1β не відрізнявся між групами (Додаток Е).

Отже, у мишей, які споживали кафетерійну їжу, розвинулися окремі ознаки ожиріння, такі як незначне збільшення маси тіла, але значне збільшення маси вісцерального жиру та індексу ожиріння. Біохімічні показники крові не виражали характерних змін, такі як вищий рівень ТАГ і холестерину в крові, які присутні при ожирінні та використовуються для діагностування у людей. Активність параоксонази також є важливим параметром, оскільки цей фермент усуває накопичення окислених ліпідів у судинах, попереджуючи розвиток атеросклерозу і наслідки запалення при ожирінні. Вищий рівень глюкози в крові визначили лише у групі мишей, у яких була комбінація кафетерійної їжі з паростками броколі. Ми припускаємо, що розвиток ожиріння мав місцевий осередок, такий як розростання вісцерального жиру, накопичення ліпідів у печінці та відсутність високих рівнів ліпідного профілю чи запальних процесів у крові, які поширюються організмом. Такий профіль морфологічних і біохімічних змін свідчить про розвиток у тварин фенотипу метаболічно здорового ожиріння (англ. lean but obese, худе ожиріння), який характеризується накопиченням вісцерального жиру за відсутності типових системних метаболічних порушень. Проте цей стан має свої ризики для здоров’я, такі як накопичення і розростання адипоцитів з поширення запалення у жировій та інших тканинах. Ці фактори можуть пошкоджувати внутрішні органи, викликати захворювання (неалкогольна жирова хвороба печінки) чи бути ланкою у виникненні інших порушень (наприклад гіперглікемії, цукрового діабету 2 типу тощо).

Вплив паростків броколі на ожиріння не був чітко виражений. Попри зменшення споживання корму, стабільність параметрів ліпідного профілю у крові, при додаванні паростків броколі до кафетерійної їжі не було уникнення зростання маси тіла та маси вісцерального жиру у мишей. Як припущення, споживання

броколі може зменшити надходження їжі до організму миші, проте не може вплинути на розподіл отриманої енергії чи використання запасних ліпідів.

3.2.4 Маркери оксидативного стресу у печінці та корі головного мозку мишей

Вміст пероксидів ліпідів достовірно не відрізнявся між дослідними групами у печінці та корі головного мозку мишей (Додаток Є і Ж). Це свідчить про відсутність окисних пошкоджень та термінацію генерації окислення ліпідів, які виникають внаслідок отримання надлишку енергії з їжею.

При споживанні кафетерійної їжі вміст карбонільних груп білків у печінці був найвищим і відрізнявся від решти дослідних груп (Рис. 3.9). При додаванні паростків броколі цей показник не відрізнявся від значень при споживанні БЇ (Рис. 3.9).

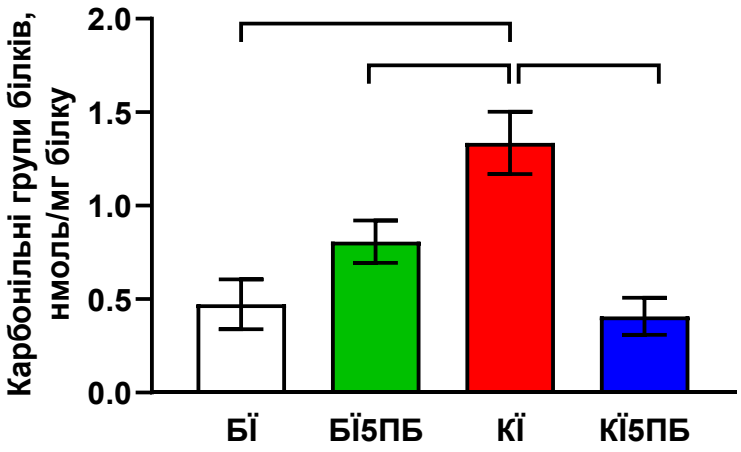


Рис. 3.9. **Вміст карбонільних груп білків у печінці мишей**. Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ) кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Отримані результати свідчать, що кафетерійна їжа викликала ОС у печінці мишей, що було встановлено за вмістом карбонільних груп білків, тоді як вміст пероксидів ліпідів не відрізнявся між групами.

Можна припустити, що захисні системи організму зупиняють пероксидне окислення ліпідів, яке може виникати внаслідок споживання кафетерійної їжі. Однак ці системи можуть виснажуватися і бути неефективними у боротьбі з ОС та його наслідками, про що свідчить високий вміст карбонільних груп при споживанні лише кафетерійної їжі. Комплексна дія антиоксидантних ферментів з антиоксидантами, виробленими як і клітинами печінки мишей, так і отриманими у базовій чи кафетерійній їжі з паростками броколі демонструє здатність зупиняти пероксидне окислення ліпідів і вільнорадикальне окислення білків у печінці мишей.

3.2.5 Активність ферментів антиоксидантного захисту у печінці мишей

Встановити відповідь організму на оксидативний стрес можна не лише за допомогою реєстрації маркерів ОС, а й за допомогою визначення активності антиоксидантних та допоміжних ферментів.

Активність супероксиддисмутази достовірно не відрізнялася між дослідними групами (Додаток Є). Активність каталази була достовірно нижчою при споживанні кафетерійної їжі разом з паростками броколі, порівняно з базовою їжею (Рис. 3.10А). Активність глютатіонпероксидази не відрізнялася між дослідними групами (Додаток Є). Активність глютатіон-S-трансферази (GST) була достовірно вищою при споживанні кафетерійної їжі з паростками броколі порівняно з базовою їжею та кафетерійною їжею (Рис. 3.10Б). Активність GST була достовірно нижчою при споживанні базової їжі з паростками броколі порівняно з рештою груп (Рис. 3.10Б). Групи БЇ5ПБ, КЇ та КЇ5ПБ продемонстрували нижчу активність глютатіонредуктази порівняно з групою БЇ (Рис. 3.10В). Активність HXO1 не відрізнялася між дослідними групами (Додаток Є).

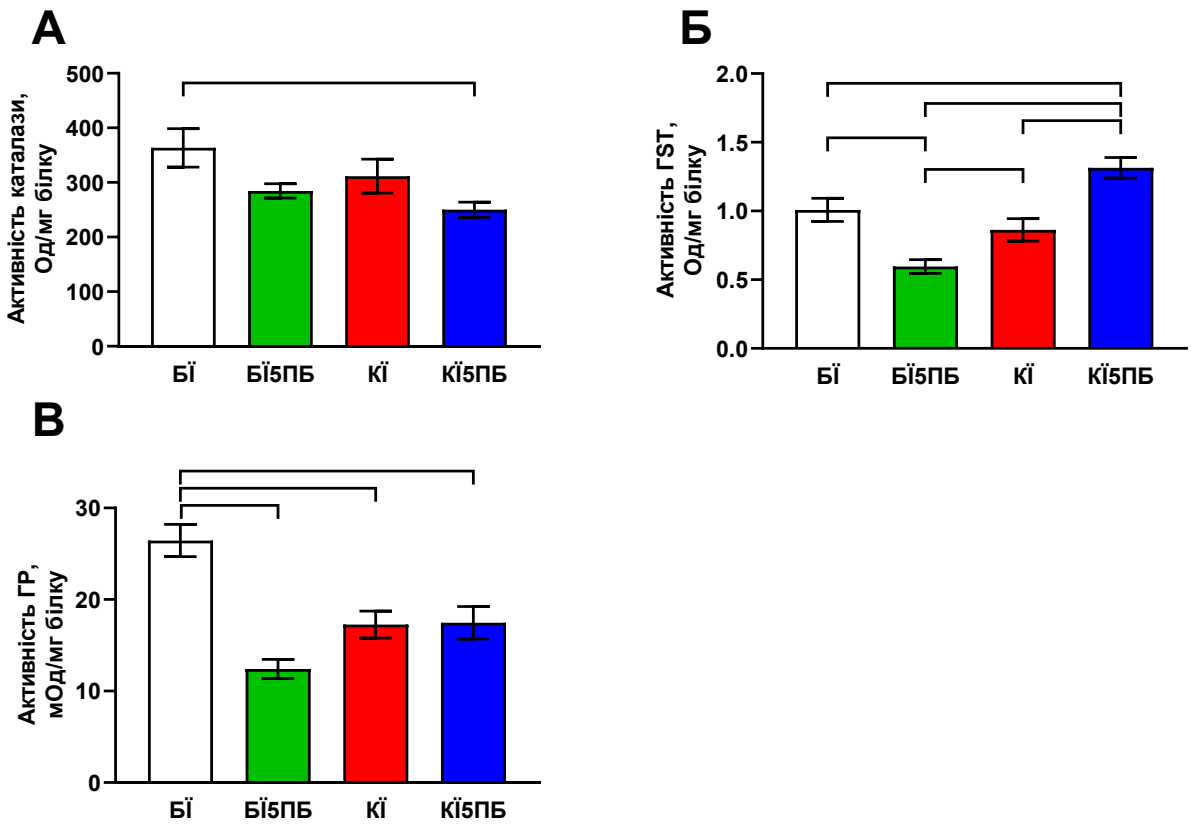


Рис. 3.10. **Активність антиоксидантних та допоміжних ферментів у печінці мишей**. Активність каталази (А), глютатіон-S-трансферази (Б) та глютатіонредуктази (В) у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Ми припускали, що додавання паростків броколі сприятиме розвитку захисних антиоксидантних механізмів у печінці мишей проти оксидативного стресу, спричиненого кафетерійним харчуванням [7]. Однак у цьому дослідженні ми не виявили покращення функціонування основних або допоміжних антиоксидантних ферментів. Активність GST була вищою в групі КЇ5ПБ, що може свідчити про інтенсивну детоксикацію ксенобіотиків у печінці, яка

стимулювалась додаванням паростків броколі до кафетерійної їжі. Однак при споживанні паростків броколі з базовою їжею був встановлений протилежний ефект, причиною якого могла бути нижча активність ГР, яку ми встановили для всіх трьох дослідних груп.

Як висновок можна сказати, що споживання кафетерійної їжі або додавання паростків броколі, а також тривалість такого харчового втручання суттєво не впливало на активність антиоксидантних ферментів у печінці мишей.

3.2.6 Вміст триацилгліцеролів і глікогену в печінці мишей

При споживанні кафетерійної їжі у печінці мишей був виявлений найвищий рівень триацилгліцеролів серед усіх дослідних груп, що є очікуваним результатом при споживанні кафетерійної їжі (Рис. 3.11А). Додавання паростків броколі до кафетерійної їжі нормалізувало вміст ТАГ у печінці мишей до показників групи базової їжі. Також вміст ТАГ був достовірно нижчим у печінці мишей БЇ5ПБ порівняно з групою БЇ.

Отже, зменшення вмісту ТАГ паростками броколі відбувалося незалежно від калорійності та типу їжі. Ці дані підтверджують здатність паростків броколі бути ефективною харчовою добавкою проти розвитку прихованого ожиріння усуваючи накопичення ліпідів у печінці для запобігання захворювань цього органу.

Вміст глікогену в печінці мишей, які споживали кафетерійну їжу, був достовірно нижчим порівняно з групою мишей, що споживали базову їжу (Рис. 3.11Б). Одним з негативних наслідків ожиріння є інсулінорезистентність у клітинах організму, що спонукає печінку до глюконеогенезу. Ця хибна потреба у глюкозі може спонукати вивільнення глюкози і зменшення запасів глікогену в печінці, що тільки погіршує стан організму при ожирінні та гіперглікемії. Також незбалансоване харчування може бути бідним на вітаміни і корисні сполуки, які необхідні для метаболізму глікогену. Таким чином, у мишей, які споживали

кафетерійну їжу, було порушення обміну речовин, що призвело до неоптимального накопичення глікогену, а отже, його нижчого рівня.

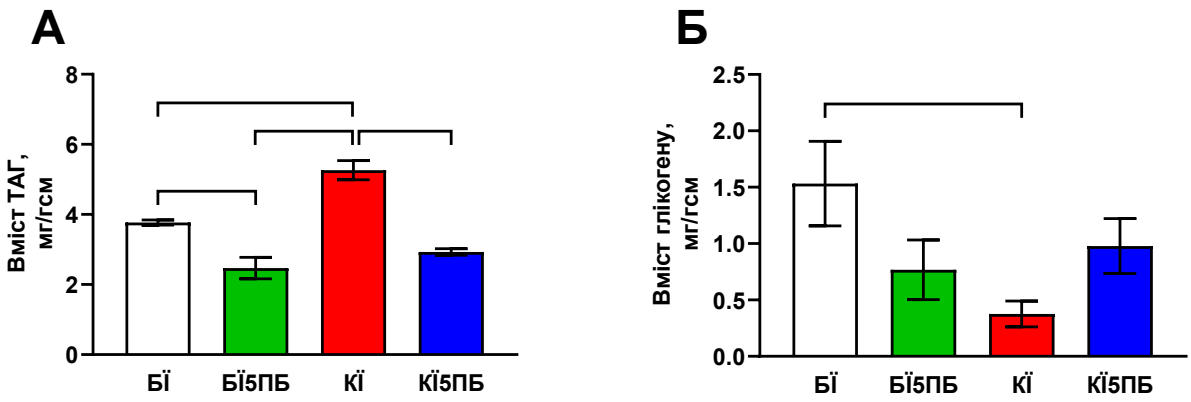


Рис. 3.11. **Вміст триацилгліцеролів (А) та глікогену (Б) у печінці мишей**, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Ознаки спричиненого кафетерійною їжею порушення обміну речовин проявлялися незначним збільшенням маси тіла, але значним накопиченням вісцеральної жирової тканини, яке не усувалося додаванням паростків броколі. Параметри у крові були стабільні, проте у печінці було виявлено вищий вміст карбонільних груп білків та порушення обміну вуглеводів та ліпідів, проте при додаванні паростків броколі до кафетерійної їжі цих змін ми не встановили. Ці результати демонструють здатність сполук паростків броколі сприяти усуненню білків, структура яких порушена внаслідок оксидативного стресу. Можливим шляхом такого захисту є попереджувальна дія антиоксидантів проти АФК.

3.2.7 Активність ферментів антиоксидантного захисту у корі головного мозку мишей

Активність ГП у корі головного мозку мишей достовірно не відрізнялася між дослідними групами (Додаток Ж). Активність GST була вищою при споживанні кафетерійної їжі, паростків броколі та їх комбінації (Рис. 3.12А).

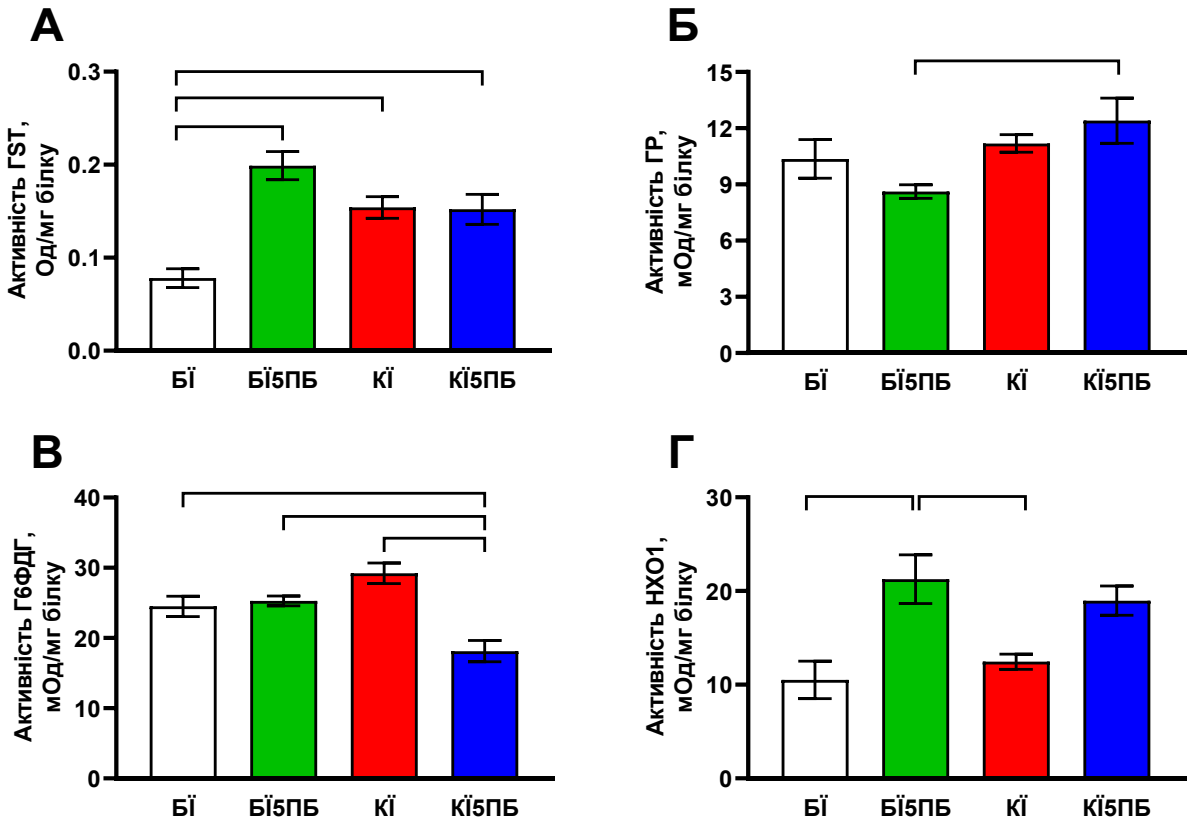


Рис. 3.12. **Активність ферментів у корі головного мозку мишей**: глютатіон-S-трансферази (А), глютатіонредуктази (Б), глюкозо-6-фосфат дегідрогенази (В) і НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 (Г). Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Активність ГР у групі КЇ5ПБ була вищою порівняно з групою БЇ5ПБ (Рис. 3.12Б). У групі КЇ5ПБ активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази була найнижчою порівняно з рештою дослідних груп (Рис. 3.12В). При споживанні паростків броколі з базовою чи з кафетерійною їжею активність НХО1 була вищою порівняно зі значеннями у групі БЇ чи КЇ (Рис. 3.12Г).

Отже, при споживанні кафетерійної їжі з паростками броколі активність ферментів антиоксидантного захисту і детоксикації ксенобіотиків (глютатіон-S-трансферази і НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1) у корі головного мозку мишей була вищою, ніж при споживанні базової чи кафетерійної їжі. Схожу закономірність було встановлено для цих ферментів при споживанні паростків броколі з базовою їжею. Ці результати свідчать про стимулюючу дію сполук паростків броколі на обрані параметри захисних систем у мозку мишей, які не залежали від типу їжі (базової чи кафетерійної).

3.3 Вплив різного вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей

3.3.1 Споживання їжі та рідини мишами

У цьому експерименті ми застосовували вироблений нами гранульований кафетерійний корм для мишей, серед компонентів якого був різний вміст проростків броколі. Перевагою такого методу є те, що експериментальний корм можна виготовляти власноруч з заданими параметрами (регулювати вміст кафетерійних продуктів, вміст проростків броколі) і він подібний до корму, яким лабораторні миші харчуються зазвичай.

Миші з групи БЇ споживали приблизно 6 г/мишу/добу корму (Рис. 3.13А). Миші з групи КЇ споживали приблизно на 14% менше їжі порівняно з мишами БЇ (Рис. 3.13А). Додавання проростків броколі до кафетерійного корму також впливало на споживання їжі. Зокрема, миші КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ і КЇ10ПБ споживали

на 22%, 25% і 31% менше їжі порівняно з групою БЇ. Проте, група БЇ5ПБ споживала на 6% більше їжі порівняно з групою БЇ.

Як узагальнення, миші з кафетерійним кормом споживали менше їжі, ніж миші з базовим кормом. Менше споживання ВКЇ раніше було встановлено у дослідженні з молодими мишами [9,237]. У нашому дослідженні ми отримали такий результат у самців мишей середнього віку.

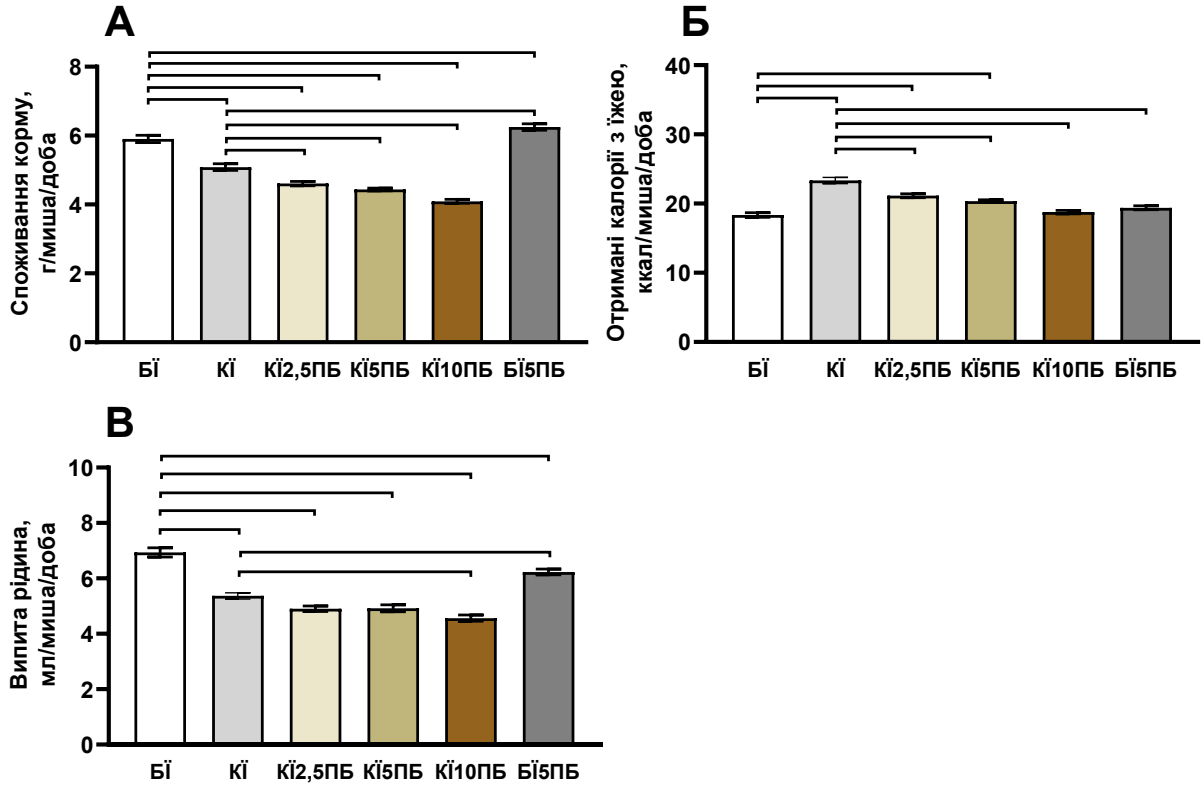


Рис. 3.13. **Параметри харчування мишей**. Споживання корму (А), кількість отриманих калорій з їжею (Б) та споживання рідини (В) мишами, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Група БЇ отримувала 18,3±0,3 ккал/миша/добу, а миші КЇ 23,3±0,4 ккал/миша/добу, що було приблизно на 27% більше, ніж у групі БЇ (Рис. 3.13Б). Також КЇ отримували найбільшу кількість енергії з калорій серед усіх експериментальних груп.

Дослідження інших науковців з 10% вмістом у їжі суцвіття чи стебел броколі показали, що додавання броколі не впливає на споживання корму [238]. Інше дослідження, в якому використовували сік з мікрозелені броколі (20 г/кг маси тіла) свідчило про менше споживання корму мишами [237]. У нашому експерименті з проростками броколі та кафетерійним раціоном споживання їжі було меншим і дозозалежним. Миші в групах КЇ2,5ПБ і КЇ5ПБ отримували на 15% і 11% більше калорій, відповідно, ніж у групі БЇ. Отримання калорій у групі КЇ10ПБ було подібним до значень в групі БЇ. Поєднання базової їжі з проростками броколі (група БЇ5ПБ) не впливало на кількість отриманих калорій порівняно з групою БЇ, а миші КЇ5ПБ отримували більше калорій, ніж миші БЇ5ПБ. Як висновок, проростки броколі по-різному впливали на споживання їжі мишами, коли їх додавали до базової чи кафетерійної їжі.

У всіх експериментальних групах було виявлено менше споживання води порівняно з групою БЇ (Рис. 3.13В). Як і споживання їжі, споживання води зменшувалося зі збільшенням вмісту проростків броколі в кафетерійній їжі. Миші КЇ споживали на 23% менше води, а миші КЇ10ПБ – на 31% менше води, ніж група БЇ. Подібні результати щодо зменшення споживання води спостерігалися, коли мишей годували їжею з високим вмістом жирів та соком мікрозелені броколі [237].

3.3.2 Маса тіла та органів мишей

Споживання кафетерійної їжі не викликало різкого збільшення маси тіла мишей, а лише на приблизно 5% протягом 20 тижнів годування (Додаток З). Споживання кафетерійної їжі разом з проростками броколі не запобігало незначному збільшенню маси тіла у мишей які поживали різний вміст проростків

броколі у кафетерійному кормі. Кінцева маса мишей не відрізнялася між групами (Рис. 3.14А). У дослідженнях інших науковців повідомлялося про втрату маси тіла у мишей при споживанні їжі з мікрозеленню броколі або з СФН, виділеним з проростків броколі [237,239,240]. У нашому дослідженні споживання проростків броколі не впливало на масу тіла мишей.

Розвиток спричинених висококалорійною їжею метаболічних порушень не завжди супроводжується збільшенням маси тіла. Натомість, у гризунів може збільшуватися маса вісцерального жиру або таких органів, як печінка чи селезінка [9,67].

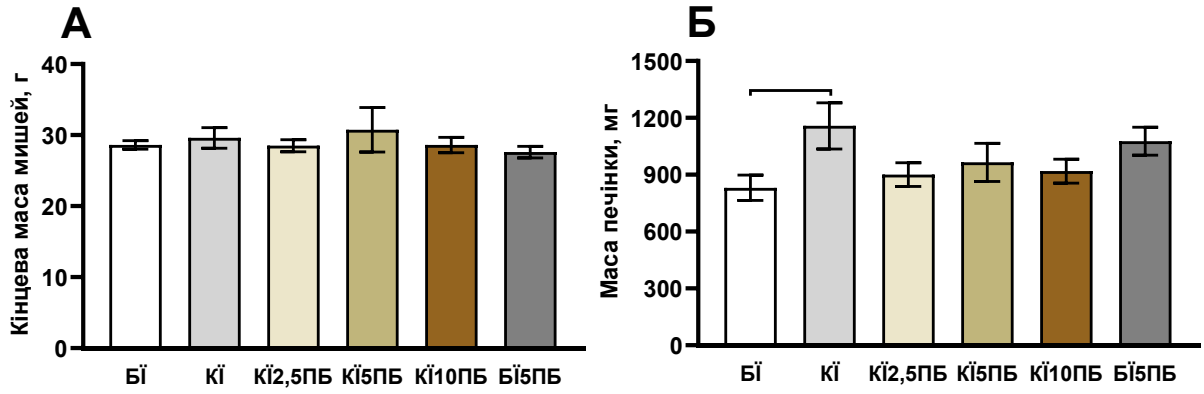


Рис. 3.14. **Параметри тіла мишей**. Кінцева маса тіла (А) і маса печінки (Б) мишей, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Миші з групи КЇ мали найважчу печінку (1158±122 мг) серед усіх дослідних груп (Рис. 3.14Б). Це значення було на 40% більшим порівняно з групою БЇ. У решти груп маса печінки не відрізнялася між собою.

Миші в групах КЇ5ПБ і КЇ10ПБ мали приблизно в 3,9 і 2,9 рази більше вісцерального жиру, відповідно, ніж миші в групі БЇ (Рис. 3.15А). Також миші КЇ5ПБ та КЇ10ПБ мали найбільший вміст усіх трьох типів вісцерального жиру, а саме епідидимального (розташований біля придатка яєчок), перинального (розташований навколо нирок) та мезентеріального (навколо кишківника) (Рис. 3.15Б-Г).

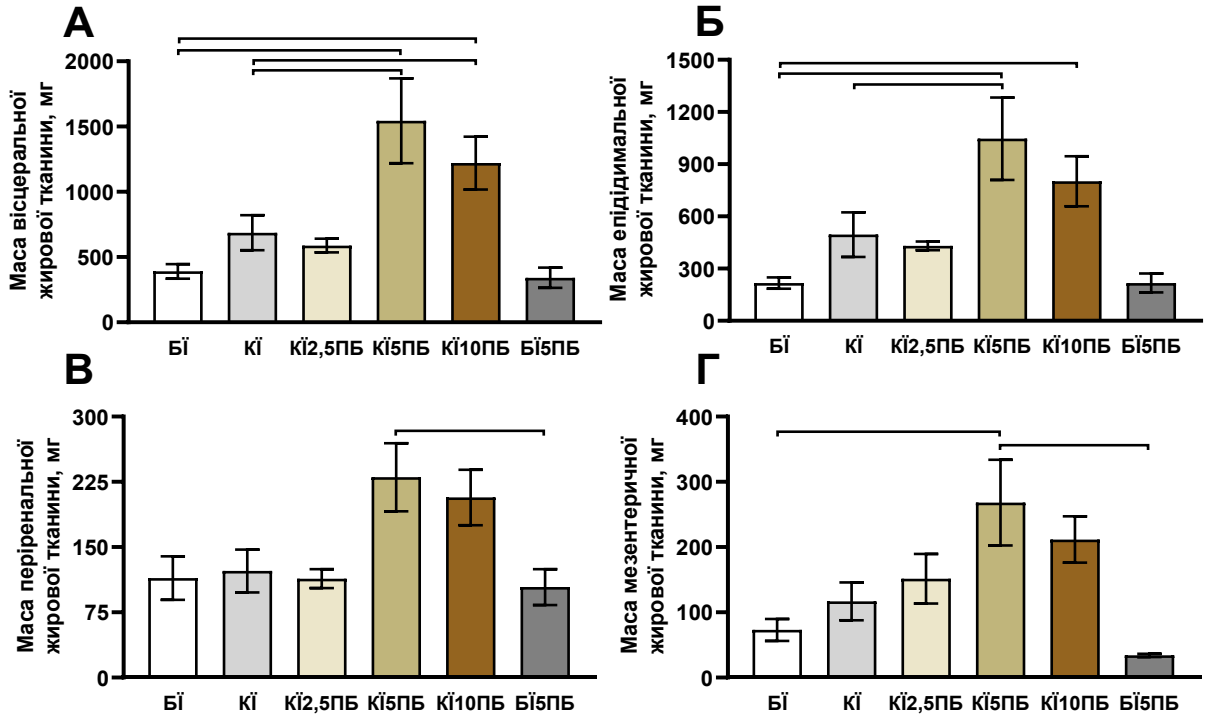


Рис. 3.15. **Маса різних типів жирової тканини**. Маса загальної жирової тканини (А), епідідимальної (Б), перінальної (В) та мезентеричної (Г) у мишей, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Висококалорійна кафетерійна їжа спричинила зменшення споживання їжі, проте, загальна кількість отриманих калорій була більшою. При цьому маса тіла мишей залишалася майже незмінною впродовж досліду, а збільшення кількості вісцеральної жирової тканини було помірним. Підвищений синтез ТАГ у вісцеральній жировій тканині часто супроводжується інфільтрацією лейкоцитами, що супроводжується запаленням та розвитком оксидативного стресу [4].

3.3.3 Гематологічні та біохімічні показники крові мишей

Рівень гемоглобіну не відрізнявся між групами і знаходився в межах діапазону значень, описаних в літературі (Додаток И) [202,241]. Не було виявлено суттєвих відмінностей або значних відхилень між групами за гематокритом (Додаток И). Крім того, кількість еритроцитів і загальна кількість лейкоцитів були подібними між групами (Додаток И). Як висновок, кафетерійна їжа окремо та разом з паростками броколі не впливала на гематологічні показники та показники імунної системи у самців мишей.

У групі КЇ рівень глюкози в крові був на 25% більшим, ніж у групі БЇ (Рис. 3.16А). Цей ефект є типовим при споживанні висококалорійної їжі або при розвитку ожиріння [242]. Миші з груп КЇ2,5ПБ і КЇ5ПБ мали приблизно в 1,5 рази більший рівень глюкози в крові порівняно з мишами з БЇ. У групі КЇ10ПБ рівень глюкози був у 1,3 рази більшим, ніж у групі БЇ. Таким чином, у мишей, які отримували кафетерійну їжу з 2,5% та 5% вмістом проростків броколі, рівень глюкози був більшим, ніж у мишей, які отримували лише кафетерійну їжу. У мишей групи БЇ5ПБ рівень глюкози в крові був подібним до показника в групі БЇ. Раніше повідомлялося, що броколі стабілізувало рівень глюкози у мишей, які отримували висококалорійну їжу [238,243]. Натомість, в нашому експерименті присутність проростків броколі в кафетерійній їжі сприяла навіть більшому рівню глюкози в крові, ніж тільки кафетерійний їжа. При додаванні проростків броколі до базової їжі такий ефект не спостерігався і рівень глюкози в крові був у межах значень групи БЇ.

Результати тесту на толерантність до глюкози представлено кривими на Малюнку 3.16Б. Криві демонстрували типову дзвоноподібну динаміку рівня глюкози в крові мишей після навантаження глюкозою, хоча значного збільшення рівня глюкози після навантаження не спостерігалося. В одній з робіт пояснюється, що низький пік рівня глюкози в крові може бути пов'язаний з пероральним введенням глюкози, і цей метод не викликає таких значних змін рівня глюкози в крові, як внутрішньоочеревинна ін'єкція [244]. Наші результати показали найменші значення кривих рівня глюкози в крові в групах БЇ і БЇ5ПБ, найбільші – в групах КЇ2,5ПБ і КЇ5ПБ, а проміжні значення – в групах КЇ і КЇ10ПБ.

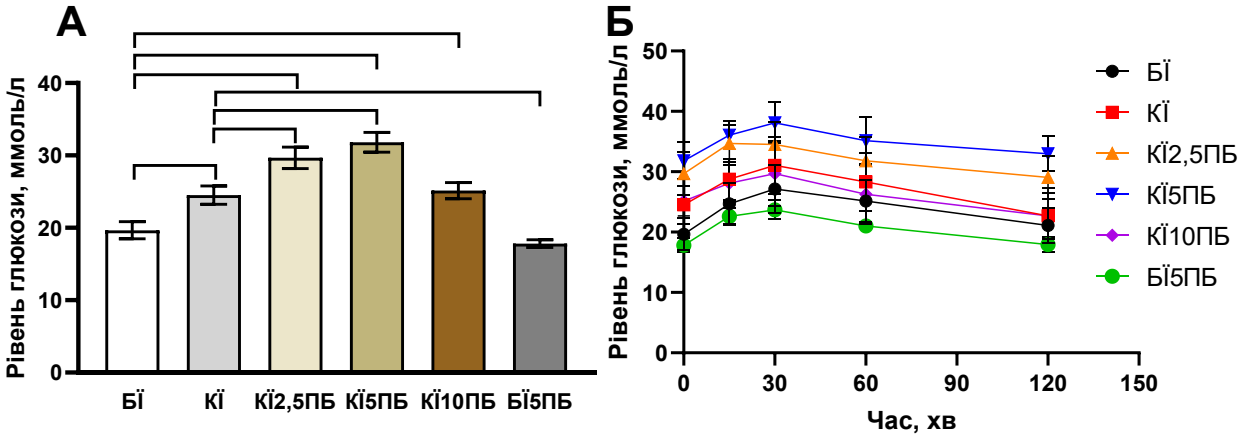


Рис. 3.16. **Рівень глюкози у крові мишей**: у кінцевій точці (А) та впродовж глюкозотолерантного тесту (Б). Миші отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Кафетерійна їжа окремо і в поєднанні з проростками броколі не впливала на рівень загального холестерину в плазмі крові мишей (Додаток И). Схожий результат повідомлявся раніше в аналогічному дослідженні діабету 2 типу мишей

з застосуванням сульфорафану [245]. Рівень ТАГ в плазмі крові був приблизно в 2,2 рази більшим у мишей КЇ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.17А). Ми встановили, що рівень ТАГ у плазмі зменшувався зі збільшенням дози проростків броколі в групах з кафетерійною їжею. Значення ТАГ досягали рівня БЇ в групах КЇ5ПБ і КЇ10ПБ. У мишей групи БЇ5ПБ рівень ТАГ був на ~ 90% меншим, ніж у групі БЇ. Ці результати свідчать про те, що споживання їжі з паростками броколі зменшувало рівень ТАГ у крові. Подібні результати були отримані в кількох попередніх експериментах з мишами, які харчувалися їжею з високим вмістом жирів і додаванням сульфорафану з броколі [245,246]. Наше дослідження показало, що додавання проростків броколі ефективно запобігає збільшенню рівня ТАГ у плазмі крові мишей у дозозалежній манері.

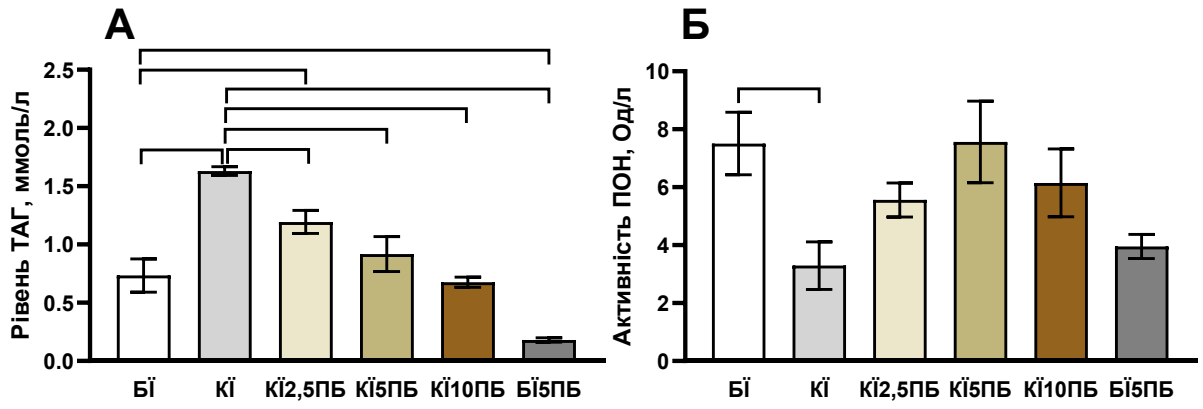


Рис. 3.17. **Біохімічні показники плазми крові мишей**. Рівень триацилгліцеролів (А) і активність параоксонази (Б) у плазмі крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

У всіх групах, які отримували проростки броколі, рівень білку в крові був більшим порівняно з мишами КЇ, але достовірно не відрізнявся від значення у групі мишей БЇ (Додаток И).

Миші КЇ мали на 56% меншу активність плазмової параоксонази (ПОН) порівняно з групою БЇ (Рис. 3.17Б). Додавання 2,5%, 5% та 10% проростків броколі до кафетерійної їжі мало тенденцію до збільшення активності ПОН порівняно з БЇ. Проте група БЇ5ПБ мала приблизно на 47% меншу активність ПОН, ніж група БЇ. Як підсумок, додавання 5% проростків броколі до кафетерійної чи до базової їжі мало протилежні ефекти на активність ПОН.

Параоксоназа – це фермент, який запобігає зростанню рівня окислених ліпопротеїнів низької щільності. Останній процес веде до розвитку атеросклерозу як супутнього захворювання при ожирінні. Повідомлялося, що споживання їжі з високим вмістом жирів призводило до зменшення активності параоксонази в крові мишей [247]. Дослідження з використанням самців щурів показало, що активність параоксонази та рівень білку PON1 у сироватці крові були зменшені. Автори пов’язали свої висновки зі зменшенням рівня відносного транскрипту іРНК PON1 у самців і довели позитивну кореляцію між активністю параоксонази та рівнем іРНК PON1 [248]. Ми визначили нижчу активність параоксонази в групі КЇ та КЇ5ПБ порівняно з групою БЇ. Активність ПОН була більшою в групах, які отримували кафетерійну їжу з проростками броколі. Можна припустити, що додавання проростків броколі покращувало активність ПОН та ліпідний профіль, зокрема зменшувало рівень ТАГ, який були більшим при споживанні кафетерійної їжі.

На активність мієлопероксидази, основного ферменту імунних клітин (нейтрофілів) та рівень прозапального цитокіну IL-1β не впливав жоден тип дослідної їжі. МПО є ключовим гравцем при оксидативному стресі, запаленні, окисленні ліпопротеїнів та атеросклерозі в судинах, які спричинені ожирінням [249]. Також повідомлялося, що у людей з ожирінням рівень IL-1β у плазмі крові є збільшеним [250]. У нашому дослідженні на мишах кафетерійний раціон не впливав на ці імунні маркери.

3.3.4 Активність ферментів антиоксидантного захисту у корі головного мозку мишей

Вміст пероксидів ліпідів у корі головного мозку мишей не відрізнявся між групами (Додаток І). Це може свідчити про відсутність розвитку оксидативного стресу і пошкодження ліпідів у мозковій тканині внаслідок споживання дослідної їжі або про ефективність антиоксидантних систем, які запобігають накопиченню продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

Активність ГП у корі головного мозку мишей достовірно не відрізнялася від групи БЇ (Рис. 3.18А). Активність цього ферменту мала тенденцію до зменшення у групі КЇ5ПБ порівняно з групою БЇ. Також показник групи КЇ5ПБ був достовірно меншим порівняно з групою БЇ5ПБ, що свідчить про певні відмінності у функціонуванні глютатіонпероксидази при споживанні кафетерійної їжі, не встановлені у інших дослідних групах.

Активність GST достовірно не відрізнялася між дослідними групами (Додаток І). У клітині є кількома ізоформ глютатіон-S-трансферази, які можуть реагувати на різні чинники по-різному. Визначення сумарної активності ферменту може не відображати змін окремих ізоформ, тому загальна активність GST може бути схожою між дослідними групами.

Миші груп КЇ10ПБ та БЇ5ПБ мали достовірно вищу активність ГР у мозку, порівняно з рештою дослідних груп (Рис. 3.18Б). Значення інших дослідних груп не відрізнялись, як і не відрізнялись значення КЇ10ПБ та БЇ5ПБ між собою. Це може вказувати на позитивний вплив споживання проростків на активність ГР у корі головного мозку мишей за додавання 10% у кафетерійну їжу, а також при додаванні 5% до базового корму. Група БЇ5ПБ мала найбільшу активність Г6ФДГ у корі головного мозку мишей (Рис. 3.18В). Решта груп достовірно не відрізнялися між собою.

Активність HXO1 у групі БЇ5ПБ була достовірно більшою порівняно з групами БЇ, КЇ, КЇ2,5ПБ і КЇ5ПБ. У групі КЇ10ПБ активність ферменту була достовірно більшою порівняно з групою КЇ5ПБ (Рис. 3.18Г). Через відсутність

змін вмісту пероксидів ліпідів клітина може задіювати окремі ферменти для знешкодження шкідливих сполук.

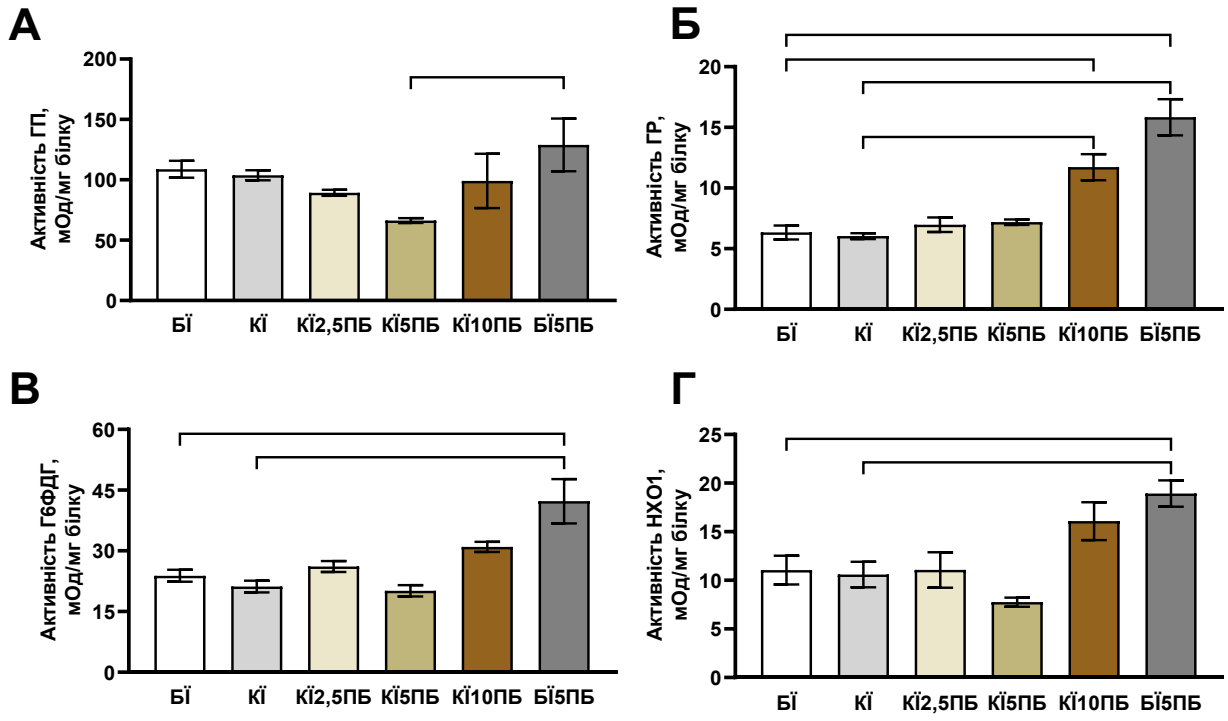


Рис. 3.18. **Активність ферментів у корі головного мозку мишей**: глютатіонпероксидази (А), глютатіонредуктази (Б), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (В) та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 (Г). Миші отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Отримані результати вказують на потенційний позитивний вплив додавання проростків броколі до їжі на функціонування окремих ланок антиоксидантної системи кори головного мозку мишей. Споживання 5% та 10% проростків броколі

сприяло вищій активності ГР та Г6ФДГ для підтримки рівня відновленого глютатіону. Проте залежний від дози вплив на ці ферменти, а також ГП, GST і HXO1 був відсутнім.

3.4 Вплив споживання проростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей

3.4.1 Споживання їжі та води мишами

Миші з груп КЇ та КЇ5ПБ споживали приблизно на 32% та 22% менше корму порівняно з групою БЇ (Рис. 3.19А). Між групами БЇ та БЇ5ПБ достовірної відмінності у споживанні кількості корму не встановлено. У групі КЇ5ПБ споживання їжі було достовірно більшим порівняно з групою КЇ.

Ці результати свідчать про те, що проростки броколі не впливали на кількість спожитого корму при споживанні разом з базовою їжею. Групи з кафетерійною їжею продемонстрували менше споживання корму порівняно з групами, які харчувалися базовим кормом. У літературі присутні дані про те, що тримісячні самці мишей споживали стабільну кількість висококалорійної їжі (енергетичною цінністю приблизно 470 ккал на 100 г) протягом 30 днів, як і тритижневі самці щурів протягом чотирьох місяців (енергетичною цінністю 400-500 ккал на 100 г) [11,233]. Також є дані про те, що тримісячні самки мишей протягом 12 тижнів споживали менше їжі, але кількість отриманих калорій дорівнювала значенню у контрольній групі [234]. Результати нашого дослідження можна пояснити різницею у калорійності базової і кафетерійної їжі, що вплинула на відчуття ситості у тварин і не спричиняла переїдання внаслідок смакових якостей кафетерійної їжі.

Ми визначили, що миші з груп КЇ5ПБ отримували найбільше енергії, що надходила з їжею (приблизно 15,3 ккал/миша/доба) порівняно з рештою дослідних груп (Рис. 3.19Б). У групі КЇ цей показник був приблизно на 16%

достовірно меншим порівняно з КЇ5ПБ. Також значення групи КЇ не відрізнялося від значень груп БЇ та БЇ5ПБ.

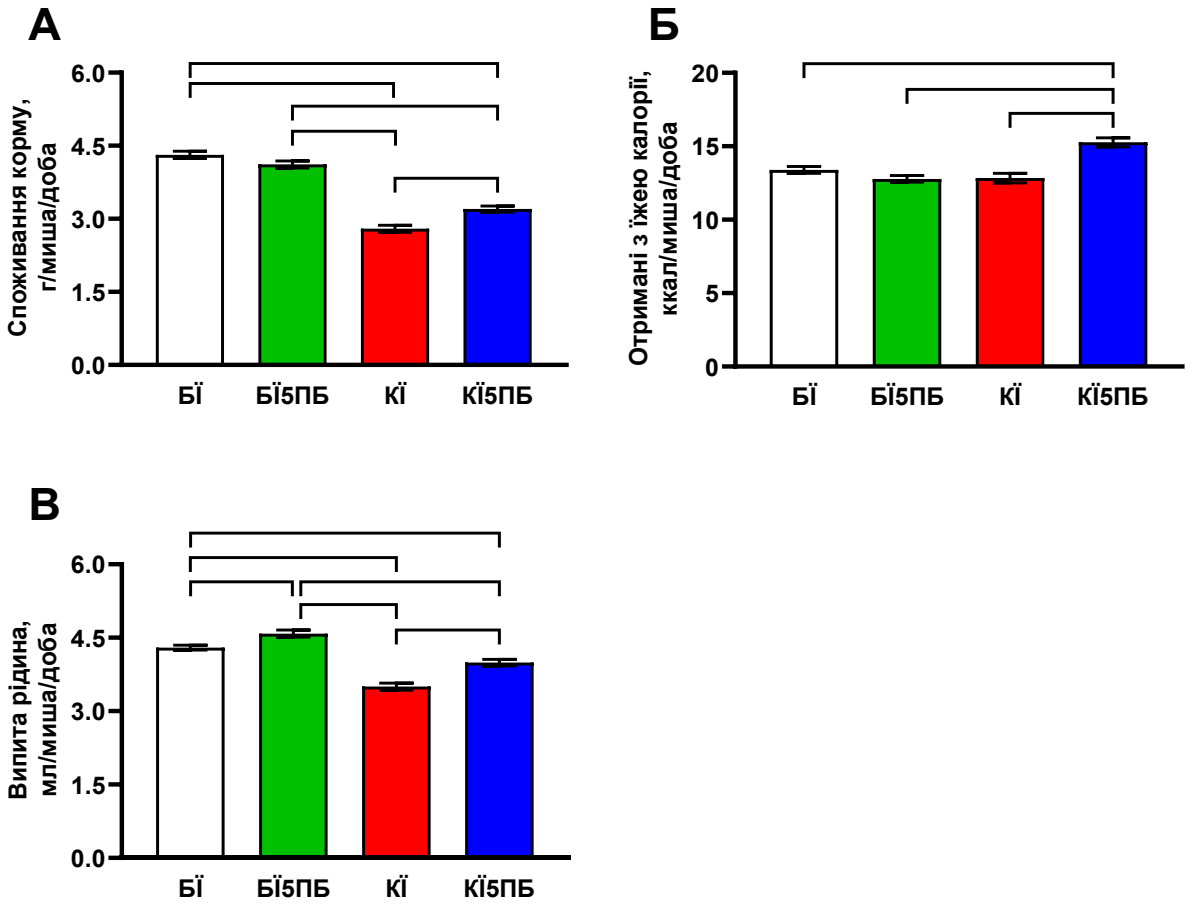


Рис. 3.19. **Параметри харчування мишей**. Споживання корму (А), кількість отриманих калорій з їжею (Б) та споживання рідини (В) мишами, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Споживання їжі та води визначали кожного другого дня. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього від кількості визначень протягом усього експерименту (98 визначень). У кожній групі було 8-9 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Загалом дві групи мишей, що харчувалися кафетерійною їжею, споживали менше корму, проте отримували майже ідентичну чи більшу кількість калорій порівняно з двома групами з базовою їжею. Комбінація проростків броколі з базовою їжею не впливала на параметри харчування. Проте проростки броколі з кафетерійною їжею мали вплив на харчування порівняно з кафетерійною їжею окремо та проростками броколі з базовою їжею. Як припущення, проростки броколі мали слабкий вплив на споживання висококалорійної кафетерійної їжі та апетит.

Декілька робіт з одно- чи десятимісячними самцями мишей повідомляли про надходження надлишку енергії разом з їжею та переїдання при споживанні висококалорійної їжі [10,251,252]. Попри це, в нашому дослідженні було встановлено, що більше калорій з їжею отримувала лише група з кафетерійною їжею та проростками броколі. Це свідчило про відсутність переїдання у групі лише з кафетерійною їжею та надходження енергії з їжею відповідно до потреб організму мишей, як і у мишей з базовою їжею чи базовою їжею з проростками броколі.

Результати споживання води відрізнялись між групами (Рис. 3.19В). Група, яка споживала БЇ, випивала приблизно 4,29±0,05 мл води на мишу на добу (Рис. 3.19В). Миші з групи КЇ споживали найменше води порівняно з рештою дослідних груп (3,50±0,71 мл води на мишу на добу), тоді як миші з групи БЇ5ПБ споживали найбільше води (4,58±0,71 мл води на мишу на добу). КЇ5ПБ група споживала більше води, ніж КЇ але менше, ніж БЇ. Висококалорійна їжа, як повідомлялося в літературі, не впливала на почуття спраги в лабораторних мишей [67]. Натомість у нашому досліді при споживанні кафетерійної їжі у мишей була менша потреба споживати воду.

Попри різне споживання води та корму, майже ідентичну кількість отриманих калорій, групи мишей мали певні спільні риси у параметрах споживання їжі та води. Миші з групи КЇ5ПБ споживали більше їжі та води, порівняно з групою КЇ. БЇ5ПБ миші споживали більше води та їжі, ніж КЇ5ПБ

миші. Видно, що споживання проростків броколі мало незначний вплив на харчування та пиття, стимулюючи апетит чи відчуття спраги.

3.4.2 Маса тіла та органів мишей

Маса тіла мишей з групи БЇ критично не змінилася впродовж досліду (Додаток Ї). У кінці досліду миші з групи БЇ5ПБ були на 8% важчими. КЇ та КЇ5ПБ були приблизно на 7% та 6% важчими, відповідно.

Миші, які споживали базову їжу, мали стабільну масу тіла впродовж експерименту, що є прогнозованим показником. У двох групах мишей з кафетерійною їжею була дещо більша маса тіла, а споживання проростків броколі разом з кафетерійною їжею не зменшувало маси тіла. Проте при споживанні проростків броколі з базовою їжею було незначне збільшення маси тіла впродовж досліду, хоча ці миші споживали кількість корму, яка приблизно дорівнює значенню у групі з базовою їжею. Кінцева маса тіла мишей КЇ5ПБ була достовірно більшою порівняно з групою БЇ (Рис. 3.20А). Хоча відмінності маси тіла на у трьох експериментальних групах незначні, дещо більша кінцева маса тварин маса загалом може відповідати очікуваним змінам впродовж тривалості досліду.

Маса печінки не відрізнялася між дослідними групами, що свідчить про відсутність печінкових уражень або накопичення ліпідів у печінці, таких як неалкогольна жирова хвороба печінки або стеатоз, що зазвичай збільшують масу печінки (Додаток Ї). Печінка є природним резервуаром для здорової кількості ліпідів, але їх надмірне накопичення призводить до патології і, передбачувано, може бути виявлене за допомогою зважування після препарування тварини [10].

Миші з групи КЇ, мали приблизно в 3,4 рази більшу масу вісцерального жиру порівняно з мишами групи БЇ (Рис. 3.20Б). Крім того, миші з КЇ5ПБ мали приблизно в три рази більшу масу вісцерального жиру порівняно з мишами з БЇ. Цей показник у групі БЇ5ПБ не відрізнявся від значень БЇ, а у групі КЇ був подібним до такого у КЇ5ПБ. У мишей з КЇ індекс ожиріння він був достовірно

більшим, ніж у мишей з БЇ, а значення групи БЇ5ПБ мало тенденцію до збільшення (Рис. 3.20В).

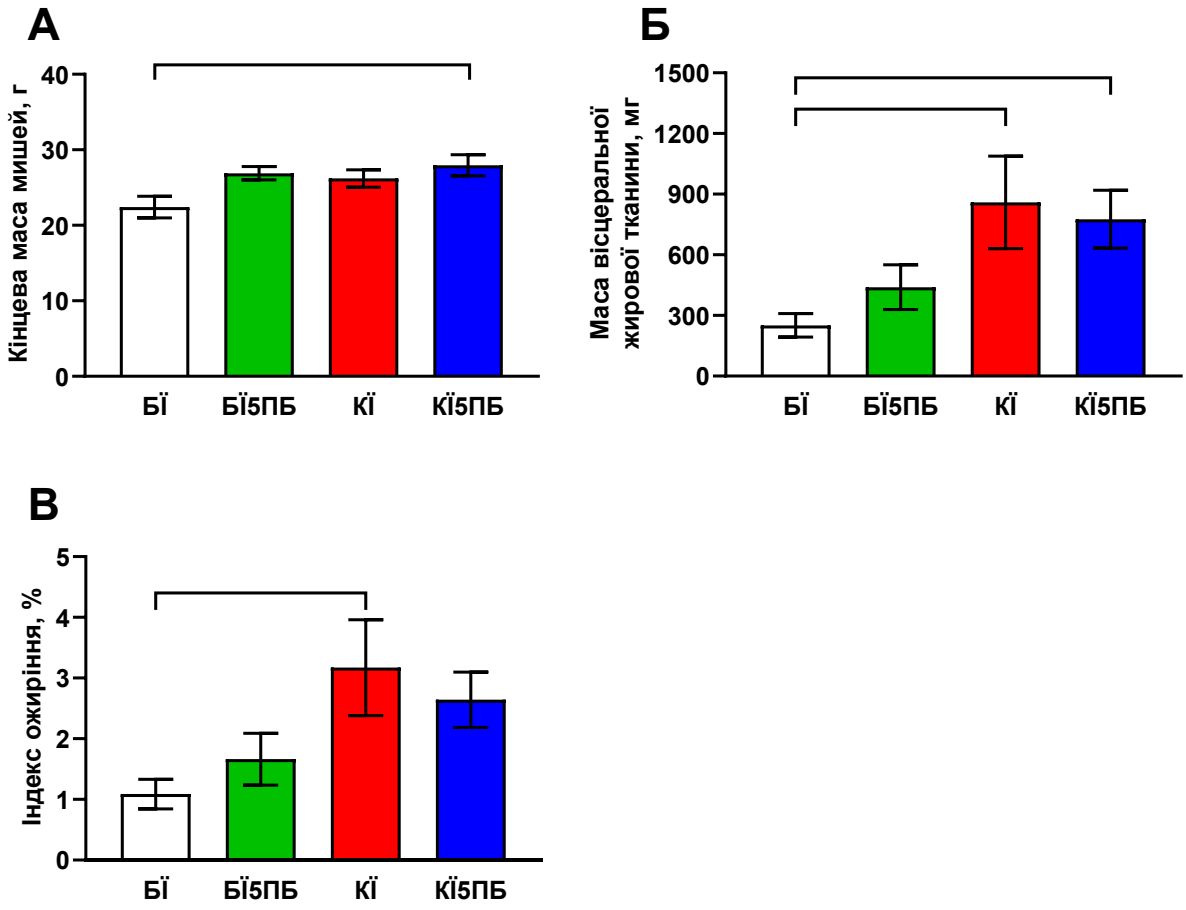


Рис. 3.20. **Параметри тіла мишей**. Кінцева маса тіла (А), маса жирової тканини (Б) та індекс ожиріння (В) мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Висококалорійна кафетерійна їжа може спричинити різке збільшення маси тіла та накопичення вісцеральної жирової тканини, що природним чином

відбувається під час споживання такої їжі [10,253]. Наші результати показали, що в обох групах кафетерійної їжі впродовж експерименту відбувалося помірне збільшення маси тіла, але препарування в кінці досліду засвідчило, що накопичення вісцерального жиру було втричі більшим порівняно з групою базової їжі. Було встановлено, що дванадцятиденне споживання кафетерійної їжі подвоювало жирові відкладення у десятиденних самців щурів, незалежно від маси тіла [254]. Гіпотетично, споживання кафетерійної їжі у нашому досліді з мишами спричинило не стільки збільшення загальної маси тіла, скільки активні зміни тканин у організмі мишей для розростання вісцеральної жирової тканини. Ці зміни становлять ризик, оскільки розростання і накопичення вісцерального жиру негативно впливає на внутрішні органи. Окрім того, такі пошкодження можуть бути прихованими і ожиріння організму залишатиметься недіагностованим через відсутність або поступове збільшення загальної маси тіла. Цікавим результатом є збільшення маси тіла мишей і вмісту вісцерального жиру, попри відсутність переїдання у мишей, що раніше повідомлялося в літературі [255].

Для дослідів часто обирають восьмимісячних мишей, оскільки в цьому віці вони не схильні набирати більше масу тіла через природний ріст і розвиток, як у ранньому віці [256]. Кілька досліджень *in vivo* та *in vitro* продемонстрували, що глюкорафанін або СФН можуть протидіяти ожирінню [239,256–259]. Наприклад, дослідження на мишах, які отримували висококалорійну їжу, показало, що прийом 0,1% СФН протягом шести тижнів послаблював індуковане дієтою збільшення вмісту жиру в печінці та збільшення маси тіла у мишей, що супроводжувалося зменшенням маси перинеральної та епідидимальної вісцеральної жирової тканини та зменшенням розміру епідидимальних адипоцитів [239]. У мишей, яких годували висококалорійною їжею з додаванням 0,3% глюкорафаніну протягом 14 тижнів, відзначалося зниження приросту маси тіла без зміни споживання їжі, а також зменшення жирової маси [239]. Аналогічно, інше дослідження також показало, що глюкорафанін (150 мкмоль/кг маси тіла) зменшував масу тіла, масу епідидимальної жирової тканини та масу печінки у мишей, яких годували висококалорійною їжею [257].

Ожиріння може розвиватися і без збільшення загальної маси тіла [258]. Дослідження називають 20% збільшення маси тіла дієвою моделлю для розвитку ожиріння, проте не виключають також набуття ознак прихованого ожиріння за вмістом вісцерального жиру чи крові організму (так званий стан прихованого ожиріння при нормальній масі тіла lean but obese) [258,259].

3.4.3 Тест «Відкрите поле»

Миші з групи КЇ5ПБ продемонстрували значно вищу середню швидкість пересування під час тесту «Відкрите поле» порівняно з групою БЇ (Рис. 3.21А).

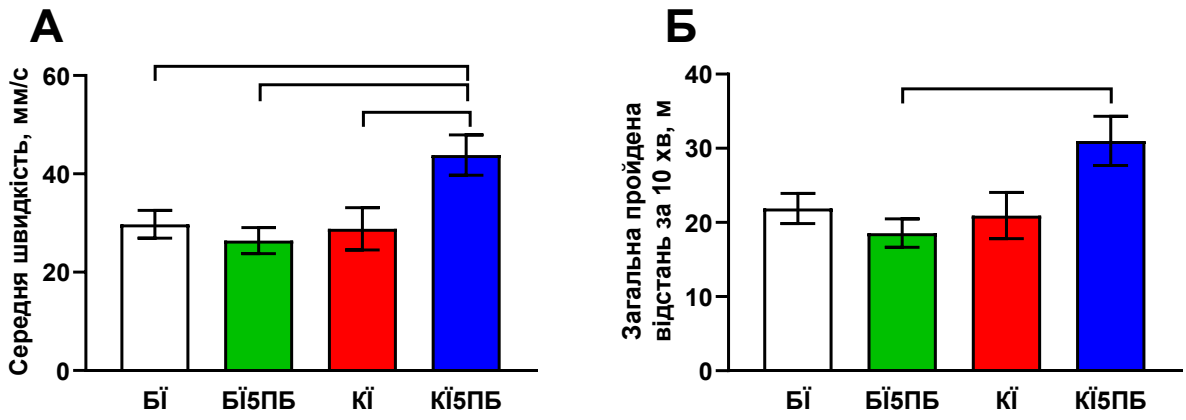


Рис. 3.21. **Результати тесту «Відкрите поле»**. Середня швидкість (А) та загальна пройдена відстань за 10 хв (Б) мишами, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Окрім того, миші КЇ5ПБ подолали більшу відстань порівняно з мишами БЇ5ПБ (Рис. 3.21Б). Натомість у літературі повідомляється про відсутність фізіологічних або поведінкових змін, які може спричиняти кафетерійна їжа [255].

Споживання кафетерійної їжі з проростками броколі збільшувало рухову активність мишей. Це може бути пов'язане зі змінами в метаболізмі, рівні глюкози, або нейрогуморальними процесами в мозку, що впливають на мотивацію та енергетичний рівень тварин.

3.4.4 Гематологічні та біохімічні параметри крові мишей

На Рис. 3.22А показано, що рівень гемоглобіну був найнижчим у групі БЇ, що вказує на незначне відхилення від діапазону описаних у літературі значень [202,241]. Решта груп мишей мали значення в межах нормального діапазону, і вони були подібними. Гематокрит також був меншим у групі з БЇ (Рис. 3.22Б), але відповідав літературним даним [260].

Кількість еритроцитів не відрізнялася між дослідними групами (Рис. 3.22В). Кількість лейкоцитів була достовірно нижчою у мишей КЇ5ПБ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.22Г).

Рівень глюкози, триацилгліцеролів та холестеролу в крові не відрізнявся між дослідними групами (Додаток Й). Активність МПО та відносний рівень IL-1β суттєво не відрізнялися між групами (Додаток Й). Вміст загального білку був достовірно вищим у групі КЇ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.23А).

Активність ПОН була приблизно в 1,9 разів вищою в групі КЇ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.23Б), а групи КЇ5ПБ та БЇ5ПБ показали лише тенденцію до зростання цього показника порівняно з групою БЇ.

У кількох дослідженнях повідомлялося про зниження ферментативної активності, рівня білку або відносного рівня транскрипту іРНК гену параоксонази 1 (PON1) при ожирінні та прогресуванні оксидативного стресу, атеросклерозу і серцево-судинних захворювань [247,248,261]. Однак наші результати продемонстрували вищу активність ПОН у плазмі крові мишей, які споживали

кафетерійну їжу або проростки броколі. Одне дослідження показало, що надекспресія PON1 затримує прогресування атеросклерозу у мишей [262].

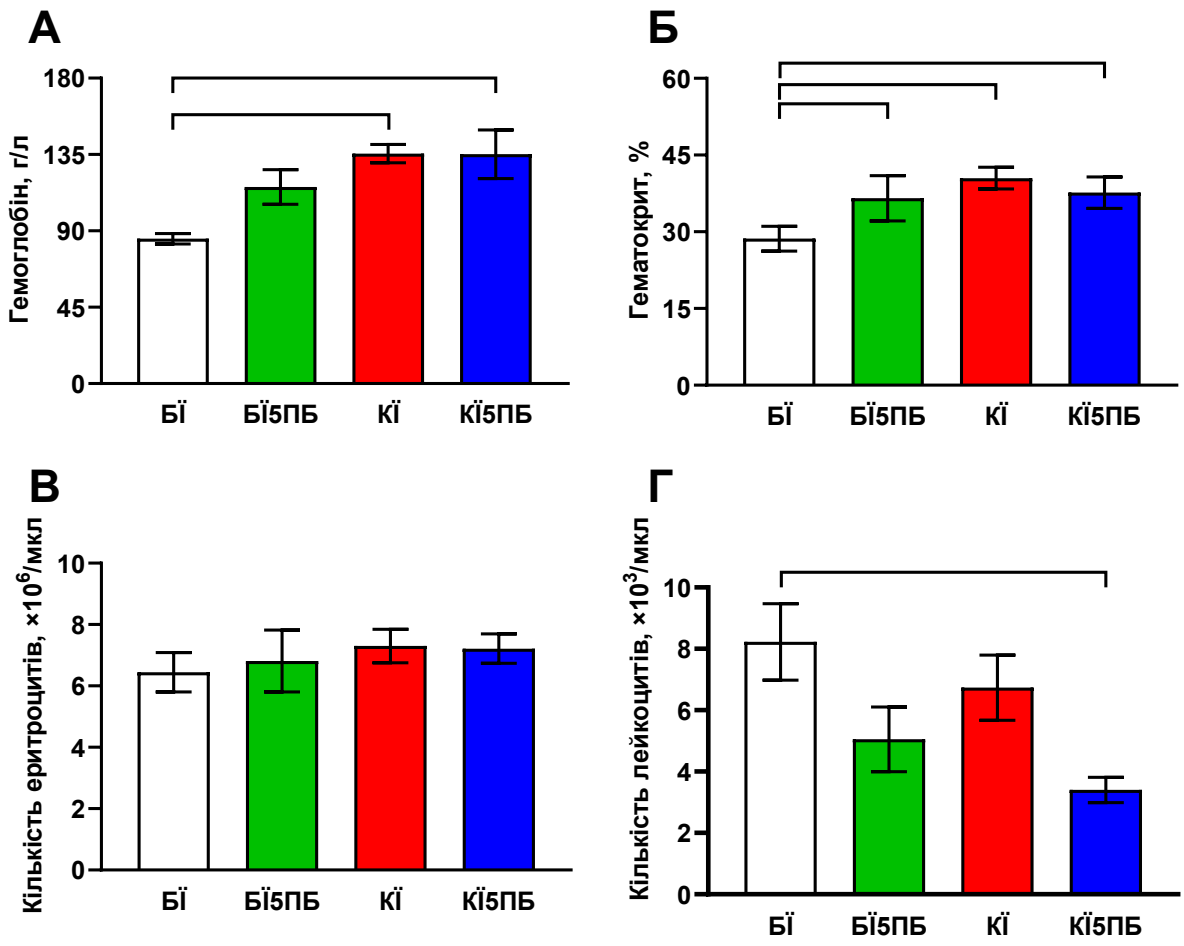


Рис. 3.22. **Гематологічні параметри крові мишей**. Гемоглобін (А), гематокрит (Б), кількість еритроцитів (В) та лейкоцитів (Г) у крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Відсутність високого рівня ТАГ або холестерину в крові, разом з незначним підвищенням активності ПОН, може свідчити про попередження можливого супутнього захворювання при ожирінні – атеросклерозу [261,263].

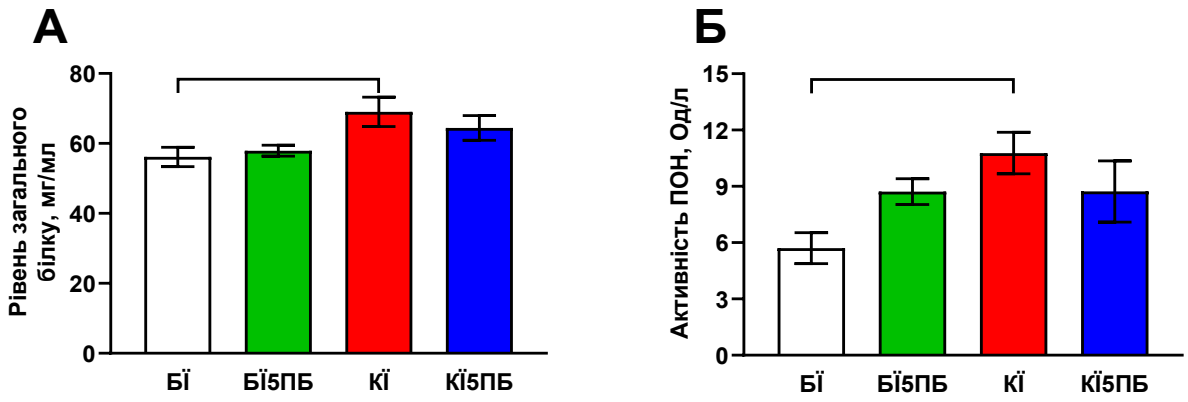


Рис. 3.23. **Біохімічні параметри крові мишей**. Рівень загального білку (А) та активність параоксонази (Б) у крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Каротиноїди, вітамін С, поліфенольні сполуки та деякі інші антиоксиданти вважаються потенційними індукторами активності PON1, і вони також присутні в проростках броколі [13,261,264–269]. Потенційними шляхами індукції PON1 харчовими антиоксидантами є вплив на експресію генів та підтримка стабільності молекули PON1 під час каталізу [261,270]. Ми припустили, що сполуки проростків броколі були слабкими індукторами PON1 під час споживання базової або кафетерійної їжі з броколі. Окрім того, вища активність PON1 у мишей, які споживали кафетерійну їжу, могла допомагати контролювати рівень окислених ліпопротеїнів у крові задля збереження здорових судин.

3.4.5 Маркери оксидативного стресу у печінці та корі головного мозку мишей

Вміст пероксидів ліпідів не відрізнявся між групами в печінці та головному мозку мишей (Додаток К і Л). Вміст карбонільних груп білків також не відрізнявся між дослідними групами у печінці мишей (Додаток К). Наші результати показали відсутність вищого рівня маркерів ОС в печінці і те, що антиоксидантна система впоралася з генерацією АФК, надпродукція яких могла бути спричинена споживанням кафетерійної їжі. Також ці дані свідчать про відсутність критичних вражень печінки мишей внаслідок пероксидного окислення чи оксидативного стресу.

3.4.6 Активність антиоксидантних ферментів у печінці мишей

У нашому дослідженні активність СОД у печінці була найвищою в групі тварин, які споживали КЇ5ПБ, але не відрізнялася між групами, які споживали БЇ, КЇ та БЇ5ПБ (Рис. 3.24А).

Методом нативного гель-електрофорезу з наступним проявленням ізоформ СОД показано, що відношення активностей ізоформ SOD1 та SOD2 не відрізнялося у препаратах печінки тварин всіх чотирьох досліджених груп (Рис. 3.25).

У літературі повідомлялося, що споживання як їжі західного типу, так і додатків броколі призводило до вищої активності СОД у печінці шеститижневих мишей [55]. Вища активність СОД також супроводжувалася усуненням більшої продукції АФК у шеститижневих мишей з іншого дослідження впливу споживання їжі західного стилю життя [258]. Деякі роботи надали дані про те, що ВКЇ не впливала на активність СОД у печінці мишей [237,255,271]. Також при харчуванні ВКЇ можливий вищий рівень ферменту СОД у печінці мишей [272,273]. Наші результати свідчать про те, що два фактори разом (кафетерійна

їжа та проростки броколі) спричинили зростання активності СОД, яку визначали у кюветі, проте не активність ферменту на гелі.

Активність каталази достовірно не відрізнялася між дослідними групами (Додаток 14). Відсутність впливу споживання ВКЇ чи броколі на активність каталази в печінці мишей уже повідомлялася в літературі [55,258].

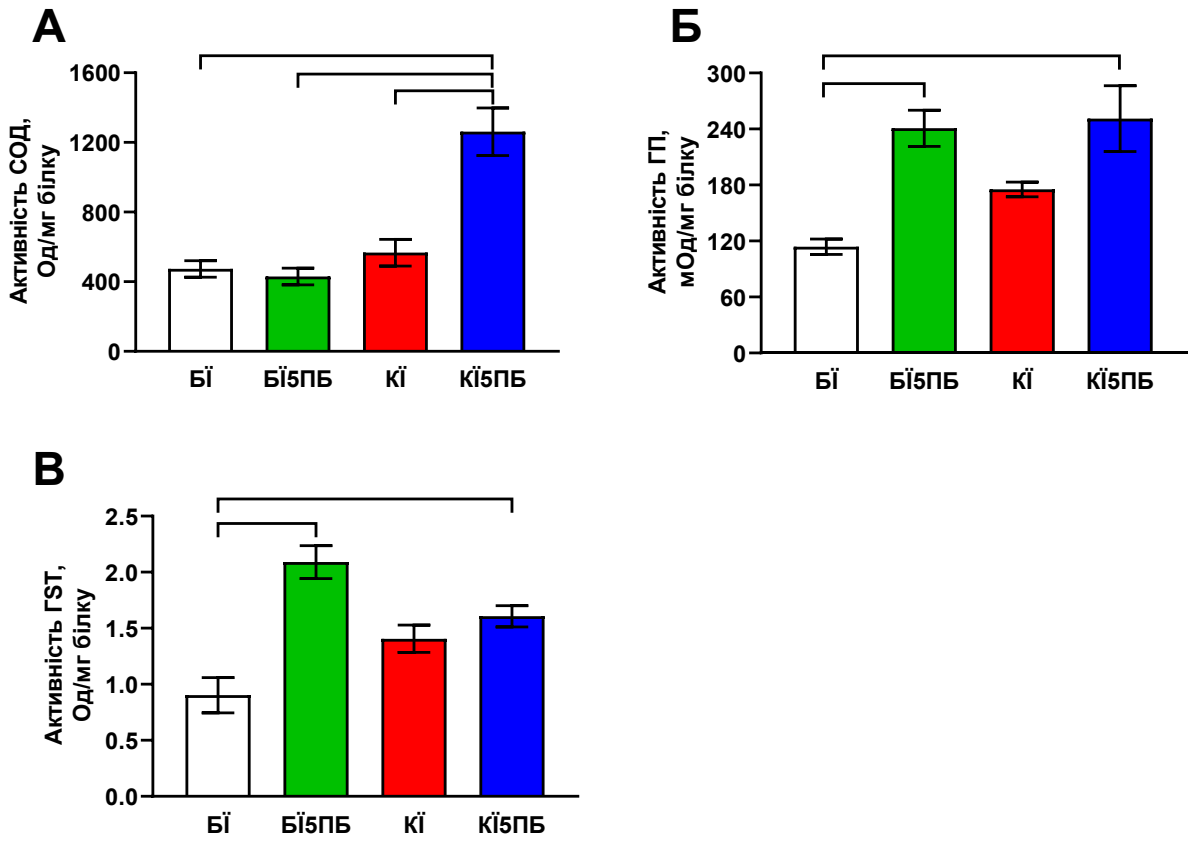


Рис. 3.24. **Активність антиоксидантних і допоміжних ферментів у печінці мишей**. Активність супероксиддисмутази (А), глютатіонпероксидази (Б) та глютатіон-S-трансферази (В) у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

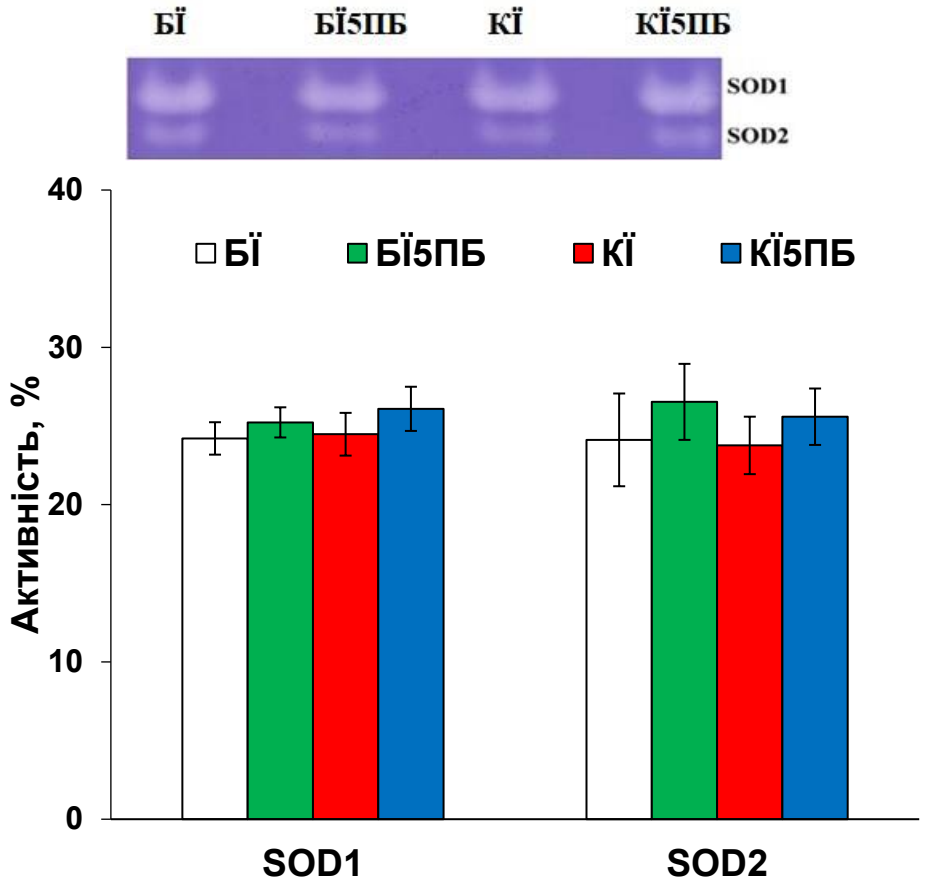


Рис. 3.25. **Демонстративне фото гелю і активність ізоформ печінки мишей СОД у гелі**. Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було по п’ять повторів.

Активність ГП у кюветі була достовірно вищою в групах мишей КЇ5ПБ та БЇ5ПБ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.24Б). Значення групи КЇ5ПБ і БЇ5ПБ не відрізнялися між собою. Методом нативного гель-електрофорезу з наступним проявленням ізоформ ГП показано, що активність ізоформи GPx1 та GPx3 не відрізнялася між дослідними групами (Рис. 3.26). Проте активність ізоформи GPx2 була вищою у групах мишей БЇ5ПБ та КЇ5ПБ порівняно з групою БЇ. Також активність у групі мишей БЇ5ПБ була достовірно вищою порівняно з групою КЇ.

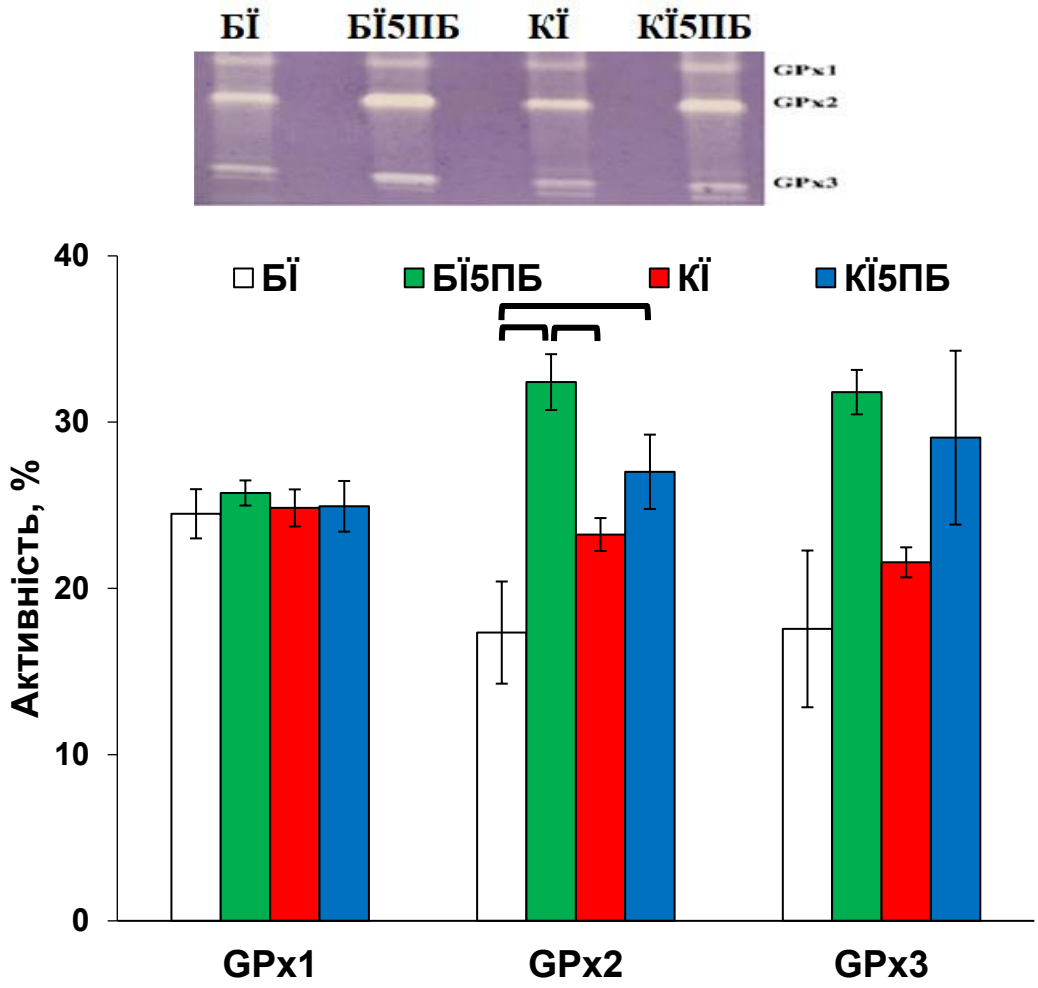


Рис. 3.26. Демонстративне фото гелю і активність ізоформ глютатіонпероксидази на гелі у печінці мишей. Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4 повтори. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами, з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Дослідження інших вчених демонструють, що ВКЇ чи різні рослинні препарати броколі не впливали на активність ГП [55,258]. Як припущення, додавання проростків броколі вплинуло на активність ГП для утилізації АФК при споживанні кафетерійної їжі, але не вплинуло на основні антиоксидантні ферменти – СОД і каталазу.

ГП – це допоміжний антиоксидантний фермент, який використовує глютатіон для знешкодження АФК. Наше дослідження показало, що активність ГП була вищою в групах, котрим додавали проростки броколі до їжі. Дослідження активності ГП на гелі показало, що підвищена активність ферменту була ізоформно-специфічною для GPx2. Підвищений печінковий рівень ферменту ГП вже описувався при споживанні ВКЇ [272]. Інші дослідження показували, що харчування не впливало на цей фермент [273]. Також про збільшену активність ГП уже повідомлялося у дослідженні ВКЇ [55].

Фермент GST трансформує ксенобіотики та шкідливі речовини для подальшої утилізації. Також GST бере участь в антиоксидантному захисті і перетворює продукти пероксидного окислення ліпідів. У нашому дослідженні активність GST демонструвала певну схожість з активністю ГП.

Активність GST була достовірно вищою у групі мишей, які споживали кафетерійну їжу з паростками броколі та базову їжу з паростками броколі порівняно з групою базової їжі (Рис. 3.24В). Активність не відрізнялася між групами БЇ5ПБ та КЇ5ПБ.

Методом нативного гель-електрофорезу з наступним проявленням ізоформ GST показано, що вища активність ферменту була ізоформно-специфічною для GSTm і GSTt (Рис. 3.27). Активність GSTm була достовірно вищою у групі БЇ5ПБ та КЇ порівняно з групою БЇ. Активність GSTt була достовірно вищою у групі БЇ5ПБ порівняно з групою КЇ. Літературні джерела вказують різний вплив висококалорійного харчування та препаратів броколі (борошно з листя і стебел) на активність GST у печінці шестимісячних мишей, яких годували такою їжею протягом 14 тижнів [55]. У схожому дослідженні була встановлена вища активність GST [255]. Також існують дані ніяких змін активності GST при споживанні броколі чи ВКЇ не спостерігалося [258]. Активність GST напряму пов’язують з наявністю в броколі СФН та глюкорафаніну [140,274]. Також одне джерело називає СФН напряму індуктором GST у печінці [255].

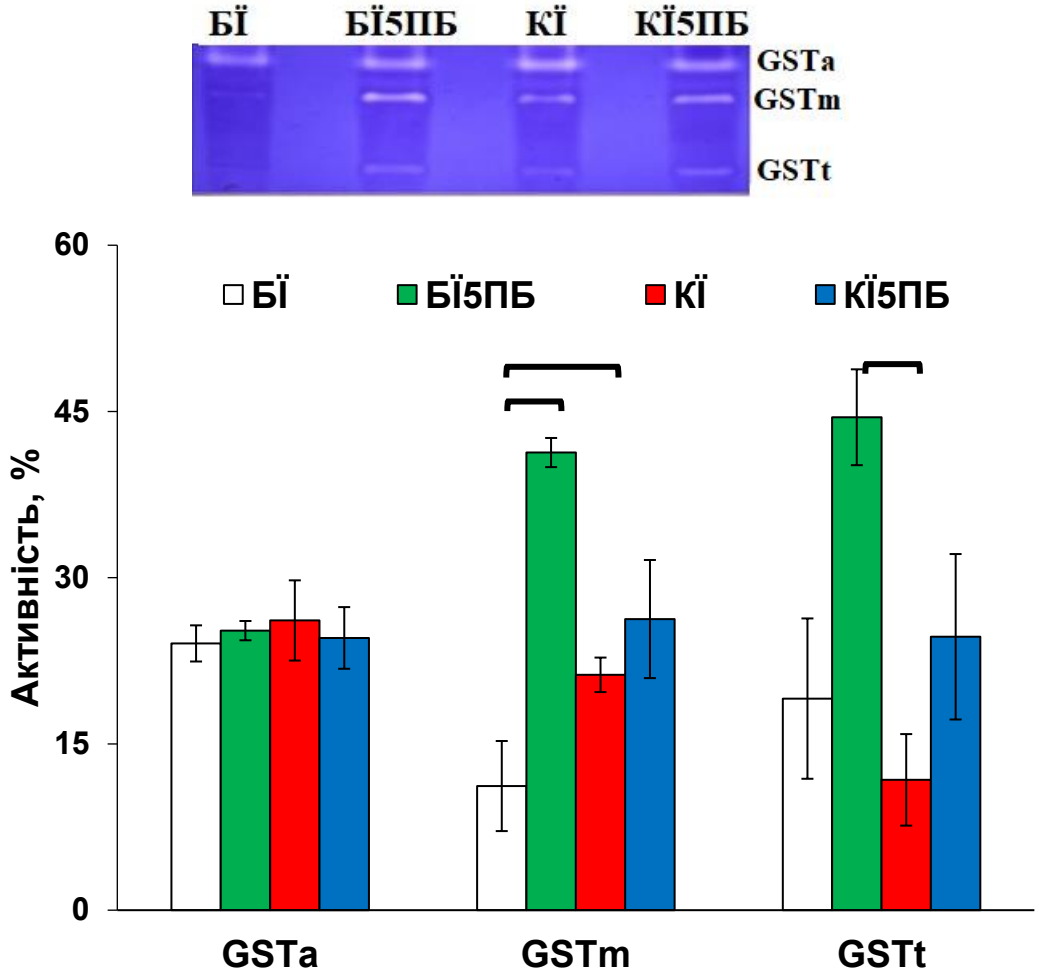


Рис. 3.27. **Демонстративне фото гелю і активність ізоформ глютатіон-S-трансферази на гелі у печінці мишей**. Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 3 повтори. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами, з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Глутатіонредуктаза підтримує рівень відновленого глютатіону та співвідношення GSH/GSSG. Активність ГР була достовірно вищою в групі КЇ порівняно з групою БЇ, що вказує на необхідність відновлювати глютатіон для антиоксидантної та детоксикаційної дії (Рис. 3.28А). Цей показник був найвищим у групі КЇ5ПБ порівняно з іншими групами.

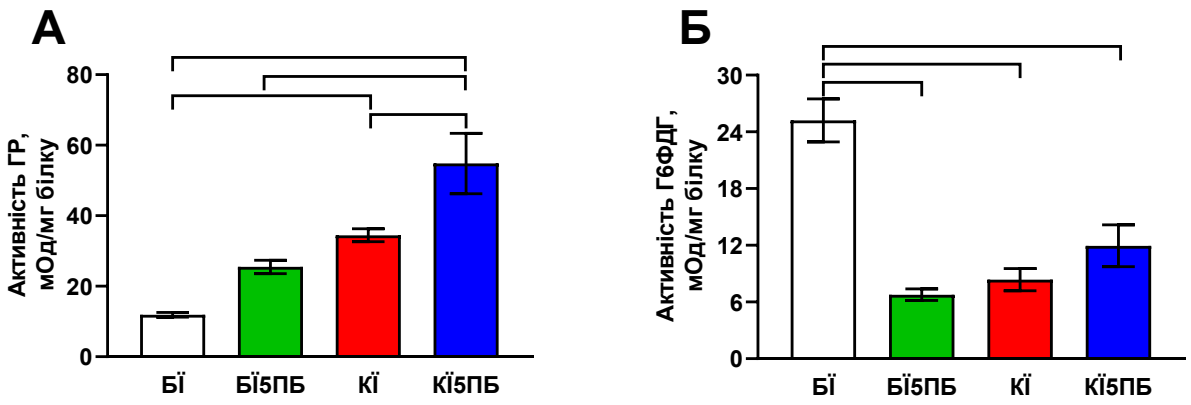


Рис. 3.28. **Активність ферментів у печінці мишей**. Активність глютатіонредуктази (А) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Б) у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Незважаючи на посилення антиоксидантних та детоксикаційних процесів (більша активність ГП та GST), у групі БЇ5ПБ достовірних змін активності ГР не встановлено.

Патологічні стани, такі як неалкогольна жирова хвороба печінки (яка є можливим супутнім захворюванням при ожирінні) призводять до виснаження GSH і зниження співвідношення GSH/GSSG [275]. Фермент Г6ФДГ залучає НАДФН для відновлення глютатіону за допомогою ГР. У групах КЇ, КЇ5ПБ та БЇ5ПБ активність Г6ФДГ була нижчою порівняно з групою БЇ (Рис. 3.28Б). Показники цих трьох груп були подібними між собою.

НАД(Ф)-хінон оксидоредуктаза 1 є важливим багатофункціональним ферментом. Активність цього ферменту достовірно не відрізнялася між експериментальними групами (Додаток К).

3.4.7 Вміст триацилгліцеролів та глікогену у печінці мишей

Ожиріння часто змінює вуглеводний і ліпідний обмін речовин, а також порушує накопичення енергії. Надлишок енергії, окрім використання на побудову, відновлення та нагрівання організму, також концентрується в накопиченні триацилгліцеролів та глікогену в межах біологічної норми. Незважаючи на однакові значення маси печінки мишей в експериментальних групах, ми знайшли вищий вміст ТАГ у печінці мишей групи КЇ порівняно з рештою дослідних груп (Рис. 3.29А). Крім того, ми виявили вищий вміст ТАГ у групі КЇ5ПБ порівняно з БЇ, але значення у групі КЇ5ПБ були достовірно нижчими, ніж у групі КЇ. Вміст ТАГ у групі БЇ був найнижчим серед експериментальних груп, а в групі БЇ5ПБ цей показник був майже вдвічі вищим. Ці результати свідчать про те, що споживання проростків броколі усувало накопичення ТАГ, яке було зумовлене споживанням кафетерійної їжі.

Раніше на щурах та мишах були описані ефекти нижчого вмісту триацилгліцеролів у печінці при споживанні екстракту броколі [276,277]. Також у нашому попередньому досліді при споживанні паростків броколі та кафетерійної їжі вміст ТАГ у печінці був нижчим.

У досліді зі споживанням проростків броколі вміст ТАГ був нижчим, ніж при споживанні лише кафетерійної їжі, але вищим, ніж при споживанні лише базової їжі. Можливим поясненням такого ефекту є неоднозначність впливу споживання броколі на регуляторні та енергетичні системи організму мишей. Ці системи перш за все відповідають за отримання та розподіл енергії з їжі і у мишей спостерігалося накопичення вісцерального жиру.

Рівень ТАГ чи холестеролу у плазмі крові мишей залишалися незмінними між дослідними групами. Накопичення вісцерального жиру відбувалося навіть при споживанні броколі, що також допускає відкладання запасних речовин у печінці. Проте накопичення ТАГ у печінці відбувалося і при споживанні кафетерійної їжі, і при споживанні з нею проростків броколі. Тоді як при споживанні паростків броколі з кафетерійною їжею ми встановили, що вміст ТАГ

не відрізнявся від значень групи базової їжі та базової їжі з проростками броколі. Це означає що ефекти споживання паростків і проростків броколі на вміст ТАГ у печінці мишей відрізняються. Це пояснюється впливом різних чинників, такі як склад і поживна цінність кафетерійної їжі, а також відповіддю систем організму на кількість отриманих калорій чи склад цієї їжі.

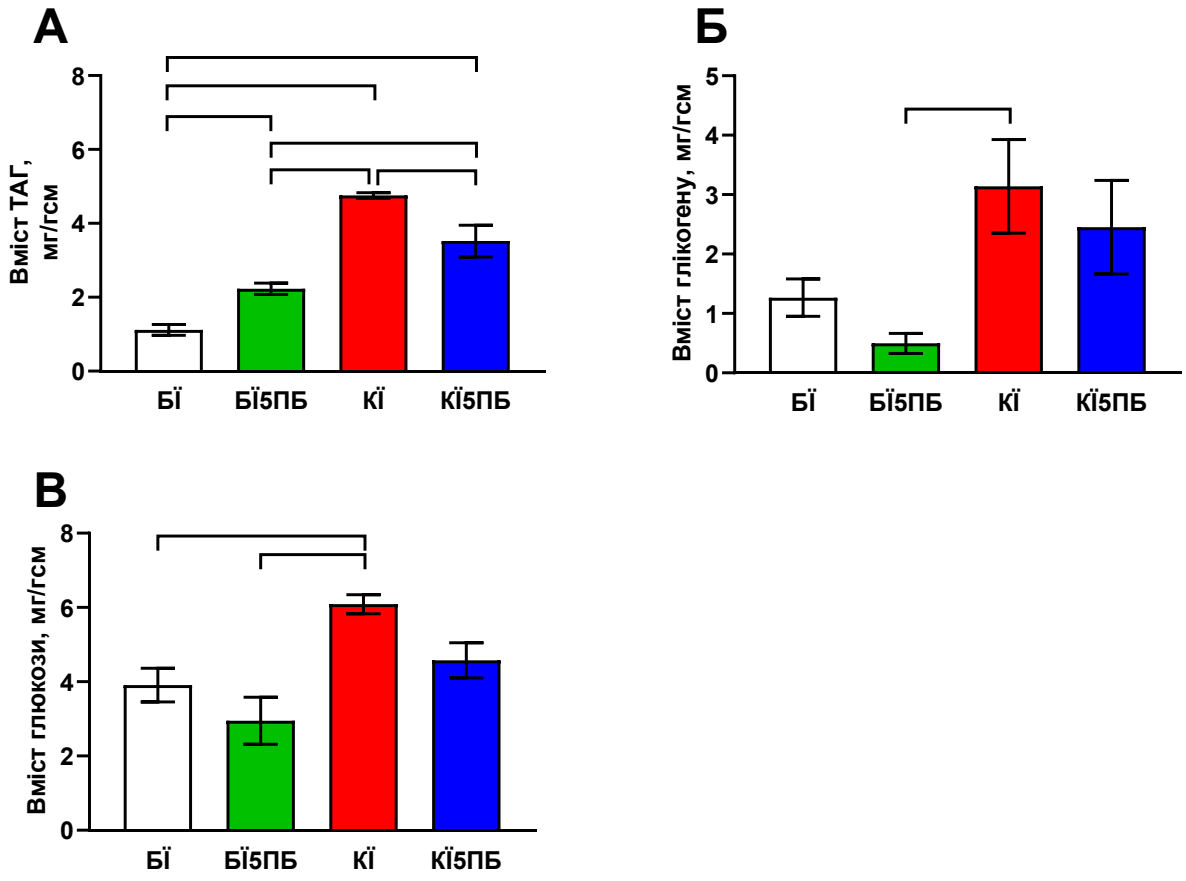


Рис. 3.29. **Вміст запасних речовин у печінці мишей**. Вміст триацилгліцеролів (А) та глікогену (Б) у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Глікоген є важливим джерелом глюкози під час голодування. Наше дослідження продемонструвало вищий вміст глікогену в печінці мишей групи КЇ порівняно з групою БЇ5ПБ (Рис. 3.29Б). Вміст вільної глюкози був достовірно вищим у печінці мишей групи КЇ порівняно з групами БЇ та БЇ5ПБ (Рис. 3.29В). Вміст як вільної глюкози, так і глікогену достовірно не відрізнявся між групами БЇ, КЇ5ПБ та БЇ5ПБ. Дослідження інших вчених показало вищий вміст глікогену внаслідок регуляції синтезу глікогену, індукованої сульфорафаном [278]. Проте у нашому дослідженні лише кафетерійна їжа спричинила вищий вміст глікогену в печінці мишей.

Споживання кафетерійної їжі спричиняло накопичення ТАГ, глікогену та вільної глюкози в печінці мишей, що було очікувано. У групі БЇ5ПБ ми спостерігали дещо більший вміст ТАГ у печінці порівняно з групою БЇ. Цей результат можна пояснити нормальним накопиченням ліпідів, оскільки миші у групі БЇ5ПБ протягом експерименту набирали масу тіла і вісцерального жиру, в той час як маса тіла мишей групи БЇ залишалася стабільною. Крім того, значення маси печінки були подібними між цими групами. Ми не встановили впливу проростків броколі на обмін глікогену чи глюкози.

3.4.8 Активність гліколітичних ферментів та фруктокінази у печінці мишей

Клітини отримують і розподіляють глюкозу з кровоносного русла, щоб підтримувати нормальний рівень глюкози в крові та насичувати важливі органи і тканини, такі як мозок, печінка та м’язи. Гліколітичні ферменти відіграють ключову роль у метаболізмі глюкози, але глюкозо-6-фосфати також можуть проходити пентозофосфатним шляхом, або конденсуватися для накопичення глікогену. У нашому дослідженні на активність гексокінази не впливали споживання проростків броколі, кафетерійної їжі або їх поєднання (Рис. 3.30А). Зрозуміло, що надлишок енергії внаслідок споживання кафетерійної їжі не

вплинув на активність ГК, а також біоактивні сполуки проростків броколі не впливали на регуляцію активності цього ферменту.

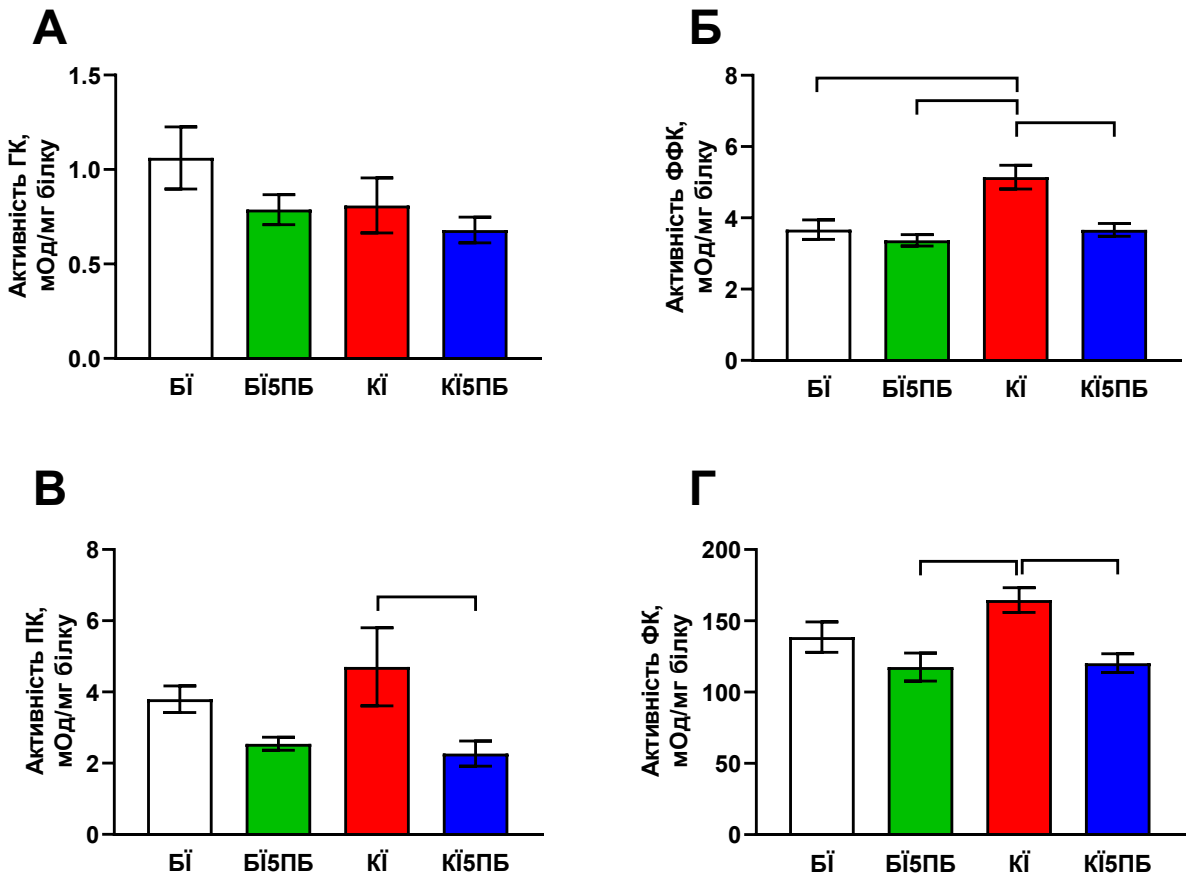


Рис. 3.30. **Активність ферментів обміну вуглеводів**. Активність фосфофруктокінази (А), піруваткінази (Б) та фруктокінази (В) у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Фосфофруктокіназна реакція є лімітуючою та регуляторною стадією гліколізу. Активність ФФК залежить від наявності інших субстратів та метаболітів, такі як АТФ. Наші результати показали найвищу активність ФФК у

групі КЇ (Рис. 3.30Б). Між значеннями груп БЇ, КЇ5ПБ та БЇ5ПБ не було достовірної різниці. Фруктозо-6-фосфат інтенсивно перетворювався ФФК під час споживання КЇ, що є очікуваним результатом. Проте активність ФФК у групі КЇ5ПБ продемонструвала показники, подібні до значень груп БЇ і БЇ5ПБ, що вказує на те, що при споживанні кафетерійної їжі проростки броколі можуть впливати на активність ФФК.

Активність піруваткінази мала тенденцію бути нижчою в групах БЇ5ПБ і КЇ5ПБ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.30В). Значення групи КЇ не відрізнялося від значення групи БЇ. Проте значення групи КЇ було достовірно вищим порівняно з групою КЇ5ПБ. Споживання проростків броколі з базовою чи кафетерійною їжею продемонструвало здатність зменшувати активність ПК. Піруваткіназа чутлива до харчового стану організму тварин, наприклад, відносний рівень транскрипту іРНК, що кодує цей фермент та активність ферменту були вищі в *ob/ob* мишей, які надмірно споживають їжу [279]. У нашому дослідженні був встановлений незначний вплив споживання проростків броколі на кінцеву стадію гліколізу.

Фруктокіназа – важливий фермент, який сприяє перетворенню сахарози на фруктозу в процесі метаболізму та входження інших вуглеводів до гліколізу [280]. На відміну від ФФК, ФК не інгибується збільшенням утворення АТФ [281]. Ця здатність містить серйозний ризик через можливі проблеми з надлишком енергії з АТФ, яка повинна бути належним чином використана, збережена або розсіяна шляхом термогенезу, особливо при ожирінні. Надлишок фруктози та вища активність ФК збільшують утворення проміжних продуктів ацетил-КоА та гліцерол-3-фосфату [282,283]. Крім того, фруктоза використовується як натуральний підсолоджувач, тому велика кількість фруктози присутня в кафетерійній їжі [67]. У нашому дослідженні активність ФК була достовірно меншою у групах БЇ5ПБ та КЇ5ПБ порівняно з БЇ (Рис. 3.30Г). У групах КЇ та БЇ не було виявлено достовірної різниці, однак у групі КЇ спостерігалася тенденція до збільшення активності. Достовірно вища активність ФК була визначена в аналогічному дослідженні [67]. Було встановлено, що дієта з високим вмістом фруктози є індуктором стеатозу печінки зі зниженням активності цитозольних

ліпаз, що сприяє накопиченню ліпідів у печінці [284]. Надлишок фруктози також стимулював експресію ліпогенних ферментів, ацетил-КоА карбоксилази 1 (ACC1) та синтази жирних кислот (FAS) [285,286]. Також окислення жирних кислот може порушити баланс між печінковим засвоєнням і секрецією ліпідів, що призводить до накопичення ліпідів у печінці [286,287]. Фруктоза може впливати на метаболізм глюкози в печінці та інсулінове сигналювання, таким чином сприяючи розвитку порушень, пов'язаних з інсулінорезистентністю [286–288]. Дефіцит ФК виявив захисний ефект проти розвитку спричинених ожирінням захворювань печінки [289]. Ми припустили, що броколі має оптимальний вплив на ФК, знижуючи її активність, таким чином захищаючи від патологій печінки.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа є важливим багатофункціональним ферментом. Він є лімітуючою ланкою в ПФШ, підтримує окислювально-відновний гомеостаз за допомогою НАДФН і ліпогенез *de novo* [290]. У нашому дослідженні активність Г6ДФГ була достовірно в 3 рази меншою в групі КЇ, в 2,1 рази меншою в групі КЇ5ПБ і в 3,7 рази меншою в групі БЇ5ПБ порівняно з групою БЇ. КЇ, КЇ5ПБ та БЇ5ПБ достовірно не відрізнялися (Рис. 3.28Б). Раніше повідомлялося про зниження активності Г6ФДГ при застосуванні добавок проти ожиріння під час споживання висококалорійної їжі [291]. Існує припущення, що зниження активності Г6ФДГ є адаптивним природним механізмом запобігання інсулінорезистентності, спричиненої ожирінням, що було визначено на мишах з дефіцитом Г6ФДГ [290]. З іншого боку, дефіцит Г6ФДГ є найпоширенішою ензимопатією у людей, що спричиняє не лише анемію, але й надмірне утворення АФК [292]. У нашому дослідженні споживання мишами як броколі, так і кафетерійного раціону продемонструвало меншу активність Г6ФДГ у печінці. Ці результати свідчать про зниження продукції НАДФН для ліпогенезу, що вважається позитивним ефектом. Однак цей ефект реалізовувався як у групах з кафетерійною їжею, так і в групах з проростками броколі. Більший вміст ТАГ у печінці ми пояснюємо надходженням і накопиченням ліпідів із кровоносного русла при споживанні висококалорійної їжі, а не синтезом *de novo* за допомогою ацил-КоА і НАДФН. Менша активність Г6ФДГ є ризиком для підтримки системи

антиоксидантного захисту, яка залежить від підтримання співвідношення GSH/GSSG за рахунок ГР з використанням НАДФН. Більше того, було доведено, що виснаження GSH пов'язане зі спричиненою ожирінням жировою хворобою печінки [275]. Ми показали, що активність ГР не змінювалася внаслідок споживання кафетерійної їжі, і цей фермент забезпечував GSH для антиоксидантного захисту та детоксикації ксенобіотиків, як це було показано для GPx та GST. Цей висновок вказує на подвійну роль Г6ФДГ під час індукованого дієтою ожиріння – обмеження утворення НАДФН для ліпогенезу та забезпечення або перенаправлення НАДФН для відновлення глютатіону.

3.3.9 Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі зразків печінки мишей

Для проведення ПЛР використовували олігонуклеотидні послідовності до генів *TXNRD1* (тіоредоксинредуктаза 1), *CYP1A1* (цитохром Р450), *NURR77* (ядерний рецептор, регулятор імунної відповіді), *PGC1A* (регулятор біогенезу мітохондрій), *PDK2*, *PDK4* (регуляторні ферменти), *UDGH*, *GNMT* (ферменти, які беруть участь в детоксикації ксенобіотиків), *IL6*, *CCL2* (маркери запалення).

Миші, які споживали кафетерійну їжу та кафетерійну їжу разом з проростками броколі, мали, відповідно, в 1,85 та 1,69 разів нижчий рівень відносного транскрипту іРНК *TXNRD1* порівняно з мишами, що споживали базову їжу (Рис. 3.31). Також показники у цих групах були достовірно нижчими порівняно зі значенням групи БЇ5ПБ. Як припущення, при споживанні кафетерійної їжі порушувався захист від оксидативного стресу за допомогою тіоредоксинредуктази 1, а додавання проростків броколі не усувало цей шкідливий ефект.

Миші, які споживали кафетерійну їжу, мали в 2,6 разів вищий рівень відносного транскрипту іРНК гену *CYP1A1* порівняно з БЇ5ПБ, що свідчило про потребу збільшити знешкодження ксенобіотиків цитохромом Р450 при споживанні кафетерійної їжі (Рис. 3.31). Інших відмінностей між дослідними

групами не було встановлено. Також при споживанні лише кафетерійної їжі був достовірно вищим рівень відносного транскрипту іРНК регулятора імунної відповіді *NURR77* (Рис. 3.31).

Відносний рівень транскрипту іРНК *CCL2* (маркеру запалення) у групі КЇ був найвищим серед усіх дослідних груп, що могло свідчити про розвиток запальних процесів у печінці мишей, які споживали кафетерійну їжу (Рис. 3.31).

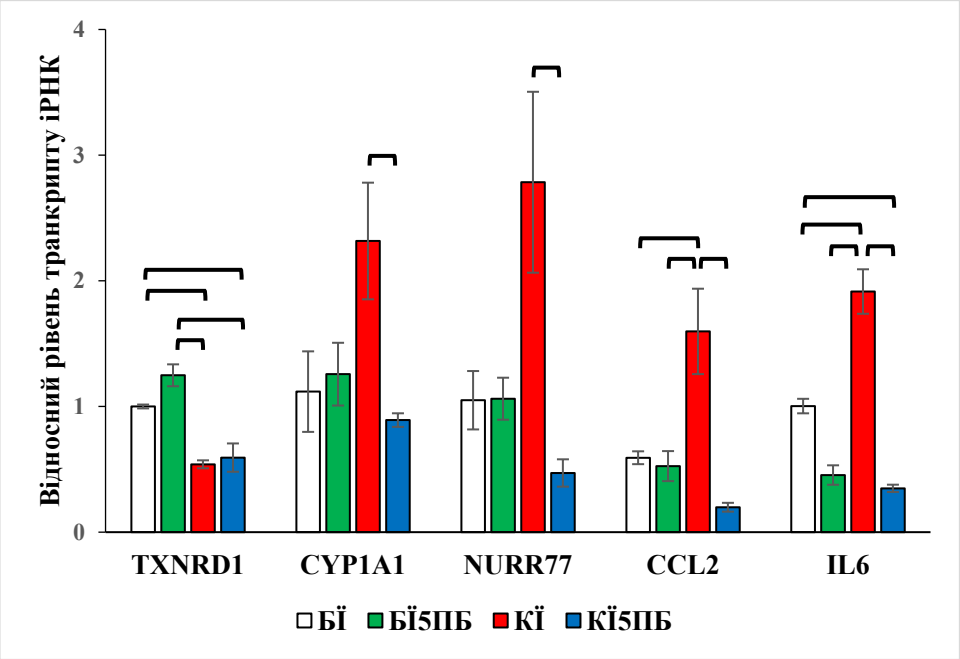


Рис. 3.31. **Рівні відносного транскрипту іРНК у печінці мишей**. Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 3-4 повтори. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Рівень відносного транскрипту іРНК гену *IL6* був найвищим при споживанні кафетерійної їжі порівняно з рештою дослідних груп (Рис. 3.31). Також рівні в групах КЇ5ПБ та БЇ5ПБ були достовірно нижчими порівняно з групою БЇ. Як проміжний підсумок, споживання кафетерійної їжі могло сприяти

розвитку запальних процесів у печінці мишей, а додавання проростків броколі до кафетерійного чи базового корму могло протидіяти розвитку запалення.

Рівень відносного транскрипту іРНК гену *UGDH* був втричі нижчим у групах КЇ, КЇ5ПБ та БЇ5ПБ порівняно з групою БЇ (Рис. 3.32). Як припущення, дослідна їжа зменшувала здатність знешкоджувати ксенобіотики за допомогою білку UGDH.

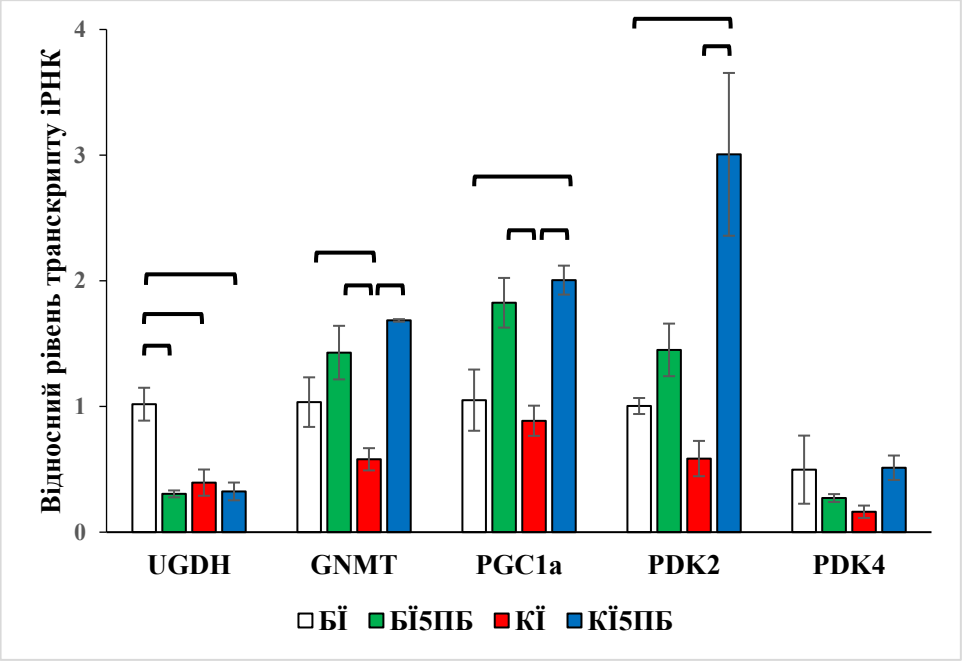


Рис. 3.32. **Рівні відносного транскрипту іРНК у печінці мишей**. Миші отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 3-4 повтори. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Рівні гену *GNMT* були достовірно вищими у групах КЇ5ПБ і БЇ5ПБ порівняно з групою КЇ (Рис. 3.32). Додавання проростків броколі могло сприяти обміну метильних груп у печінці завдяки білку GNMT. Зниження транскрипту *GNMT* чи менший вміст його білку у печінці є сигналом про захворювання

печінки, наприклад неалкогольну жирову хворобу печінки (НАЖХП), усі перелічені порушення можуть виникати при споживанні кафетерійної їжі.

У групі КЇ5ПБ та БЇ5ПБ рівень відносного транскрипту іРНК гену *PGC1A* був у два рази більшим порівняно з групою КЇ (Рис. 3.32). Також показник групи КЇ5ПБ був удвічі вищим за значення групи БЇ. Ці результати свідчать, що додавання проростків броколі до їжі сприяло біогенезу мітохондрій, який відбувається у відповідь на надлишок отриманої з їжею енергії.

У групі КЇ5ПБ рівень відносного транскрипту іРНК гену *PDK2* був у 3 рази вищим порівняно з групою БЇ і в 5,12 рази вищим порівняно з КЇ (Рис. 3.32). Як пояснення, вплив споживання кафетерійної їжі з броколі на обмін речовин міг здійснюватися за допомогою білку PDK2, який пригнічує синтез ацетил-КоА у мітохондріях, який є необхідною сполукою для синтезу ліпідного ланцюга і ліпогенезу *de novo*.

Відносні рівні іРНК гену *PDK4* достовірно не відрізнялися між дослідними групами, хоча білок PDK4 є більш чутливим до енергетичних змін, ніж PDK2.

Споживання кафетерійної їжі вплинуло на відносну транскрипцію іРНК генів білків, які беруть участь у запальних процесах та імунній відповіді. Також споживання кафетерійної їжі зменшувало рівні відносної транскрипції іРНК генів, білки яких відповідають за знешкодження ксенобіотиків та метилювання, що підтверджує порушення обміну речовин, можливість виникнення оксидативного стресу та захворювань печінки. Споживання проростків броколі сприяло на рівні транскрипції генів усуненню запалення, перерозподілу отриманої енергії, проте роль у знешкодженні ксенобіотиків була вибіркова та двояка.

3.4.10 Гістологія зразків печінки мишей

Ожиріння є сукупністю молекулярних, біохімічних, анатомічних і фізіологічних змін, які призводять не тільки до енергетичного, а й механічного навантаження жирової тканини на інші тканини і системи органів, серед яких сполучні тканини, внутрішні органи та верхні дихальні шляхи. При ожирінні

вражається печінка, як ключовий орган у метаболізмі ліпідів, вуглеводів та білків і зазнає негативних змін при споживанні висококалорійної дієти. Збільшене накопичення ліпідів у гепатоцитах призводить до розвитку НАЖХП, яка може прогресувати до глобального запалення, фіброзу і навіть цирозу.

Ми досліджували ступінь жирової інфільтрації, наявність запальних процесів, а також стан мембранних структур клітин печінки при споживанні кафетерійної їжі, проростків броколі та їх комбінації. Отримане типове зображення з групи БЇ показує одноманітну, фіолетово-забарвлену клітинну структуру, характерну для здорових гепатоцитів, основних функціональних клітин печінки (Рис. 3.33А). Клітини мали правильну, багатокутну форму, розташовані щільно, їх ядра є видимими. Синусоїдні капіляри (тип кровоносних судин) розташовані між пластинами гепатоцитів і мають відкриту структуру для ефективного кровообігу та обміну речовин між кров'ю та гепатоцитами. Патологічні ознаки запалення, некрозу або аномальної морфології клітин не спостерігалися.

Рисунок 3.33 Б демонструє гістологічну структуру печінки миші, яка отримувала базовий корм із додаванням 5% проростків броколі. На гістологічному зрізі також було видно чітко виражену структуру печінки. Гепатоцити були розташовані у вигляді пластин навколо центральних вен і мали нормальну форму з чіткими ядрами. Клітини мали рівномірну цитоплазму, без вакуолей або сторонніх включень, характерних для жирової дистрофії. Гепатоцити демонстрували здорову структуру з чіткими міжклітинними межами.

При аналізі зображень з групи кафетерійної їжі були помітними скупчення імунних клітин, що є ознакою запалення (Рис. 3.33В). Це свідчило про шкідливий вплив споживання кафетерійної їжі на стан печінки мишей. Накопичення ліпідів у печінці може призвести до порушення нормального функціонування та будови гепатоцитів. На це явище можуть реагувати імунні клітини, щоб зменшити шкоду від некрозу або неконтрольованого росту ліпідних крапель.

При харчуванні кафетерійною їжею з додаванням проростків броколі гепатоцити зберігали свою структуру і ознаки масового скупчення імунних клітин

або виражених жирових клітин були відсутні (Рис. 3.33Г). Це свідчило про відсутність жирової інфільтрації. Проростки броколі могли мати позитивний вплив на усунення або попередження пошкоджень, спричинених споживанням висококалорійної їжі. Зразок тканини печінки з цієї групи КЇ5ПБ виглядав однорідним, без великих ліпідних крапель, що свідчило про відсутність патологічних процесів.

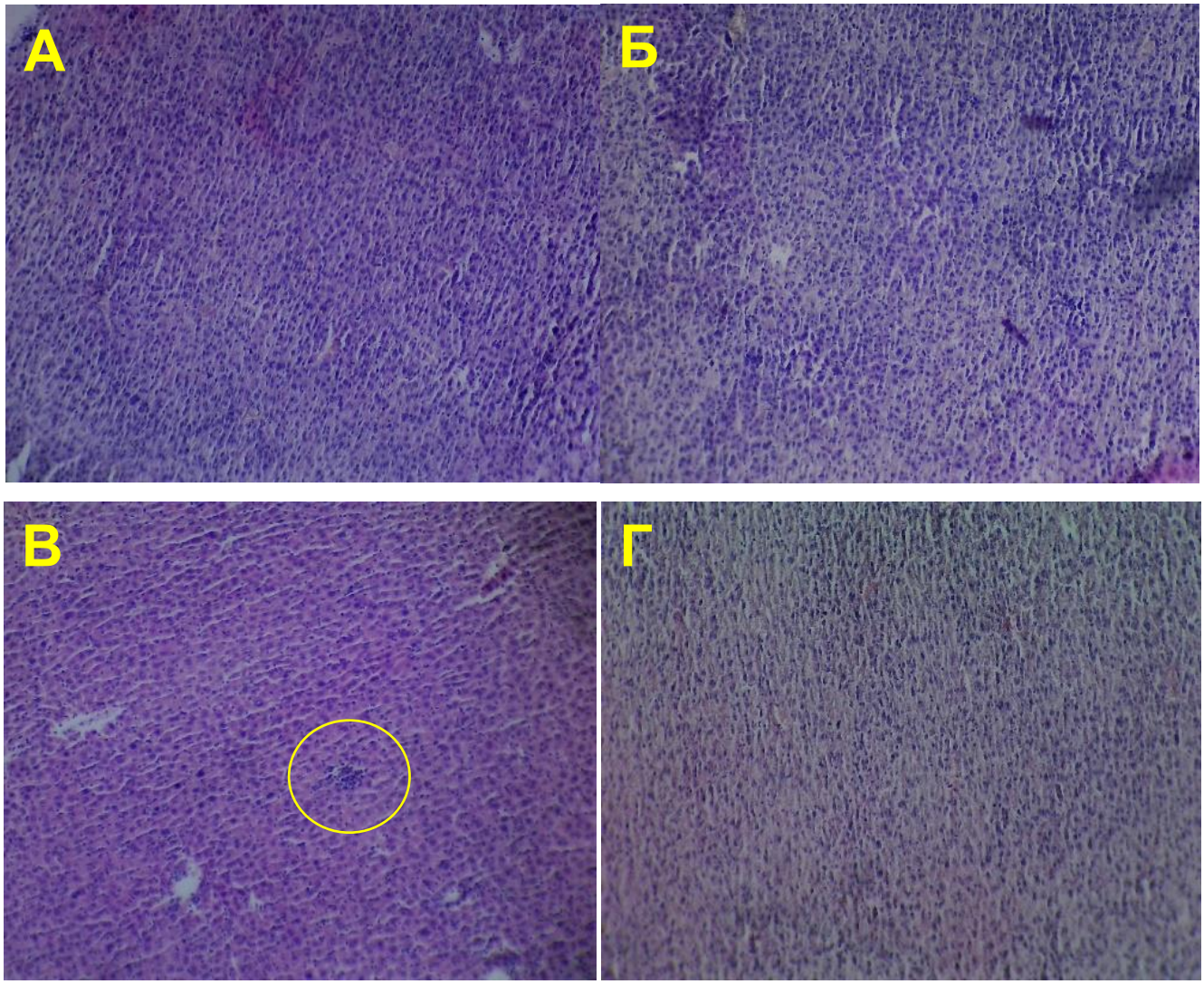


Рис. 3.33. Типовий гістологічний зріз печінки мишей: отримували базову їжу (А), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (Б), кафетерійну їжу (В) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (Г). Фарбування відбувалося гематоксилін-еозином. Загальне збільшення 160х. Жовтим колом позначено скупчення імунних клітин.

У досліджуваних зразках тканини печінки дослідних мишей не було виявлено ліпідних крапель, що свідчило про відсутність ознак жирової дистрофії або стеатозу. У печінці періодично можуть бути незначні накопичення ліпідів при отриманні більшої кількості калорій. При здоровому харчуванні та нормальній функції печінки ліпідні краплі є мінімальними і не призводять до жирової інфільтрації. Усі гістологічні зрізи демонстрували відсутність значного накопичення жирових відкладень у гепатоцитах. Відсутність ліпідних крапель є важливим показником, оскільки їх надмірне накопичення в печінкових клітинах пов'язане з розвитком метаболічного синдрому, запальних процесів, а також з пригніченням інших функцій печінки. Наші результати свідчать про те, що додавання проростків броколі до кафетерійної їжі сприяє підтримці нормальної тканинної структури печінки, зменшуючи імовірність виникнення ожиріння та пов'язаних із ним патологічних станів печінки.

3.4.11 Активність ферментів антиоксидантного захисту у корі головного мозку мишей

Активність ГП мала тенденцію бути нижчою у корі головного мозку мишей груп КЇ та КЇ5ПБ порівняно з БЇ (Рис. 3.34А). Ці дві групи мали достовірно меншу активність порівняно з групою БЇ5ПБ.

Ми припускаємо, що споживання кафетерійної їжі окремо чи з паростками броколі може негативно впливати на активність ГП і знешкодження АФК у корі головного мозку мишей. Додавання проростків броколі не мало впливу на активність ГП при споживанні базової чи кафетерійної їжі.

Активність GST була на достовірно нижчою у групі КЇ порівняно з групою БЇ та БЇ5ПБ (Рис. 3.34Б). Наші результати свідчили про те, що споживання кафетерійної їжі негативно вплинуло на активність ГП і GST, що могло свідчити про пригнічення антиоксидантних та детоксикаційних процесів у корі головного мозку мишей.

Активність ГР між групами достовірно не відрізнялася, що свідчило про відсутність впливу споживання кафетерійної їжі і проростків броколі разом чи окремо на активність цього глютатіон-залежного ферменту (Додаток Л).

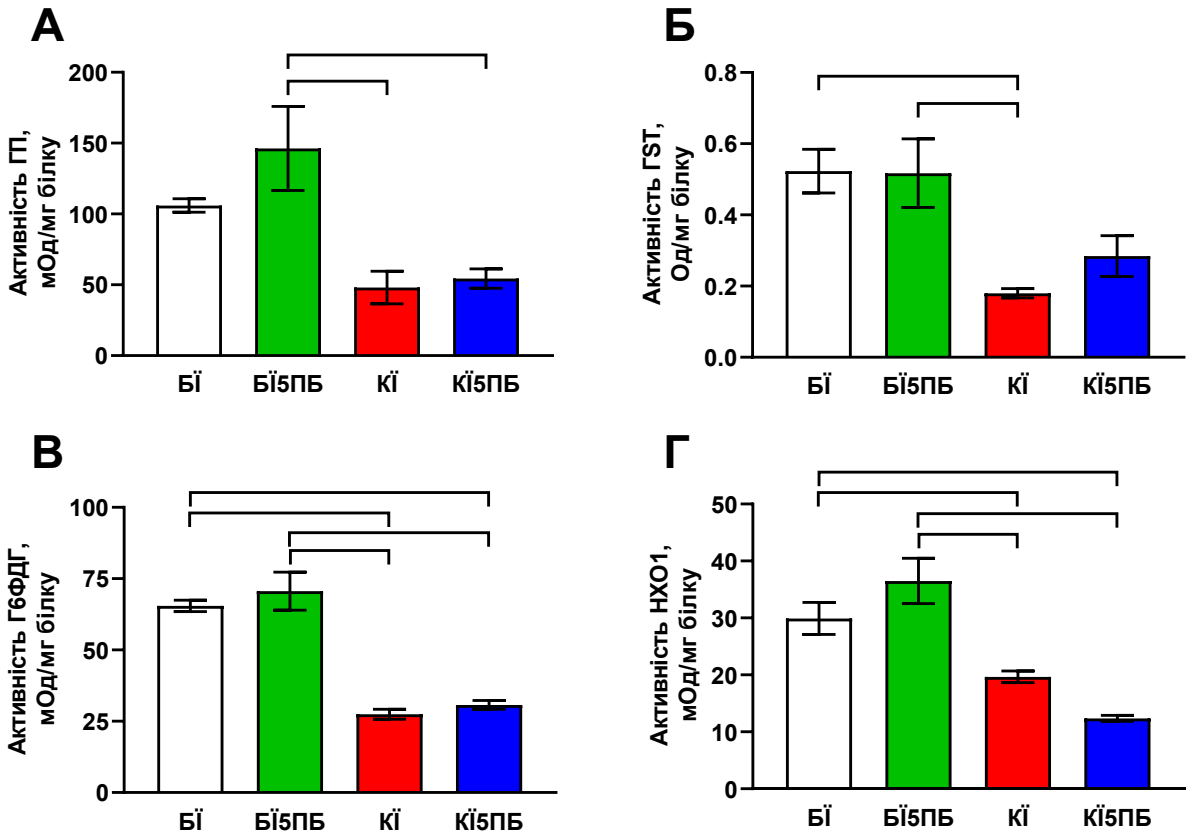


Рис. 3.34. **Активність антиоксидантних та допоміжних ферментів у корі головного мозку мишей**. Активність глютатіонпероксидази (А), глютатіон-S-трансферази (Б), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (В) та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 у корі головного мозку мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

Активність Г6ФДГ у групах КЇ та КЇ5ПБ була приблизно удвічі нижчою порівняно з групою БЇ та БЇ5ПБ (Рис. 3.34В). Можна підсумувати, що хоча активність Г6ФДГ була меншою при споживанні кафетерійної їжі, активність ГР була подібною між дослідними групами, що свідчить про відсутність критичних змін відновлення глютатіону, проте є наявним вплив споживання кафетерійної їжі на продукцію НАДФН.

Активність НХО1 у групах КЇ та КЇ5ПБ була достовірно нижчою порівняно з групою БЇ та БЇ5ПБ, що показано на Рис. 3.34Г.

Як висновок, споживання кафетерійної їжі окремо чи з броколі мало негативний вплив на антиоксидантний захист і знешкодження ксенобіотиків. Проте за негативного впливу цієї їжі на Г6ФДГ ми не спостерігали змін активності глютатіонредуктази, яка відновлює важливий антиоксидант – трипептид глютатіон. Припускається, що він є основним діячем антиоксидантного захисту в корі головного мозку мишей, за умов коли захисні ферменти мали нижчу активність через шкідливий вплив кафетерійної їжі. Додавання проростків броколі до їжі не мало суттєво ефекту на активність антиоксидантних і допоміжних ферментів.

Розділ 4. Узагальнення

4.1 Вміст сполук та загальна антиоксидантна активність препаратів броколі

Розуміння вмісту біологічно-активних природних речовин та загальної антиоксидантної активності різних екстрактів з паростків та проростків броколі надає цінну інформацію для харчового і лікувального використання. Отримані результати демонструють, що паростки броколі мали вищий вміст пігментів, ніж проростки броколі. Проростки броколі містили більше крохмалю, проліну та вітаміну B_1 порівняно з паростками броколі. Як проміжний підсумок, паростки і проростки мали свої переваги у сполуках з антиоксидантною здатністю, а саме у пігментах та проліні, які мають корисний вплив і на тваринний організм.

Процедура екстракції мала вплив на вміст біологічно активних природних сполук та загальну антиоксидантну активність препаратів броколі. Водний екстракт паростків броколі мав лише вищу здатність відновлювати залізо порівняно зі спиртовою екстракцією паростків. Спиртовий екстракт паростків мав найвищий вміст поліфенольних сполук і флавоноїдів. Водний екстракт проростків броколі мав найвищу здатність знешкоджувати $ABTS^{\bullet+}$-катіон радикал і відновлювати окислене залізо. Спиртовий екстракт проростків мав найбільшу загальну антиоксидантну здатність лише за фосфомолібдатним методом. Спиртова екстракція хоч, і забезпечувала більше вивільнення поліфенольних сполук і флавоноїдів, проте водна екстракція забезпечувала більшу антиоксидантну активність. Як підсумок, спиртова екстракція паростків чи проростків є більш сприятливою для вивільнення поліфенольних сполук, проте перевагою водної екстракції є вища антиоксидантна здатність. Ця антиоксидантна здатність цілком може бути реалізована при споживанні тваринами та людьми подрібнених паростків та проростків броколі.

4.2 Вплив споживання паростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей

Миші з груп кафетерійної їжі, паростків броколі та їх комбінації споживали менше корму, ніж група з базовою їжею. Попри це, маса тіла мишей впродовж експерименту зросла на 7 і 14% для групи з кафетерійною їжею і кафетерійною їжею з паростками броколі відповідно. Маса вісцерального жиру була найвищою у групі з кафетерійною їжею і паростками броколі. Як проміжний підсумок, паростки броколі у кафетерійній їжі не сприяли зниженню або стабільності маси тіла мишей впродовж експерименту, проте маса мишей з базовою їжею і паростками броколі залишалася незмінною.

Рівень глюкози у крові мишей був вищим при споживанні кафетерійної їжі та її комбінації з паростками броколі, що є очікуваним ефектом при споживанні висококалорійної їжі. Проте рівень холестеролу, триацилгліцеролів, активність параоксонази і мієлопероксидази у плазмі крові не відрізнялися між дослідними групами, що свідчило про відсутність впливу кафетерійної їжі на маркери ожиріння та запалення крові мишей.

При споживанні кафетерійної їжі вміст карбонільних груп білків у печінці мишей був найвищим серед дослідних груп, а при споживанні кафетерійної їжі з паростками цей показник не відрізнявся від значень групи з базовою їжею, що схематично зображено на Рис. 4.1. Цей результат підтверджує здатність споживання паростків броколі сприяти механізмам знешкодження або захисту від оксидативного стресу. Проте вплив споживання паростків броколі на активність ферментів захисту від активних форм кисню та знешкодження ксенобіотиків був неоднозначний.

Активність супероксиддисмутази, глютатіонпероксидази та НАД(Ф)-хінон оксидоредуктази 1 у печінці мишей не відрізнялася між дослідними групами (Рис. 4.1). При споживанні кафетерійної їжі з паростками броколі активність глютатіон-S-трансферази була найвищою серед усіх груп, а при споживанні базової їжі з паростками броколі – найнижчою (Рис. 4.1). Ці результати свідчать, що вплив

паростків броколі на активність цього ферменту може залежати від типу і калорійності їжі мишей.

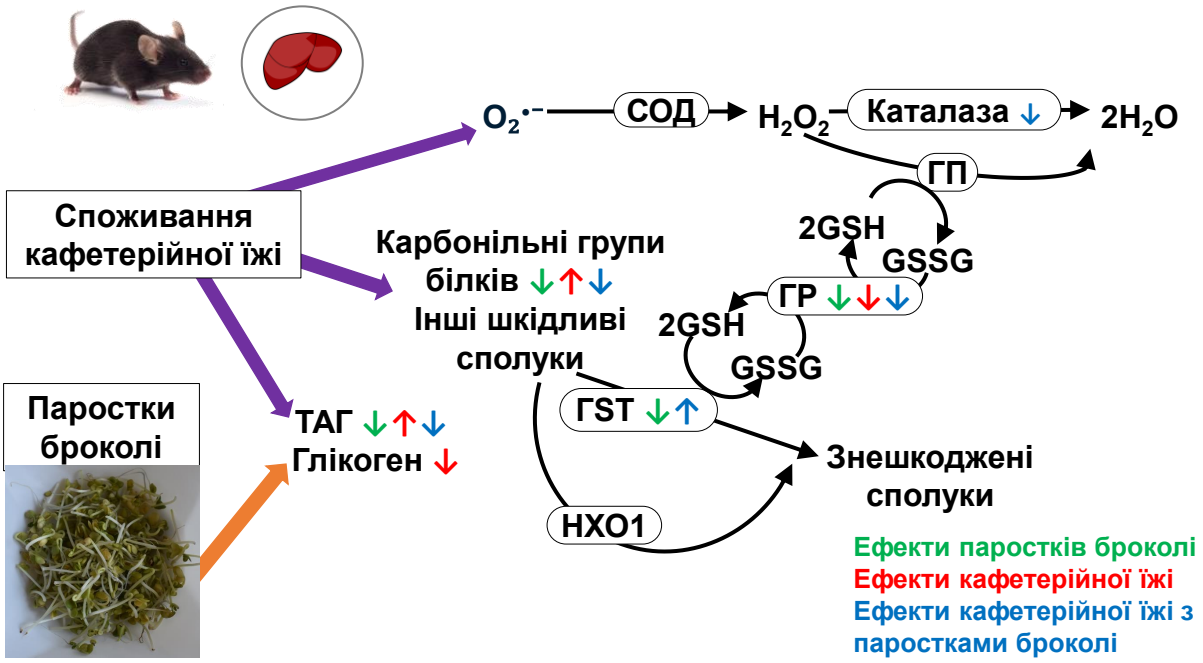


Рис. 4.1. **Узагальнена схема впливу споживання паростків броколі, кафетерійної їжі та їх комбінації на параметри у печінці мишей**. *$O_2^{\bullet-}$ – супероксидний аніон-радикал, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глютатіонпероксидаза, GSH – відновлений глютатіон, GSSG – окислений глютатіон, ГР – глютатіон редуктаза, ГST – глютатіон-S-трансфераза, НХО1 – НАД(Ф)Н-хінон оксидоредуктаза 1, ТАГ – триацилгліцероли.*

Вміст триацилгліцеролів був найвищим у печінці мишей, що споживали кафетерійну їжу, що є ризиком для виникнення жирової дистрофії печінки і цирозу (Рис. 4.1). При споживанні паростків броколі окремо чи з кафетерійною їжею вміст ТАГ був достовірно меншим порівняно з групою кафетерійної їжі. Цей результат свідчив про усунення накопичення триацилгліцеролів у печінці мишей за споживання обох видів їжі.

При споживанні паростків броколі з базовою їжею був сприятливий вплив на активність ферментів знешкодження активних форм кисню та ксенобіотиків у корі головного мозку мишей, а при споживанні паростків з кафетерійною їжею – на активність глютатіонредуктази (Рис. 4.2).

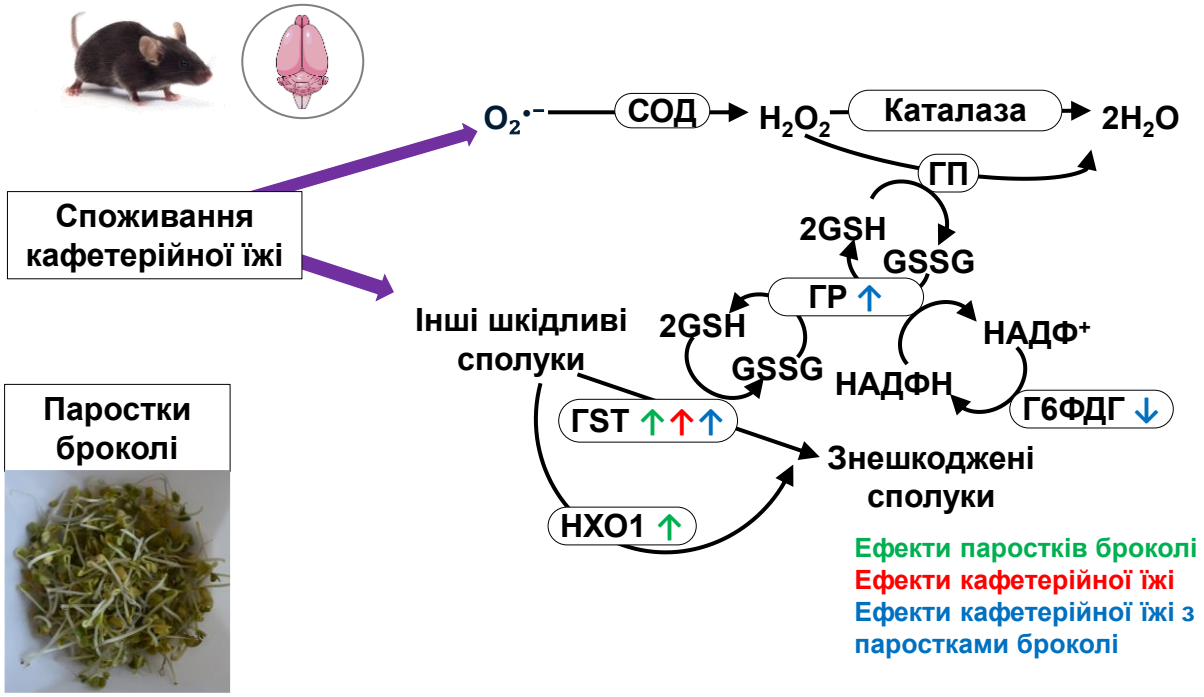


Рис. 4.2. **Узагальнена схема впливу споживання паростків броколі, кафетерійної їжі та їх комбінації на параметри у корі головного мозку мишей**. *$O_2^{\bullet-}$ – супероксидний аніон-радикал, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глютатіонпероксидаза, GSH – відновлений глютатіон, GSSG – окислений глютатіон, ГР – глютатіон редуктаза, НАДФ⁺ – окислений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, НАДФН – відновлений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, ГST – глютатіон-S-трансфераза, НХО1 – НАД(Ф)Н-хінон оксидоредуктаза 1.*

Як підсумок, споживання паростків броколі з кафетерійною їжею не знижувало масу тіла мишей та накопичення вісцерального жиру. Проте додавання паростків броколі усувало накопичення триацилгліцеролів та карбонільних груп

білків. Також споживання паростків броколі сприяло активності ферментів знешкодження ксенобіотиків у корі головного мозку мишей. Ці результати свідчать про вибіркову сприятливу дію паростків броколі проти метаболічних порушень та оксидативного стресу.

4.3 Вплив споживання різного вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей

У експерименті з різним вмістом проростків броколі у кафетерійній їжі протягом 20 тижнів у мишей не зростала маса тіла. Це могло бути пов’язано з віком мишей та зменшенням кількості спожитого корму. Ми використовували мишей середнього віку, які більш стійкі до розвитку ожиріння, ніж молоді. Також молоді миші схильні продовжувати ріст і пов’язане з ним збільшення маси тіла, тому ознаки ожиріння можуть бути непомітними або хибними. Проростки броколі у кафетерійній їжі мали дозозалежний вплив на споживання корму мишами, яке зменшувалося зі збільшенням вмісту проростків броколі.

Незважаючи на відсутність збільшення маси тіла, споживання кафетерійної їжі призводило до деяких метаболічних порушень у мишей. Серед них більша маса печінки, тенденція до більшого накопичення вісцерального жиру, вищий рівень триацигліцеролів і глюкози у крові, а також нижча активність параоксонази в крові. Печінка збільшується під час патологічних станів, таких як печінковий стеатоз (жирова дистрофія печінки), що призводить до цирозу. Вона містить жирові відкладення і має аномальні метаболічні функції через ожиріння або цукровий діабет 2 типу. Збільшення печінки було виявлено лише в групі кафетерійної їжі, тоді як у решти мишей, яких годували цим кормом з броколі, маса печінки була в межах контрольного діапазону. Вищий рівень триацилгліцеролів у крові може призвести до проблем із судинами, атеросклерозу та серцево-судинних захворювань. Параоксоназа гідролізує окислені фосфоліпіди, присутні в ліпопротеїнах низької щільності (ЛПНЩ). Як наслідок, відсутність реакції параоксонази на харчування з високим вмістом жирів вважається

фактором ризику, що призводить до спричинених ожирінням атеросклерозу та запалення. Цей фермент послаблює прозапальну дію висококалорійної їжі і розвиток атеросклерозу.

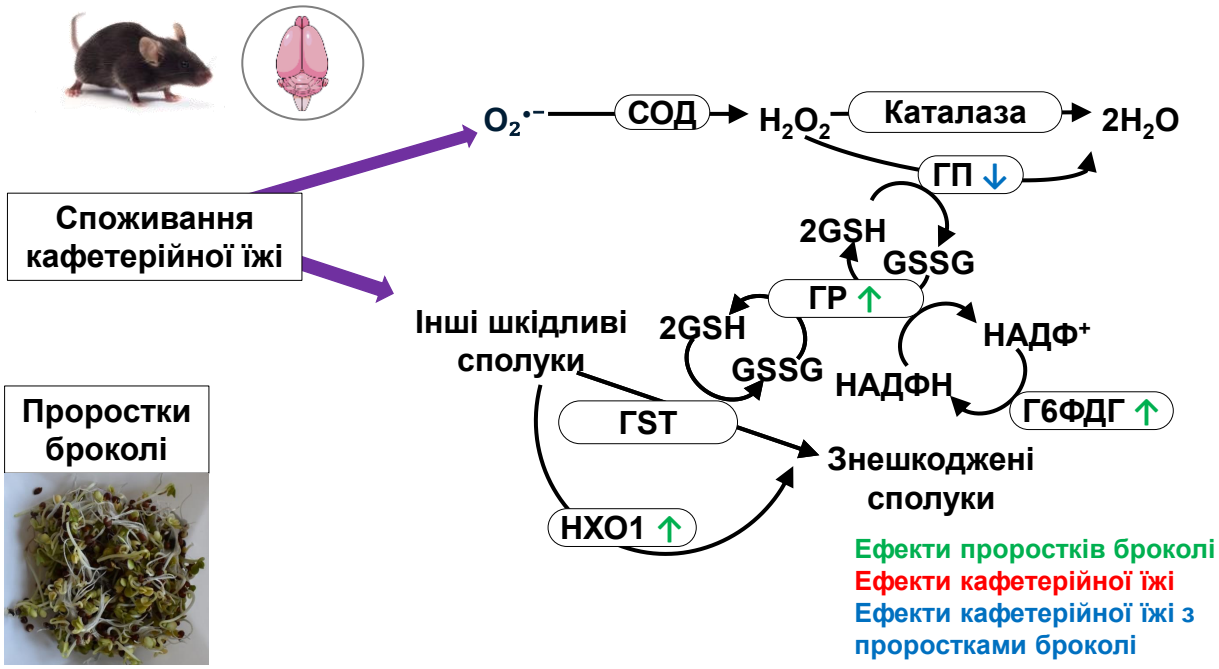


Рис. 4.3. Узагальнена схема впливу споживання різного вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі на параметри у корі головного мозку мишей. *$O_2^{\bullet-}$ –супероксидний аніон-радикал, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глютатіонпероксидаза, GSH – відновлений глютатіон, GSSG – окислений глютатіон, ГР – глютатіон редуктаза, НАДФ⁺ – окислений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, НАДФН – відновлений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, ГST – глютатіон-S-трансфераза, НХО1 – НАД(Ф)Н-хінон оксидоредуктаза 1.*

Довготривале споживання кафетерійної їжі призводило до метаболічної перебудови з несприятливими наслідками. Додавання до кафетерійної їжі проростків броколі не впливало на деякі метаболічні порушення, спричинені кафетерійною їжею, зокрема вищий рівень глюкози в крові, а також накопичення

вісцеральної жирової тканини. Проростки броколі у кафетерійній їжі запобігали збільшенню маси печінки, зниженню активності параоксонази і зростанню рівня триацилгліцеролів в крові мишей.

У корі головного мозку не було встановлено дозозалежних ефектів споживання броколі на активність антиоксидантних і допоміжних ферментів (Рис. 4.3). Проте споживання 5% проростків у базовій їжі та 10% у кафетерійній їжі мало позитивний вплив на усунення активних форм кисню, відновлення глютатіону та продукцію НАДФН.

Це дослідження показало, що споживання кафетерійної їжі спричиняло метаболічні порушення у мишей, серед яких підвищений рівень ТАГ та глюкози в крові, зниження активності параоксонази, а також збільшення маси печінки без значного збільшення маси тіла. Додавання проростків броколі запобігало підвищенню рівня ТАГ і зниженню активності параоксонази, але не протидіяло накопиченню вісцерального жиру і гіперглікемії у мишей, яких годували кафетерійною їжею.

4.4 Вплив споживання проростків броколі та кафетерійної їжі на фізіологічні та біохімічні показники мишей

У групах з кафетерійною їжею разом з проростками броколі та лише кафетерійною їжею споживання корму було меншим порівняно з групою базової їжі чи її комбінації з проростками броколі. Проте кількість енергії отриманої з їжі була найбільшою при споживанні кафетерійної їжі з проростками броколі. Як підсумок, менше споживання корму мишами з кафетерійною їжею не було ознакою недоїдання, так як миші отримували рівну чи більшу кількість калорій разом з їжею.

Протягом досліду маса мишей з базовою їжею залишилася незмінною, а маса решти мишей зросла на 6-8%. Це свідчило про незначний набір маси тіла та відсутність впливу проростків броколі на зменшення цього показника. Маса вісцерального жиру була достовірно більшою при споживанні кафетерійної їжі

окремо та разом з проростками броколі. Проростки броколі не мали впливу на протидію зростанню маси тіла та вісцерального жиру у мишей. Середня швидкість та загальна пройдена відстань були достовірно вищими при споживанні кафетерійної їжі з проростками броколі. Це свідчило про певний вплив комбінації цих двох чинників на рухову активність мишей, чого раніше не спостерігалося.

Рівень глюкози, триацилгліцеролів, холестеролу та активність мієлопероксидази у крові не відрізнялися між групами. Активність параоксонази при споживанні кафетерійної їжі була достовірно більшою порівняно з базовою їжею, що може свідчити про протидію запаленню та атеросклерозу в судинах миші.

Активність глютатіонпероксидази та глютатіон-S-трансферази у печінці мишей була достовірно вищою при споживанні кафетерійної їжі з проростками броколі і базової їжі з проростками броколі порівняно з базовою їжею (Рис. 4.4). Активність глютатіонредуктази була найвищою у групі кафетерійної їжі з броколі. Також активність глютатіонредуктази була достовірно вищою при споживанні кафетерійної їжі порівняно з базовою їжею (Рис. 4.4).

Вміст триацилгліцеролів у печінці мишей був найвищим при споживанні кафетерійної їжі (Рис. 4.4). При комбінації кафетерійної їжі з проростками броколі вміст триацилгліцеролів був достовірно нижчим порівняно з групою кафетерійної їжі, але також достовірно вищим порівняно зі значеннями групи з базовою їжею. Вміст глікогену був достовірно меншим мишей з базовою їжею з проростками броколі порівняно з кафетерійною їжею (Рис. 4.4).

Активність гексокінази не відрізнялася між дослідними групами (Рис. 4.4). Це свідчило про те, що кафетерійна їжа чи проростки броколі не вплинули на початковий етап гліколізу чи включення до гліколізу інших вуглеводів (сахарози чи фруктози). Активність фосфофруктокінази, піруваткінази та фруктокінази була вищою у групі кафетерійної їжі (Рис. 4.4). Споживання проростків броколі з кафетерійною їжею сприяло зниженню активності цих трьох ферментів до показників групи з базовою їжею чи базової їжі з проростками броколі.

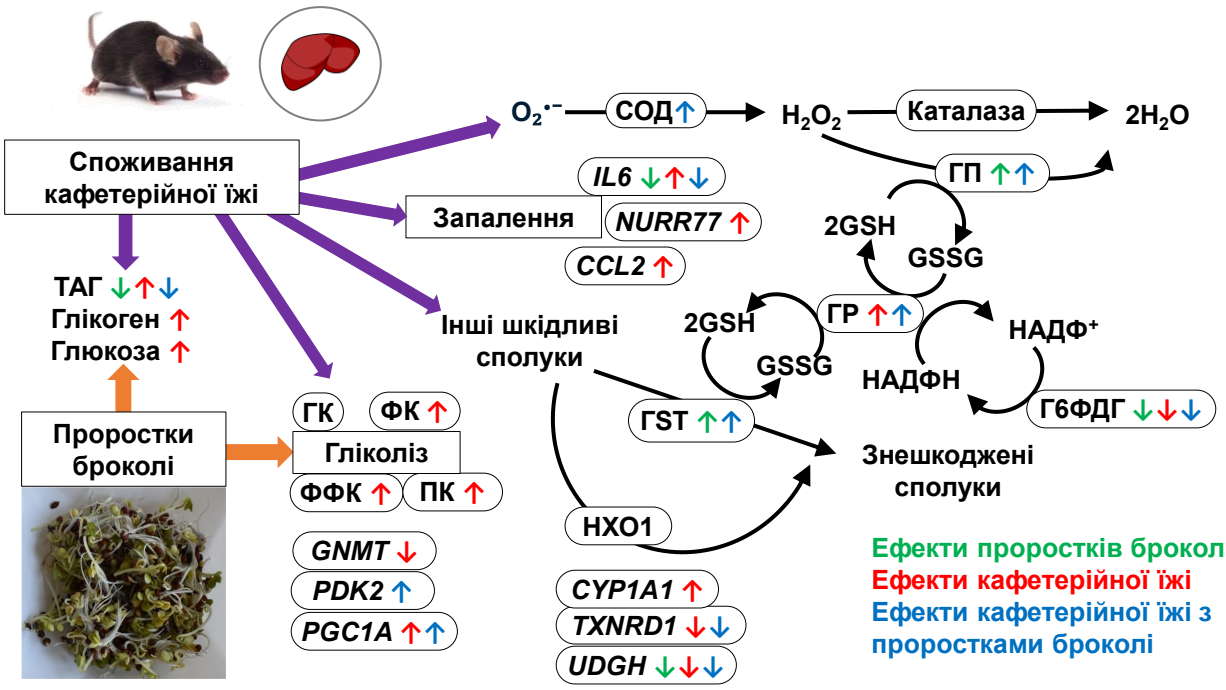


Рис. 4.4. Узагальнена схема впливу споживання проростків броколі, кафетерійної їжі та їх комбінації на параметри у печінці мишей. *$O_2^{\bullet-}$ – супероксидний аніон-радикал, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глютатіонпероксидаза, GSH – відновлений глютатіон, GSSG – окислений глютатіон, ГР – глютатіон редуктаза, НАДФ$^+$ – окислений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, НАДФН – відновлений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, ГST – глютатіон-S-трансфераза, НХО1 – НАД(Ф)Н-хінон оксидоредуктаза 1, ТАГ – триацилгліцероли, ГК – гексокіназа, Г6Ф – глюкозо-6-фосфат, ФФК – фосфофруктокіназа, ПК – піруваткіназа, ФК – фруктокіназа, відносні рівні транскриптів іРНК генів: IL6, CCL2 (маркери запалення), NURR77 (ядерний рецептор, регулятор імунної відповіді), CYP1A1 (цитохром P450), TXNRD1 (тіоредоксинредуктаза 1), UDGH, GNMT (ферменти, які беруть участь в детоксикації ксенобіотиків), PGC1A (регулятор біогенезу мітохондрій), PDK2 (регуляторний фермент).*

Кафетерійний раціон сприяв збільшенню інтенсивності гліколізу, тоді як при споживанні кафетерійної їжі з броколі цього ефекту не було (Рис. 4.4). Надлишок глюкози від кафетерійного харчування міг не окислюватися, а перерозподілятися на накопичення глікогену в печінці, що було встановлено для обидвох груп з кафетерійною їжею. Також, при споживанні всіх трьох дослідних раціонів активність Г6ФДГ була нижчою для запобігання порушенню метаболізму.

Споживання кафетерійної їжі вплинуло на рівні транскрипту іРНК регуляторів запалення (стимулювало зростання) та знешкодження ксенобіотиків (пригнічувало) у печінці мишей (Рис. 4.4). Проростки броколі разом з базовою чи кафетерійною їжею пригнічували вироблення ацетил-коензиму А в мітохондріях та розвитку запальних процесів, що було встановлено методом ПЛР (Рис. 4.4).

Споживання проростків броколі разом з кафетерійною їжею усувало розвиток запалення. Скупчення імунних клітин і запальні процеси були виявлені лише на гістологічних зрізах печінки мишей, які споживали кафетерійної їжу.

Кафетерійний раціон негативно вплинув на активність антиоксидантних і допоміжних ферментів у корі головного мозку мишей (Рис. 4.5). Споживання проростків броколі не усувало негативного впливу кафетерійної їжі.

Споживання кафетерійної їжі спричинило накопичення вісцерального жиру, триацилгліцеролів та глікогену у печінці мишей. Накопичення ліпідів у гепатоцитах спричиняло запальні процеси. Вища активність ферментів гліколізу, спричинена харчуванням і ожирінням, може надає більше продуктів для циклу трикарбонових кислот і ЕТЛ, що призводить до перевантаження останнього і розвитку оксидативного стресу. Проте проростки броколі здатні знижувати стимульовану споживанням кафетерійної їжі активність ферментів гліколізу та впливати на регуляцію метаболізму, про що свідчить аналіз відносної транскрипції. Внаслідок цього глюкоза спрямовується на накопичення глікогену у печінці та м’язах. Споживання броколі сприяло знешкодженню шкідливих сполук у печінці мишей, про що свідчила вища активність глютатіонзалежних ферментів та вміст маркерів оксидативного стресу. Також споживання проростків броколі

протидіяло розвитку запальних процесів у печінці мишей, що було встановлено за допомогою методу ПЛР та гістології.

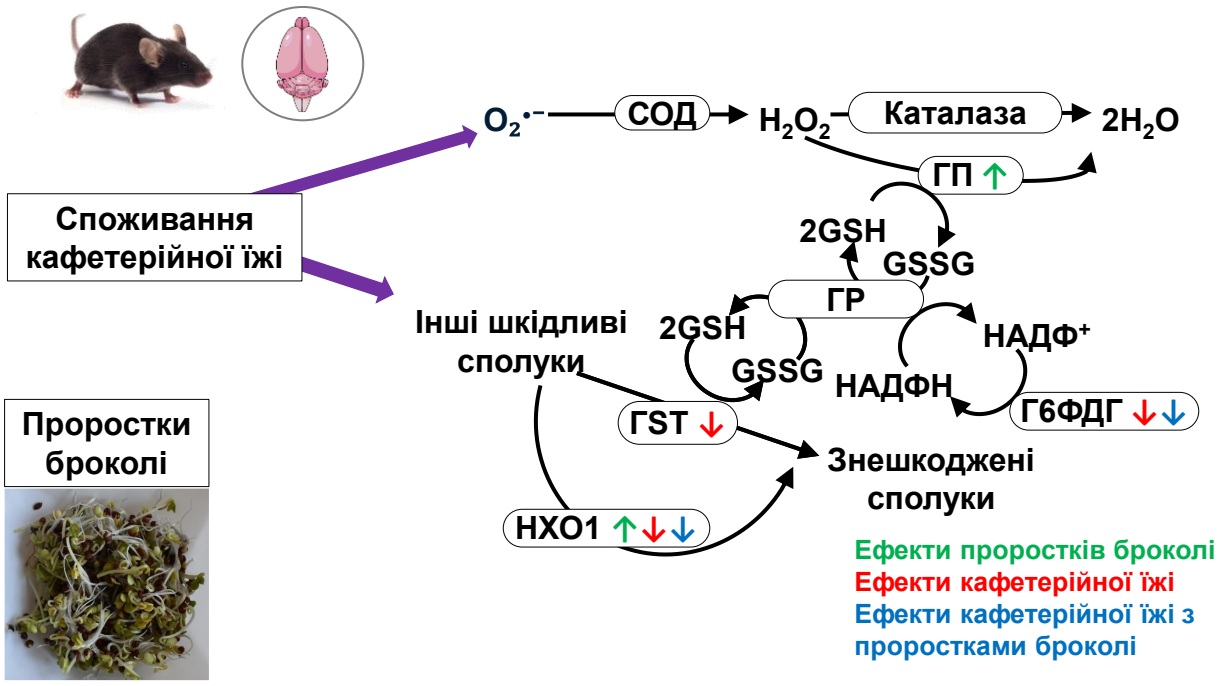


Рис. 4.5. Узагальнена схема впливу споживання проростків броколі, кафетерійної їжі та їх комбінації на параметри у корі головного мозку мишей. *$O_2^{\bullet-}$ – супероксидний аніон-радикал, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глютатіонпероксидаза, GSH – відновлений глютатіон, GSSG – окислений глютатіон, ГР – глютатіон редуктаза, НАДФ⁺ – окислений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, НАДФН – відновлений нікотинаденіндинуклеотидфосфат, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, ГST – глютатіон-S-трансфераза, НХО1 – НАД(Ф)Н-хінон оксидоредуктаза 1.*

4.5 Узагальнення впливу споживання препаратів броколі на мишей

Отримані результати свідчать про вибірковий сприятливий вплив препаратів броколі на параметри організму мишей для протидії розвитку метаболічних порушень та оксидативного стресу. Препарати броколі містять

біологічно активні сполуки, поліфеноли та глюкозилати, які є активаторами сигнального шляху Nrf2. Дослідження інших науковців показали, що активований білок Nrf2 відіграє подвійну роль при порушенні обміну речовин, маючи здатність запобігати оксидативному стресу, або сприяти прогресуванню ожиріння через вплив на проліферацію та диференціацію адипоцитів. Неоднозначна роль Nrf2 при ожирінні частково збігається з отриманими нами результатами.

При споживанні препаратів броколі разом з кафетерійною їжею були зміни ліпідного обміну – накопичувався вісцеральний жир, як при ожирінні спричиненому лише кафетерійною їжею. Проте був нижчим вміст триацилгліцеролів у печінці мишей за додавання препаратів броколі. Такий перерозподіл отриманих з їжею ліпідів є захисним механізмом проти виникнення стану гіпертрофованої жирної печінки та цирозу внаслідок розростання жирових клітин та руйнування гепатоцитів. Реалізується цей механізм через зниження експресії ключових ліпогенних генів та сприяння β-окисленню жирних кислот білком Nrf2. Також у двох дослідах з трьох ми встановили стабільність біохімічних параметрів крові. Лише при споживанні мишами кафетерійної їжі протягом 20 тижнів у крові було встановлено вищий рівень глюкози та триацилгліцеролів, але останній параметр знижувався зі збільшенням вмісту проростків броколі у їжі.

Споживання кафетерійної їжі збільшило інтенсивність гліколізу та порушувало накопичення глікогену. При комбінації з кафетерійної їжі та проростків броколі активність ферментів гліколізу була нормалізована. Проте вміст глікогену все ж був високий, імовірно через розподіл глюкозо-6-фосфатів на запасання і сприяння глікогенезу завдяки активації білку Nrf2, або через нижчу активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази як і при споживанні кафетерійної їжі, так і при споживанні проростків броколі.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа є мішенню Nrf2 як і для антиоксидантної дії (для збільшення відновлення НАДФН для наступного відновлення глютатіону), так і для регуляції вуглеводного обміну (збільшення інтенсивності

ПФШ понад гліколізом чи глюконеогенезом). У нашому дослідженні активність Г6ФДГ у печінці була пригніченою, проте активність ГР навпаки була вищою.

Проростки броколі сприяли антиоксидантному захисту у печінці мишей за допомогою глютатіон-залежних ферментів, які є мішенями Nrf2. Вища активність ГП та GST у печінці при споживанні проростків була встановлена спектрофотометрично і також була ізоформно-специфічною, що було встановлено за допомогою нативного гель-електрофорезу. Натомість паростки броколі мали неоднозначний вплив на активність глютатіон-залежних ферментів у печінці мишей. Перевагою паростків броколі було лише сприяння активності антиоксидантних ферментів у корі головного мозку мишей, що не було встановлено для проростків броколі у корі головного мозку мишей.

Результати ПЛР та гістології продемонстрували протизапальний ефект споживання проростків броколі у печінці мишей. Також споживання проростків броколі вплинуло на відносний рівень транскриптів регуляторів обміну речовин для інгибування продукції ацетил-коА. Вплив на транскрипцію тіоредоксинредуктази 1 та UDP-глюкозо-6-дегідрогенази, які є мішенями Nrf2 і знешкоджують ксенобіотики, був неоднозначним.

Як загальний підсумок споживання препаратів броколі сприяє усуненню оксидативного стресу та запалення, які розвиваються разом з порушенням обміну речовин та ожирінням у організмі мишей. Проте вплив броколі на ліпідний профіль є обмеженим і стосується коригування деяких прихованих ознак ожиріння, таких як вміст запасних речовин у печінці мишей, не впливаючи на інші, такі як накопичення вісцерального жиру між органами мишей.

Висновки

1. Вміст біологічно активних природних речовин у броколі залежав від типу рослинного матеріалу. Більше пігментів було у паростках, більше інших корисних сполук у проростках. Спиртова екстракція забезпечувала більше вивільнення поліфенольних сполук і флавоноїдів, проте водна екстракція забезпечувала більшу антиоксидантну активність проростків броколі.

2. Паростки і проростки броколі усували спричинене споживанням кафетерійної їжі накопичення триацилгліцеролів у печінці мишей. Також збільшенням вмісту проростків броколі у кафетерійній їжі рівень триацилгліцеролів у плазмі крові мишей зменшувався до значень групи базової їжі.

3. При споживанні проростків броколі активність глютатіонпероксидази та глютатіон-S-трансферази була вищою у печінці мишей, що свідчить про їх сприятливий вплив на антиоксидантний захист і знешкодження ксенобіотиків.

4. Споживання кафетерійної їжі вплинуло на зростання рівня відносної транскрипції факторів запалення, а споживання проростків броколі на зростання рівня регуляторів обміну вуглеводів.

5. Аналіз гістологічних зрізів показав, що споживання проростків броколі усувало розвиток запальних процесів у печінці мишей, який викликала кафетерійна їжа.

Список використаних джерел

1. Venkatakrishnan K, Chiu HF, Wang CK. Extensive review of popular functional foods and nutraceuticals against obesity and its related complications with a special focus on randomized clinical trials. Food Funct. 2019; 10(5):2313–29.

2. Koumpouli D, Koumpouli V, Koutelidakis AE. Functional Foods, Gut Microbiome and Association with Obesity and Metabolic Syndrome: A Literature Review. Applied Sciences. 2024; 14(13):5578.

3. Bayliak MM, Dmytriv TR, Melnychuk AV, Strilets NV, Storey KB, Lushchak VI. Chamomile as a potential remedy for obesity and metabolic syndrome. EXCLI Journal; 20:Doc1261; ISSN 1611-2156 [Internet]. 2021; Available from: https://www.excli.de/index.php/excli/article/view/4013

4. Bayliak MM, Abrat OB, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: Comparison between Drosophila and mammals. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2019; 228:18–28.

5. Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. Computers in Biology and Medicine. 2021; 136:104754.

6. Lushchak VI, Covasa M, Abrat OB, Mykytyn TV, Tverdokhlib IZ, Storey KB, et al. Risks of obesity and diabetes development in the population of the Ivano-Frankivsk region in Ukraine. EXCLI Journal; 22:Doc1047; ISSN 1611-2156 [Internet]. 2023; Available from: https://www.excli.de/index.php/excli/article/view/6296

7. Ivanochko MV, Bayliak MM, Lushchak VI. Potential of isothiocyanate sulforaphane from broccoli to combat obesity and type 2 diabetes: involvement of NRF2 regulatory pathway. UkrBiochemJ. 2024; 96(6):17–28.

8. Kopp W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. DMSO. 2019; Volume 12:2221–36.

9. Demianchuk O, Bayliak M, Vatashchuk M, Gospodaryov D, Hurza V, Derkachov V, et al. Alpha-ketoglutarate promotes anxiety, activates autophagy, and suppresses antioxidant enzymes in the cerebral cortex of female mice on cafeteria diet. Brain Research Bulletin. 2025; 222:111255.

10. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. Inflamm Res. 2015; 64(7):501–12.

11. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. Physiology & Behavior. 2016; 167:382–91.

12. Le TN, Luong HQ, Li HP, Chiu CH, Hsieh PC. Broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) Sprouts as the Potential Food Source for Bioactive Properties: A Comprehensive Study on In Vitro Disease Models. Foods. 2019; 8(11):532.

13. Ivanochko MV, Fediv KV, Shvadchak VV, Bayliak MM, Lushchak VI. Nutritional analysis of aqueous and ethanol broccoli sprout extracts. J Plant Biochem Biotechnol [Internet]. 2025; Available from: https://link.springer.com/10.1007/s13562-025-00974-9

14. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(19):10367–72.

15. Houghton CA. Sulforaphane: Its “Coming of Age” as a Clinically Relevant Nutraceutical in the Prevention and Treatment of Chronic Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019; 2019:1–27.

16. Furukawa Y, Torres AS, O’Halloran TV. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. EMBO J. 2004; 23(14):2872–81.

17. Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, Wakabayashi N, Dolan PM, Aja S, et al. Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide. European Journal of Pharmacology. 2009; 620(1–3):138–44.

18. Fahey JW, Kensler TW. The Challenges of Designing and Implementing Clinical Trials With Broccoli Sprouts… and Turning Evidence Into Public Health Action. Front Nutr. 2021; 8:648788.

19. Syed RU, Moni SS, Break MKB, Khojali WMA, Jafar M, Alshammari MD, et al. Broccoli: A Multi-Faceted Vegetable for Health: An In-Depth Review of Its Nutritional Attributes, Antimicrobial Abilities, and Anti-inflammatory Properties. Antibiotics (Basel). 2023; 12(7):1157.

20. Olszewska MA, Granica S, Kolodziejczyk-Czepas J, Magiera A, Czerwińska ME, Nowak P, et al. Variability of sinapic acid derivatives during germination and their contribution to antioxidant and anti-inflammatory effects of broccoli sprouts on human plasma and human peripheral blood mononuclear cells. Food Funct. 2020; 11(8):7231–44.

21. Bayliak MM, Abrat OB. Role of Nrf2 in Oxidative and Inflammatory Processes in Obesity and Metabolic Diseases. In: Deng H, editor. Nrf2 and its Modulation in Inflammation [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 153–87. (Progress in Inflammation Research; vol. 85). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-44599-7_7

22. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. BMC Microbiol. 2017; 17(1):120.

23. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. Gut Microbes. 2018; 1–18.

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

25. Puppala S, Li C, Glenn JP, Saxena R, Gawrieh S, Quinn A, et al. Primate fetal hepatic responses to maternal obesity: epigenetic signalling pathways and lipid accumulation. The Journal of Physiology. 2018; 596(23):5823–37.

26. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. Advances in Nutrition. 2019; 10:S17–30.

27. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. Cell. 2012; 151(2):400–13.

28. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. IJMS. 2011; 12(5):3117–32.

29. Gao Y, Li J, Cheng W, Diao T, Liu H, Bo Y, et al. Cross-tissue human fibroblast atlas reveals myofibroblast subtypes with distinct roles in immune modulation. Cancer Cell. 2024; 42(10):1764-1783.e10.

30. Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani JP, Schutz Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. Int J Obes. 2010; 34(S2):S4–17.

31. Dobre MZ, Virgolici B, Timnea O. Key Roles of Brown, Subcutaneous, and Visceral Adipose Tissues in Obesity and Insulin Resistance. CIMB. 2025; 47(5):343.

32. Romero MDM, Sabater D, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Glycerol Production from Glucose and Fructose by 3T3-L1 Cells: A Mechanism of Adipocyte Defense from Excess Substrate. Peterson J, editor. PLoS ONE. 2015; 10(10):e0139502.

33. Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. In: Prakash YS, editor. Comprehensive Physiology [Internet]. 1st ed. Wiley; 2018. p. 1031–63. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c170046

34. García-Sánchez A, Gámez-Nava JI, Díaz-de La Cruz EN, Cardona-Muñoz EG, Becerra-Alvarado IN, Aceves-Aceves JA, et al. The Effect of Visceral Abdominal Fat Volume on Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines in Subjects with Normal Weight, Overweight and Obesity. DMSO. 2020; Volume 13:1077–87.

35. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. Journal of Clinical Investigation. 2017; 127(1):1–4.

36. Scherer PE. The Multifaceted Roles of Adipose Tissue—Therapeutic Targets for Diabetes and Beyond: The 2015 Banting Lecture. Diabetes. 2016; 65(6):1452–61.

37. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. J Mol Cell Biol. 2016; 8(2):93–100.

38. Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. Circulation Research. 2005; 96(9):939–49.

39. Kim JY, Van De Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. J Clin Invest. 2007; 117(9):2621–37.

40. Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity. 2015; 22(5):353–9.

41. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. Front Endocrinol. 2021; 12:585887.

42. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millot M, Leturque A, Girard J, Staels B, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. Nature. 1995; 377(6549):527–8.

43. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1996; 81(9):3419–23.

44. Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS, Havel PJ. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. Metabolism. 1998; 47(4):429–34.

45. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, et al. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. Diabetes. 1996; 45(11):1511–5.

46. Espinoza García AS, Martínez Moreno AG, Reyes Castillo Z. The role of ghrelin and leptin in feeding behavior: Genetic and molecular evidence. Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed). 2021; 68(9):654–63.

47. Hewagalamulage SD, Lee TK, Clarke IJ, Henry BA. Stress, cortisol, and obesity: a role for cortisol responsiveness in identifying individuals prone to obesity. Domestic Animal Endocrinology. 2016; 56:S112–20.

48. Leeners B, Geary N, Tobler PN, Asarian L. Ovarian hormones and obesity. Human Reproduction Update. 2017; 23(3):300–21.

49. Caselli C. Role of adiponectin system in insulin resistance. Molecular Genetics and Metabolism. 2014; 113(3):155–60.

50. Cignarelli A, Genchi VA, Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F. Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. IJMS. 2019; 20(3):759.

51. Sears B, Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. Lipids Health Dis. 2015; 14(1):121.

52. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. Biochimie. 2016; 125:259–66.

53. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. J Pediatr (Rio J) [Internet]. 2007; 0(0). Available from: http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1713&cod=&idSecao=3

54. Kluth O, Mirhashemi F, Scherneck S, Kaiser D, Kluge R, Neschen S, et al. Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure. Diabetologia. 2011; 54(3):605–16.

55. Martins T, Leite R, Matos AF, Soares J, Pires MJ, De Lurdes Pinto M, et al. Beneficial Effects of Broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) By-products in Diet-induced Obese Mice. In Vivo. 2022; 36(5):2173–85.

56. Agha M, Agha R. The rising prevalence of obesity: part A: impact on public health. International Journal of Surgery Oncology. 2017; 2(7):e17–e17.

57. Jayasinghe S, Byrne NM, Hills AP. Cultural influences on dietary choices. Progress in Cardiovascular Diseases. 2025; S0033062025000209.

58. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. Int J Obes. 2018; 42(3):525–34.

59. Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. PeerJ. 2019; 7:e6656.

60. Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. Nat Rev Neurosci. 2011; 12(11):638–51.

61. Mucellini AB, Goularte JF, De Araujo Da Cunha AC, Caceres RC, Noschang C, Da Silva Benetti C, et al. Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. Br J Nutr. 2014; 111(8):1499–506.

62. Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. Appetite. 2009; 52(1):34–8.

63. Lushchak VI, Storey KB. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications and regulatory pathways implicated. EXCLI Journal; 21:Doc956; ISSN 1611-2156 [Internet]. 2021; Available from: https://www.excli.de/index.php/excli/article/view/3596

64. Lechuga-Sancho AM, Gallego-Andujar D, Ruiz-Ocaña P, Visiedo FM, Saez-Benito A, Schwarz M, et al. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. Portero-Otin M, editor. PLoS ONE. 2018; 13(1):e0191547.

65. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. Journal of Endocrinology. 2017; 233(1):R15–42.

66. Tarantini S, Valcarcel-Ares MN, Yabluchanskiy A, Tucsek Z, Hertelendy P, Kiss T, et al. Nrf2 Deficiency Exacerbates Obesity-Induced Oxidative Stress, Neurovascular Dysfunction, Blood–Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation,

Amyloidogenic Gene Expression, and Cognitive Decline in Mice, Mimicking the Aging Phenotype. The Journals of Gerontology: Series A. 2018; 73(7):853–63.

67. Bayliak MM, Vatashchuk MV, Gospodaryov DV, Hurza VV, Demianchuk OI, Ivanochko MV, et al. High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2022; 1866(12):130226.

68. Jiang F, Lim HK, Morris MJ, Prior L, Velkoska E, Wu X, et al. Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. Redox Report. 2011; 16(6):223–9.

69. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. IJMS. 2014; 16(1):378–400.

70. Kilic E, Özer ÖF, Erek Toprak A, Erman H, Torun E, Kesgin Ayhan S, et al. Oxidative Stress Status in Childhood Obesity: A Potential Risk Predictor. Med Sci Monit. 2016; 22:3673–9.

71. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest. 2004; 114(12):1752–61.

72. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. Obesity Research & Clinical Practice. 2013; 7(5):e330–41.

73. Zawada A, Machowiak A, Rychter AM, Ratajczak AE, Szymczak-Tomczak A, Dobrowolska A, et al. Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Body and Dietary Habits. Nutrients. 2022; 14(19):3982.

74. Castro JP, Grune T, Speckmann B. The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. Biological Chemistry. 2016; 397(8):709–24.

75. Lee H, Jose PA. Coordinated Contribution of NADPH Oxidase- and Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Metabolic Syndrome and Its Implication in Renal Dysfunction. Front Pharmacol. 2021; 12:670076.

76. Abou-Rjeileh U, Contreras GA. Redox Regulation of Lipid Mobilization in Adipose Tissues. Antioxidants. 2021; 10(7):1090.

77. Napolitano G, Fasciolo G, Venditti P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. Antioxidants. 2021; 10(11):1824.

78. García-Berumen CI, Ortiz-Avila O, Vargas-Vargas MA, Del Rosario-Tamayo BA, Guajardo-López C, Saavedra-Molina A, et al. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. Lipids Health Dis. 2019; 18(1):78.

79. Emelyanova L, Boukatina A, Myers C, Oyarzo J, Lustgarten J, Shi Y, et al. High calories but not fat content of lard-based diet contribute to impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in C57BL/6J mice heart. Loor JJ, editor. PLoS ONE. 2019; 14(7):e0217045.

80. Lushchak VI. Interplay between bioenergetics and oxidative stress at normal brain aging. Aging as a result of increasing disbalance in the system oxidative stress–energy provision. Pflugers Arch - Eur J Physiol. 2021; 473(5):713–22.

81. DeVallance E, Li Y, Jurczak MJ, Cifuentes-Pagano E, Pagano PJ. The Role of NADPH Oxidases in the Etiology of Obesity and Metabolic Syndrome: Contribution of Individual Isoforms and Cell Biology. Antioxidants & Redox Signaling. 2019; 31(10):687–709.

82. Vermot A, Petit-Härtlein I, Smith SME, Fieschi F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. Antioxidants. 2021; 10(6):890.

83. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes. 2000; 49(11):1939–45.

84. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. Metabolism. 2006; 55(7):928–34.

85. Den Hartigh LJ, Omer M, Goodspeed L, Wang S, Wietecha T, O'Brien KD, et al. Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity. ATVB. 2017; 37(3):466–75.

86. Pepping JK, Vandanmagsar B, Fernandez-Kim SO, Zhang J, Mynatt RL, Bruce-Keller AJ. Myeloid-specific deletion of NOX2 prevents the metabolic and neurologic consequences of high fat diet. Chowen JA, editor. PLoS ONE. 2017; 12(8):e0181500.

87. Furuhashi M, Koyama M, Higashiura Y, Murase T, Nakamura T, Matsumoto M, et al. Differential regulation of hypoxanthine and xanthine by obesity in a general population. J of Diabetes Invest. 2020; 11(4):878–87.

88. Zhou Y, Li H, Xia N. The Interplay Between Adipose Tissue and Vasculature: Role of Oxidative Stress in Obesity. Front Cardiovasc Med. 2021; 8:650214.

89. Hernandez-Hernandez ME, Torres-Rasgado E, Pulido-Perez P, Nicolás-Toledo L, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, et al. Disordered Glucose Levels Are Associated with Xanthine Oxidase Activity in Overweight Type 2 Diabetic Women. IJMS. 2022; 23(19):11177.

90. Huang J, Tabbi-Anneni I, Gunda V, Wang L. Transcription factor Nrf2 regulates SHP and lipogenic gene expression in hepatic lipid metabolism. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2010; 299(6):G1211–21.

91. Mirzai S, Laffin LJ. Supplements for Lipid Lowering: What Does the Evidence Show? Curr Cardiol Rep. 2023; 25(8):795–805.

92. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(21):9926–30.

93. Lushchak VI, Lushchak O. Interplay between reactive oxygen and nitrogen species in living organisms. Chemico-Biological Interactions. 2021; 349:109680.

94. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. Antioxidants & Redox Signaling. 2018; 29(17):1727–45.

95. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2018; 1865(5):721–33.

96. Furukawa M, Xiong Y. BTB Protein Keap1 Targets Antioxidant Transcription Factor Nrf2 for Ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 Ligase. Molecular and Cellular Biology. 2005; 25(1):162–71.

97. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(18):11908–13.

98. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biology. 2013; 1(1):45–9.

99. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2011; 153(2):175–90.

100. Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, McMahon M, Sun C, Moffat GJ, et al. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. Biochemical Society Transactions. 2000; 28(2):33–41.

101. Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. Journal of Amino Acids. 2012; 2012:1–26.

102. Wen H, Yang H ji, An YJ, Kim JM, Lee DH, Jin X, et al. Enhanced Phase II Detoxification Contributes to Beneficial Effects of Dietary Restriction as Revealed by Multi-platform Metabolomics Studies. Molecular & Cellular Proteomics. 2013; 12(3):575–86.

103. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2001; 482(1–2):21–6.

104. Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. Redox Biology. 2021; 41:101950.

105. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. Chemico-Biological Interactions. 2000; 129(1–2):77–97.

106. Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC, Ross D. The Reduction of α-Tocopherolquinone by Human NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase: The Role of α-Tocopherolhydroquinone as a Cellular Antioxidant. Molecular Pharmacology. 1997; 52(2):300–5.

107. Čolak E, Pap D, Nikolić L, Vicković S. The impact of obesity to antioxidant defense parameters in adolescents with increased cardiovascular risk. Journal of Medical Biochemistry [Internet]. 2019; 0(0). Available from: https://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=1452-82582003346Q

108. Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Spasić S, Bogavac-Stanojević N, Bujisić N. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. Diabetes Research and Clinical Practice. 2008; 79(1):156–63.

109. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial Role of Nrf2 in Regulating NADPH Generation and Consumption. Toxicological Sciences. 2011; 123(2):590–600.

110. Fu J, Xiong Z, Huang C, Li J, Yang W, Han Y, et al. Hyperactivity of the transcription factor Nrf2 causes metabolic reprogramming in mouse esophagus. Journal of Biological Chemistry. 2019; 294(1):327–40.

111. Armoni M, Harel C, Ramdas M, Karnieli E. CYP2E1 Impairs GLUT4 Gene Expression and Function: NRF2 as a Possible Mediator. Horm Metab Res. 2014; 46(07):477–83.

112. Vasileva LV, Savova MS, Amirova KM, Dinkova-Kostova AT, Georgiev MI. Obesity and NRF2-mediated cytoprotection: Where is the missing link? Pharmacological Research. 2020; 156:104760.

113. Uruno A, Yagishita Y, Katsuoka F, Kitajima Y, Nunomiya A, Nagatomi R, et al. Nrf2-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Glycogen Metabolism. Molecular and Cellular Biology. 2016; 36(11):1655–72.

114. He F, Antonucci L, Yamachika S, Zhang Z, Taniguchi K, Umemura A, et al. NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. Journal of Hepatology. 2020; 72(6):1182–95.

115. Seo HA, Lee IK. The Role of Nrf2: Adipocyte Differentiation, Obesity, and Insulin Resistance. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013; 2013:1–7.

116. Slocum SL, Skoko JJ, Wakabayashi N, Aja S, Yamamoto M, Kensler TW, et al. 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. 2016; 591:57–65.

117. Pi J, Leung L, Xue P, Wang W, Hou Y, Liu D, et al. Deficiency in the Nuclear Factor E2-related Factor-2 Transcription Factor Results in Impaired Adipogenesis and Protects against Diet-induced Obesity. Journal of Biological Chemistry. 2010; 285(12):9292–300.

118. Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, et al. The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus. Molecular and Cellular Biology. 2013; 33(15):2996–3010.

119. Yamane T, Kozuka M, Konda D, Nakano Y, Nakagaki T, Ohkubo I, et al. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and α-glucosidase. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2016; 31:106–12.

120. Di Francesco A, Choi Y, Bernier M, Zhang Y, Diaz-Ruiz A, Aon MA, et al. NQO1 protects obese mice through improvements in glucose and lipid metabolism. npj Aging Mech Dis. 2020; 6(1):13.

121. Meakin PJ, Chowdhry S, Sharma RS, Ashford FB, Walsh SV, McCrimmon RJ, et al. Susceptibility of Nrf2-Null Mice to Steatohepatitis and Cirrhosis upon Consumption of a High-Fat Diet Is Associated with Oxidative Stress, Perturbation of the Unfolded Protein Response, and Disturbance in the Expression of Metabolic Enzymes but Not with Insulin Resistance. Molecular and Cellular Biology. 2014; 34(17):3305–20.

122. Park JS, Leem YH, Park JE, Kim DY, Kim HS. Neuroprotective Effect of β-Lapachone in MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Model: Involvement of Astroglial p-AMPK/Nrf2/HO-1 Signaling Pathways. Biomol Ther. 2019; 27(2):178–84.

123. Chartoumpekis DV, Palliyaguru DL, Wakabayashi N, Fazzari M, Khoo NKH, Schopfer FJ, et al. Nrf2 deletion from adipocytes, but not hepatocytes, potentiates systemic metabolic dysfunction after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2018; 315(2):E180–95.

124. Sampath C, Sprouse JC, Freeman ML, Gangula PR. Activation of Nrf2 attenuates delayed gastric emptying in obesity induced diabetic (T2DM) female mice. Free Radical Biology and Medicine. 2019; 135:132–43.

125. Sun Y, Ge X, Li X, He J, Wei X, Du J, et al. High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Cell Death Dis. 2020; 11(10):914.

126. Illesca P, Valenzuela R, Espinosa A, Echeverría F, Soto-Alarcon S, Ortiz M, et al. Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription factors Nrf2, SREBP-1c, PPAR-γ and NF-κB. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019; 109:2472–81.

127. Li B, Cheng Z, Sun X, Si X, Gong E, Wang Y, et al. *Lonicera caerulea* L. Polyphenols Alleviate Oxidative Stress-Induced Intestinal Environment Imbalance and Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in HFD-Fed Rats by Regulating the Nrf2/HO-1/NQO1 and MAPK Pathways. Molecular Nutrition Food Res. 2020; 64(10):1901315.

128. Li M, Yu H, Pan H, Zhou X, Ruan Q, Kong D, et al. Nrf2 Suppression Delays Diabetic Wound Healing Through Sustained Oxidative Stress and Inflammation. Front Pharmacol. 2019; 10:1099.

129. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. Trends in Biochemical Sciences. 2014; 39(4):199–218.

130. Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. Redox Biology. 2019; 23:101107.

131. Xu J, Kulkarni SR, Donepudi AC, More VR, Slitt AL. Enhanced Nrf2 Activity Worsens Insulin Resistance, Impairs Lipid Accumulation in Adipose Tissue, and Increases Hepatic Steatosis in Leptin-Deficient Mice. Diabetes. 2012; 61(12):3208–18.

132. Xu J, Donepudi AC, More VR, Kulkarni SR, Li L, Guo L, et al. Deficiency in Nrf2 transcription factor decreases adipose tissue mass and hepatic lipid accumulation in leptin-deficient mice: Nrf2 Deficiency Exacerbates Metabolic Syndrome. Obesity. 2015; 23(2):335–44.

133. Chartoumpekis DV, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Papavassiliou AG, Kyriazopoulou VE, Sykiotis GP, et al. Nrf2 Represses FGF21 During Long-Term High-Fat Diet–Induced Obesity in Mice. Diabetes. 2011; 60(10):2465–73.

134. Zhang H, Liu H, Davies KJA, Sioutas C, Finch CE, Morgan TE, et al. Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. Free Radical Biology and Medicine. 2012; 52(9):2038–46.

135. Xia Y, Zhai X, Qiu Y, Lu X, Jiao Y. The Nrf2 in Obesity: A Friend or Foe? Antioxidants. 2022; 11(10):2067.

136. Schneider KS, Chan JY. Emerging Role of Nrf2 in Adipocytes and Adipose Biology. Advances in Nutrition. 2013; 4(1):62–6.

137. Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G, Shen J, et al. Dietary Modulation of Gut Microbiota Contributes to Alleviation of Both Genetic and Simple Obesity in Children. EBioMedicine. 2015; 2(8):968–84.

138. Reilly K, Valverde J, Finn L, Rai DK, Brunton N, Sorensen JC, et al. Potential of cultivar and crop management to affect phytochemical content in winter-grown sprouting broccoli (Brassica oleracea L. var. italica). J Sci Food Agric. 2014; 94(2):322–30.

139. Vale AP, Santos J, Brito NV, Peixoto V, Carvalho R, Rosa E, et al. Light influence in the nutritional composition of *Brassica oleracea* sprouts. Food Chemistry. 2015; 178:292–300.

140. Liu M, Zhang L, Ser SL, Cumming JR, Ku KM. Comparative Phytonutrient Analysis of Broccoli By-Products: The Potentials for Broccoli By-Product Utilization. Molecules. 2018; 23(4):900.

141. Glade MJ, Meguid MM. A Glance at… Broccoli, glucoraphanin, and sulforaphane. Nutrition. 2015; 31(9):1175–8.

142. Dmytriv TR, Lushchak O, Lushchak VI. Glucoraphanin conversion into sulforaphane and related compounds by gut microbiota. Front Physiol. 2025; 16:1497566.

143. Tian Q, Rosselot RA, Schwartz SJ. Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry. 2005; 343(1):93–9.

144. Baralić K, Živanović J, Marić Đ, Bozic D, Grahovac L, Antonijević Miljaković E, et al. Sulforaphane—A Compound with Potential Health Benefits for Disease Prevention and Treatment: Insights from Pharmacological and Toxicological Experimental Studies. Antioxidants. 2024; 13(2):147.

145. Fahey JW, Wade KL, Wehage SL, Holtzclaw WD, Liu H, Talalay P, et al. Stabilized sulforaphane for clinical use: Phytochemical delivery efficiency. Molecular Nutrition Food Res. 2017; 61(4):1600766.

146. López-Cervantes J, Tirado-Noriega LG, Sánchez-Machado DI, Campas-Baypoli ON, Cantú-Soto EU, Núñez-Gastélum JA. Biochemical composition of broccoli seeds and sprouts at different stages of seedling development. International Journal of Food Science & Technology. 2013; 48(11):2267–75.

147. Arena D, Ben Ammar H, Major N, Kovačević TK, Goreta Ban S, Treccarichi S, et al. Light Use Efficiency of broccoli (Brassica oleracea var. italica Plenck) and rocket (Eruca sativa L.) during the initial plant growth stages. Scientia Horticulturae. 2024; 336:113408.

148. Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. Food Chemistry. 2011; 125(2):348–54.

149. Moreira-Rodríguez M, Nair V, Benavides J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. UVA, UVB Light, and Methyl Jasmonate, Alone or Combined, Redirect the Biosynthesis of Glucosinolates, Phenolics, Carotenoids, and Chlorophylls in Broccoli Sprouts. Int J Mol Sci. 2017; 18(11):2330.

150. Mahn A, Pérez CE, Zambrano V, Barrientos H. Maximization of Sulforaphane Content in Broccoli Sprouts by Blanching. Foods. 2022; 11(13):1906.

151. Gudiño I, Martín A, Casquete R, Prieto MH, Ayuso MC, Córdoba MG. Evaluation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) crop by-products as sources of bioactive compounds. Scientia Horticulturae. 2022; 304:111284.

152. Jang HW, Moon JK, Shibamoto T. Analysis and Antioxidant Activity of Extracts from Broccoli (Brassica oleracea L.) Sprouts. J Agric Food Chem. 2015; 63(4):1169–74.

153. Kim JS, Cuong DM, Bae YB, Cho SK. Antioxidant and antiproliferative activities of solvent fractions of broccoli (Brassica oleracea L.) sprout. Applied Biological Chemistry. 2022; 65(1):34.

154. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. CP Pharmacology [Internet]. 2012; 58(1). Available from: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471141755.ph0561s58

155. Sullivan EM, Fix A, Crouch MJ, Sparagna GC, Zeczycki TN, Brown DA, et al. Murine diet-induced obesity remodels cardiac and liver mitochondrial phospholipid acyl chains with differential effects on respiratory enzyme activity. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2017; 45:94–103.

156. Nakagawa H. Recent advances in mouse models of obesity- and nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocarcinogenesis. WJH. 2015; 7(17):2110.

157. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, De Almeida TP, Boursier J, Bohnic B, et al. Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. Sookoian SC, editor. PLoS ONE. 2015; 10(5):e0127991.

158. Luo Y, Burrington CM, Graff EC, Zhang J, Judd RL, Suksaranjit P, et al. Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2016; 310(6):E418–39.

159. Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, et al. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2011; 301(5):G825–34.

160. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. J Clin Biochem Nutr. 2010; 46(3):212–23.

161. Recena Aydos L, Aparecida Do Amaral L, Serafim De Souza R, Jacobowski AC, Freitas Dos Santos E, Rodrigues Macedo ML. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. Nutrients. 2019; 11(12):3067.

162. Staňková P, Kučera O, Peterová E, Lotková H, Maseko TE, Nožičková K, et al. Adaptation of Mitochondrial Substrate Flux in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. IJMS. 2020; 21(3):1101.

163. Stephenson K, Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Thomson J, Alpini G, et al. Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. gene expr. 2018; 18(1):5–17.

164. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. Hepatology. 2002; 35(2):373–9.

165. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2005; 115(5):1343–51.

166. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Liverini G, Iossa S. A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance. Eur J Nutr. 2016; 55(1):1–6.

167. Giudetti AM, Micioni Di Bonaventura MV, Ferramosca A, Longo S, Micioni Di Bonaventura E, Friuli M, et al. Brief daily access to cafeteria-style diet impairs hepatic metabolism even in the absence of excessive body weight gain in rats. FASEB j. 2020; 34(7):9358–71.

168. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in Steatohepatitis. Semin Liver Dis. 2001; 21(01):057–70.

169. Cazettes F, Cohen JI, Yau PL, Talbot H, Convit A. Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake. Brain Research. 2011; 1373:101–9.

170. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of Cytokines across the Blood-Brain Barrier. Neuroimmunomodulation. 1995; 2(4):241–8.

171. Naomi R, Teoh SH, Embong H, Balan SS, Othman F, Bahari H, et al. The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Obesity and Its Impact on Cognitive Impairments—A Narrative Review. Antioxidants. 2023; 12(5):1071.

172. Le Thuc O, García-Cáceres C. Obesity-induced inflammation: connecting the periphery to the brain. Nat Metab. 2024; 6(7):1237–52.

173. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. Endocrinology. 2005; 146(10):4192–9.

174. Semchuk N, Lushchak OV, Falk J, Krupinska K, Lushchak VI. Effect of VTE1 AND VTE4 gene inactivation on salt stress response in Arabidopsis thaliana. Ukr Biokhim Zh. 2008; 80(3):48–54.

175. Husak VV, Stambulska UYa, Pitukh AM, Lushchak VI. Exposure of Paulownia Seedlings to Silver Nitrate Improves Growth Parameters via Stimulation of Mild Oxidative Stress. Agric Conspec Sci. 2024; 89(3):209–18.

176. Semchuk NM, Vasylyk IV, Kubrak OI, Lushchak VI. Effect of sodium nitroprusside and S-nitrosoglutathione on pigment content and antioxidant system of tocopherol-deficient plants of Arabidopsis thaliana. Ukr Biokhim Zh. 2011; 83(6):69–79.

177. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 1973; 39(1):205–7.

178. J. Azeez Y, O. Hassan R. Spectrophotometric Determination of Vitamin B1 (Thia min Hydrochloride)In Pharmaceutical Preparation by Coupling Reaction with Diazotized Sulfanilic acid. Tikrit J Pharm Sci. 2023; 1(2):1–8.

179. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72(1–2):248–54.

180. Nunes RD, De Oliveira RL, Braz GRC. A novel method for measuring fructose ingestion by mosquitoes. Journal of Vector Ecology. 2008; 33(2):225–31.

181. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Methods in Enzymology [Internet]. Elsevier; 1999. p. 152–78. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171

182. Bayliak MM, Burdyliuk NI, Lushchak VI. Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. Open Life Sciences. 2016; 11(1):298–307.

183. Vasylkovska R, Petriv N, Semchyshyn H. Carbon Sources for Yeast Growth as a Precondition of Hydrogen Peroxide Induced Hormetic Phenotype. International Journal of Microbiology. 2015; 2015:1–8.

184. Farnham MW, Wilson PE, Stephenson KK, Fahey JW. Genetic and environmental effects on glucosinolate content and chemoprotective potency of broccoli. Plant Breeding. 2004; 123(1):60–5.

185. Yagishita Y, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW. Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? Molecules. 2019; 24(19):3593.

186. Klymchenko AS, Demchenko AP. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. Phys Chem Chem Phys. 2003; 5(3):461–8.

187. Postupalenko VY, Shvadchak VV, Duportail G, Pivovarenko VG, Klymchenko AS, Mély Y. Monitoring membrane binding and insertion of peptides by two-color fluorescent label. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2011; 1808(1):424–32.

188. Auer MK, Sack M, Lenz JN, Jakovcevski M, Biedermann SV, Falfán-Melgoza C, et al. Effects of a High-Caloric Diet and Physical Exercise on Brain Metabolite Levels: A Combined Proton MRS and Histologic Study. J Cereb Blood Flow Metab. 2015; 35(4):554–64.

189. Sack M, Lenz JN, Jakovcevski M, Biedermann SV, Falfán-Melgoza C, Deussing J, et al. Early effects of a high-caloric diet and physical exercise on brain volumetry and behavior: a combined MRI and histology study in mice. Brain Imaging and Behavior. 2017; 11(5):1385–96.

190. Gac L, Kanaly V, Ramirez V, Teske JA, Pinto MP, Perez-Leighton CE. Behavioral characterization of a model of differential susceptibility to obesity induced by standard and personalized cafeteria diet feeding. Physiology & Behavior. 2015; 152:315–22.

191. Paśko P, Krośniak M, Prochownik E, Tyszka-Czochara M, Fołta M, Francik R, et al. Effect of broccoli sprouts on thyroid function, haematological, biochemical, and immunological parameters in rats with thyroid imbalance. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018; 97:82–90.

192. Alhajri AS, H. Saad H. The Biological, Biochemical, and Immunological Impact of Broccoli and Green Pea Sprouts on Acrylamide Intoxicated Rats. Curr Res Nutr Food Sci. 2023; 11(3):1243–62.

193. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. Obesity. 2011; 19(6):1109–17.

194. Zhang T, Holman J, McKinstry D, Trindade BC, Eaton KA, Mendoza-Castrejon J, et al. A steamed broccoli sprout diet preparation that reduces colitis via the gut microbiota. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2023; 112:109215.

195. Holcomb L, Holman JM, Hurd M, Lavoie B, Colucci L, Hunt B, et al. Early life exposure to broccoli sprouts confers stronger protection against enterocolitis development in an immunological mouse model of inflammatory bowel disease. Chu H, editor. mSystems. 2023; 8(6):e00688-23.

196. Rodriguez A, Zhang H, Klaminder J, Brodin T, Andersson PL, Andersson M. *ToxTrac* : A fast and robust software for tracking organisms. Freckleton R, editor. Methods Ecol Evol. 2018; 9(3):460–4.

197. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. JoVE. 2015; (96):52434.

198. Carter S, Miard S, Boivin L, Sallé-Lefort S, Picard F. Loss of Malat1 does not modify age- or diet-induced adipose tissue accretion and insulin resistance in mice. Villena JA, editor. PLoS ONE. 2018; 13(5):e0196603.

199. Chung N, Lim K. Influence of high fat and different types of carbohydrate diet on energy metabolism in growing mice. JENB. 2019; 23(3):1–12.

200. Carbone L, Carbone ET, Yi EM, Bauer DB, Lindstrom KA, Parker JM, et al. Assessing cervical dislocation as a humane euthanasia method in mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2012; 51(3):352–6.

201. Ahrens Kress AP, Zhang Y, Kaiser-Vry AR, Sauer MB. A Comparison of Blood Collection Techniques in Mice and their Effects on Welfare. j am assoc lab anim sci. 2022; 61(3):287–95.

202. Bayliak MM, Sorochynska OM, Kuzniak OV, Drohomyretska IZ, Klonovskyi AYa, Hrushchenko AO, et al. High stability of blood parameters during mouse lifespan: sex-specific effects of every-other-day fasting. Biogerontology. 2022; 23(5):559–70.

203. Vatashchuk M, Hurza V, Bayliak M. Підбір умов для спектрофотометричного визначення активності параоксонази з 4-нітрофенілацетатом у плазмі та печінці мишей. JPNU. 2023; 9(4):6–14.

204. Lushchak OV, Kubrak OI, Nykorak MZ, Storey KB, Lushchak VI. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione. Aquatic Toxicology. 2008; 87(2):108–14.

205. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry. 1971; 44(1):276–87.

206. Lin CL, Chen HJ, Hou WC. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Electrophoresis. 2002; 23(4):513–6.

207. Ricci G, Lo Bello M, Caccuri AM, Galiazzo F, Federici G. Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1984; 143(2):226–30.

208. Shen A, Kim HJ, Oh GS, Lee SB, Lee S, Pandit A, et al. Pharmacological stimulation of NQO1 decreases NADPH levels and ameliorates acute pancreatitis in mice. Cell Death Dis. 2018; 10(1):5.

209. Sorochynska OM, Bayliak MM, Gospodaryov DV, Vasylyk YV, Kuzniak OV, Pankiv TM, et al. Every-Other-Day Feeding Decreases Glycolytic and Mitochondrial Energy-Producing Potentials in the Brain and Liver of Young Mice. Front Physiol. 2019; 10:1432.

210. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001; 25(4):402–8.

211. Queiroz Zepka L, Jacob-Lopes E, Roca M. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. Current Opinion in Food Science. 2019; 26:94–100.

212. Pérez-Gálvez A, Viera I, Roca M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. Antioxidants. 2020; 9(6):505.

213. MacNeill GJ, Mehrpouyan S, Minow MAA, Patterson JA, Tetlow IJ, Emes MJ. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. Raines C, editor. Journal of Experimental Botany. 2017; 68(16):4433–53.

214. Fitzpatrick TB, Chapman LM. The importance of thiamine (vitamin B1) in plant health: From crop yield to biofortification. Journal of Biological Chemistry. 2020; 295(34):12002–13.

215. Salam U, Ullah S, Tang ZH, Elateeq AA, Khan Y, Khan J, et al. Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. Life. 2023; 13(3):706.

216. Anwar Hossain M, Hoque MdA, Burritt DJ, Fujita M. Chapter 16 - Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms. In: Ahmad P, editor. Oxidative Damage to Plants [Internet]. San Diego: Academic Press; 2014. p. 477–522. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127999630000162

217. Zieliński H, Frias J, Piskuła MK, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. Vitamin B1 and B2, dietary fiber and minerals content of Cruciferae sprouts. Eur Food Res Technol. 2005; 221(1–2):78–83.

218. Yoshikawa H, Hirano A, Arakawa T, Shiraki K. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. International Journal of Biological Macromolecules. 2012; 50(3):865–71.

219. Plaskova A, Mlcek J. New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. Front Nutr. 2023; 10:1118761.

220. Baenas N, Moreno DA, García-Viguera C. Selecting Sprouts of Brassicaceae for Optimum Phytochemical Composition. J Agric Food Chem. 2012; 60(45):11409–20.

221. De Nicola GR, Bagatta M, Pagnotta E, Angelino D, Gennari L, Ninfali P, et al. Comparison of bioactive phytochemical content and release of isothiocyanates in selected brassica sprouts. Food Chemistry. 2013; 141(1):297–303.

222. Thomas M, Badr A, Desjardins Y, Gosselin A, Angers P. Characterization of industrial broccoli discards (Brassica oleracea var. italica) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. Food Chem. 2018; 245:1204–11.

223. Lv X, Meng G, Li W, Fan D, Wang X, Espinoza-Pinochet CA, et al. Sulforaphane and its antioxidative effects in broccoli seeds and sprouts of different cultivars. Food Chemistry. 2020; 316:126216.

224. Pilarski R, Zieliński H, Ciesiołka D, Gulewicz K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of Uncaria tomentosa (Willd.) DC. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 104(1–2):18–23.

225. Cosme P, Rodríguez AB, Espino J, Garrido M. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. Antioxidants. 2020; 9(12):1263.

226. Bhandari SR, Kwak JH. Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of Brassica Vegetables. Molecules. 2015; 20(1):1228–43.

227. Işıl Berker K, Güçlü K, Tor İ, Demirata B, Apak R. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. Food Anal Methods. 2010; 3(3):154–68.

228. Bessada SMF, Barreira JCM, Oliveira MBPP. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. Industrial Crops and Products. 2015; 76:604–15.

229. Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. Antioxidants. 2020; 9(8):709.

230. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Radical Research. 2015; 49(5):633–49.

231. Kaul S, Sharma SS, Mehta IK. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. Amino Acids. 2008; 34(2):315–20.

232. Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. Free Radical Biology and Medicine. 2019; 140:14–27.

233. Luijten IHN, Feldmann HM, Von Essen G, Cannon B, Nedergaard J. In the absence of UCP1-mediated diet-induced thermogenesis, obesity is augmented even in the obesity-resistant 129S mouse strain. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2019; 316(5):E729–40.

234. Weiner J, Dommel S, Gebhardt C, Hanschkow M, Popkova Y, Krause K, et al. Differential expression of immunoregulatory cytokines in adipose tissue and liver in response to high fat and high sugar diets in female mice. Front Nutr. 2023; 10:1275160.

235. Kim J, Shin W. How to Do Random Allocation (Randomization). Clin Orthop Surg. 2014; 6(1):103.

236. Park SA, Grusak MA, Oh MM. Concentrations of minerals and phenolic compounds in three edible sprout species treated with iron-chelates during imbibition. Hortic Environ Biotechnol. 2014; 55(6):471–8.

237. Li X, Tian S, Wang Y, Liu J, Wang J, Lu Y. Broccoli microgreens juice reduces body weight by enhancing insulin sensitivity and modulating gut microbiota in high-fat diet-induced C57BL/6J obese mice. Eur J Nutr. 2021; 60(7):3829–39.

238. Zandani G, Kaftori-Sandler N, Sela N, Nyska A, Madar Z. Dietary broccoli improves markers associated with glucose and lipid metabolism through modulation of gut microbiota in mice. Nutrition. 2021; 90:111240.

239. Choi KM, Lee YS, Kim W, Kim SJ, Shin KO, Yu JY, et al. Sulforaphane attenuates obesity by inhibiting adipogenesis and activating the AMPK pathway in obese mice. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2014; 25(2):201–7.

240. Liu Y, Fu X, Chen Z, Luo T, Zhu C, Ji Y, et al. The Protective Effects of Sulforaphane on High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice Through Browning of White Fat. Front Pharmacol. 2021; 12:665894.

241. Frith CH, Suber RL, Umholtz R. Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice. Lab Anim Sci. 1980; 30(5):835–40.

242. Winzell MS, Ahrén B. The High-Fat Diet–Fed Mouse. Diabetes. 2004; 53(suppl_3):S215–9.

243. Tian S, Li X, Wang Y, Lu Y. The protective effect of sulforaphane on type II diabetes induced by high-fat diet and low-dosage streptozotocin. Food Science & Nutrition. 2021; 9(2):747–56.

244. Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. METABOLIC PHENOTYPING GUIDELINES: Assessing glucose homeostasis in rodent models. Journal of Endocrinology. 2014; 222(3):G13–25.

245. Zhang Z, Wang S, Zhou S, Yan X, Wang Y, Chen J, et al. Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2014; 77:42–52.

246. Shawky NM, Pichavaram P, Shehatou GSG, Suddek GM, Gameil NM, Jun JY, et al. Sulforaphane improves dysregulated metabolic profile and inhibits leptin-induced VSMC proliferation: Implications toward suppression of neointima formation after arterial injury in western diet-fed obese mice. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2016; 32:73–84.

247. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. J Clin Invest. 1996; 97(7):1630–9.

248. Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. Mol Med. 2007; 13(3–4):203–9.

249. Qaddoumi MG, Alanbaei M, Hammad MM, Al Khairi I, Cherian P, Channanath A, et al. Investigating the Role of Myeloperoxidase and Angiopoietin-like Protein 6 in Obesity and Diabetes. Sci Rep. 2020; 10(1):6170.

250. Ghanbari M, Momen Maragheh S, Aghazadeh A, Mehrjuyan SR, Hussen BM, Abdoli Shadbad M, et al. Interleukin-1 in obesity-related low-grade inflammation: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. International Immunopharmacology. 2021; 96:107765.

251. Inokuma K ichi, Okamatsu-Ogura Y, Omachi A, Matsushita Y, Kimura K, Yamashita H, et al. Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of

β_3 -adrenergic stimulation. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2006; 290(5):E1014–21.

252. Subias-Gusils A, Álvarez-Monell A, Boqué N, Caimari A, Del Bas JM, Mariné-Casadó R, et al. Behavioral and Metabolic Effects of a Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Oleuropein Supplementation in Obese Male Rats. Nutrients. 2021; 13(12):4474.

253. Moss D, Ma A, Cameron DP. Cafeteria feeding promotes diet-induced thermogenesis in monosodium glutamate-treated mice. Metabolism. 1985; 34(12):1094–9.

254. Castro H, Pomar CA, Picó C, Sánchez J, Palou A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. Int J Obes. 2015; 39(3):430–7.

255. Martins T, Oliveira PA, Pires MJ, Neuparth MJ, Lanzarin G, Félix L, et al. Effect of a Sub-Chronic Oral Exposure of Broccoli (Brassica oleracea L. Var. Italica) By-Products Flour on the Physiological Parameters of FVB/N Mice: A Pilot Study. Foods. 2022; 11(1):120.

256. Martins T, Colaço B, Venâncio C, Pires MJ, Oliveira PA, Rosa E, et al. Potential effects of sulforaphane to fight obesity. J Sci Food Agric. 2018; 98(8):2837–44.

257. Xu X, Dai M, Lao F, Chen F, Hu X, Liu Y, et al. Effect of glucoraphanin from broccoli seeds on lipid levels and gut microbiota in high-fat diet-fed mice. Journal of Functional Foods. 2020; 68:103858.

258. Martins T, Matos AF, Soares J, Leite R, Pires MJ, Pinto MDL, et al. Effects of Sulforaphane and Chlorophyl a in a Western Diet-Induced Obesity Model. Obesities. 2023; 3(4):265–86.

259. Lu SF, Tang YX, Zhang T, Fu SP, Hong H, Cheng Y, et al. Electroacupuncture Reduces Body Weight by Regulating Fat Browning-Related Proteins of Adipose Tissue in HFD-Induced Obese Mice. Front Psychiatry. 2019; 10:353.

260. Silva-Santana G, Bax JC, Fernandes DCS, Bacellar DTL, Hooper C, Dias AASO, et al. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus*. Anim Models and Exp Med. 2020; 3(4):304–15.

261. Otocka-Kmiecik A. Effect of Carotenoids on Paraoxonase-1 Activity and Gene Expression. Nutrients. 2022; 14(14):2842.

262. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, et al. Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraoxonase Transgenic Mice. Circulation. 2002; 106(4):484–90.

263. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. Nat Rev Dis Primers. 2019; 5(1):56.

264. Young A, Lowe G. Carotenoids—Antioxidant Properties. Antioxidants. 2018; 7(2):28.

265. Calla MS, Lynch SM. Vitamin C preserves the cardio-protective paraoxonase activity of high-density lipoprotein during oxidant stress. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2006; 452(2):129–37.

266. Daniels JA, Mulligan C, McCance D, Woodside JV, Patterson C, Young IS, et al. A randomised controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. Cardiovasc Diabetol. 2014; 13(1):16.

267. Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Buren LV, Wagner E, Wiseman S, et al. The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. Free Radical Research. 2002; 36(2):217–33.

268. Lixandru D, Mohora M, Coman A, Stoian I, Van Gils C, Aerts P, et al. Diet and Paraoxonase 1 Enzymatic Activity in Diabetic Foot Patients from Romania and Belgium: Favorable Association of High Flavonoid Dietary Intake with Arylesterase Activity. Ann Nutr Metab. 2010; 56(4):294–301.

269. Martini D, Del Bo' C, Porrini M, Ciappellano S, Riso P. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2017; 48:1–8.

270. Rosenblat M, Aviram M. Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. BioFactors. 2009; 35(1):98–104.

271. Li X, Cai Z, Yang F, Wang Y, Pang X, Sun J, et al. Broccoli Improves Lipid Metabolism and Intestinal Flora in Mice with Type 2 Diabetes Induced by HFD and STZ Diet. Foods. 2024; 13(2):273.

272. Lu Y, Li X, Ma S, Ding M, Yang F, Pang X, et al. Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Planch) alleviates metabolic-associated fatty liver disease through regulating gut flora and lipid metabolism *via* the FXR/LXR signaling pathway. Food Funct. 2025; 16(4):1218–40.

273. Mao B, Ren B, Wu J, Tang X, Zhang Q, Zhao J, et al. The Protective Effect of Broccoli Seed Extract against Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury via Gut Microbiota Modulation and Sulforaphane Production in Mice. Foods. 2023; 12(14):2786.

274. Boddupalli S, Mein JR, Lakkanna S, James DR. Induction of Phase 2 Antioxidant Enzymes by Broccoli Sulforaphane: Perspectives in Maintaining the Antioxidant Activity of Vitamins A, C, and E. Front Gene [Internet]. 2012; 3. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2012.00007/abstract

275. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A, Berardo C. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. Antioxidants. 2021; 10(3):364.

276. Aranaz P, Navarro-Herrera D, Romo-Hualde A, Zabala M, López-Yoldi M, González-Ferrero C, et al. Broccoli extract improves high fat diet-induced obesity, hepatic steatosis and glucose intolerance in Wistar rats. Journal of Functional Foods. 2019; 59:319–28.

277. Chen YJ, Wallig MA, Jeffery EH. Dietary Broccoli Lessens Development of Fatty Liver and Liver Cancer in Mice Given Diethylnitrosamine and Fed a Western or Control Diet. The Journal of Nutrition. 2016; 146(3):542–50.

278. Teng W, Li Y, Du M, Lei X, Xie S, Ren F. Sulforaphane Prevents Hepatic Insulin Resistance by Blocking Serine Palmitoyltransferase 3-Mediated Ceramide Biosynthesis. Nutrients. 2019; 11(5):1185.

279. Clandinin MT, Cheema S, Pehowich D, Field CJ. Effect of polyunsaturated fatty acids in obese mice. Lipids. 1996; 31(1Part1):S13.

280. Tappy L, Rosset R. Health outcomes of a high fructose intake: the importance of physical activity. The Journal of Physiology. 2019; 597(14):3561–71.

281. Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. Trends Endocrinol Metab. 2011; 22(2):60–5.

282. Ter Horst K, Serlie M. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Nutrients. 2017; 9(9):981.

283. De Melo AF, Moreira CCL, Sales CF, Rentz T, Raposo HF, Garófalo MAR, et al. Increase in liver cytosolic lipases activities and VLDL-TAG secretion rate do not prevent the non-alcoholic fatty liver disease in cafeteria diet-fed rats. Biochimie. 2018; 150:16–22.

284. Rodrigues AH, Moreira CCL, Mario ÉG, De Souza Cordeiro LM, Avelar GF, Botion LM, et al. Differential modulation of cytosolic lipases activities in liver and adipose tissue by high-carbohydrate diets. Endocrine. 2016; 53(2):423–32.

285. Miyazaki M, Dobrzyn A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim HJ, et al. Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression Is Necessary for Fructose-mediated Induction of Lipogenic Gene Expression by Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c-dependent and -independent Mechanisms. Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(24):25164–71.

286. Kovacevic S, Elakovi´c I, Vojnovi´c Milutinovi´c D, Nikoli´c-Koki´c, A, Mati´c D, Blagojevi´c G, et al. Fructose-Rich Diet Attenuates Stress-Induced Metabolic Disturbances in the Liver of Adult Female Rats. The Journal of Nutrition. 2021; 151(12):3661–70.

287. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2010; 299(5):E685–94.

288. Softic S, Stanhope KL, Boucher J, Divanovic S, Lanaspa MA, Johnson RJ, et al. Fructose and hepatic insulin resistance. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2020; 57(5):308–22.

289. Simoes ICM, Janikiewicz J, Bauer J, Karkucinska-Wieckowska A, Kalinowski P, Dobrzyń A, et al. Fat and Sugar—A Dangerous Duet. A Comparative Review on Metabolic Remodeling in Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Nutrients. 2019; 11(12):2871.

290. Ham M, Choe SS, Shin KC, Choi G, Kim JW, Noh JR, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Improves Insulin Resistance With Reduced Adipose Tissue Inflammation in Obesity. Diabetes. 2016; 65(9):2624–38.

291. Perez Gutierrez RM, Valadez Romero R. Effects of bixin in high-fat diet-fed-induced fatty liver in C57BL/6J mice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2016; 6(12):1015–21.

292. Fojas EG, Lessan N, Chiong MA, Naemi R. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) expression and obesity: A systematized review. Obesity Medicine. 2024; 48:100546.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Ivanochko M., Bayliak M., Lushchak V. Potential of isothiocyanate sulforaphane from broccoli to combat obesity and type 2 diabetes: involvement of NRF2 regulatory pathway. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2024. 96: 6. Q4

DOI: https://doi.org/10.15407/ubj96.06.017

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/85213384541?origin=resultslist

2. Ivanochko M., Fediv K., Shvadchak V., Bayliak M., Lushchak V. Nutritional analysis of aqueous and ethanol broccoli sprout extracts. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2025. Q2

DOI: https://doi.org/10.1007/s13562-025-00974-9

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105003850390?origin=resultslist

3. Ivanochko M., Dmytriv T., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Metabolic effects of broccoli sprouts in mice with cafeteria diet-induced obesity. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2025. 97: 6. Q4

DOI: https://doi.org/10.15407/ubj97.06.065

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105026672297?origin=resultslist

Статті у наукових фахових виданнях України категорії Б:

4. Ivanochko M., Demianchuk O., Bayliak M., Lushchak V. Consumption of broccoli sprouts increased the activity of glutathione-dependent antioxidant enzymes in murine liver. *Biotechnologia Acta*. 2023. 16: 2. P. 26-29.

DOI: https://doi.org/10.15407/biotech16.02.026

URL: https://biotechnology.kiev.ua/index.php/en/journal-archive-en/2023-en/2023-no2-en/consumption-of-broccoli-sprouts-increased-the-activity-of-glutathione-dependent-antioxidant-enzymes-in-murine-liver-m-v-ivanochko-o-i-demianchuk-m-m-bayliak-v-i-lushchak

5. Derkachov V., Ivanochko M., Bayliak M. The effect of broccoli sprouts on oxidative stress markers in mice fed with cafeteria diet. *Biotechnologia Acta*. 2023. 16: 2. P. 18-20.

DOI: https://doi.org/10.15407/biotech16.02.018

URL: https://biotechnology.kiev.ua/index.php/en/journal-archive-en/2023-en/2023-no2-en/the-effect-of-broccoli-sprouts-on-oxidative-stress-markers-in-mice-fed-with-cafeteria-diet-vp-derkachov-mv-ivanochko-mm-bayliak

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Іваночко М.В. Проростки броколі сповільнюють розвиток ожиріння у мишей на кафетерійній дієті // *92-а науково-практична конференція студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023). – С. 165.

URL: https://surl.li/xanofy

7. Лабич І., Іваночко М. Паростки броколі не коригують експериментально індуковане ожиріння у мишей. // *92-а науково-практична конференція студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 23-25 березня 2023). – С. 16.

URL: https://surl.li/xanofy

8. Деркачов В., Березовський В., Іваночко М., Байляк М. Вплив паростків броколі на поведінку мишей та на маркери запалення // *III міжнародна науково*

практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 163-164.

URL:https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf

9. Іваночко М., Лущак В. Вплив споживання кафетерійної дієти та паростків броколі на біохімічні показники крові мишей // *III міжнародна науково практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 184-186.

URL:https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf

10. Ткачик А., Балацький В., Іваночко М., Байляк М. Біохімічні показники крові мишей за споживання кафетерійної дієти та проростків броколі // *III міжнародна науково практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 374-376.

URL:https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf

11. Іваночко М., Лущак В. Антиоксидантні властивості екстрактів паростків та проростків броколі // *X Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології»* (м. Харків, 10-11 травня 2023). – С. 180-181.

URL: https://tfp.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2023/05/zbirnik-konferencija-tfp-2023.pdf

12. Іваночко М., Дем'янчук О., Лущак В. Споживання проростків броколі збільшує активність глютатіон-залежних ферментів у печінці мишей // *Шоста міжнародна конференція молодих учених «Харківський Природничий Форум»* (м. Харків, 18-19 травня 2023). – С. 422-424.

URL: https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/909ba3b5-ca28-4195-9abc-4892d466753c/content

13. Василишин О., Іваночко М. Модуляція окремих гематологічних показників за умови споживання «кафетерійної дієти» та проростків броколі // *93а*

науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації» (м. Івано-Франківськ, 28-30 березня 2024). – С. 62.

URL:https://drive.google.com/drive/folders/1NrIhc3s3dzW0gz4JjyXvb4bq8og1BD47

14. Іваночко М., Байляк М. Проростки броколі запобігають зростанню активності ферментів катаболізму глюкози та фруктози у печінці мишей на тлі кафетерійної їжі // *93а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 28-30 березня 2024). – С. 64.

URL:https://drive.google.com/drive/folders/1NrIhc3s3dzW0gz4JjyXvb4bq8og1BD47

15. Іваночко М., Байляк М., Лущак В. Проростки броколі не запобігають збільшенню вмісту глікогену та триацилгліцеролів у печінці мишей при споживанні кафетерійної їжі // *XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 18-20 квітня 2024 р.). – С. 59-60.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024_.pdf

16. Іваночко М., Байляк М. Паростки броколі не коригують розвиток ожиріння у мишей при споживанні кафетерійної їжі // *94а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 27-29 березня 2025). – С. 48.

URL: https://surl.li/ykbfre

17. Яцків І., Лабич І., Іваночко М. Вплив споживання паростків броколі і кафетерійної їжі на гематологічні та деякі біохімічні показники крові мишей // *94а науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації»* (м. Івано-Франківськ, 27-29 березня 2025). – С. 53.

URL: https://surl.li/ykbfre

18. Іваночко М., Байляк М., Лущак В. Споживання паростків броколі запобігає збільшенню вмісту триацилгліцеридів у печінці, але не маси тіла мишей за споживання кафетерійної їжі // *XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – С. 63-65.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2025/06/pimb-tezi-2025-A5.pdf

19. Яцків І., Іваночко М., Байляк М. Паростки броколі стимулюють антиоксидантний захист і детоксикаційні процеси у мозку мишей за споживання кафетерійної їжі // *XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – С. 79-80.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2025/06/pimb-tezi-2025-A5.pdf

20. Ivanochko M., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Consumption of broccoli sprouts with cafeteria diet modulates activities of glutathione-related enzymes in the murine brain // *XXIII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених* (м. Львів, 15-16 травня 2025 р.). – С. 42.

URL: https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2025/2/AB_2025_27_2.pdf

21. Ivanochko M., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Consumption of a cafeteria diet with green broccoli sprouts affects xenobiotic detoxification rather than oxidative stress markers in murine liver // *XlX All-Ukrainian Conference of Young Scientists* (м. Київ, 20-21 травня 2025 р.). – С. 33.

URL:https://kbb.cnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/28/2026/03/zbirnyk_tez_khikh_vseukrainskoi_konferentsii_molodykh_vchenykh_imbh_2025.pdf

22. Yatskiv I., Ivanochko M., Bayliak M., Lushchak V. Green broccoli sprouts decrease hepatic triacylglycerol level but do not prevent adipose tissue accumulation in mice on a cafeteria diet // *XlX All-Ukrainian Conference of Young Scientists* (м. Київ, 20-21 травня 2025 р.). – С. 14.

URL:https://kbb.cnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/28/2026/03/zbirnyk_tez_khikh_vseukrainskoi_konferentsii_molodykh_vchenykh_imbh_2025.pdf

23. Ivanochko M., Yatskiv I., Bayliak M., Lushchak V. Addition of broccoli sprouts does not eliminate cafeteria diet-induced suppression of antioxidant enzyme activity in murine brain // Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках» (м. Київ, 28–29 жовтня 2025 р.). – С. 8.
URL: https://fz.kiev.ua/index.php?list1=414

24. Іваночко М., Господарьов Д., Лущак В. Вплив споживання проростків броколі на маркери запалення та детоксикацію ксенобіотиків у печінці мишей, які споживали кафетерійну їжу // Матеріали XX Міжнародної наукової конференції «Чаргаффські читання» (м. Чернівці, 27 – 30 жовтня 2025 р.). – С. 179.
URL:https://archer.chnu.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/13087/CHARGAFF%20READINGS-2025.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на конференціях: 92-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2023), III міжнародній науково практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 2023), X Міжнародній науково-практична конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (Харків, 2023), Шостій міжнародній конференції молодих учених «Харківський Природничий Форум» (Харків, 2023), 93-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2024), XX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2024), 94-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації у медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2025), XXI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2025), XXIII Всеукраїнській

науково-практичній конференції молодих вчених (Львів, 2025), XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists (Київ, 2025), Школі-воркшопі «Сучасні методи в нейронауках» (Київ, 2025), XX Міжнародній науковій конференції «Чаргаффські читання» (Чернівці, 2025), щорічних звітних наукових конференціях Карпатського національного університету ім. Василя Стефаника.

Додаток Б

Фото зібраних паростків броколі

Фото зібраних проростків броколі

Додаток В

Склад кафетерійних продуктів. Мишам надавався один з семи наборів продуктів.

		Жири (г)	Вуглеводи (г)	Білки (г)	Калорійність
1	Сир "Звенигора" (50 г)	14	0	11	165,5
	Шоколад "Рошен" (25 г)	5	17	1	114,5
	Печиво "Рошен" (25 г)	5	17	1,5	119,25
	Всього на 100 г	24	34	13,5	399,25
		Жири (г)	Вуглеводи (г)	Білки (г)	Калорійність
2	Ковбаса "Costa Brava" (50 г)	15	2,5	11	189
	Вафлі Артек "Світоч" (25 г)	7	17	1	128,25
	Крекер "Сеньйор Батоніо" (25 г)	4	16	2	111,5
	Всього на 100 г	26	35,5	14	428,75
		Жири (г)	Вуглеводи (г)	Білки (г)	Калорійність
3	Сир "Пирятин" (50 г)	14	0	14	181,5
	Шоколад "Рошен" (25 г)	5	17	1	114,5
	Батончик "Лайон" (25 г)	6	17	1	122,75
	Всього на 100 г	25	34	16	418,75
		Жири (г)	Вуглеводи (г)	Білки (г)	Калорійність
4	Ковбаса салямі преміум "Добров" (50 г)	15	0,5	8	161,65
	Кукурудзяні	4	18	2	111,75

	палочки "Своя Лінія" (25 г)				
	Сухарики "Флінт" (25 г)	3	18	3	106,05
	Всього на 100 г	**22**	**36,5**	**13**	**379,45**
		Жири (г)	**Вуглеводи (г)**	**Білки (г)**	**Калорійність**
5	**Сосиски "М'ясна лавка" (50 г)**	12	2	6	135,25
	Арахіс солоний "Флінт" (25 г)	13	3	8	154,25
	Сухий сніданок "Своя Лінія" (25 г)	0,5	20	2	85,5
	Всього на 100 г	**25,5**	**25**	**16**	**375**
		Жири (г)	**Вуглеводи (г)**	**Білки (г)**	**Калорійність**
6	**Сир "Звенигора" (50 г)**	14	0	11	165,5
	Солодка соломка "Розумний вибір" (25 г)	2	20	3	95,75
	Чіпси "Лейс" (25 г)	8	13	2	131,5
	Всього на 100 г	**24**	**33**	**16**	**392,75**
		Жири (г)	**Вуглеводи (г)**	**Білки (г)**	**Калорійність**
7	**Ковбаса салямі преміум "Добров" (50 г)**	8	0	4	161,65
	Кукурудзяні палочки "Своя Лінія" (25 г)	8	36	3	111,75
	Арахіс солоний "Флінт" (25 г)	9	9	3	138,5
	Всього на 100 г	**25**	**45**	**10**	**411,9**

Додаток Г

Склад гранульованого кафетерійного корму.

	Жири	**Вуглеводи**	**Білки**	**Калорійність**
	На 100 г корму			
Арахіс солодкий "Своя лінія" (28 г)	10,5	10,5	4,4	153,9
Шоколад "Рошен" молочний (28 г)	8,8	15,4	1,9	150
Крекер "Yarych" (11г)	2	7	0,9	50,8
Цукор г	0	0	0	0
Базова дієта (23г)	1,1	16,09	4,6	71,38
Казеїн (10г)	0,2	0,4	7,5	33,3
Всього	**22,6**	**49,4**	**19,3**	**459,4**

Додаток Ґ

Олігонуклеотидні послідовності (праймери), які використовувалися в дослідженні для аналізу рівнів іРНК за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Ген	Forward primer (5′→3′)	Reverse primer (5′→3′)
RPL27	TCAGGGACCCAGCTTTGAAG	TTCCCTGTCTTGTATCGCTCC
TXNRD1	GACTGGCAGCAGCTAAGGA	GAGCTTGTCCGAGCAAAGC
CYP1A1	CCCACAGCACCACAAGAGAT	TTCAGGCCGGAACTCGTTT
NURR77	TCATCACTGATCGACACGGG	TCAGACAGCTAGCAATGCGA
PGC1A	CTCTGGAACTGCAGGCCTAA	GCCTTGGGTACCAGAACACT
PDK2	GCAGAGCTGGTATGTCCAGA	ATGTTCTGGTTGGAGACGGG
UGDH	TGCATGGAATTCTCCAACCCT	AGATCGGCTTCTCTGATGGC
CCL2	CAGCCAGATGCAGTTAACGC	TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC
GNMT	GCCAGACTGCAAAGGCTGT	TGTGGGCTTTGTTGTTGACTG
IL6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	CCACGATTTCCCAGAGAACATG
PDK4	GTCCTTCCTTGACCCCAGTAG	CCAAAACCAGCCAAAGGGG

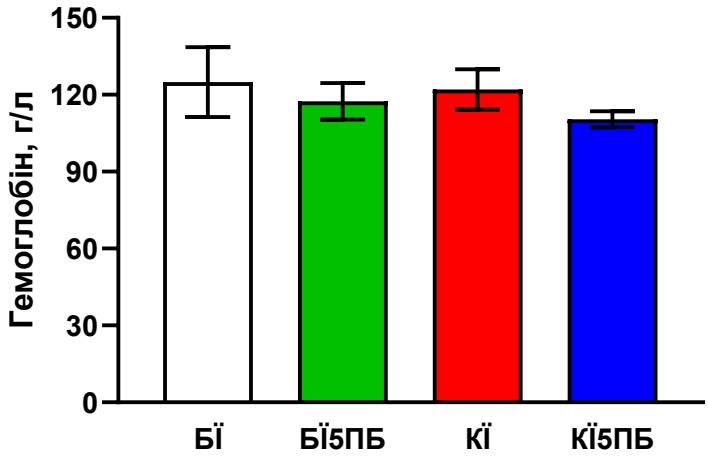
Додаток Д

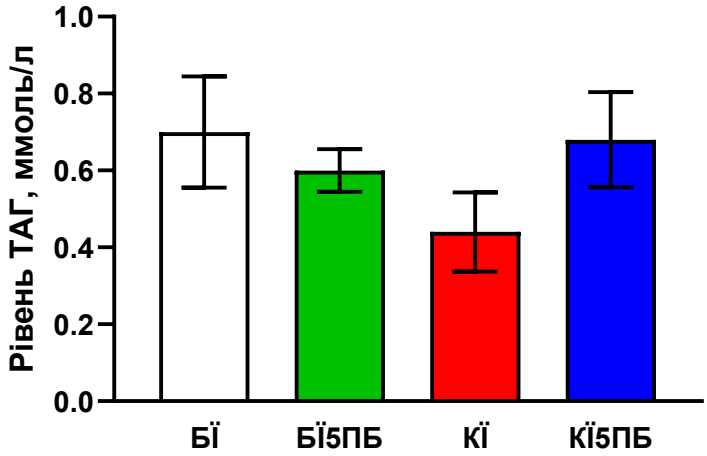
Маса тіла мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей.

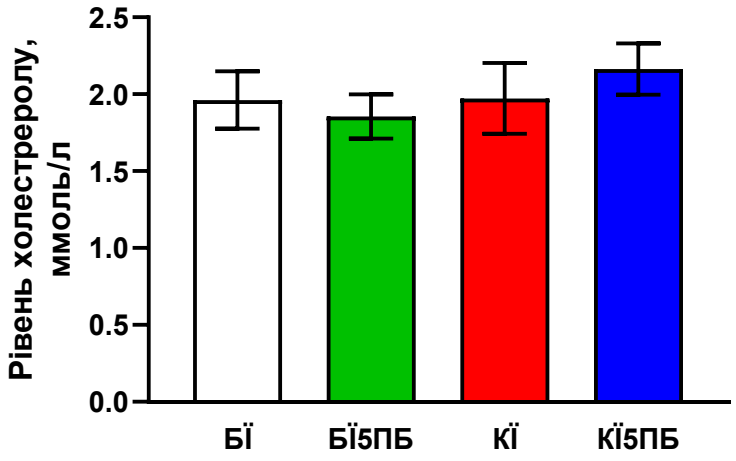
		Початок	2 тижні	4 тижні	6 тижнів	8 тижнів	10 тижнів	12 тижнів	14 тижнів
БЇ	**Mean**	25,70	25,50	26,04	26,12	24,78	24,84	22,44	23,98
	SEM	1,41	1,40	1,58	1,56	1,49	1,47	1,25	1,67
	SD	3,16	3,13	3,53	3,49	3,33	3,29	2,79	3,74
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	%	**100,00**	**99,22**	**101,32**	**101,63**	**96,42**	**96,65**	**87,32**	**93,31**
КЇ	**Mean**	24,52	23,82	25,96	28,20	24,58	27,58	26,76	26,24
	SEM	1,73	1,68	2,17	1,56	1,73	1,90	1,67	1,85
	SD	3,87	3,75	4,86	3,48	3,87	4,25	3,74	4,14
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	%	**100,00**	**97,15**	**105,87**	**115,01**	**100,24**	**112,48**	**109,14**	**107,01**
КЇ5ПБ	**Mean**	29,96	31,28	33,40	30,30	34,20	34,30	33,38	34,38
	SEM	1,19	0,74	0,60	0,32	0,59	0,83	0,84	0,91
	SD	2,65	1,65	1,35	0,72	1,32	1,86	1,88	2,04
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	%	**100,00**	**104,41**	**111,48**	**101,13**	**114,15**	**114,49**	**111,42**	**114,75**
БЇ5ПБ	**Mean**	22,43	22,43	22,28	22,46				
	SEM	1,22	1,22	0,84	0,81				
	SD	3,67	3,67	2,53	2,44				
	n	9	9	9	9				
	%	**100,00**	**100,00**	**99,31**	**100,10**				

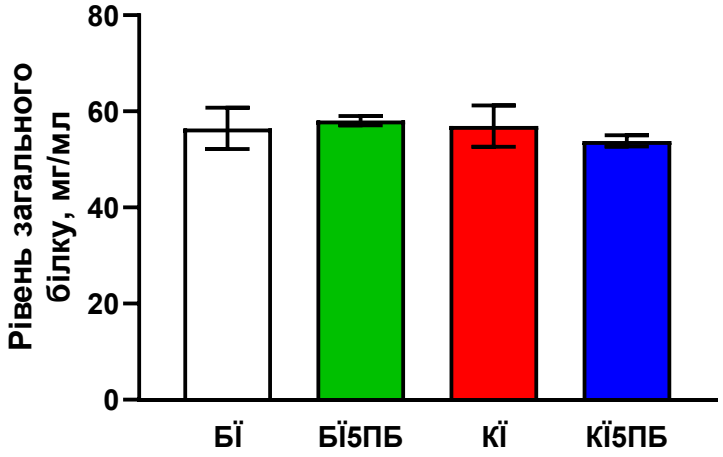
Додаток Е

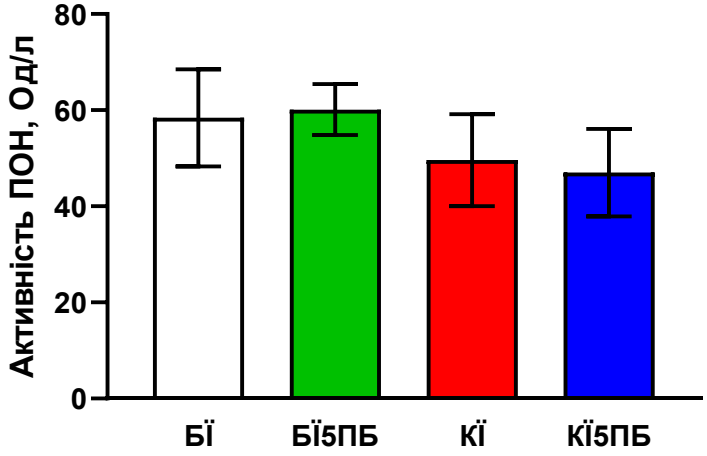
Гематологічні та біохімічні показники крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей.

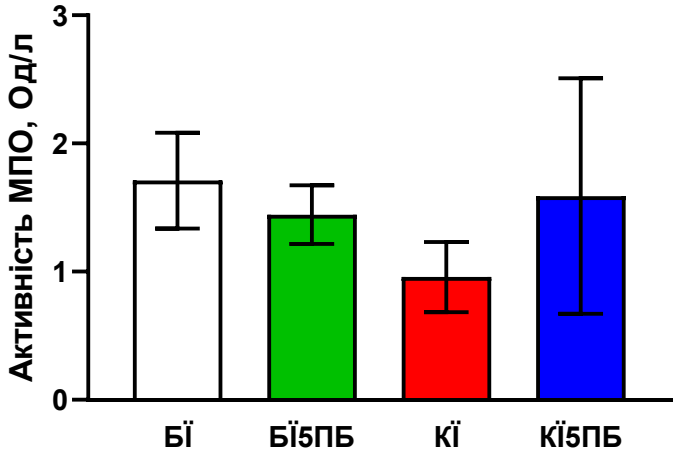


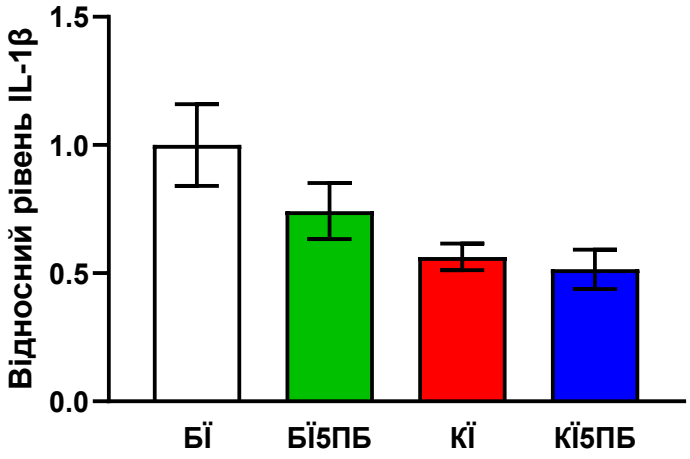



Рівень холестеролу, ммоль/л
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ


Рівень загального білку, мг/мл
80
60
40
20
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

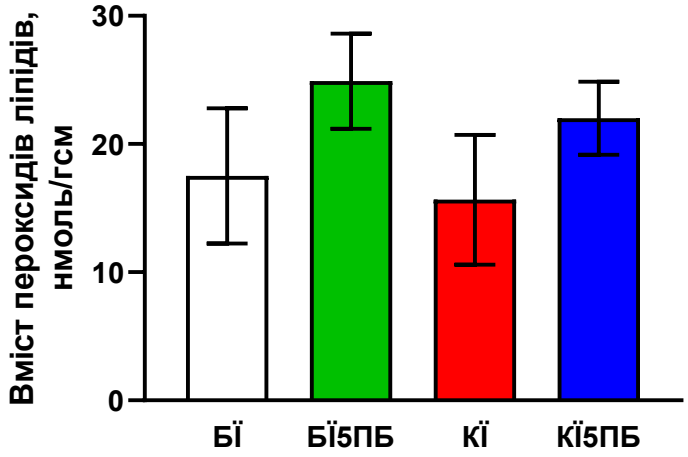

Активність ПОН, Од/л
80
60
40
20
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

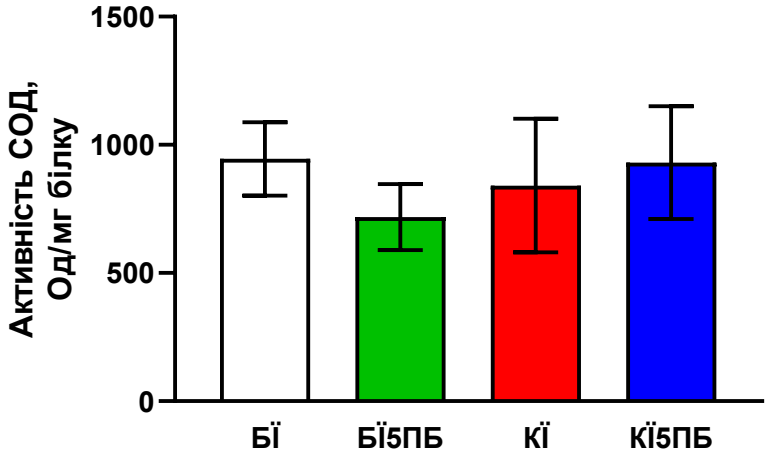

Активність МПО, Од/л
3
2
1
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

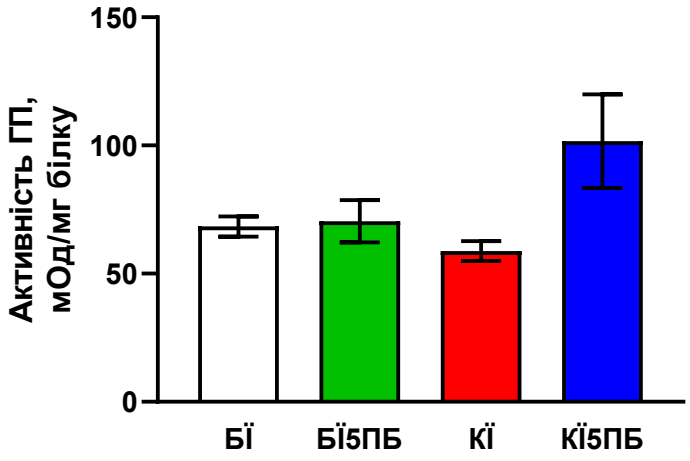

Відносний рівень IL-1β
1.5
1.0
0.5
0.0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

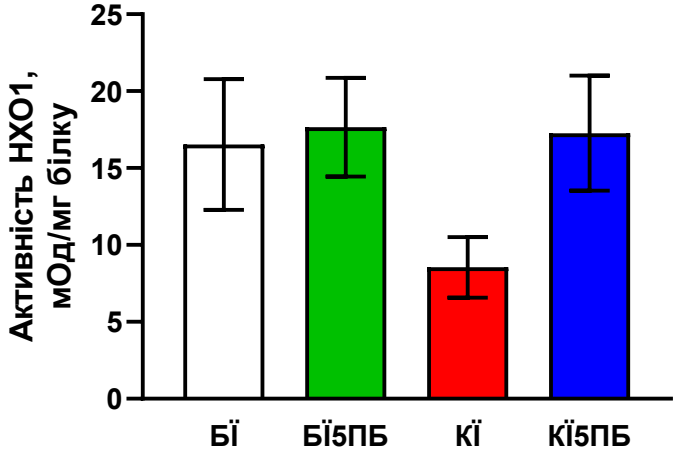
Додаток Є

Маркери оксидативного стресу та активність ферментів у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей.



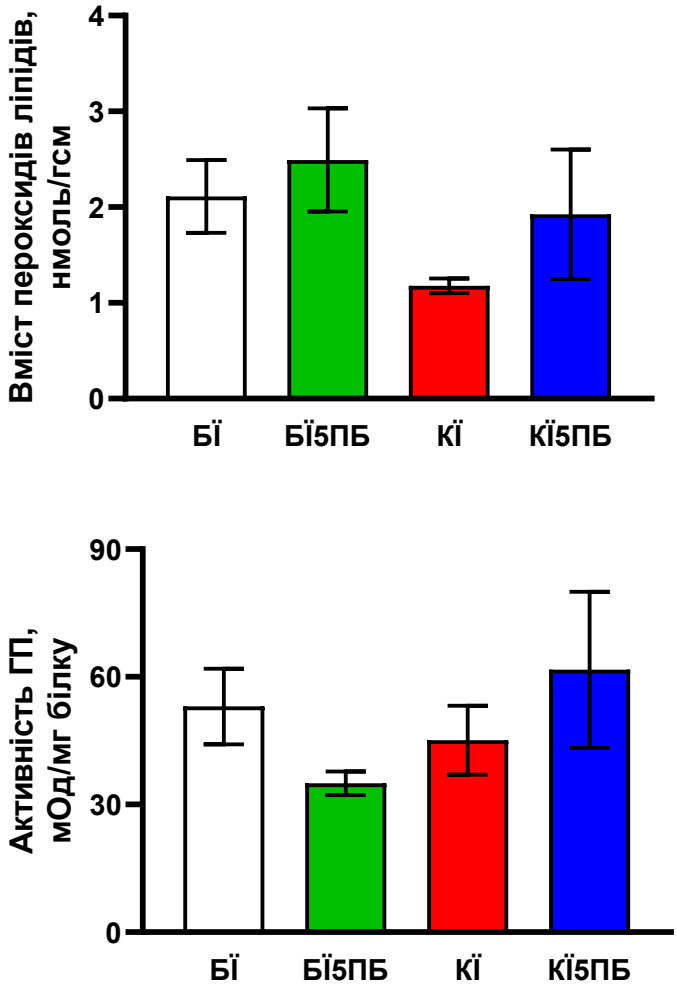



Активність ГП, мОд/мг білку
150
100
50
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ


Активність НХО1, мОд/мг білку
25
20
15
10
5
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

Додаток Ж

Вміст пероксидів ліпідів та активність глютатіонпероксидази у корі головного мозку мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% паростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% паростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 14 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 5-9 мишей.



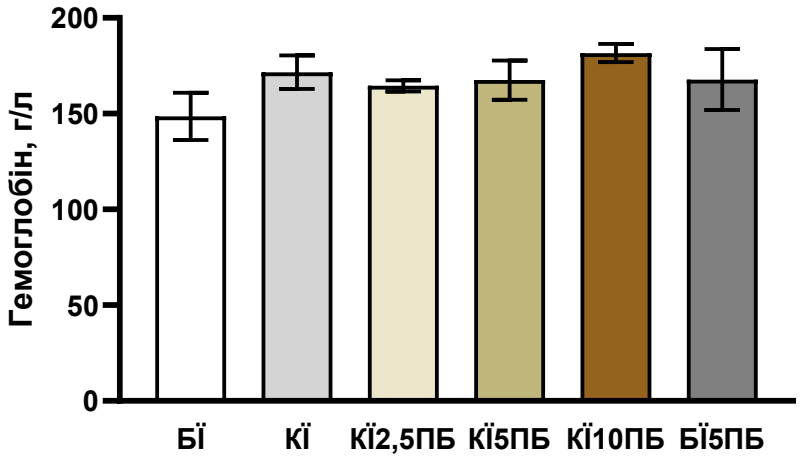
Додаток З

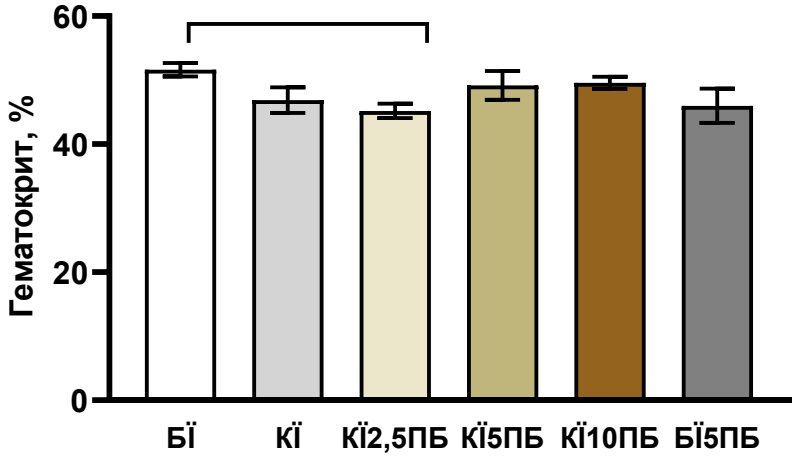
Маса тіла мишей, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей.

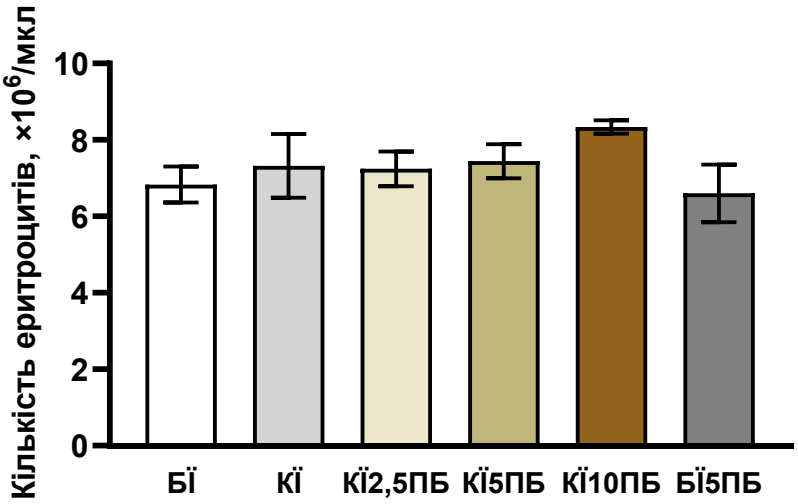
		Початкова (1)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
БЇ	Mean	26,9	27,4	27,3	27,9	27,7	27,5	28,2	28,1	28,2	28,4	28,6	28,2	28,2	28,1	28,9	28,8	28,0	28,2	28,8	28,6
	SEM	0,38	0,45	0,49	0,48	0,46	0,37	0,23	0,32	0,41	0,53	0,60	0,54	0,59	0,57	0,60	0,54	0,56	0,58	0,67	0,60
	SD	0,84	1,00	1,10	1,08	1,02	0,83	0,51	0,72	0,93	1,19	1,34	1,21	1,31	1,26	1,35	1,20	1,25	1,30	1,49	1,34
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	%	100,00	102,01	101,64	103,97	102,90	102,23	104,91	104,61	104,99	105,65	106,32	104,93	105,03	104,67	107,34	106,99	104,02	105,06	107,22	106,40
КЇ	Mean	26,8	27,2	27,3	27,6	27,6	27,6	28,0	28,1	28,2	29,2	28,6	28,0	28,7	28,3	29,2	29,0	28,4	28,9	29,0	29,6
	SEM	0,66	0,84	0,87	0,97	0,94	0,99	1,02	1,12	1,21	1,36	1,24	1,30	1,38	1,31	1,39	1,33	1,20	1,09	1,23	1,44
	SD	1,61	2,07	2,14	2,37	2,30	2,43	2,50	2,75	2,97	3,32	3,03	3,18	3,38	3,20	3,41	3,27	2,93	2,66	3,00	3,21
	n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	%	100,00	101,49	101,74	102,98	102,80	102,86	104,16	104,53	105,09	108,82	106,48	104,47	106,94	105,44	108,96	108,19	105,71	107,70	108,07	110,31
КЇ2,5ПБ	Mean	26,6	28,3	27,3	26,5	27,6	27,7	27,8	27,4	27,1	26,6	26,8	26,8	27,6	27,6	28,0	28,1	28,1	28,2	28,7	28,5
	SEM	0,88	0,72	0,86	1,59	0,94	1,07	0,95	0,51	0,46	0,70	0,56	0,43	0,57	0,64	0,59	0,80	0,83	0,89	0,85	0,85
	SD	2,17	1,77	2,10	3,89	2,31	2,62	2,32	1,26	1,13	1,72	1,37	1,05	1,40	1,56	1,46	1,95	2,02	2,19	2,09	2,07
	n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	%	100,00	106,52	102,76	99,81	103,89	104,20	104,64	103,07	102,01	100,19	100,69	100,74	103,81	103,78	105,56	105,76	105,83	106,15	107,97	107,28
КЇ5ПБ	Mean	27,2	28,1	27,9	28,2	28,2	28,1	28,8	29,0	28,1	29,1	28,8	28,7	29,8	28,8	29,5	29,7	29,7	30,6	30,7	30,8
	SEM	1,21	1,56	1,39	1,47	1,59	1,46	1,62	1,71	1,69	1,77	1,69	1,82	1,99	1,81	1,95	2,10	2,02	2,11	2,32	3,15
	SD	2,97	3,48	3,11	3,30	3,54	3,26	3,63	3,82	3,77	3,97	3,77	4,06	4,45	4,06	4,37	4,70	4,52	4,72	5,19	6,29
	n	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
	%	100,00	103,04	102,59	103,70	103,62	103,04	105,90	106,56	103,11	106,71	105,64	105,39	109,40	105,72	108,41	109,20	109,20	112,36	112,80	112,91
КЇ10ПБ	Mean	29,0	26,8	26,9	27,3	27,5	27,0	27,9	28,2	27,6	28,4	28,5	27,9	29,1	28,2	28,1	29,6	28,7	28,6	29,1	28,6
	SEM	1,39	1,51	1,30	1,45	1,21	1,27	1,54	1,38	1,20	1,39	1,21	1,25	1,07	1,18	1,13	1,17	1,34	1,24	1,03	1,08
	SD	3,10	3,37	2,91	3,25	2,70	2,85	3,43	3,08	2,69	3,11	2,72	2,79	2,39	2,65	2,53	2,61	3,00	2,76	2,31	2,41
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	%	100,00	92,41	92,76	94,14	94,90	93,03	96,28	97,17	95,03	97,79	98,37	96,37	100,39	97,34	96,97	101,92	99,03	98,62	100,48	98,62
БЇ5ПБ	Mean	27,5	27,4	27,5	27,2	27,0	26,9	26,9	27,5	26,6	27,5	27,0	27,2	27,8	27,7	28,2	27,8	27,1	27,3	27,8	27,6
	SEM	1,21	1,10	1,06	1,04	1,01	0,95	1,03	1,08	0,93	1,02	0,96	0,90	0,98	0,98	0,92	0,90	1,08	1,06	0,82	0,81
	SD	2,71	2,47	2,38	2,34	2,26	2,13	2,31	2,43	2,08	2,28	2,16	2,00	2,19	2,19	2,07	2,01	2,41	2,38	1,83	1,82
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	%	100,00	99,85	100,22	98,84	98,25	97,74	97,89	100,22	96,81	100,15	98,09	98,97	101,09	100,84	102,72	101,16	98,62	99,42	101,24	100,44

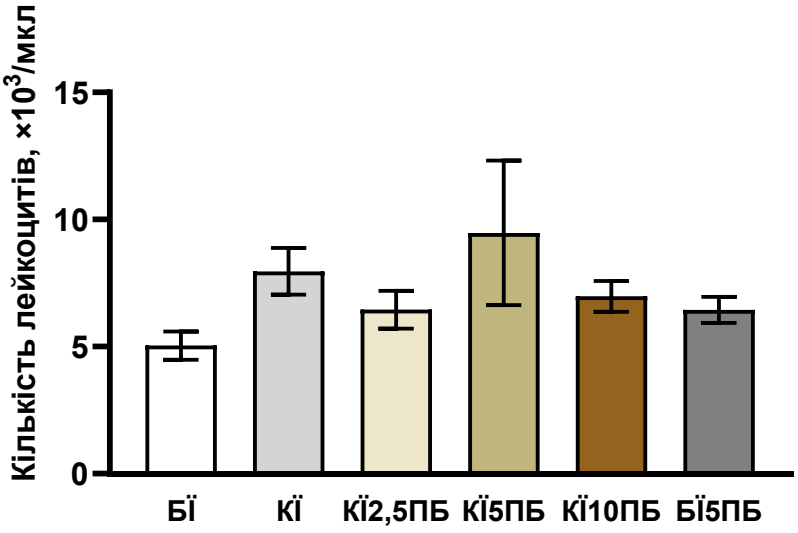
Додаток И

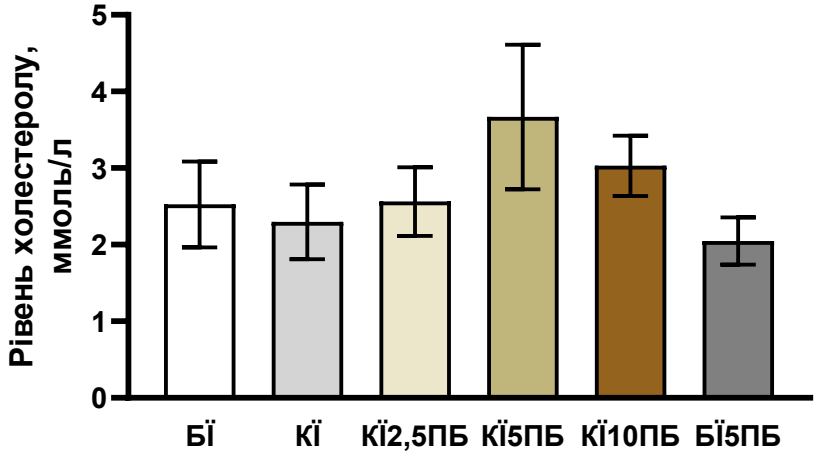
Гематологічні та біохімічні показники крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей. Скобкою вказана достовірна різниця ($P < 0,05$) між групами з використанням одностороннього ANOVA з подальшим тестом Тюкі для множинних порівнянь.

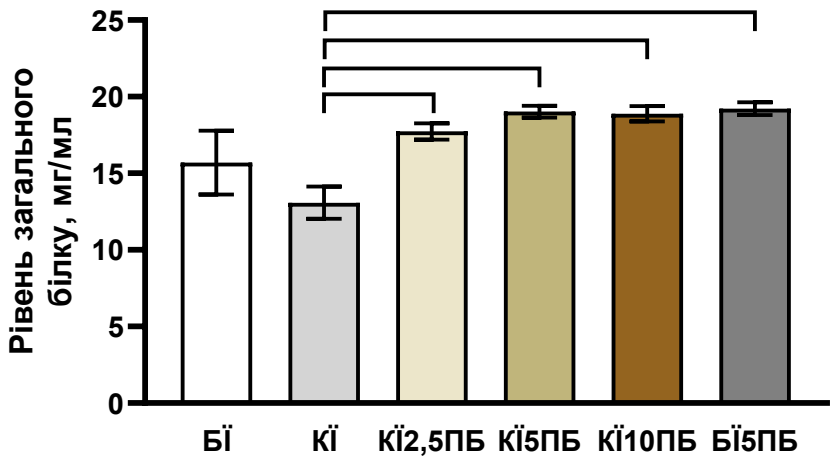


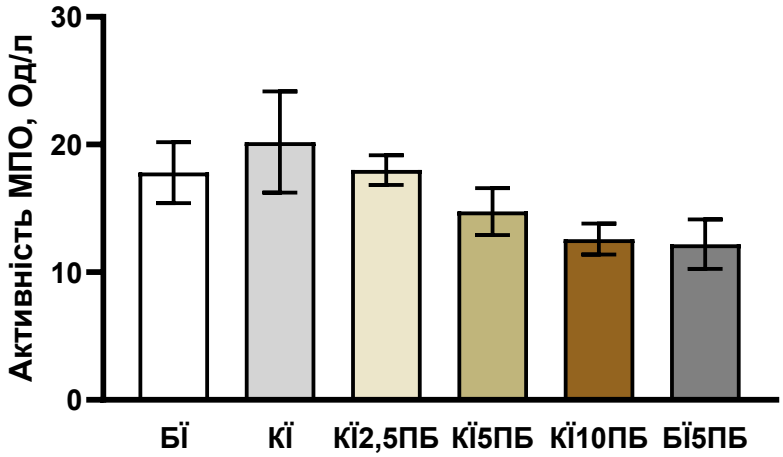


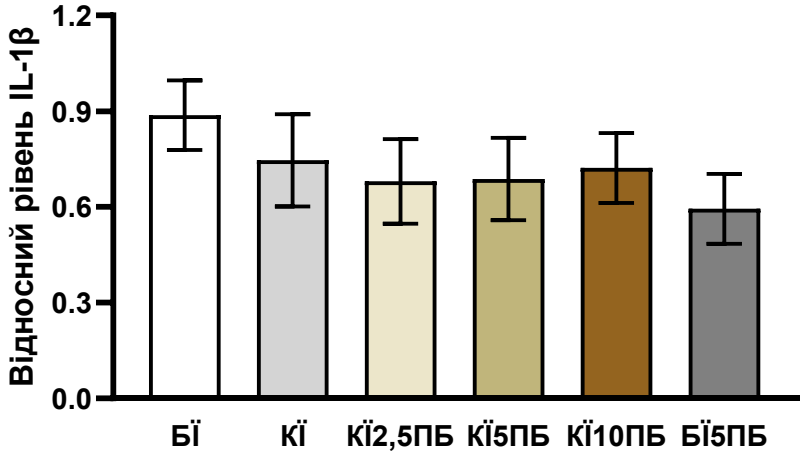

Кількість еритроцитів, ×10^6/мкл
10
8
6
4
2
0
БЇ
КЇ
КЇ2,5ПБ
КЇ5ПБ
КЇ10ПБ
БЇ5ПБ


Кількість лейкоцитів, ×10^3/мкл
15
10
5
0
БЇ
КЇ
КЇ2,5ПБ
КЇ5ПБ
КЇ10ПБ
БЇ5ПБ


Рівень холестеролу, ммоль/л
5
4
3
2
1
0
БЇ
КЇ
КЇ2,5ПБ
КЇ5ПБ
КЇ10ПБ
БЇ5ПБ

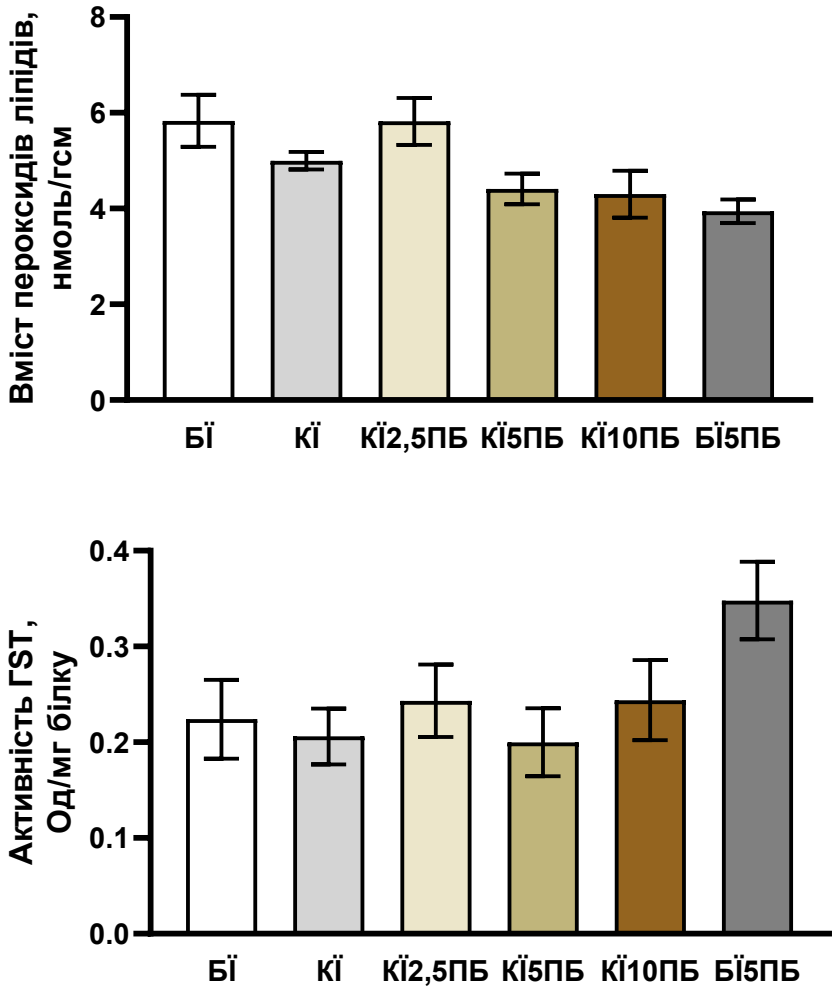

Рівень загального білку, мг/мл
25
20
15
10
5
0
БЇ
КЇ
КЇ2,5ПБ
КЇ5ПБ
КЇ10ПБ
БЇ5ПБ


Активність МПО, Од/л
30
20
10
0
БЇ
КЇ
КЇ2,5ПБ
КЇ5ПБ
КЇ10ПБ
БЇ5ПБ


Відносний рівень IL-1β
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
БЇ
КЇ
КЇ2,5ПБ
КЇ5ПБ
КЇ10ПБ
БЇ5ПБ

Додаток І

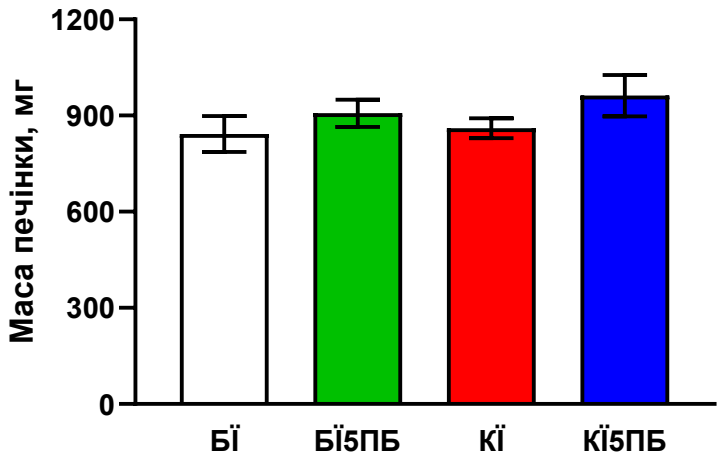
Вміст пероксидів ліпідів та активність глютатіон-S-трансферази у корі головного мозку мишей, які отримували базову їжу (БЇ), кафетерійну їжу (КЇ), кафетерійну їжу з додаванням 2,5%, 5% чи 10% проростків броколі (КЇ2,5ПБ, КЇ5ПБ, КЇ10ПБ відповідно) та базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ) протягом 20 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 4-6 мишей.



Додаток Ї

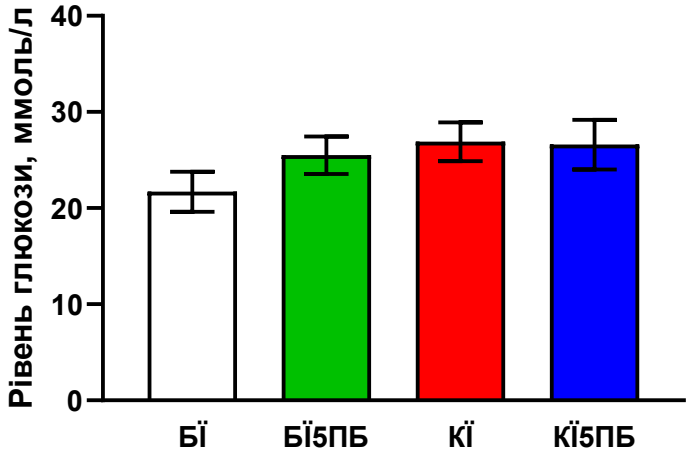
Маса тіла мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей.

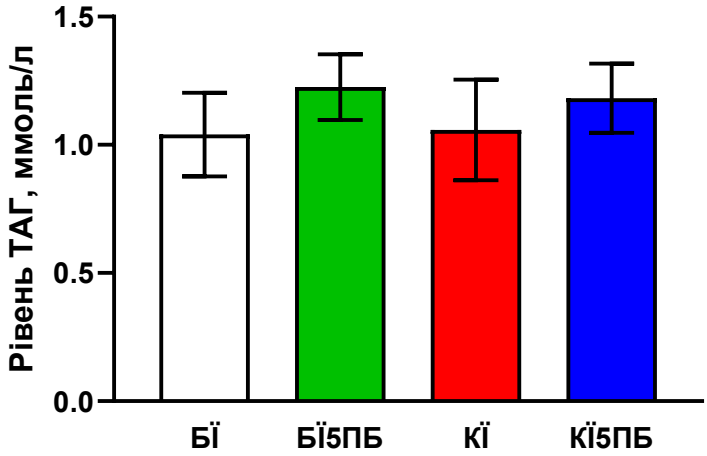
		Початкова (1)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Переддень забору тканин
БЇ	Mean	22,7	20,9	21,4	21,7	21,8	21,5	21,5	21,9	22,0	21,0	22,4	22,4	22,2	22,1	22,2	22,2	22,4
	SEM	0,85	0,84	0,91	0,91	0,97	0,97	1,10	1,00	1,05	0,93	1,06	1,18	1,21	1,18	1,37	1,44	1,43
	SD	2,40	2,38	2,56	2,58	2,73	2,75	3,11	2,82	2,96	2,64	2,99	3,34	3,42	3,35	3,87	4,08	4,04
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	%	100	92,3	94,3	95,8	96,1	94,9	94,8	96,7	97,1	92,7	99,0	99,0	97,9	97,6	97,8	97,8	98,9
КЇ	Mean	24,5	24,8	25,3	25,6	25,1	24,8	24,5	25,4	25,6	25,3	25,9	26,3	26,0	25,7	25,8	26,0	26,2
	SEM	0,63	0,71	0,79	0,78	0,80	0,80	0,83	0,73	0,78	0,86	0,88	0,85	0,86	1,02	1,02	1,23	1,15
	SD	1,80	2,01	2,25	2,20	2,25	2,25	2,35	2,07	2,20	2,43	2,49	2,42	2,42	2,88	2,87	3,26	3,04
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7
	%	100	101,4	103,3	104,7	102,5	101,3	99,9	103,7	104,5	103,4	105,8	107,2	106,0	104,8	105,2	106,3	107,1
КЇ5ПБ	Mean	26,4	26,2	27,0	27,1	27,0	27,0	27,3	27,2	27,2	27,5	27,5	27,7	27,6	28,1	27,9	27,9	28,0
	SEM	0,68	0,73	0,99	0,88	0,82	0,70	0,69	0,68	0,78	0,64	0,67	0,74	0,72	0,63	0,77	1,15	1,41
	SD	2,04	1,92	2,63	2,32	2,16	1,84	1,83	1,79	2,06	1,70	1,76	1,95	1,90	1,65	2,04	3,04	3,72
	n	9	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	%	100	99,3	102	103	102	102	104	103	103	104	104	105	105	106	106	106	106
БЇ5ПБ	Mean	24,9	25,1	25,2	25,8	26,4	26,1	25,9	26,5	26,6	25,1	26,9	27,0	27,2	27,2	27,1	27,0	26,9
	SEM	0,80	0,97	0,86	0,87	0,86	0,76	0,88	0,88	0,86	0,84	0,92	0,92	0,85	0,90	0,81	0,90	0,88
	SD	2,26	2,74	2,43	2,46	2,44	2,16	2,49	2,48	2,44	2,38	2,60	2,60	2,39	2,54	2,28	2,54	2,49
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	%	100	101	101	104	106	105	104	107	107	101	108	109	109	109	109	109	108

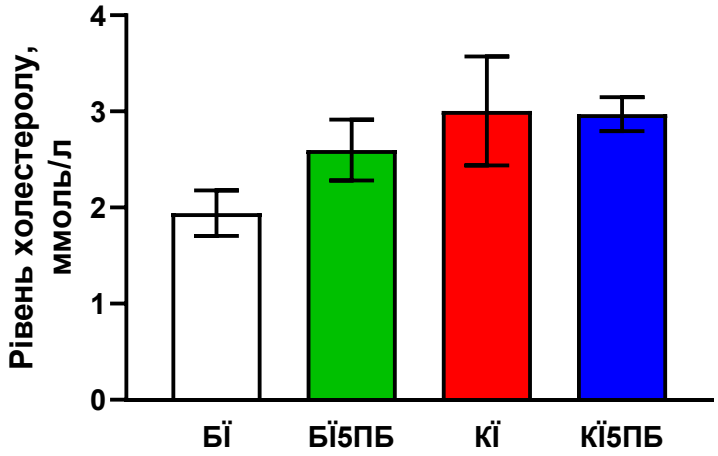


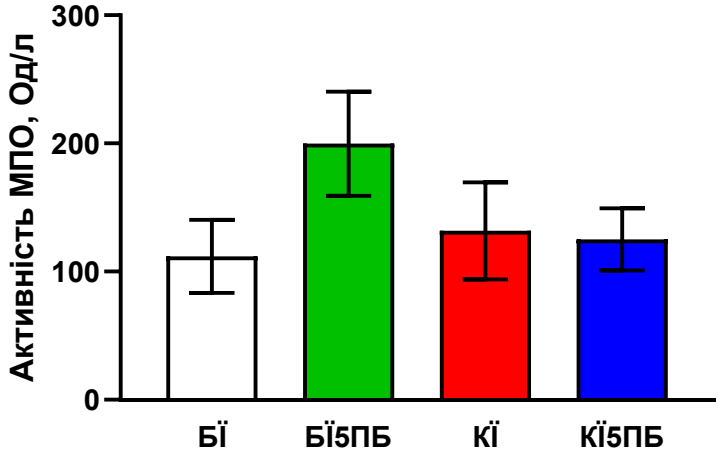
Додаток Й

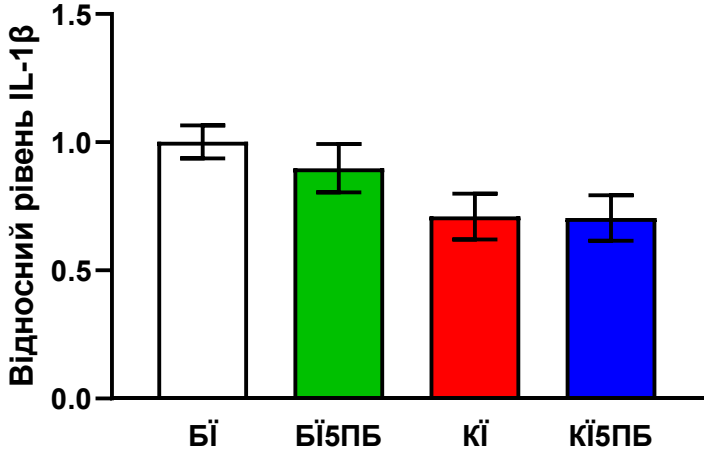
Біохімічні показники крові мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей.





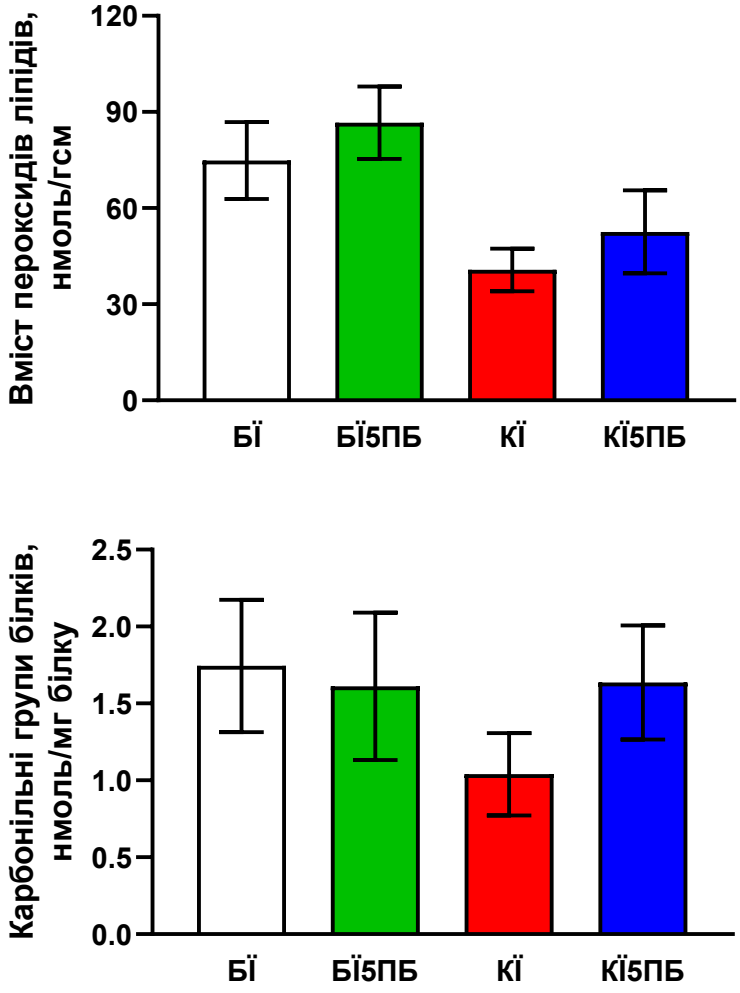

Рівень холестеролу, ммоль/л
4
3
2
1
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

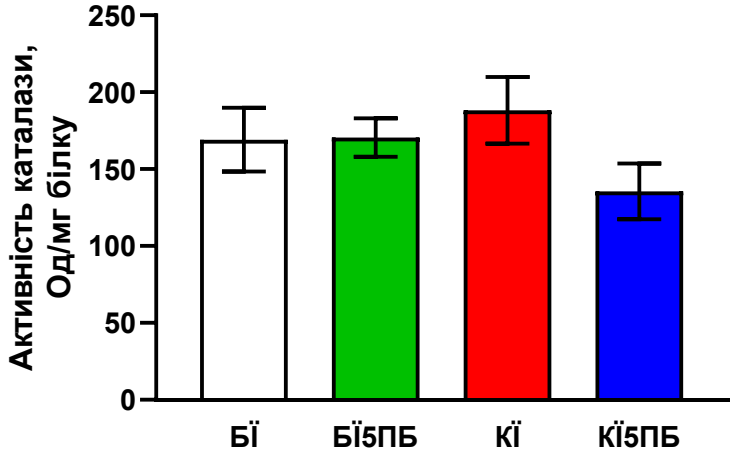

Активність МПО, Од/л
300
200
100
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

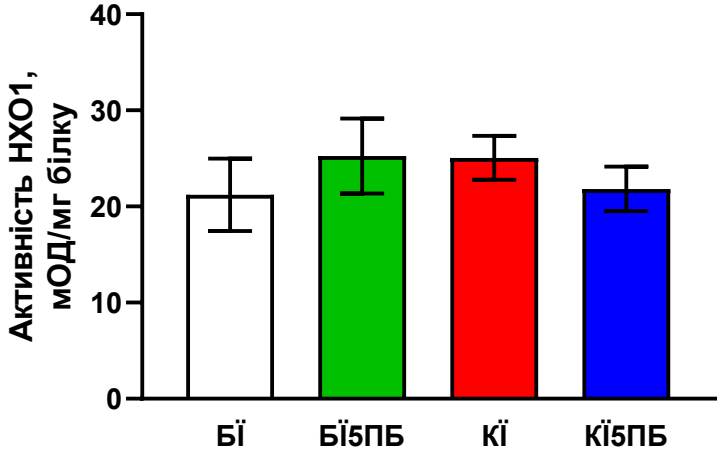

Відносний рівень IL-1β
1.5
1.0
0.5
0.0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

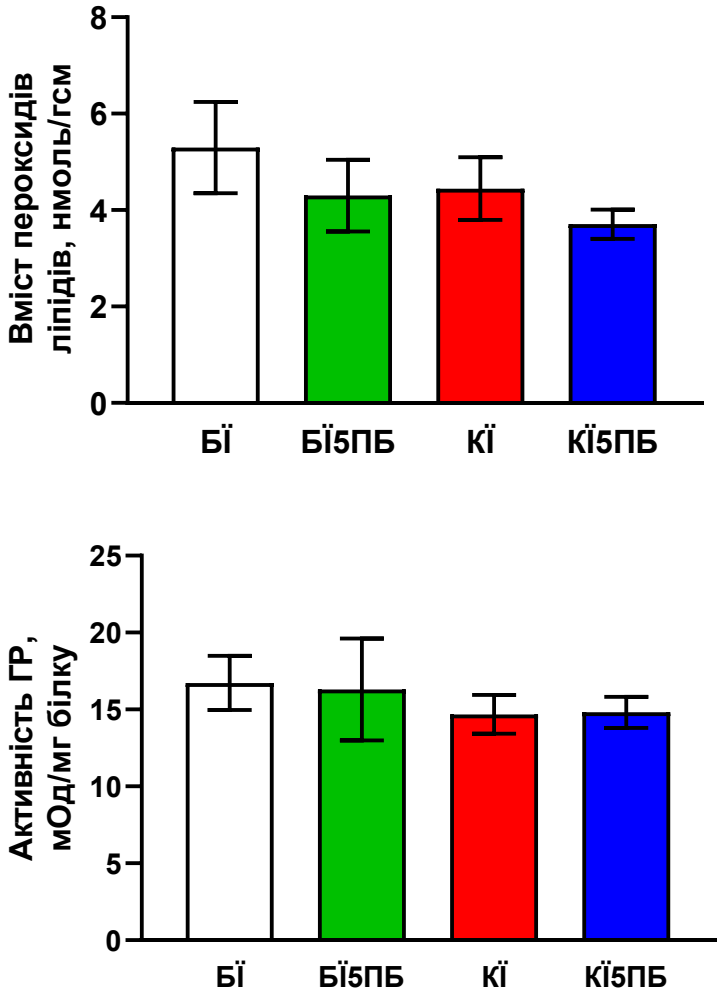
Додаток К

Маркери оксидативного стресу та активність ферментів у печінці мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей.




Активність каталази,
Од/мг білку
250
200
150
100
50
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ


Активність НХО1,
мОД/мг білку
40
30
20
10
0
БЇ
БЇ5ПБ
КЇ
КЇ5ПБ

Додаток Л

Вміст пероксидів ліпідів та активність глютатіон редуктази у корі головного мозку мишей, які отримували базову їжу (БЇ), базову їжу з додаванням 5% проростків броколі (БЇ5ПБ), кафетерійну їжу (КЇ) та кафетерійну їжу з додаванням 5% проростків броколі (КЇ5ПБ) протягом 16 тижнів. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього. У кожній групі було 7-8 мишей.