

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

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

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ДЕМ'ЯНЧУК ОЛЕГ ІГОРОВИЧ**

УДК 577+57.02

**Дисертація  
ВПЛИВ АЛЬФА-КЕТОГЛЮТАРАТУ НА ДРОЗОФІЛ ТА МИШЕЙ:  
ПАРАМЕТРИ ПОВЕДІНКИ, ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ТА  
ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ**

Спеціальність 091 Біологія  
Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ О.І. Дем'янчук

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

Івано-Франківськ – 2025

## Анотація

Дем'янчук О.І. Вплив альфа-кетоглютарату на дрозоділ та мишей: параметри поведінки, оксидативного стресу та енергетичного обміну. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Дисертація присвячена вивченню здатності альфа-кетоглютарату (АКГ), важливого клітинного метаболіту, впливати на старіння та метаболічні порушення, які, зазвичай, асоціюються зі старінням, у модельних тварин, плодової мушки *Drosophila melanogaster* та лабораторних мишей *Mus musculus*. У попередніх роботах на низці модельних об'єктів (дріжджах, плодових мушках, нематодах та мишах) показано, що додавання альфа-кетоглютарату до їжі збільшувало тривалість життя та уповільнювало старіння цих організмів, проте детально механізми дії АКГ не встановлені. Окремі дослідження вказують на те, що АКГ може модулювати про-/антиоксидантний захист та діяти як міметик калорійного обмеження. Метою цієї роботи було оцінити здатність екзогенного альфа-кетоглютарату модулювати тривалість життя, поведінку та метаболізм плодової мушки та лабораторних мишей за умов фізіологічного, уповільненого та прискореного старіння. Дослідження були зосереджені на розкритті механізмів дії АКГ, який додавали до їжі модельних тварин у формі розчину динатрієвої солі, та оцінці його потенційних геропротекторних властивостей. Як модельні об'єкти були обрані довгоживуча сублінія *D. melanogaster*, отримана з лінії Canton S (для оцінки впливу екзогенного АКГ на тривалість життя, параметри про-/антиоксидантного статусу та енергетичних процесів на тлі уповільненого старіння) та миші лінії *C57BL/6J* (для дослідження впливу екзогенного АКГ на когнітивні функції (поведінку) та біохімічні показники мозку на фоні споживання стандартної їжі та висококалорійної їжі, що були використані як модель фізіологічного та прискореного старіння, відповідно). Таким чином, робота складалася з двох частин. У першій частині досліджувався

вплив АКГ на тривалість життя довгоживучої сублінії мух та зміни у фізіологічних та біохімічних процесах, які він зумовлював. У другій частині дослідження вивчався вплив АКГ на когнітивні функції мишей і біохімічні показники (енергетичного обміну, про-/антиоксидантного статусу, автофагії та дотичних сигнальних регуляторних шляхів) у корі головного мозку мишей на фоні споживання стандартної їжі та висококалорійної їжі.

Дорослих мух утримували на живильному середовищі, які містило різні концентрації базових компонентів, сахарози та дріжджів, та 10 мМ АКГ (взято ту концентрацію, яка у попередніх дослідженнях проявила геропротекторну дію). Як фізіологічні показники дрозофіл визначали тривалість життя, індуковану рухову активність і стійкість (виживання) 25-денних мух до дії різних стресорів. Миші споживали АКГ у формі 1% розчину натрієвої солі АКГ, доданого до питної води. Вплив АКГ на поведінку мишей оцінювали через проведення тесту відкритого поля. Гомеостаз активних форм кисню (АФК) у модельних об'єктів оцінювали за рівнем пероксидів ліпідів, тіолів, глутатіону та активністю антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів, а також оцінювали рівень транскриптів генів, які пов'язані з антиоксидантною відповіддю, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією з агарозним гель-електрофорезом. Зміни енергетичного статусу оцінювали за рівнем енергетичних метаболітів (глюкози, глікогену, триацилгліцеролів), активністю гліколітичних ферментів та роботою комплексів електронтранспортного ланцюга мітохондрій. Для оцінки автофагії визначали відносний стаціонарний рівень іРНК генів, які пов'язані з автофагією, за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією.

У ході виконання цієї роботи виявлено, що екзогенний АКГ не впливав на тривалість життя довгоживучої сублінії *D. melanogaster* на стандартному середовищі, яке містило 5% сахарози та 5% дріжджів (5С:5Д), але збільшував тривалість життя на середовищах з низьким вмістом білків і високим вмістом сахарози (9С:1Д). Мухи середнього віку (25 днів), які споживали стандартне середовище (5С:5Д) без та з додаванням 10 мМ АКГ протягом трьох тижнів, не

відрізнялися між собою у значеннях таких фізіологічних показників, як рухова активність і стійкість до голодування, теплового стресу і хімічних стресорів. Проте мухи, що споживали 10 мМ АКГ, мали нижчу активність деяких антиоксидантних ферментів (каталази та глутатіон-S-трансферази) і нижчий рівень триацилгліцеролів. Водночас, у цих мух не змінювалася активність ферментів, які відновлюють НАДФ<sup>+</sup>, активність ключових ферментів гліколізу, робота мітохондріального електронтранспортного ланцюга та рівень маркерів оксидативного стресу. Таким чином, споживання екзогенного АКГ практично не впливало на основні енергозабезпечуючі процеси, а саме гліколіз та окисне фосфорилування, але послаблювало антиоксидантний захист та запобігало накопиченню запасних ліпідів у довгоживучих мух *D. melanogaster*. Для перевірки, чи екзогенний альфа-кетоглутарат діє через Nrf2-сигнальний шлях, було оцінено рівень транскриптів генів, які контролюються цим білком. Альфа-кетоглутарат призводив до збільшення відносного стаціонарного рівня іРНК гену *Cyp6a2*, але не впливав на рівень транскриптів генів *Ugt37A2* та *GstD2*. Це вказує на незначний вплив АКГ на Nrf2-сигнальний шлях.

На наступному етапі роботи, нами було оцінено ефекти АКГ у дорослих мишей за споживання висококалорійних дієт, використаних як фактор, який прискорює старіння та сприяє розвитку метаболічних порушень. Вперше було продемонстровано, що споживання з питною водою екзогенного АКГ протягом 12 тижнів може викликати в мишей (самці) тривожну поведінку на фоні базової їжі та висококалорійної їжі з високим вмістом жиру (смазьцю) та фруктози. Миші, які споживали базову та висококалорійну їжу з додаванням АКГ у тесті відкритого поля проводили менше часу у внутрішній зоні установки для тестування, порівняно з контрольною групою. Це свідчить про тривожну поведінку та зниження дослідницької активності. Подібно до плодівих мух, у корі головного мозку мишей АКГ на тлі базової їжі суттєво не впливав на маркери оксидативного стресу, але призводив до зменшення активності ферментів антиоксидантного захисту. Також альфа-кетоглутарат не впливав на рівень глюкози, активність гліколітичних ферментів та роботу комплексів

мітохондріального електронтранспортного ланцюга у корі головного мозку мишей. Подібно, як і АКГ, їжа з високим вмістом жирів і фруктози призводила до зниження активності ферментів, які здійснюють глутатіонзалежну детоксикацію ксенобіотиків і продуктів перекисного окислення ліпідів, а саме глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази, та зростання рівня пероксидів ліпідів та активності NAD(P)H:хіноноксидоредуктази 1 (NQO1). Базова їжа з додаванням АКГ призводила до вищого співвідношення відновленого до окисленого глутатіону, вищої активності NQO1 та вищих рівнів мРНК UDP-глюкозо-6-дегідрогенази та фактору транскрипції EB (TFEB), який є маркером автофагії. Як висококалорійна їжа з високим вмістом фруктози та жиру, так і базова їжа з додаванням АКГ, а також їхня комбінація сприяли зниженню рівнів транскриптів PDK4 (ключовий регулятор потоку циклу Кребса), гліцин-N-метилтрансферази (фермент детоксикації), PGC-1 $\alpha$  (ключовий регулятора цикл Кребса, мітохондріального біогенезу і  $\beta$ -окислення жирних кислот).

В іншій серії експериментів вивчали вплив АКГ у комбінації з кафетерійним раціоном, який містив типові оброблені продукти харчового раціону людини. На відміну від експерименту з їжею з високим вмістом фруктози та жиру, у експерименті з кафетерійним раціоном, мишей (самок) спочатку утримували на кафетерійну раціоні протягом 8 тижнів, а потім на наступні 4 тижні частина мишей до харчового раціону отримувала 1% АКГ з питною водою. Кафетерійна їжа знижувала антиоксидантний захист у корі головного мозку самок C57BL/6J середнього віку. Додавання АКГ до базової їжі сприяло поведінці мишей із симптомами схожими на тривогу. Комбінація кафетерійної їжі та АКГ посилювала поведінкові зміни у мишей, зокрема зниження дослідницької активності. Найсильнішим ефектом АКГ було індукція пов'язаних з аутофагією генів та генів-мішеней білка FOXO, транскрипційного фактору залученого в регуляцію обміну вуглеводів та антиоксидантного захисту. Припускаємо, що спостережувана дія АКГ на поведінку та клітинні функції може бути також опосередкована активацією АКГ-залежних гідроксилаз і деметилаз. Поживні речовини кафетерійного раціону можуть посилити цю дію, зберігаючи пул АКГ.

Таким чином, добавки АКГ можуть принести користь здоров'ю мозку шляхом модулювання оксидативного стресу та посилення аутофагії, хоча його потенціал викликати поведінку, подібну до тривоги, підкреслює необхідність подальших досліджень.

Отже, АКГ продовжує тривалість життя довгоживучої плодової мушки дрозофіли в умовах обмеження доступності білків, але не за оптимізованих умов (збалансованого харчування білками і вуглеводами). Також АКГ послаблює антиоксидантний захист, не впливаючи суттєво на енергетичний метаболізм як у мух, так і мишей на тлі базової їжі. Водночас, АКГ може викликати тривожну поведінку у мишей збільшення відносного стаціонарного рівня іРНК генів, які пов'язані з аутофагією, у корі головного мозку на тлі споживання базової їжі. Додавання АКГ до висококалорійної їжі частково коригує її метаболічні ефекти на мозок мишей, з більше вираженим захисним впливом АКГ на тлі їжі з високим вмістом жиру та фруктози, ніж на тлі кафетерійного раціону. Останній факт може бути пов'язаний як з складом їжі, так з тривалістю споживання та фізіологічними особливостями мишей (вік, стать). Разом, результати свідчать про те, що геропротекторні та стрес-протекторні властивості альфа-кетоглутарату залежать від складу їжі та фізіологічних особливостей модельних тварин.

**Ключові слова:** альфа-кетоглутарат, старіння, тривалість життя, висококалорійна їжа, кафетерійний раціон, мозок, аутофагія, антиоксидантна система, оксидативний стрес, активні форми кисню, *Drosophila melanogaster*, миші, енергетичний метаболізм, мітохондрії, поведінка; харчування.

### **Annotation**

Demianchuk O.I. Influence of alpha-ketoglutarate on *Drosophila* and mice: parameters of behavior, oxidative stress and energy metabolism.

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

This dissertation is devoted to the study of the ability of alpha-ketoglutarate (AKG), an important cellular metabolite, to influence aging and metabolic disorders commonly associated with aging in model animals, the fruit fly *Drosophila melanogaster* and laboratory mice *Mus musculus*. Previous studies on model organisms (yeast, fruit flies, nematodes, and mice) have shown that the addition of alpha-ketoglutarate to food increased the lifespan and slowed down the aging of these organisms, but the mechanisms of AKG action have not been established in detail. Some studies indicate that AKG can modulate pro-/antioxidant defense and act as a caloric restriction mimetic. The aim of this study was to evaluate the ability of exogenous alpha-ketoglutarate to modulate the lifespan, behavior and metabolism of fruit flies and laboratory mice under physiological, delayed and accelerated aging conditions. The research was focused on revealing the mechanisms of action of AKG, which was added to the food of model animals in the form of a disodium salt solution, and assessing its potential geroprotective properties. The long-lived subline *D. melanogaster* derived from the Canton S line (to evaluate the effect of exogenous AKG on lifespan, parameters of pro-/antioxidant status and energy processes under delayed aging) and C57BL/6J mice (to study the effect of exogenous AKG on cognitive functions (behavior) and brain biochemical parameters under consumption of standard food and high-calorie food, which were used as a model of physiological and accelerated aging, respectively). Thus, the study consisted of two parts. The first part of the study was the investigation of the effect of AKG on the lifespan of a long-lived subline of fruit flies and the AKG-induced changes in physiological and biochemical processes. In the second part of the study, we examined the effect of AKG on the cognitive functions of mice and biochemical parameters (energy metabolism, pro-/antioxidant status, autophagy and related signaling regulatory pathways) in the cerebral cortex of mice after consumption of standard and high-calorie food.

Adult flies were maintained on nutrient medium containing different concentrations of basic components, sucrose and yeast, and 10 mM AKG (the concentration that showed a geroprotective effect in previous studies). As physiological parameters of *Drosophila*, we determined the lifespan, climbing activity,

and resistance (survival) of 25-day-old flies to various stressors. Mice consumed AKG in the form of a 1% solution of AKG sodium salt added to drinking water. The effect of AKG on the behavior of mice was assessed by conducting an open field test. The homeostasis of reactive oxygen species (ROS) in the model objects was assessed by the level of lipid peroxides, thiols, glutathione and the activity of antioxidant and related enzymes, and the expression of genes related to the antioxidant response was evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with agarose gel electrophoresis. Changes in energy status were assessed by the level of storage metabolites (glucose, glycogen, triacylglycerols), the activity of glycolytic enzymes, and the functioning of electron transport chain complexes. To evaluate autophagy, the relative steady-state levels of the autophagy-related genes were assessed by reverse transcription PCR.

In this work, it was found that exogenous AKG did not affect the lifespan of the long-lived subline *D. melanogaster* on a standard medium containing 5% sucrose and 5% yeast (5C:5D), but increased the lifespan on media with low protein and high sucrose (9C:1D). Middle-aged flies (25 days old) consuming standard medium (5C:5D) without and with the addition of 10 mM AKG for three weeks did not differ in the values of such physiological parameters as climbing activity and resistance to starvation, heat stress and chemical stressors. However, flies consuming 10 mM AKG had lower activity of some antioxidant enzymes (catalase and glutathione-S-transferase) and lower levels of triacylglycerols. At the same time, AKG did not affect the activity of enzymes that reduce NADPH<sup>+</sup>, activity of key glycolysis enzymes, functioning of the mitochondrial electron transport chain, and level of oxidative stress markers. Thus, the consumption of exogenous AKG had virtually no effect on the main energy-supplying processes, namely glycolysis and oxidative phosphorylation, but weakened antioxidant defense and prevented the accumulation of storage lipids in long-lived *D. melanogaster* flies. To test whether exogenous AKG acts through the Nrf2 signaling pathway, the transcript levels of genes controlled by this protein were evaluated. Alpha-ketoglutarate led to an increase in the relative steady-state level of



*Cyp6a2* gene mRNA, but did not affect the level of transcripts of *Ugt37A2* and *GstD2* genes. This indicates a minor effect of AKG on the Nrf2 signaling pathway.

At the next stage of our work, we evaluated the effects of AKG in adult mice consuming high-calorie diets, which are used as a factor that accelerates aging and promotes the development of metabolic disorders. For the first time, it was demonstrated that consumption of exogenous AKG with drinking water for 12 weeks can induce anxiety behavior in mice (males) on basal food and high-calorie food high in fat (lard) and fructose. In the open field test, the mice that consumed the basic food or high fat high fructose food with the addition of AKG spent less time in the inner area compared to the control group. This indicates anxious behavior and reduced exploratory activity. Similarly to fruit flies, in the cerebral cortex of mice fed AKG on basal food, markers of oxidative stress were not significantly affected, but the activities of antioxidant defense enzymes were decreased. Also, alpha-ketoglutarate did not affect glucose levels, glycolytic enzyme activity, and the functioning of mitochondrial electron transport chain complexes in the cerebral cortex of mice.

Similarly to AKG, a diet high in fat and fructose resulted in a decrease in the activity of enzymes involved in the glutathione-dependent detoxification of xenobiotics and lipid peroxidation products, namely glutathione peroxidase and glutathione S-transferase, and an increase in lipid peroxide levels and NAD(P)H:quinone oxidase 1 (NQO1) activity. The basal diet supplemented with AKG resulted in a higher ratio of reduced to oxidized glutathione, higher NQO1 activity, and higher mRNA levels of UDP-glucose-6-dehydrogenase and transcription factor EB (TFEB), which is a marker of autophagy. Both high-calorie foods high in fructose and fat and the basic food with the addition of AKG, as well as their combination, contributed to a decrease in the levels of transcripts of PDK4 (a key regulator of Krebs cycle flux), glycine-N-methyltransferase (a detoxification enzyme), PGC-1 $\alpha$  (a key regulator of Krebs cycle, mitochondrial biogenesis and  $\beta$ -oxidation of fatty acids).

In another series of experiments, the effect of AKG in combination with a cafeteria diet containing typical processed foods of the human diet was studied. In contrast to the experiment with high fat high fructose diet, in the cafeteria diet

experiment, mice (females) were first kept on a cafeteria diet for 8 weeks, and then for the next 4 weeks, a group of mice received 1% AKG with drinking water in addition to their diet. Cafeteria diet decreased antioxidant defense in the cerebral cortex of middle-aged C57BL/6J females. The addition of AKG to the basic food promoted the behavior of mice with anxiety-like symptoms. The combination of cafeteria diet and AKG enhanced behavioral changes in mice, including a decrease in exploratory activity. The strongest effect of AKG was the induction of autophagy-related genes and the target genes of FOXO protein, a transcription factor involved in the regulation of carbohydrate metabolism and antioxidant defense. We suggest that the observed effects of AKG on behavior and cellular functions may also be mediated by the activation of AKG-dependent hydroxylases and demethylases. The nutrients in the cafeteria diet may enhance this effect by preserving the AKG pool. Thus, AKG supplementation may benefit brain health by modulating oxidative stress and enhancing autophagy, although its potential to induce anxiety-like behaviors highlights the need for further research.

Thus, AKG prolongs the life of fruit flies under protein restriction, but not under normal conditions (balanced diet of proteins and carbohydrates). AKG also weakens antioxidant defense in flies and mice without affecting energy metabolism. This may indicate the absence of geroprotective properties of alpha-ketoglutarate.

Thus, AKG prolongs the lifespan of the long-lived fruit fly *Drosophila* under conditions of limited protein availability, but not under optimized conditions (balanced protein and carbohydrate nutrition). Also, AKG weakens antioxidant defense without significantly affecting energy metabolism in both flies and mice on a standard diet. At the same time, AKG can cause anxiety behavior in mice by increasing the relative steady-state level of autophagy-related genes in the cerebral cortex after consumption of chow. The addition of AKG to high-calorie food partially corrects its metabolic effects on the brain of mice, with a more pronounced protective effect of AKG on high fat high fructose diet than on the cafeteria diet. The latter fact may be related to both the composition of the food and the duration of consumption and physiological characteristics of the mice (age, sex). Taken together, the results indicate that the

geroprotective and stress-protective properties of alpha-ketoglutarate depend on the composition of the food and physiological characteristics of the model animals.

**Keywords:** alpha-ketoglutarate, aging, life span, high caloric food, cafeteria diet, brain, autophagy, antioxidant system, oxidative stress, reactive oxygen species, *Drosophila melanogaster*, mice, energy metabolism, mitochondria, behavior, nutrition.

### Список опублікованих праць за темою дисертації

#### Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

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

1. Demianchuk O., Vatashchuk M., Gospodaryov D., Hurza V., Ivanochko M., Derkachov V., Berezovskyi V., Lushchak O., Storey K.B., Bayliak M., & Lushchak V.I. High-fat high-fructose diet and alpha-ketoglutarate affect mouse behavior that is accompanied by changes in oxidative stress response and energy metabolism in the cerebral cortex. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. 2024. № 1868(1). 130521. Q1

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130521>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85180010013&origin=resultlist>

2. Demianchuk O., Lylyk M., Balatskiy V., Gospodaryov D., & Bayliak M. Alpha-ketoglutarate supplementation in long-lived *Drosophila melanogaster*: Impact on lifespan and metabolic responses. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2024. № 116(1). e22116. Q2

DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.22116>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85192910713&origin=resultlist>

*Фахові видання України (категорія Б)*

3. Demianchuk O.I. & Gospodaryov D.V. Alpha-ketoglutarate induces nuclear receptors rather than nrf2 in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Biotechnologia acta*. 2024. № 17(2). P. 27-28.

DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech17.02.027>

URL: <https://biotechnology.kiev.ua/index.php/en/journal-archive-en/2024-en/2024-no2-en/alpha-ketoglutarate-induces-nuclear-receptors-rather-than-nrf2-in-the-fruit-fly-drosophila-melanogaster-demianchuk-o-i-gospodaryov-d-v>

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Demianchuk O.I., Lylyk M.P., Bayliak M.M. Effect of alpha-ketoglutarate on pro-/antioxidant status in middle-aged *Drosophila melanogaster* // *The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the russian invaders (Kyiv, from 15 th to 17 th of June 2022). – P. 100.

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

2. Дем'янчук О.І., Лилик М.П., Шмігель Г.В., Господарьов Д.В., Байляк М.М. Вплив екзогенного альфа-кетоглутарату на тривалість життя та антиоксидантний захист *Drosophila melanogaster* // *III міжнародна науково-практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 161-162.

URL: [https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy\\_iii\\_konferentsii\\_kafedry\\_biotekhnolohii\\_nfau\\_.pdf](https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf)

3. Дем'янчук О., Лилик М., Господарьов Д. Вплив екзогенного альфа-кетоглутарату на метаболічні показники у тілі *Drosophila melanogaster* // *VIII Міжнародної конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології»* (м. Івано-Франківськ, 27–29 червня 2023 р.). – С. 27.

URL: <https://kbb.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/28/2023/06/0032-abstract-book-degb-2023.pdf>

4. Дем'янчук О., Ватащук М., Гурза В., Шмігель Г., Байляк М. Вплив дієти з високим вмістом жирів і фруктози та екзогенного альфа-кетоглутарату на про-/антиоксидантний статус в корі головного мозку мишей // *XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених*, присвячена 100-річчю від дня

народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (м. Львів, 18–19 травня 2023 р.) – С. 56.

URL: [https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2023/2/AB\\_2023\\_25\\_2.pdf](https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2023/2/AB_2023_25_2.pdf)

5. Demianchuk O., Dodon D., Gospodaryov D., Bayliak M. Effect of alpha-ketoglutarate and cafeteria diet on antioxidant enzymes and markers of autophagy in the cerebral cortex of mice // *XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 18-20 квітня 2024 р.) – С. 75-76.

URL: <https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024-2.pdf>

6. Дем'янчук О., Ватащук М., Господарьов Д., Луцак В., Байляк М. Вплив альфа-кетоглютарату на поведінку мишей, окисно-відновний баланс та автофагію в корі головного мозку на тлі кафетерійної дієти // *XXII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених*, присвячена 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава ФЕДОРУКА (м. Львів, 19–20 вересня 2024 р.) – С. 139

URL: [https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2024/3/AB\\_2024\\_26\\_3.pdf](https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2024/3/AB_2024_26_3.pdf)

## Зміст

|   |    |
|---|----|
| Перелік умовних позначень _____   | 19 |
| Вступ _____   | 21 |
| Розділ 1. Огляд літератури _____  | 27 |
| 1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> як модельний об'єкт в біогеронтології _____               | 27 |
| 1.1.1. Переваги використання <i>Drosophila melanogaster</i> у дослідженнях _____              | 27 |
| 1.1.2. Використання плодової мушки у дослідженні тривалості життя _____                       | 28 |
| 1.2. Лабораторна миша як модель біомедичних досліджень _____                                  | 29 |
| 1.2.1. Загальні відомості _____   | 29 |
| 1.2.2. Переваги лабораторної миші як модельного організму _____                               | 32 |
| 1.2.3. Лабораторні миші лінії <i>C57BL/6J</i> _____   | 33 |
| 1.2.4. Обмеження лабораторної миші як модельного організму _____                              | 35 |
| 1.3. Сигнальні шляхи, що впливають на тривалість життя _____                                  | 36 |
| 1.3.1. Інсуліновий шлях та інсуліноподібний фактор росту _____                                | 36 |
| 1.3.2. Сигнальний шлях mTOR _____   | 39 |
| 1.3.3. АМФ-активована протеїнкіназа _____   | 40 |
| 1.3.4. Сигнальний шлях Keap1-Nrf2 _____   | 42 |
| 1.4. Геропротектори _____   | 46 |
| 1.5. Альфа-кетоглютарат _____   | 49 |
| 1.5.1. Роль альфа-кетоглютарату в метаболічних процесах _____                                 | 49 |
| 1.5.2. Вплив альфа-кетоглютарату на регуляторні шляхи _____                                   | 52 |
| 1.5.3. Вплив альфа-кетоглютарату на про-/антиоксидантний статус _____                         | 54 |
| 1.5.4. Вплив альфа-кетоглютарату на автофагію _____   | 56 |
| 1.6. Моделі викликання ожиріння у гризунів _____  | 58 |
| 1.6.1. Їжа з високим вмістом жирів/вуглеводів _____   | 58 |
| 1.6.2. Кафетерійна їжа або кафетерійний раціон _____  | 59 |
| 1.7. Вплив висококалорійної їжі на мозок _____  | 61 |
| 1.7.1. Взаємозв'язок між їжею з високим вмістом жиру та когнітивними функціями у тварин _____ | 61 |

|   |    |
|---|----|
| 1.7.2. Оксидативний стрес спричинений надлишком калорій   | 63 |
| Розділ 2. Матеріали і методи  | 65 |
| 2.1. Умови утримання модельних організмів   | 65 |
| 2.1.1. Умови утримання <i>D. melanogaster</i> та дизайн експерименту  | 65 |
| 2.1.2. Умови утримання <i>M. musculus</i> та дизайн експерименту  | 67 |
| 2.2. Поведінковий тест відкритого поля  | 71 |
| 2.3. Визначення індукованої рухової активності  | 71 |
| 2.4. Визначення стійкості до теплового стресу та голодування  | 71 |
| 2.5. Визначення рівня триацилгліцеролів, глюкози та глікогену   | 72 |
| 2.6. Ферментативне визначення вільного глютамату в тканинах   | 73 |
| 2.7. Визначення вмісту пероксидів ліпідів   | 74 |
| 2.8. Визначення вмісту тіолів   | 74 |
| 2.9. Визначення рівня відновленого і окисленого глутатіону  | 75 |
| 2.10. Визначення активності гліколітичних ферментів, та НАДФН-залежних ферментів та глютамаатдегідрогенази                              | 76 |
| 2.11. Визначення активності антиоксидантних ферментів   | 77 |
| 2.12. Нативний електрофорез у поліакриламідному гелі  | 78 |
| 2.13. Прозорий нативний електрофорез (Clear native electrophoresis)   | 79 |
| 2.14. Полімеразна ланцюгова реакція з агарозним гелем електрофорезом  | 80 |
| 2.15. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі  | 81 |
| 2.16. Статистичний аналіз   | 82 |
| Розділ 3. Результати досліджень   | 84 |
| 3.1. Ефекти екзогенного альфа-кетоглутарату на фізіологічні та біохімічні показники в тілі довгоживучої сублінії <i>D. melanogaster</i> | 84 |
| 3.1.1. Вплив екзогенного альфа-кетоглутарату на тривалість життя  | 84 |
| 3.1.2. Вплив АКГ на рухову активність, стійкість до теплового шоку та голодування у довгоживучої сублінії <i>D. melanogaster</i>        | 86 |
| 3.1.3. Вплив АКГ на рівень запасних метаболітів у довгоживучої сублінії <i>D. melanogaster</i>  | 87 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.1.4. Вплив АКГ на активність гліколітичних, антиоксидантних та споріднених ферментів _____   | 88  |
| 3.1.5. Вплив АКГ на активацію експресії генів-мішеней для Nrf2 _____   | 93  |
| 3.2. Вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на когнітивні функції та біохімічні показники у корі головного мозку мишей на фоні висококалорійної їжі з високим вмістом жирів і фруктози _____      | 94  |
| 3.2.1. Дані поведінки з поведінкового тесту відкритого поля _____  | 94  |
| 3.2.2. Показники оксидативного стресу в корі головного мозку мишей _____   | 96  |
| 3.2.3. Рівень глюкози, активність гліколітичних ферментів та мітохондріальних дихальних комплексів _____   | 99  |
| 3.2.4. Експресія мішеней Nrf2, регуляторів метаболізму, мітохондріального біогенезу та автофагії _____   | 102 |
| 3.3. Вплив альфа-кетоглютарату на активність автофагії та про-/антиоксидантний статус у корі головного мозку мишей на фоні кафетерійного раціону _____   | 104 |
| 3.3.1. Вплив кафетерійного раціону та альфа-кетоглютарату на поведінку мишей _____   | 104 |
| 3.3.2. Кафетерійний раціон доповнений альфа-кетоглютаратом сприяє зниженню загального вмісту тіолів та активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів у корі головного мозку мишей _____ | 105 |
| 3.3.3. Їжа з додаванням альфа-кетоглютарату сприяє зниженню активності гексокінази та рівня вільного глютамату в корі головного мозку мишей _____  | 108 |
| 3.3.4. Їжа з додаванням альфа-кетоглютарату збільшує рівень транскриптів генів, пов'язаних з автофагією _____  | 109 |
| Розділ 4. Аналіз та узагальнення результатів _____   | 110 |
| 4.1. Вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на тривалість життя, оксидативний стрес і метаболічні процеси у <i>D. melanogaster</i> _____  | 110 |
| 4.1.1. Тривалість життя довгоживучої сублінії <i>D. melanogaster</i> на живильних середовищах з різним співвідношенням білків і вуглеводів та вплив на неї АКГ _____                             | 110 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.1.2. Вплив АКГ на локомоторну активність, тепловий шок та стійкість до голодування довгоживучої сублінії <i>D. melanogaster</i>   | 111 |
| 4.1.3. Вплив АКГ на рівень запасних метаболітів у довгоживучої сублінії <i>D. melanogaster</i>  | 112 |
| 4.1.4. Вплив АКГ на активність гліколітичних, антиоксидантних та пов'язаних ферментів   | 112 |
| 4.1.5. Узагальнення про вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на тривалість життя, фізіологічні та біологічні показники у <i>D. melanogaster</i>                            | 114 |
| 4.2. Вплив альфа-кетоглютарату на когнітивні функції та біохімічні показники у корі головного мозку мишей на фоні висококалорійної їжі з високим вмістом жирів і фруктози   | 115 |
| 4.2.1. Поведінковий тест відкритого поля  | 115 |
| 4.2.2. Показники оксидативного стресу, антиоксидантні та пов'язані з ними ферменти  | 116 |
| 4.2.3. Ферменти, що належать до шляхів енергетичного обміну   | 118 |
| 4.2.4. Рівні іРНК мішеней Nrf2, регуляторів метаболізму, мітохондріального біогенезу та автофагії   | 118 |
| 4.2.5. Узагальнення про вплив альфа-кетоглютарату на когнітивні функції та біохімічні показники у корі головного мозку мишей на фоні їжі з високим вмістом жирів і фруктози | 120 |
| 4.3. Вплив альфа-кетоглютарату на активність автофагії та про-/антиоксидантний статус у корі головного мозку мишей на фоні кафетерійного раціону                            | 121 |
| 4.3.1. Поведінкові реакції у мишей, що споживали кафетерійний раціон доповнений АКГ   | 121 |
| 4.3.2. Вплив кафетерійного раціону з додаванням альфа-кетоглютарату на активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів  | 122 |
| 4.3.3. Вплив кафетерійного раціону з додаванням альфа-кетоглютарату на активність ключових гліколітичних ферментів  | 124 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.4. Вплив кафетерійного раціону доповненого альфа-кетоглютаратом на експресію генів, що регулюють вуглеводний обмін та автофагію _____                                 | 125 |
| 4.3.5. Зв'язок між поведінкою та автофагією в корі головного мозку: можливі ефекти АКГ та кафетерійного раціону _____   | 126 |
| 4.3.6. Узагальнення про вплив альфа-кетоглютарату на активність автофагії та про-/антиоксидантний статус у корі головного мозку мишей на фоні кафетерійного раціону _____ | 127 |
| Розділ 5. Узагальнення про вплив альфа-кетоглютарату на модельні організми: плодових мух і лабораторних мишей _____   | 129 |
| Висновки _____  | 131 |
| Список використаних джерел _____  | 133 |
| Додатки _____   | 170 |

## Перелік умовних позначень

- DCPIP – 2,6-дихлорфеноліндофенол
- GCL – глютаматцистеїнлігаза
- GSH – відновлений глутатіон
- GSH/GSSG – співвідношення відновленого до окисленого глутатіону
- GSSG – окислений глутатіон
- HF/HS – їжа з високим вмістом жирів і/або вуглеводів
- HIF-1 $\alpha$  – Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit
- IGF – інсуліноподібний фактор росту
- Keap1 – Kelch-like ECH-associated protein 1
- mTOR – механістична мішень для рапаміцину
- NF- $\kappa$ B – Nuclear factor kappa B
- NQO1 – НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктаза 1
- Nrf2 – ядерний фактор еритроїдний 2-споріднений фактор 2
- O-GlcNAcylation – O-зв'язане N-ацетилглюкозамінілювання
- RT-qPCR – Кількісна ПЛР зі зворотною транскрипцією
- SASP – секреторний фенотип, який пов'язаний зі старінням
- TFEB – transcription factor EB
- TORC1 – механістична мішень для рапаміцину, комплекс 1
- UGDH – UDP-глюкозодегідрогеназа
- АДФ – аденозиндифосфат
- АКГ – альфа-кетоглютарат
- АМФ – аденозинмонофосфат
- АМФК – АМФ-активована протеїнкіназа
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активні форми кисню
- ВКІ – висококалорійна їжа
- GST – глутатіон-S-трансфераза
- ГАМК –  $\gamma$ -аміномасляна кислота

ГДГ – глютаматдегідрогеназа  
ГК – гексокіназа  
ГПК – гідропероксид кумену  
ДТНБ – 2-нітро-5-тіобензоатна кислота  
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота  
ІДГ – ізоцитратдегідрогеназа  
іРНК – інформаційна рибонуклеїнова кислота  
КГС3 – кіназа глікогенсинтетази 3  
КР – кафетерійний раціон  
ЛДГ – лактатдегідрогеназа  
МДГ – малатдегідрогеназа  
НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений  
НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений  
ПК – піруваткіназа  
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція  
ПОЛ – пероксиди ліпідів  
СОД – супероксиддисмутаза  
ТАГ – триацилгліцероли  
ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид  
ФФК – фосфофруктокіназа

## Вступ

**Актуальність теми.** Геропротектори є фармакологічними та нефармакологічними агентами, які здатні впливати на фундаментальні механізми старіння, потенційно сповільнюючи розвиток асоційованих з віком патологій та подовжуючи тривалість життя [1]. Дослідження впливу геропротекторів набуває все більшої актуальності в контексті глобальних демографічних змін і розвитку біogerонтології. За прогнозами ВООЗ, до 2050 року частка населення віком понад 60 років зросте з 12% до 22% [2]. Це зумовлює необхідність розробки стратегій для забезпечення здорового старіння та зниження важкості асоційованих з віком захворювань.

До потенційних механізмів впливу геропротекторів відносять зниження інтенсивності оксидативного стресу, покращення мітохондріальної функції та регуляцію автофагії. Усі ці характеристики, ймовірно, можуть бути притаманними альфа-кетоглютаратові (АКГ). Це кетокислота, що є проміжним метаболітом багатьох біохімічних процесів, зокрема є інтермедіатом циклу трикарбонових кислот та впливає на регуляторні шляхи [3]. Для перевірки геропротекторних властивостей АКГ використовувалися модельні об'єкти різного рівня організації. Було показано, що екзогенний АКГ збільшував середню тривалість життя нематод *Caenorhabditis elegans* [4]. Також встановлено, що плодові мушки *Drosophila melanogaster*, які вирощувалися з личинкової стадії на середовищі з 10 мМ АКГ, теж жили довше, ніж контрольна група [5].

Для підтвердження геропротекторних властивостей АКГ необхідні дослідження про вплив екзогенного АКГ безпосередньо на дорослих особин мух *Drosophila melanogaster* та більш високоорганізованих організмів – мишей *Mus musculus*. Хоча вже є деякі дослідження на лабораторних мишах щодо ефектів АКГ на тривалість життя, але їх не достатньо для того, щоб визначити причинний механізм, який лежить в основі впливу АКГ на довголіття [6].

Ожиріння та зумовлені ним метаболічні порушення є одним з факторів, що прискорюють процеси старіння. Ожиріння супроводжується збільшенням продукції прозапальних цитокінів й активацією NF-κB сигнального шляху, які, натомість, призводять до розвитку оксидативного стресу і пошкодження біомолекул (білків, ДНК) [7]. Насамперед від таких процесів страждає головний мозок. Це супроводжується втратою когнітивних функцій та розвитком нейродегенеративних захворювань (таких як хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона) [8]. АКГ може покращити стан спричинений ожирінням через активацію антиоксидантних процесів та автофагії [3]. Окрім того, на плідній м'язі було показано, що АКГ може сприяти зменшенню рівня триацилгліцеролів (основних запасних ліпідів) [9].

**Зв'язок цієї роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу проводили з 2021 до 2025 р. на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, і вона є частиною наукової тематики кафедри «Інтермедіати фенілпропаноїдного шляху як речовини для продовження тривалості і якості життя» (№ держреєстрації – 0120U104755, 21 жовтня 2020 – 31 грудня 2021, травень-листопад 2023). Дисертант був співвиконавцем проєкту та проводив частину досліджень. Також робота частково профінансована у рамках проєктів 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) та «Пошук маркерів посттравматичного стресового розладу на основі показників оксидативного стресу та запалення» (№ держреєстрації – 0123U101790, з 27 березня 2023 по 31 грудня 2025 року)

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було оцінити здатність екзогенного альфа-кетоглютарату (АКГ) модулювати тривалість життя, поведінку та метаболізм у модельних тварин, плідної мушки та лабораторних мишей, за умов фізіологічного, уповільненого або прискореного старіння.

*Завдання роботи:*

1. Дослідити вплив АКГ на тривалість життя довгоживучої сублінії *D. melanogaster*.

2. Дослідити вплив АКГ на стійкість до теплового стресу і голодування, рухову активність, енергетичний метаболізм, маркери оксидативного стресу та антиоксидантну активність у довгоживучої сублінії *D. melanogaster*.

3. Дослідити поведінкові реакції у тесті відкритого поля у мишей, які споживали АКГ разом з базовою або висококалорійною їжею, їжею з високим вмістом жирів та фруктози (ВКЇ), чи раціоном харчування на основі кафетерійних продуктів раціону людини (КР).

4. Дослідити вплив споживання екзогенного АКГ у комбінації з базовою чи висококалорійною їжею на показники енергетичного метаболізму, про-/антиоксидантного статусу, маркери автофагії у корі головного мозку мишей.

*Об'єкт дослідження* – біохімічні процеси у плодових мушок *D. melanogaster* і лабораторних мишей *M. musculus*.

*Предмет дослідження* – тривалість життя, показники фізіологічного старіння, поведінка та біохімічні показники (показники енергетичного метаболізму, оксидативного стресу, антиоксидантного захисту, автофагії та регулятори метаболізму) у лабораторних тварин на фоні споживання базової або висококалорійної їжі з додаванням АКГ.

*Методи дослідження* включали *фізіологічні* (визначення тривалості життя мух, індукованої рухової активності, стійкості до голодування і теплового стресу в мух, оцінка поведінки мишей у тесті відкритого поля), *біохімічні* (визначення вмісту метаболітів (глюкози, глікогену, триацилгліцеролів, глютамату і загального білку), активностей антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глютатіонпероксидази, глютатіонредуктази, глютатіон-S-трансферази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, НАД(Ф)Н-залежної хіноноксидоредуктази 1), активностей ключових ферментів шляхів катаболізму глюкози (гексокінази, фосфофруктокінази, піруваткінази, лактатдегідрогенази), активностей комплексів мітохондріального електронтранспортного ланцюга,

маркерів оксидативного стресу (рівнів пероксидів ліпідів, окисленого та відновленого глутатіону, тіолів)), *молекулярно-біологічні* методи (оцінка транскрипції генів методом ПЛР, вестерн блот, гель-електрофорез білків) та методи *математичної статистики*.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У цій роботі вперше показано, що екзогенний АКГ не впливає на тривалість життя, функціональне старіння та показники енергетичного метаболізму та показники про-/антиоксидантного статусу у довгоживучих мух *D. melanogaster* за споживання збалансованого раціону. Водночас, АКГ збільшував тривалість життя мух довгоживучої сублінії на середовищах з низьким вмістом білків і високим вмістом сахарози.

Вперше показано, що АКГ викликає тривожну поведінку у мишей, як у самців, так і самок, на тлі споживання як стандартної їжі, так і висококалорійних раціонів – їжі з високим вмістом жиру (смальцю) та фруктози та кафетерійного раціону. Встановлено, що додавання АКГ до базової їжі спричиняє зменшення активності антиоксидантних ферментів й активацію автофагії у корі головного мозку мишей; на тлі висококалорійних раціонів, ці ефекти АКГ послаблюються. Це дослідження розширює розуміння механізмів дії АКГ на про-/антиоксидантні процеси та захисні механізми у мозку.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати розширюють уявлення про вплив АКГ на тривалість життя та здорове старіння мозку. Отримані результати допоможуть зрозуміти те, що деякі препарати можуть по різному діяти на різні модельні об'єкти. Визначення властивостей АКГ можуть допомогти в майбутньому в розробці біологічно активних додатків, які допоможуть сповільнити процеси старіння.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційне дослідження виконано під керівництвом професора кафедри біохімії та біотехнології доктора біологічних наук Володимира Луцака. Дисертант самостійно здійснив пошук та аналіз наукової літератури за тематикою дисертаційного дослідження, виконав експериментальну роботу, здійснив статистичний аналіз даних, валідацію 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 В. Луцаком за консультативної допомоги доктора біологічних наук, професорки Марії Байляк. Технічну допомогу у виконанні експериментальної частини роботи надавали студенти та працівники кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Співучасть у виконанні цієї роботи закордонних колег, студентів та співробітників кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника висвітлена у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були представлені на конференціях: All-ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the russian invader (Київ, 2022), VIII Міжнародній конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології» (Івано-Франківськ, 2023), III міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 2023), XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (Львів, 2023), XXII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава Федорука (Львів, 2024), XX міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2024), щорічних звітних наукових конференціях Прикарпатського національного університету ім. Василя Стефаника.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковані 9 праць, зокрема дві статті – у міжнародних наукових виданнях, які індексуються наукометричними базами даних Scopus та Web of Science та відносяться до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal, одна стаття

опублікована в науковому фаховому виданні категорії «Б», та 6 тез доповідей наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел. Робота викладена на 167 сторінках та містить 24 рисунки і 5 таблиць.

## Розділ 1. Огляд літератури

### 1.1. *Drosophila melanogaster* як модельний об'єкт в біогеронтології

#### 1.1.1. Переваги використання *Drosophila melanogaster* у дослідженнях

Плодова мушка (*Drosophila melanogaster*) – відомий і перевірений модельний організм у біологічних і генетичних дослідженнях. Першим використав плодову мушку як модельний об'єкт у генетичних дослідженнях американський генетик Томас Хант Морган. Він встановив основи класичної генетики, зокрема концепцію генів як одиниць спадкової інформації, які розташовані на хромосомах [10]. За свої дослідження Томас Хант Морган отримав Нобелівську премію з фізіології або медицини в 1933 році.

Плодова мушка стала ключовою моделлю для проведення експериментів, спрямованих на вивчення харчових продуктів, раціону харчування та дії біологічно активних речовин. Це дозволяє отримувати нові знання про механізми, що лежать в основі цих процесів. Передусім це зумовлено низкою переваг, які надає використання плодової мушки в дослідженнях:

1) Короткий життєвий цикл: повний цикл розвитку від яйця до імаго триває близько 10-12 днів, а середня тривалість життя імаго близько 50-60 днів. Це дозволяє швидко проводити експерименти [11].

2) Легкість утримання: мушки невибагливі, їх легко і недорого утримувати в лабораторних умовах [11].

3) Статевий диморфізм дає можливість легко розрізнити і розділити мух за статтями.

4) Висока плодючість: одна самка може відкласти сотні яєць, забезпечуючи великі вибірки для досліджень [12].

5) Дуже висока спорідненість з геномом людини, що дає можливість інтерпретувати результати на людину. Геном плодової мушки складається з близько 13600 генів [13] і на 60% подібний до людського геному.

Незважаючи на переваги, у плодової мушки є ряд недоліків, які обмежують її застосування у біологічних дослідженнях. Однією з головних проблем є значні фізіологічні та морфологічні відмінності між мухами та ссавцями. Це ускладнює екстраполяцію результатів на людину або інших ссавців. Також мухи є менш придатною моделлю для вивчення складних нейрофізіологічних процесів, таких як соціальна поведінка або когнітивні функції, у порівнянні з тваринами, що мають більш розвинену нервову систему (наприклад, мишами) [14].

### 1.1.2. Використання плодової мушки у дослідженні тривалості життя

Дрозодфіла використовується в генетичних дослідженнях протягом десятиліть, але лише нещодавно вона стала цікавою для вивчення впливу харчування на фізіологічні та біохімічні показники. За останні 10 років помітно зросла кількість публікацій, які досліджують вплив харчових факторів на тривалість життя, фізичну форму, плодючість та розвиток дрозодфіли.

Плодова мушка, як згадувалося раніше, має ряд переваг використання її у дослідженнях, що робить її зручним модельним організмом для вивчення ймовірних змін тривалості життя, спричинених дієтичними факторами [15]. Завдяки швидкому розмноженню можна в межах декількох місяців отримати великі за кількістю когорти мух, а завдяки короткому життєвому циклу можна швидко перевірити вплив певних дієт або біологічних добавок на тривалість життя всієї популяції.

Крім того, існує велика кількість мутантних ліній, які можна використовувати для дослідження впливу генетичних змін на фізіологічні та біохімічні показники. Подібно до людей, самки в середньому живуть довше, ніж самці [16], самки мух часто демонструють довшу тривалість життя, ніж самці [17]. Тривалість життя залежить від генотипу, плодючості самок і шлюбного статусу [18]. До того ж, самці і самки *D. melanogaster* з одного і того ж штаму демонструють різні ефекти щодо тривалості життя, які залежать від харчування і додавання в раціон біологічно активних речовин. Нещодавні дослідження

різних ізольованих рослинних сполук, комплексних екстрактів рослин та макроелементів не виявили їхньої здатності впливати на тривалість життя. Дослідники повинні враховувати, що різні штами мух демонструють відмінності у генетично обумовленій тривалості життя та чутливості до дієтичних втручань. Тому рекомендується використовувати різні концентрації речовин і тестувати різні лінії мух у дослідження харчових втручань. Важливо, що як дорослі особини, так і личинки дрозофіли демонструють здатність до навчання і пов'язують їжу з її поживною цінністю та смаковими якостями, що призводить до вживання або уникнення певної їжі. Оскільки ця здатність може спричинити плутанину, особливо в довготривалих експериментах з годуванням, таких як визначення тривалості життя, рекомендується проводити смакові тести та тести на вибір. Окрім того, харчові звички личинок можуть впливати на фенотип імаго *D. melanogaster*. Було показано, що додавання високого вмісту вуглеводів, наприклад, сахарози і фруктози, до раціону харчування може викликати ожиріння у дорослих плодових мух [19,20]. Тому, варто розглянути найбільш придатний склад раціону при плануванні досліджень з харчування з урахуванням бажаного фенотипу й дослідницького питання.

## **1.2. Лабораторна миша як модель біомедичних досліджень**

### **1.2.1. Загальні відомості**

Хатня миша (*Mus musculus*) типовий синантропний вид, тісно пов'язаний з людиною і часто мешкає в будинках, на складах, фермах та інших антропогенних ландшафтах. Цей невеликий гризун, що зазвичай важить від 20 до 30 грамів, став основою біологічних та біомедичних досліджень. Дорослі особини *Mus musculus* мають довжину тіла від шести до десяти сантиметрів, з додатковими від семи до десяти сантиметрами на хвіст. Вони мають хутро від сірого до коричневого кольору [21].

Лабораторна миша особливо цінується в дослідженнях завдяки своєму швидкому репродуктивному циклу і генетичній схожості з людиною. Миші досягають статевої зрілості приблизно у віці 6-8 тижнів, а самки можуть приносити великі приплоди від 6 до 12 мишенят кожні 3-4 тижні, після періоду вагітності, який триває від 19 до 21 дня [22]. Така висока швидкість розмноження в поєднанні з відносно короткою тривалістю життя (від 1 до 3 років) робить їх ідеальними для досліджень у кількох поколіннях [23].

Миша була одним з перших ссавців, чий геном був повністю секвенований, що надає дослідникам великий генетичний ресурс. Геном *Mus musculus* є висококонсервативним для всіх ссавців, що робить його зручною моделлю для вивчення генетики людини, біології розвитку та біологічних дисфункцій [24].

Миша зробила безпрецедентний внесок у численні наукові відкриття та досягнення в різних галузях. Миші як модельний організм почали використовувати в біологічних дослідженнях ще в кінці XIX століття. Першим, хто систематично застосував мишей для наукових цілей, вважається французький біолог Луї Пастер, який у 1880-х роках використовував їх у дослідженнях інфекційних захворювань [25]. Ранні дослідження кінця 1800-х – початку 1900-х років були зосереджені на їхній репродуктивній біології та генетиці.

Однією з основоположних праць у ранньому використанні мишей як модельних організмів є робота Люсьєна Кюєно, опублікована в 1902 році. Його робота продемонструвала менделівське успадкування забарвлення шерсті мишей, забезпечивши критичний зв'язок між принципами Менделя і генетикою ссавців, і зробила мишей моделлю для генетичних досліджень [26].

Становлення миші як важливого модельного організму розпочалося на початку 20-го століття зі значними досягненнями в генетиці та селекції протягом 1920-х і 1930-х років. У 1909 році Кларенс Кук Літл розробив перший інбредний штаб мишей, відомий як DBA, який мав вирішальне значення для вивчення генетичних ознак і захворювань. Літл детально описав успадкування мутацій кольору шерсті у мишей, заклавши фундаментальні знання для генетичних

досліджень і продемонструвавши, як можна систематично вивчати успадковані ознаки [27].

Літгл відіграв ключову роль у створенні штаму *C57BL/6*, який став одним з найбільш широко використовуваних інбредних штамів у дослідженнях. Цей штам забезпечив послідовне генетичне тло для численних досліджень, що зробило його безцінним для генетичних і біомедичних досліджень. Його робота мала вирішальне значення для стандартизації штамів мишей, що значно підвищило точність і відтворюваність експериментів і генетичних досліджень, зробивши можливим вивчення генетичних захворювань і ознак з більшою точністю.

Протягом 1950-х та 1960-х років миша все більше закріплювала свої позиції як модельний організм у генетичних дослідженнях. Значний внесок у цей процес зробила Лабораторія Джексона, заснована в 1929 році. Її дослідження сприяли стандартизації штамів лабораторних мишей та розширили спектр їх застосування в генетичних експериментах [28].

Поява трансгенних і нокаутних мишей у 1980-х роках зробила революцію в цій галузі. У 1981 році Френк Раддл, Френк Костантіні та Елізабет Лейсі разом з Ральфом Л. Брінстером та Річардом Палмітером продемонстрували передачу генетичного матеріалу наступним поколінням мишей [29,30]. Ця робота заклала основу для створення трансгенних мишей.

Пізніше, у 1980-х роках, Маріо Капеккі та Олівер Смітіс розробили методи створення нокаутних мишей, що сприяло подальшому розвитку цієї галузі. Новаторська робота Маріо Капеккі над нокаутними мишами була детально описана в кількох ключових публікаціях. Одна з найвідоміших робіт має назву «Сайт-спрямований мутагенез шляхом таргетування генів у стовбурових клітинах, отриманих з ембріонів мишей», опублікована в 1987 році [31]. Ця робота, разом з роботами Мартіна Еванса та Олівера Смітіса, заклала основу для створення нокаутних мишей і принесла їм Нобелівську премію з фізіології та медицини в 2007 році [32,33]. З тих пір генетично модифіковані миші стали

важливими інструментами для вивчення функції генів і моделювання людських хвороб.

### 1.2.2. Переваги лабораторної миші як модельного організму

Лабораторна миша (*Mus musculus*) є одним із найбільш використовуваних модельних організмів у сучасній біомедичній науці. Її універсальність зумовлена рядом біологічних, генетичних і експериментальних переваг, які дозволяють застосовувати цей модельний організм для досліджень у таких галузях, як генетика, нейробиологія, імунологія, онкологія та багато інших.

Однією з ключових переваг миші є висока схожість її геному з геномом людини. Геном миші був повністю секвенований на початку 2000-х років, і було встановлено, що приблизно 85% її генів мають гомологи у людини [24]. Це дозволяє ефективно моделювати людські захворювання та проводити дослідження, спрямовані на розуміння механізмів їх виникнення. Генетичні інструменти, такі як технологія CRISPR-Cas9, дозволяють створювати трансгенні мишачі моделі, в яких змінюються окремі гени для вивчення їх функції або внесення мутацій, що характерні для людських патологій [34].

Крім того, миші характеризуються коротким життєвим циклом і високою репродуктивною здатністю. Період вагітності у мишей становить лише 19–21 день, а статевозрілість досягається у віці 6–8 тижнів [35]. Це дає змогу проводити багатопокілнні експерименти за відносно короткий період часу, що є важливим для вивчення генетичних ефектів, старіння, епігенетичних змін тощо.

Лабораторні миші добре адаптовані до умов утримання у віваріях, а стандартизовані лінії, такі як *C57BL/6*, *BALB/c* та інші, забезпечують мінімізацію генетичної варіабельності в експериментах [36]. Це дає можливість отримувати надійні та відтворювані результати, що є важливим аспектом для зменшення експериментальних похибок. До того ж, утримання мишей є економічно вигідним порівняно з більшими лабораторними тваринами, такими як щури чи



примати, що дозволяє використовувати їх у великих кількостях для статистично значущих досліджень.

Миші також відіграють важливу роль у фармакологічних дослідженнях і тестуванні нових лікарських засобів. Наприклад, численні моделі, що імітують онкологічні захворювання, метаболічні розлади (зокрема діабет і ожиріння) та нейродегенеративні патології (хвороба Альцгеймера, Паркінсона), дозволяють тестувати ефективність і безпечність терапевтичних стратегій [37]. Завдяки мишам стало можливим вивчення молекулярних механізмів старіння, процесів регенерації тканин, роботи імунної системи та багато іншого.

Окрему увагу слід приділити їх використанню у дослідженні впливу харчування і навколишнього середовища. Завдяки контрольованим умовам утримання можна вивчати взаємодію генетичних і зовнішніх факторів, що формують фенотип. Наприклад, миші, які споживають висококалорійну їжу, використовуються для вивчення ожиріння, інсулінорезистентності та інших порушень енергетичного обміну [38].

Усе це разом забезпечує лабораторній миші статус універсального модельного організму, який поєднує генетичну подібність до людини, експериментальну гнучкість, економічну доцільність і високий рівень адаптації до лабораторних умов.

### **1.2.3. Лабораторні миші лінії *C57BL/6J***

Миші лінії *C57BL/6J* є однією з найбільш поширених та широко використовуваних інбредних ліній у біомедичних дослідженнях. Їх популярність зумовлена низкою біологічних та експериментальних характеристик, які забезпечують універсальність цієї моделі у вивченні молекулярних, фізіологічних та поведінкових аспектів.

Назва інбредної лінії лабораторних мишей *C57BL/6J* містить інформацію про походження, генетичну історію та специфіку її розведення. Перша літера "С" вказує на те, що ця лінія була створена американським генетиком Кларенсом

Літлом (Clarence Little), який у 1920-х роках заснував численні інбредні лінії лабораторних мишей. Число "57" позначає порядковий номер конкретної інбредної лінії, виділеної Літлом у процесі розведення. Ця нумерація використовувалася для позначення кожної нової стабілізованої генетичної лінії.

Скорочення "BL" є аббревіатурою від слова "Black" і вказує на фенотипічну ознаку цієї лінії — чорне забарвлення шерсті. Така позначка є типовою для багатьох ліній лабораторних мишей і використовується для їхньої візуальної ідентифікації. Цифра "6" після символу "/" означає шосту сублінію, що була виділена в результаті додаткових поколінь інбридингу для досягнення стабільності генетичного фону. Це позначення допомагає відстежувати походження сублінії в межах певної лінії.

Останній символ "J" вказує на Jackson Laboratory, одну з провідних установ США, яка займається підтримкою, розведенням та розповсюдженням лабораторних мишей. Саме в цьому інституті лінія *C57BL/6J* була стандартизована та підтримується як основна референтна лінія для багатьох досліджень.

Генетична однорідність *C57BL/6J* дозволяє мінімізувати варіабельність між особинами, що є критично важливим для проведення експериментів із високим рівнем відтворюваності. Ця лінія була однією з перших, геном якої був секвенований у рамках міжнародного проекту з вивчення генетичної структури мишей, що сприяло створенню генетичних карт для порівняння з людським геномом [24].

Миші *C57BL/6J* демонструють стабільну реакцію на різноманітні експериментальні впливи, що робить їх оптимальною моделлю для дослідження багатьох патологічних станів, включаючи ожиріння, діабет, серцево-судинні захворювання, нейродегенеративні розлади та ракові захворювання [39]. Зокрема, вони мають високу чутливість до дієт з високим вмістом жирів, що дозволяє використовувати їх у метаболічних дослідженнях.

*C57BL/6J* також широко застосовуються у поведінкових дослідженнях завдяки стабільному поведінковому профілю, зокрема у тестах на просторове

навчання, пам'ять та стресові реакції [40]. Крім того, ця лінія використовується як фонові модель для створення численних трансгенних та нокаутних ліній, що значно розширює її застосування в генетичних дослідженнях [37].

Таким чином, миші лінії *C57BL/6J* залишаються незамінним інструментом сучасної експериментальної біології, забезпечуючи унікальну можливість для вивчення молекулярних і системних механізмів різноманітних захворювань.

#### **1.2.4. Обмеження лабораторної миші як модельного організму**

Попри численні переваги, лабораторна миша (*Mus musculus*) як модельний організм має певні обмеження, які необхідно враховувати при інтерпретації експериментальних результатів та їхньому перенесенні на людську фізіологію.

Однією з основних проблем є генетична та фізіологічна відмінність між мишами і людьми. Хоча близько 85% генів мишей мають гомологи у людському геномі, відмінності у регуляції генів, епігенетичних механізмах та експресії генів часто обмежують можливість екстраполяції отриманих даних [41]. Наприклад, імунна система мишей значно відрізняється від людської, що ускладнює моделювання автоімунних захворювань та розробку імунотерапевтичних підходів [42].

Метаболічні процеси у мишей також суттєво відрізняються. Зокрема, вони проходять значно швидше, ніж у людей, що впливає на дослідження фармакокінетики та токсикології лікарських засобів. Це створює труднощі у переносі отриманих даних на клінічну практику, оскільки препарати, які демонструють ефективність у мишей, можуть виявляти токсичність або низьку ефективність у людській популяції [43].

Іншим важливим аспектом є умови утримання мишей у лабораторіях. Вони перебувають у стандартизованому середовищі з контрольованими параметрами, такими як температура, освітлення та харчування. Це може значно відрізнятися від реальних умов життя людей і, відповідно, впливати на фізіологічні процеси,

включаючи реакцію на стресові фактори чи вплив навколишнього середовища [36].

Окрім того, інбредні лінії, такі як *C57BL/6J*, характеризуються генетичною однорідністю, що знижує варіативність експериментальних даних. Однак це обмежує можливості моделювання генетичної різноманітності, характерної для людської популяції. Таке обмеження є критичним для вивчення патологій пов'язаних з нервовою системою [44].

Ще одним значущим аспектом є біоетичні обмеження використання лабораторних тварин, зокрема дотримання принципів 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Цей підхід спрямований на зменшення кількості використаних тварин, вдосконалення експериментальних методів для мінімізації страждань та заміну тварин альтернативними моделями там, де це можливо [45]. Дотримання цих принципів є обов'язковим при роботі з лабораторними хребетними тваринами. Однак для безхребетних модельних організмів, таких як *D. melanogaster*, правило 3R не поширюється. Це дозволяє використовувати плодову мушку у великій кількості експериментів без обмежень щодо кількості особин чи маніпуляцій, що значно розширює її застосування в біологічних і генетичних дослідженнях.

Таким чином, хоча миші є важливим інструментом у біомедичних дослідженнях, їх використання потребує критичного підходу з урахуванням фізіологічних, генетичних і біоетичних обмежень. Паралельне використання безхребетних моделей, таких як *D. melanogaster*, може частково компенсувати ці обмеження за рахунок унікальних переваг безхребетних організмів.

### **1.3. Сигнальні шляхи, що впливають на тривалість життя**

#### **1.3.1. Інсуліновий шлях та інсуліноподібний фактор росту**

Інсуліновий шлях і інсуліноподібний фактор росту (IGF) відіграють ключову роль у регуляції метаболізму, росту і тривалості життя в різних

організмів, включаючи ссавців, комах та нематод. Зокрема, інсуліноподібні сигнальні шляхи інтегрують сигнали про доступність поживних речовин та енергетичний баланс, що впливає на процеси старіння та розвиток вікових патологій [46].

Основними компонентами інсулінового шляху є рецептори інсуліну та IGF, які активують внутрішньоклітинну каскадну сигналізацію через фосфатидилінозитол-3-кіназу (PI3K) і протеїнкіназу В (Akt). Цей каскад впливає на активність транскрипційного фактора FOXO, який регулює експресію генів, залучених до антиоксидантного захисту, апоптозу, а також механізмів репарації ДНК [47]. У пригніченому стані інсулінового шляху FOXO залишається активним, що сприяє збільшенню тривалості життя.

Дослідження на модельних організмах підтверджують важливість цього шляху у контролі старіння. Наприклад, мутації у генах, пов'язаних з інсуліноподібним сигналюванням, такі як *daf-2* у *Caenorhabditis elegans*, збільшують тривалість життя черв'яків удвічі [48]. Аналогічні ефекти спостерігаються у *D. melanogaster* при зниженні активності інсулінових рецепторів або факторів, що відповідають за їхню активацію [49].

У ссавців сигнальна система IGF є важливою для росту й розвитку, однак її гіперактивність у дорослому віці пов'язана з підвищеним ризиком онкологічних захворювань, метаболічного синдрому та скороченням тривалості життя [50]. Наприклад, у мишей з дефіцитом рецепторів GH (гормону росту), який регулює секрецію IGF-1, спостерігається значне збільшення тривалості життя, що супроводжується зниженням рівня системного запалення та оксидативного стресу [51].

Крім того, вплив інсулінового шляху на тривалість життя підтверджується дослідженнями, що вивчають ефекти калорійного обмеження. Обмеження калорійності дієти сприяє зниженню активності IGF та інших пов'язаних сигнальних шляхів, що стимулює аутофагію, репарацію клітин і уповільнює старіння [52].

У плодової мухи є кілька генів, пов'язаних з довголіттям, які регулюються поживно-залежними сигнальними шляхами (таким як інсуліновий шлях) і на які може впливати обмеження калорійності. На експресію цих генів можуть впливати вторинні рослинні метаболіти та поживні речовини, що призводить до модифікації тривалості життя. До перспективних генів-кандидатів належать спаргель (*srl*), сиртуїн 2 (*sir2*), *chico*, мафусаїл (*mth*) і forkhead box O (*foxo*). Таким чином, як індукція, так і пригнічення експресії цих генів може змінити тривалість життя плодової мухи. Підвищення рівня транскриптів *foxo*, *srl* і *sir2* і зниження транскрипції генів *chico* і *mth* збільшує тривалість життя.

Надмірна експресія *srl*, що є ортологом *PGC1* ссавців у дрозоді, асоціюється зі збільшенням тривалості життя у плодових мух. Індукція транскрипції *srl* у стовбурових клітинах кишківника особливо корелює зі значним збільшенням тривалості життя [53], тоді як зниження експресії *srl* призводить до зменшення тривалості життя [54]. Подібним чином, *sir2*, ортолог сиртуїну 1 ссавців, залучений до регуляції тривалості життя дрозоді, оскільки зниження експресії гену *sir2* спричиняє ранню летальність [55], тоді як помірні гіперекспресія гену *sir2*, особливо в жировому тілі та нейронах, продовжує тривалість життя плодових мушок [56,57]. Важливо, що експресія іРНК як *srl*, так і *sir2* може бути індукована додаванням в раціон харчування рослинних біологічно активних речовин, наприклад, екстракту зеленого чаю (що більше ніж на 90% складався з епігалокатехін-3-галату) [58] та ізофлавоноу прунетину (що відноситься до класу ізофлавононів, які виявляють фітоестрогенні властивості) [59], які сприяють продовженню тривалості життя плодових мушок. *Foxo* дрозоді, ортолог *Foxo3a* ссавців, продовжує тривалість життя, коли його експресія активується виключно в перичеребральному жировому тілі, що призводить до зменшення транскрипції інсуліноподібного пептиду 2 (dILP2) в нейронних клітинах, що виробляють інсулін [60]. Аналогічно, тривалість життя продовжується при надмірній експресії *foxo* в черевному жировому тілі мухи [61]. Надмірна експресія *foxo* інгибує сигнальний шлях, схожий на сигнальний шлях інсуліну/інсуліноподібного фактору росту, і, таким чином, збільшує

тривалість життя. Таким чином, індукція *foxo* в ранньому дорослому віці у мух найефективніше продовжує тривалість життя, як порівняти з надмірною регуляцією *foxo* у старшому віці [62]. І навпаки, втрата експресії *chico*, субстрату інсулінових рецепторів у дрозоділі, призводить до збільшення тривалості життя [49]. Аналогічно, тривалість життя дрозоділі збільшується, коли мухи несуть вкорочену версію гену *mth* [63] або коли експресія *mth* порушується за допомогою специфічних інгібіторів [64]. Слід зазначити, що ефекти *mth*, ймовірно, збільшують тривалість життя дрозоділі через активацію FoxO [65].

### 1.3.2. Сигнальний шлях mTOR

Механістична мішень для рапаміцину (англійською Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)) – це чутлива до амінокислот сигнальна кіназа, яка відіграє важливу роль у різних аспектах функціонування клітини [66]. Вперше mTOR був досліджений у *Saccharomyces cerevisiae* трьома науковцями Джозефом Хейтманом, Рао Моввою та Майклом Холлом у 1991 році як результат незалежного досліджень рапаміцину [67].

Було показано, що інгибування mTOR призводить до збільшення тривалості життя *Drosophila melanogaster* [68]. Також зниження функції mTOR збільшує тривалість життя інших модельних організмів, зокрема дріжджів [69], нематод [70] та мишей [71].

mTOR, як правило, вважається основною амінокислото-чутливою та сигнальною молекулою в клітинах, і тому не дивно, що вона тісно пов'язана з тривалістю життя у відповідь на зміни в складі макроелементів у раціоні харчування. Зокрема, у мух високий вміст дріжджів у раціоні харчування (єдиного джерела білку для мух) або підвищений вміст амінокислот у раціоні призводили до зниження тривалості життя, а активація супресора mTOR TSC2 або додавання в раціон рапаміцину (інгібітора mTOR) долало ефект скорочення тривалості життя [68,72,73]. Подібний зв'язок між вмістом білку в раціоні харчування, функцією mTOR та тривалістю життя був також виявлений у мишей

[74]. У нещодавньому мета-аналізі 29 експериментів з вивчення тривалості життя мишей із застосуванням рапаміцину було виявлено, що він надійно продовжує тривалість життя, але розмір ефекту залежить від статі (більший ефект у самок, ніж у самців) та генетичного фону [75].

Пригнічення mTOR призводить до загального зменшення трансляції, а також до активації автофагії – двох добре вивчених явищ, які, як вважають, призводять до збільшення тривалості життя за рахунок посилення протеостазу [76]. Ця дедалі популярніша концепція охоплює позитивні ефекти багатьох втручань, спрямованих на збільшення тривалості життя в різних модельних організмах, і, таким чином, кваліфікується як одна з дев'яти ознак старіння [77]. Найбільш вивченими молекулярними мішенями фосфорилування mTOR є активатор трансляції S6 кіназа та репресор трансляції 4EVP. Було показано, що пригнічення S6 кінази призводить до продовження тривалості життя як у мух [68], так і у мишей [78]. Білок 4EVP також був ідентифікований у плодовій мушки як такий, що бере участь у продовженні тривалості життя від дії рапаміцину [72]. Функціональна автофагія призводить до збільшення тривалості життя при додаванні в їжу рапаміцину [72], а збільшення експресії компонентів автофагії ATG1 або ATG8a теж впливає на продовження тривалості життя мух. Таким чином, дієтичне та/або медикаментозне лікування, спрямоване на посилення автофагії, стало привабливою перспективою для здорового старіння.

### 1.3.3. АМФ-активована протеїнкіназа

АМФ-активована протеїнкіназа (АМФК) визначає енергетичний статус клітини шляхом моніторингу співвідношення рівнів АМФ і АДФ до рівня АТФ (АМФ + АДФ:АТФ) і є критично важливою для збалансування катаболічних і анаболічних процесів у клітині. У мух зниження активності АМФК призводить до чутливості до голоду, гіперактивності, гіперфагії та аномального накопичення ліпідів – все це вважається ознаками того, що мухи відчувають симптоми легкого голодування через незбалансоване використання енергетичних запасів [79].



Надмірна експресія АМФК призводить до збільшення тривалості життя у плодової мушки [80]. Було показано, що в мух підвищення рівня регуляції альфа-субодиниці АМФК у жировому тілі, м'язах [80], нейронах або кишківнику [81] подовжує тривалість життя. Цікаво, що нейронально-специфічна надмірна експресія АМФК призводить до посиленої автофагії нейронів і вимагає її для продовження життя, а також посиленої автофагії та затримки бар'єрної дисфункції в старіючому кишківнику [81]. Це пов'язано зі зниженням рівня  $ipr2$ , що дозволяє припустити, що зниження системного інсуліну відповідає за координацію міжтканинної активації автофагії. У черв'яків нейронний АМФК також регулює системний сигнал, що сприяє довголіттю в периферичних тканинах шляхом активації АМФК [82]. Якщо активація автофагії є ключовим механізмом збереження тривалості життя після активації АМФК, це може відбуватися через її інгібуючу дію на mTOR [83] або через пряму дію АМФК на фосфорилування та активацію білків, пов'язаних з автофагією (ATG), що спостерігається у ссавців [84]. Нещодавно досліджено, що в нематод АМФК була залучена до стабілізації гомеостазу сплайсингу пре-мРНК, що також є фактором для збільшення тривалості життя [85].

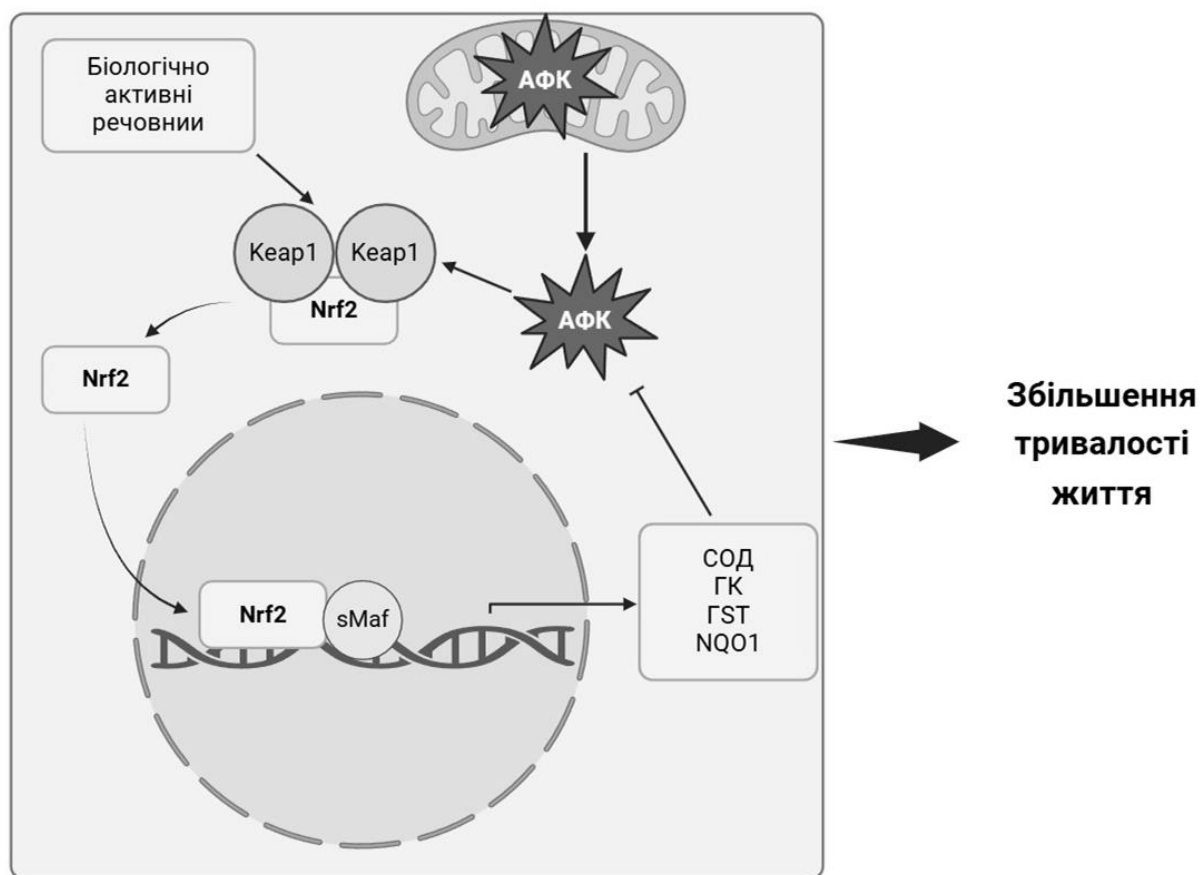
Метформін є широко призначуваним протидіабетичним препаратом з широким спектром молекулярної активності, включаючи зниження сигналізації через інсулін, IGF-1, mTOR і АМФК, інгибування мітохондріального електронтранспортного ланцюга, а також зниження продукції АФК і пошкодження ДНК [86]. Враховуючи цей перелік механізмів забезпечення довголіття, не дивно знайти численні дослідження як на черв'яках [87], так і на мишах, про те, що застосування метформіну може продовжити здорову тривалість життя і сповільнити розвиток маркерів, пов'язаних зі старінням [88]. Існує велика зацікавленість у просуванні цього препарату як засобу для лікування старіння у людей, з плануванням та збором коштів для проведення випробування лікування метформіном на 3000 осіб віком 65-79 років з подальшим спостереженням за випадками серцево-судинних захворювань, раку, деменції та смертності [86]. Натомість, дослідження по впливу метформіну на

організм дорослих особин плодової мухи показав, що жодна з концентрацій метформіну не продовжувала тривалість життя, але призводила до активації АМФК, а високі концентрації проявляли токсичні ефекти [89].

#### 1.3.4. Сигнальний шлях Keap1-Nrf2

Ядерний фактор еритроїдний 2-споріднений фактор 2 (Nrf2 або NFE2L2) – це фактор транскрипції, що належить до підродино «cap “n” collar (CNC) лейцинової застібки базового регіону (bZIP) [90]. Гомологи Nrf2 були знайдені у багатьох тварин, а саме у *Danio rerio* [91], *Caenorhabditis elegans* [92], *Drosophila melanogaster* [93] та ссавців [91]. За нормальних умов білок інгибується Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Комплекс Nrf2-Keap1 під дією Cullin3 (Cul3) зазнає поліубіквітинування і відправляється на протеосомальну деградацію [94]. Але під дією оксидантів Keap1 окислюється і втрачає свої властивості. Вільний Nrf2 направляється в ядро і активує експресію генів, в яких промотор містить нуклеотидну послідовність елемента антиоксидантної відповіді (ARE) [95]. Окрім того, активність Nrf2 регулюється кіназою глікогенсинтетази 3 (КГС3), яка каталізує приєднання неорганічного фосфору до Ser335 і Ser338 у домені Neh6 (Nrf2-ECH domains). У такому вигляді Nrf2 може з'єднуватися з білками, що містять бета-трансдуцинові повтори ( $\beta$ -TrCP), і руйнуватися [96].

Було показано, що активація Nrf2, як через інгибування Keap1 так і КГС3 призводить до збільшення тривалості життя плодової мушки і ссавців [97]. Зокрема ці ефекти пов'язані з активацією механізмів антиоксидантного захисту.



**Рис. 1.1. Активація сигнального шляху Nrf2 та його роль у продовженні тривалості життя**

Транскрипційний фактор Nrf2 регулює експресію генів, відповідальних за детоксикацію ксенобіотиків та подолання оксидативного стресу. Однією з головних мішеней є НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктаза 1 (або НАД(Ф)Н-хінондегідрогеназа) (NQO1) [98]. NQO1 виконує кілька важливих функцій у клітині. Перша функція, яка впливає з назви, полягає в тому, що NQO1 каталізує одноетапну реакцію детоксикації хінонів [99]. Фермент функціонує за кінетикою «пінг-понгу», коли НАДН або НАДФН зв'язується з активним центром, відновлює флавіновий кофактор до ФАДН<sub>2</sub>, а потім вивільняється перед зв'язуванням із субстратом і повним відновленням шляхом перенесення гідриду [100]. Субстратами для NQO1 є хінони, хіноніміни, глутатіонілзаміщені нафтохінони, дихлорфеноліндолфенол, метиленовий синій, а також азо- та нітросполуки [99]. Крім того, деякі ендогенні антиоксиданти, такі як убіхінон або

$\alpha$ -токоферолхінон, можуть виступати субстратами для NQO1 [101]. Підтримання відновленої форми антиоксидантів – це його друга функція. І третя з вивчених на сьогоднішній день функцій – регуляція p53, який є активатором апоптозу у відповідь на пошкодження ДНК [102]. Деякі дослідження показали зниження рівня p53 при обробці культури клітин HCT116 дикумаролом, який є інгібітором NQO1 [103]. Ймовірно, цей шлях регуляції не залежить від репродуктора p53 Mdm-2 та убіквітинування, але цей шлях інгибування p53 також підлягає протеосомній деградації [104].

Іншою мішенню для Nrf2 є сімейство ферментів глутатіон-S-трансфери (GST) [105]. Антиоксидантний фермент GST належать до ферментів другої фази детоксикації ксенобіотиків. Основна функція ферментів другої фази полягає у перетворенні ліпофільних неполярних ксенобіотиків у водорозчинну форму, яку легше виводити з клітини [106]. Антиоксидантний фермент GST каталізує реакцію кон'югації відновленого глутатіону через тіолову групу з електрофільними центрами на різних субстратах (ксенобіотиках), щоб зробити сполуки більш розчинними у воді [107]. Мішенями для GST є велика кількість різних сполук: гербіциди, інсектициди, хіміотерапевтичні препарати, пестициди, канцерогени.

Також Nrf2 регулює синтез глутатіону. Глутаматцистеїнлігаза (GCL) – фермент, який каталізує утворення  $\gamma$ -глутамілцистеїну з L-глутамату та L-цистеїну. Саме ця реакція є лімітуючою на шляху синтезу глутатіону. GCL – це димерний білок, що складається з каталітичної субодиниці GCL (GCLC) та субодиниці модифікатора GCL (GCLM) [108]. Транскрипційний фактор Nrf2 індукуює експресію обох субодиниць [109,110].

Уридин-5'-дифосфо-глюкуронозилтрансфераза (УДФ-глюкуронозилтрансфераза або UGT) – це мікросомальний фермент, який каталізує перенесення глюкуронової кислоти від УДФ-глюкуронової кислоти до гідрофобних молекул. Ксенобіотики, кон'юговані з глюкуроновою кислотою, є більш полярними і тому легше виводяться з організму. Показано, що Nrf2 індукуює експресію генів UGT [111].

Окрім того, Nrf2 регулює низку важливих метаболічних шляхів. Транскрипційний фактор Nrf2 підвищує експресію генів ключових ферментів пентозофосфатного шляху, а саме глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ), фосфоглюконатдегідрогенази, транскетолази (ТКТ) і трансальдолази 1 (Taldo1). Він також впливає на експресію генів ферментів, відповідальних за синтез нуклеотидів: фосфорибозилпірофосфатамідотрансферази (Prat) і метилентетрагідрофолатдегідрогенази 2 (Mthfd2) [112]. Вища активність Г6ФДГ та фосфоглюконатдегідрогенази є очевидною відповіддю на оксидативний стрес, оскільки реакції, що каталізуються цими ферментами, супроводжуються відновленням НАДФ<sup>+</sup> до НАДФН, який використовується для відновлення окисненого глутатіону [113]. Транскрипційний фактор Nrf2 також регулює експресію інших генів, відповідальних за синтез НАДФН. Дослідження показали, що нокаут гена Nrf2 знижує експресію гена малатдегідрогенази (ME1) [114] у печінці мишей та ізоцитратдегідрогенази (IDH1) [115] у стравоході мишей. Натомість, коли ген Keap1 був нокаutowаний, експресія ME1 зросла, а рівень НАДФН збільшився [114].

Також Nrf2 регулює активність гліколізу шляхом підвищення активності ключових ферментів реакції. Дослідження показали, що нокаут гена Keap1 підвищував активність гексокінази та піруваткінази, а також збільшував рівень АТФ. За допомогою вестерн-блотингу було продемонстровано підвищення рівня ферментів гліколізу: гексокінази 1 (Hk1), глюкозофосфат-ізомерази 1 (Gpi1), 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-біфосфатази 2 (Pfkfb2), фруктозо-бісфосфат-альдолази А (Aldoa), енолази 1 (Epo1) та енолази 4 (Epo4) [115].

Nrf2 демонструє дуже цікаві тканиноспецифічні властивості щодо накопичення глікогену. При нокаутуванні гена Keap1 у м'язах мишей спостерігалось зниження рівня глікогену [116], але при активації Nrf2 у печінці накопичення глікогену зростало [117].

## 1.4. Геропротектори

Геропротектори – це речовини, які сповільнюють старіння, відновлюють вікові пошкодження та подовжують здорову тривалість життя [1]. Дослідження на модельних організмах та ретроспективні дослідження на пацієнтах показують, що вони можуть поліпшити дисфункцію тканин та зменшити початок і тяжкість багатьох захворювань [118]. Основною характеристикою геропротекторів є їхня здатність впливати на такі фундаментальні механізми старіння, як окисне пошкодження та запалення [119].

Критеріями потенційних геропротекторів є збільшення тривалості життя, покращення біомаркерів старіння людини та підвищення якості життя, пов'язаної зі здоров'ям. При цьому вони мають мати мінімальні побічні ефекти при терапевтичному дозуванні. Бажаними є також еволюційна консервативність механізму дії та відтворюваність геропротекторних ефектів на різних модельних організмах [1].

До геропротекторів відносять понад 200 різних сполук, кожна з яких уповільнює старіння та/або подовжує тривалість життя в різних організмах [119]. Прикладами таких речовин є рапаміцин, метформін, резвератрол, кверцетин, фізетин і акарбоза.

Одним з найбільш вивчених геропротекторів є рапаміцин. Це інгібітор mTOR сигнального шляху, який відповідає за сприйняття поживних речовин і тісно пов'язаний зі старінням і довголіттям. mTOR є високо консервативним біологічним шляхом, що включає два різні комплекси: mTORC1 та mTORC2. Ці комплекси відрізняються за складом і функцією. mTORC1 гостро інгібується рапаміцином, тоді як mTORC2 потребує його тривалого впливу. Таким чином, рапаміцин впливає на різні механізми старіння, включаючи автофагію, оксидативний стрес і репарацію ДНК [120]. Нещодавно було показано, що рапаміцин також пригнічує секреторний фенотип, пов'язаний зі старінням (SASP), який складається з прозапальних факторів і факторів тканинного ремоделювання та секретується старіючими клітинами [121]. Рапаміцин, вже

використовується в клініці як імуносупресор, і його було широко протестовано на тваринних моделях старіння та захворювань, пов'язаних із віком [118].

До геропротекторів відносять також метформін – препарат, який використовується для лікування цукрового діабету 2 типу. Дослідження показують, що він пригнічує запалення, зменшує пошкодження ДНК та інгибує SASP [120]. Крім того, метформін індукує автофагію шляхом активації АМФК і, отже, потенційно може використовуватися для стимулювання тривалості життя за допомогою механізмів, подібних до гормезису [122]. Існує також багато доказів з досліджень на тваринах та ретроспективних досліджень на людях, що метформін позитивно впливає на різні захворювання, пов'язані зі старінням [118].

Ще одним прикладом геропротекторної сполуки є резвератрол. Це природний поліфенол, який міститься в понад 70 рослинах і має широкий спектр біологічних властивостей. Зокрема резвератрол добре відомий своїми антиоксидантними та протипухлинними властивостями [123]. Крім того, він має протизапальну дію і захищає від погіршення пам'яті, що було продемонстровано на моделі церебрального паралічу в щурів [124]. Було показано, що резвератрол значно пригнічує кілька факторів SASP, таких як інтерлейкін-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), інтерлейкін-8 (IL-8) та фактор некрозу пухлин-альфа (TNF- $\alpha$ ) через пригнічення активації NF- $\kappa$ B [125]. Він також може активувати сиртуїн 1 (SIRT1) – гістондеацетилазу, яка відповідає за регуляцію репарації ДНК, метаболізму, реакції на окислювальний стрес, функціонування та біогенез мітохондрій [126]. Резвератрол сприяє профілактиці вікових захворювань, активуючи білок Nrf2 і підвищуючи активність антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза. Це знижує рівень утворення АФК та, відповідно, зменшує оксидативний стрес [127]. Також було з'ясовано, що резвератрол може брати участь у зменшенні хронічного запалення. Його протизапальний ефект пов'язаний з кількома сигнальними шляхами, такими як шлях арахідонової кислоти, NF- $\kappa$ B та мітоген-активованою протеїнкіназою (МАРК) [128].

Кверцетин відомий своїми антиоксидантними та протираковими властивостями. Його дія пов'язана з активацією багатьох сигнальних шляхів, таких як естрогенові рецептори, mTOR, NF- $\kappa$ B, PI3k/Akt, p53/p21/serpine і HIF-1 $\alpha$  [123]. Кверцетин може подовжувати життя первинних людських фібробластів HFL-1 і сприяти омолодженню старіючих клітин. Його лікувальні ефекти також пов'язані із зменшення відсотка  $\beta$ -галактозидазопозитивних клітин у фібробластах [129]. Крім того, було показано, що він індукує апоптоз у старіючих ендотеліальних клітинах пупкової вени людини (HUVEC) та мезенхімальних стовбурових клітинах кісткового мозку мишей, здебільшого через шляхи PI3k/Akt та p53/p21/serpine [130].

Фізетин – це флавонол, який міститься в різних рослинах, таких як цибуля, полуниця, яблука та хурма. Завдяки своїм гідрофобним властивостям він здатний проникати в клітинні мембрани та накопичуватися там, що сприяє його антиоксидантній і протизапальній дії. Крім того, він викликає апоптоз старіючих клітин, пригнічуючи активність членів родини Bcl-2 та інших компонентів мережі SCAP [131]. Вважається, що лікувальні властивості фізетину пов'язані з його здатністю модулювати редокс-чутливі транскрипційні фактори NF- $\kappa$ B та Nrf2. У дослідженнях на щурах з діабетичною нейропатією фізетин показав здатність захищати від окислювальних ушкоджень і нейрозапалення шляхом пригнічення NF- $\kappa$ B і активації Nrf2 [132]. На сьогодні проводиться кілька клінічних досліджень, які вивчають ефекти фізетину при вікових захворюваннях, таких як остеоартрит та синдром втоми, що свідчить про його потенційні клінічні переваги з точки зору практичності, безпеки та переносимості [123].

Акарбоза – це інгібітор кишкового ферменту  $\alpha$ -глюкозидази, який використовується для лікування цукрового діабету. Дія цієї сполуки полягає у пригніченні перетравлення складних вуглеводів та зниженні постпрандіальної гіперглікемії [133]. Акарбоза знижує концентрацію глюкози в крові, артеріальний тиск, рівень триацилгліцеролів, прогресування товщини інтими, частоту серцево-судинних подій і вперше діагностованої гіпертензії, а також демонструє сприятливий вплив на людей з надмірною вагою і знижує біомаркери



запалення [134]. Хоча механізми, через які акарбоза сприяє збільшенню тривалості життя, залишаються недостатньо вивченими, припускається, що вона є міметиком калорійного обмеження. Повідомляється, що акарбоза покращує показники здоров'я, зокрема зменшує частоту пухлин легень у самців мишей, знижує дегенерацію печінки в обох статей, а також гломерулосклероз у самок мишей [135].

Було також виявлено, що деякі метаболіти такі як жирні кислоти, вітаміни, мікроелементи, нуклеїнові кислоти та амінокислоти, впливають на старіння і мають органоспецифічні ефекти. Серед цих сполук особливу увагу привернув АКГ через його важливу роль у клітинному метаболізмі, виробництві енергії та процесах старіння. У зв'язку з цим АКГ досліджується як геропротекторний агент на моделях тварин [136].

## 1.5. Альфа-кетоглютарат

### 1.5.1. Роль альфа-кетоглютарату в метаболічних процесах

Альфа-кетоглютарат (АКГ) або  $\alpha$ -кетоглютарат або 2-оксоглютарат, органічна сполука з молекулярною формулою  $C_5H_6O_5$ , є однією з найважливіших молекул у метаболізмі еукаріотичних клітин. Ця дикарбонова кислота, що містить кетогрупу в альфа-положенні відносно однієї з карбоксильних груп, відіграє центральну роль у численних біохімічних процесах, пов'язуючи різні метаболічні шляхи та забезпечуючи критичні функції в клітинному метаболізмі [137].

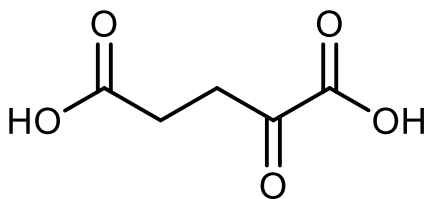


Рис. 1.2. Хімічна формула альфа-кетоглютарату

У циклі трикарбонних кислот (цикл Кребса) АКГ займає стратегічно важливе положення. Його утворення відбувається в результаті окислювального декарбоксілювання ізоцитрату, реакції, що каталізується ізоцитратдегідрогеназою (ІДГ). Цей процес здійснюється у два етапи: спочатку відбувається окислення ізоцитрату з використанням НАД<sup>+</sup> або НАДФ<sup>+</sup> як кофактору, що призводить до утворення оксалосукцинату та відновленої форми нікотинамідного кофермента (НАДН або НАДФН). Потім оксалосукцинат піддається декарбоксілюванню з вивільненням молекули CO<sub>2</sub> та формуванням АКГ [3].

Подальша доля АКГ в циклі Кребса пов'язана з його перетворенням на сукциніл-КоА за допомогою складного мультиферментного комплексу  $\alpha$ -кетоглютаратдегідрогенази. Ця трансформація є багатоетапним процесом, який потребує кількох кофакторів, включаючи тіамінпірофосфат, ліпоєву кислоту та кофермент А. В результаті цієї реакції не тільки утворюється сукциніл-КоА, але й відбувається відновлення чергової молекули НАД<sup>+</sup> до НАДН, що робить свій внесок у формування протонного градієнта для подальшого синтезу АТФ в електрон-транспортному ланцюзі [138].

Особливо важливою є роль АКГ у метаболізмі амінокислот. Ця молекула служить ключовим акцептором аміногруп у реакціях трансамінування, які каталізуються різними амінотрансферазами, такими як аспартатамінотрансфераза та аланінамінотрансфераза. У процесі трансамінування АКГ приймає аміногрупу від амінокислоти, перетворюючись на глютамат, тоді як амінокислота перетворюється на відповідну кетокислоту. Цей процес має критичне значення для перерозподілу азоту між різними амінокислотами, катаболізму надлишкових амінокислот та синтезу замінних амінокислот [139].

Альфа-кетоглютарат також відіграє центральну роль у біосинтезі кількох важливих амінокислот. Найбільш безпосередньо це стосується синтезу глютамату, який утворюється шляхом прямого амінування АКГ за допомогою глютаматдегідрогенази з використанням NH<sub>4</sub><sup>+</sup> як джерела азоту та НАДН або

НАДФН як відновника [140]. Глютамат, натомість, служить попередником для синтезу інших амінокислот, включаючи пролін й аргінін. Синтез проліну відбувається через утворення глютамат-5-семіальдегіду за участю ферментів глютамат-5-кінази та піролін-5-карбоксилатсинтетази з подальшою спонтанною циклізацією та відновленням [141]. Аргінін синтезується через утворення орнітину як проміжного продукту, що тісно пов'язано з циклом сечовини [142].

У контексті регуляції метаболізму АКГ виступає як важливий алостеричний регулятор для різних ферментів та бере участь у регуляторних шляхах [143]. Особливо важливою є його роль у регуляції сигнального шляху mTOR, який контролює біосинтез білку та ріст клітин [144]. АКГ також впливає на епігенетичну регуляцію як кофактор для різних деметилаз, що модифікують гістони та ДНК [145].

В енергетичному метаболізмі роль АКГ не обмежується його участю в циклі Кребса. Перетворення сукциніл-КоА, що утворюється з АКГ, у сукцинат супроводжується субстратним фосфорилюванням з утворенням гуанінтрифосфату (ГТФ) [146]. Крім того, АКГ служить важливим анаплеротичним субстратом, здатним поповнювати пул інтермедіатів циклу Кребса, коли вони використовуються для різних біосинтетичних процесів. Ця здатність забезпечує метаболічну гнучкість, дозволяючи клітинам адаптуватися до різних енергетичних потреб та забезпечувати субстрати для біосинтезу [147].

Розуміння комплексної ролі АКГ у клітинному метаболізмі має величезне значення для розробки нових терапевтичних стратегій та кращого розуміння метаболічних захворювань. Подальші дослідження механізмів дії цієї молекули можуть відкрити нові перспективи в розумінні та маніпулюванні клітинним метаболізмом, що матиме важливе значення як для фундаментальної біології, так і для медичної практики. Крім того, глибше розуміння функцій АКГ може сприяти розвитку нових біотехнологічних застосувань, заснованих на маніпуляціях з клітинним метаболізмом [148].

### 1.5.2. Вплив альфа-кетоглютарату на регуляторні шляхи

Альфа-кетоглютарат відіграє набагато важливішу роль у клітинному метаболізмі, ніж просто участь у циклі трикарбонових кислот. Він є потужним регулятором багатьох ключових процесів, контролюючи активність ферментів, сигнальні шляхи і навіть впливаючи на генну експресію.

Один із найважливіших шляхів, яким АКГ впливає на клітини, – це його здатність змінювати активність АМФК, головного датчика енергетичного стану клітини. Коли в клітині падає рівень АТФ, одночасно підвищується концентрація АКГ, що активує АМФК. Цей фермент запускає процеси, які дозволяють клітині отримувати енергію, зокрема стимулює катаболізм і блокує анаболічні шляхи. Також він збільшує експресію генів, пов'язаних із біогенезом мітохондрій, забезпечуючи енергетичні потреби клітини [149].

Альфа-кетоглютарат, як ключовий метаболічний продукт, відіграє важливу роль у регуляції сигнального шляху mTOR. Цей шлях контролює клітинний ріст і метаболізм, реагуючи на кількість поживних речовин і енергетичний статус клітини. Високі рівні АКГ у клітині можуть пригнічувати активність mTOR, впливаючи на баланс метаболітів та сигналів про енергетичний стан. Це означає, що коли АКГ накопичується, клітина отримує сигнал про зміни в метаболізмі або нестачу енергії, що змушує уповільнити ріст і розмноження. У цьому контексті АКГ діє як сенсор, який повідомляє клітину про необхідність зміни активності mTOR [144].

Інгибування mTOR через АКГ змушує клітину перейти з анаболічного стану, коли вона зростає і накопичує ресурси, до катаболічного режиму, де вона розщеплює і використовує наявні запаси. Це супроводжується активацією автофагії – процесу, під час якого клітина розщеплює власні компоненти, наприклад, пошкоджені органели або білки, для отримання енергії. Автофагія стає особливо важливою за умов стресу або нестачі поживних речовин, оскільки дозволяє клітині пережити несприятливі умови [150].

Далі АКГ інгибує mTOR, що призводить до зниження синтезу білків і ліпідів. mTOR зазвичай стимулює біосинтез, необхідний для клітинного росту і ділення, але коли цей процес блокується, клітина уповільнює виробництво цих молекул. Це важливий механізм виживання, оскільки зниження синтезу допомагає клітині зберігати ресурси у випадку дефіциту поживних речовин [66].

Крім того, інгибування mTOR через АКГ може призвести до перепрограмування метаболізму клітини. Це включає зниження глюконеогенезу, тобто синтезу глюкози з інших джерел, та переходу до використання альтернативних джерел енергії, таких як жирні кислоти. Така адаптація до змін у доступності поживних речовин допомагає клітині виживати в умовах дефіциту, підтримуючи її енергетичний баланс [151].

Окрім метаболічних шляхів, АКГ відіграє важливу роль у регуляції епігенетичних процесів. Цей метаболіт необхідний для роботи ферментів, які відповідають за деметилування ДНК і гістонів, що, натомість, впливає на стан хроматину і активність генів. Таким чином, АКГ безпосередньо впливає на те, які гени будуть активовані, а які залишаться "вимкненими", що критично важливо для регуляції клітинного метаболізму [152].

Кисневий режим клітини також не залишається без уваги АКГ. За умов нормального рівня кисню цей метаболіт сприяє деградації Huxoia inducible factor 1 alpha subunit (HIF-1 $\alpha$ ) – ключового транскрипційного фактору, що активує гени, пов'язані з гліколізом [153]. Але при гіпоксії, коли рівень кисню знижується, АКГ-залежні ферменти втрачають свою активність, і HIF-1 $\alpha$  стабілізується, активуючи процеси, що дозволяють клітині виживати в умовах браку кисню [154].

Ще однією важливою функцією АКГ є регуляція метаболізму амінокислот через фермент general control nonderepressible 2 (GCN2). Коли в клітині бракує амінокислот, АКГ сигналізує про це, активуючи GCN2, що знижує синтез білків і активує шляхи, які допомагають клітині справлятися з дефіцитом [155]. Щодо ліпідів, АКГ може впливати на їхнє окислення через активацію АМФК і

регулювання активності ферментів, що беруть участь у метаболізмі жирних кислот [149].

Не менш важливою є роль АКГ у підтримці антиоксидантного захисту клітини. Цей метаболіт регулює синтез глутатіону, одного з основних антиоксидантів, а також модулює активність Nrf2, який відповідає за активацію антиоксидантної відповіді на стрес [146].

АКГ не обмежується лише клітинним метаболізмом. Він також бере участь у міжорганній взаємодії, регулюючи такі процеси, як глюконеогенез у печінці, утилізація глюкози в м'язах і секреція інсуліну в підшлунковій залозі [156].

Порушення регуляторних функцій АКГ може призводити до розвитку таких захворювань, як діабет, ожиріння та метаболічний синдром. Однак завдяки своїм численним функціям АКГ також відкриває перспективи для створення нових терапевтичних стратегій. Зокрема, його можна використовувати як метаболічний модулятор або як основу для розробки таргетних терапій, спрямованих на корекцію АКГ-залежних процесів [139,148].

### **1.5.3. Вплив альфа-кетоглутарату на про-/антиоксидантний статус**

АКГ може проявляти, як антиоксидантні так і прооксидатні властивості.

У контексті метаболічної активності, АКГ функціонує як ключовий компонент циклу Кребса, де він забезпечує енергетичні потреби клітини завдяки продукції НАДН альфа-кетоглутаратдегідрогеназним комплексом [147]. Одним із головних джерел АФК є мітохондріальний електронтранспортний ланцюг. Збільшення постачання НАДН до мітохондріального електронтранспортного ланцюга призводить до збільшення продукції не тільки АТФ, а ще й АФК [157,158].

Окрім цього, альфа-кетоглутаратдегідрогеназний комплекс може безпосередньо продукувати АФК. Одним із основних механізмів, за допомогою якого альфа-кетоглутаратдегідрогеназний комплекс генерує АФК, є «витік» електронів під час ферментативної реакції. У нормальних умовах електрони

передаються з альфа-кетоглутарату на НАД<sup>+</sup>, що забезпечує утворення НАДН. Однак, при порушенні балансу між окисленими та відновленими формами коферментів (наприклад, при надмірному накопиченні НАДН або обмеженій доступності НАД<sup>+</sup>), електрони можуть передаватися на молекули кисню (O<sub>2</sub>), замість того, щоб залишатися в окисно-відновних реакціях циклу. Це призводить до утворення супероксид-аніон радикалу (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [159].

Альфа-кетоглутарат має вагомий вплив на антиоксидантні процеси в клітинах, що забезпечує його роль у підтримці редокс-гомеостазу та запобіганні оксидативного стресу. Дослідження показують, що АКГ може знижувати рівень АФК завдяки здатності до безпосередньої детоксикації пероксидів та інших реактивних метаболітів, що утворюються під час окислювальних процесів. Було показано, що АКГ безпосередньо вступає в реакцію пероксидом водню з утворенням сукцинату, вуглекислого газу та води [160].

Крім того, з АКГ може синтезуватися глутамат, який, натомість, є попередником для синтезу глутатіону – одного з найважливіших антиоксидантів у клітинах. Глутатіон відіграє центральну роль у нейтралізації вільних радикалів і підтримці антиоксидантної системи організму [161].

Дослідження на моделях *in vitro* та *in vivo* підтверджують, що введення АКГ підвищує стійкість клітин до оксидативного стресу. Наприклад, у експериментах на тваринах було продемонстровано, що додавання АКГ знижує ступінь пошкодження тканин, індукованих пероксидним окисненням ліпідів, що свідчить про його захисну дію. Подібні ефекти були зафіксовані й на клітинних культурах, де АКГ знижував рівень апоптозу, викликаного надлишком вільних радикалів.

Альфа-кетоглутарат також відіграє важливу роль у регуляції системи Nrf2, яка є ключовим компонентом антиоксидантного захисту клітин. Система Nrf2 контролює експресію численних антиоксидантних і детоксикаційних ферментів, включаючи глутатіонпероксидазу, супероксиддисмутазу та каталазу, які допомагають клітинам захищатися від шкідливого впливу оксидативного стресу та АФК [162].

Альфа-кетоглютарат може активувати шлях Nrf2 через модифікацію внутрішньоклітинного редокс-гомеостазу. Одним із ключових механізмів цієї активації є зниження оксидативного стресу, що вивільняє Nrf2 від його інгібітора Keap1, який у нормальних умовах утримує Nrf2 в цитоплазмі, запобігаючи його транслокації до ядра [94]. Під впливом АКГ, рівень АФК знижується, що сприяє стабілізації Nrf2 і його переміщенню в ядро клітини, де він активує антиоксидантні та цитозахисні гени [95].

Дослідження *in vitro* та *in vivo* показали, що підвищені рівні АКГ стимулюють активацію Nrf2, що веде до посилення експресії антиоксидантних ферментів. Наприклад, у клітинних моделях було продемонстровано, що АКГ підвищує рівень експресії генів, регульованих Nrf2, таких як HO-1 (гемоксигеназа-1), NQO1 і глутатіонсинтетази, які захищають клітини від шкідливих впливів окислювальних агентів [117,162].

Таким чином, АКГ не тільки виступає як антиоксидант сам по собі, але й діє як індуктор системи Nrf2, підвищуючи загальну здатність клітин до антиоксидантного захисту. Це робить його перспективним засобом для профілактики та терапії захворювань, пов'язаних із порушенням редокс-гомеостазу, включаючи нейродегенеративні хвороби, онкологічні процеси та хронічні запальні стани [148].

#### **1.5.4. Вплив альфа-кетоглютарату на автофагію**

Автофагія – це філогенетично консервативний шлях деградації, під час якого частина цитоплазми загортається в органели з подвійною мембраною, автофагосоми, які потім зливаються з лізосомами для ферментативного гідролізу макромолекул, що містяться в автофагічному вантажі, до мікромолекул, які можуть бути використані для анаболічних реакцій або біоенергетичних цілей [163].

Автофагія має значне цитопротекторне значення. Це означає, що вона підвищує стійкість клітин до різноманітних зовнішніх стресових сигналів [164].



Автофагія є частиною загальної реакції на стрес, яка дозволяє клітинам адаптуватися до мінливих й іноді несприятливих умов, мобілізувати свій енергетичний резерв, усунути надлишковий матеріал і патогенів, що вторглися, а також оптимізувати контроль якості білків, білкових комплексів і органел цитоплазми [165].

Хронічна або циклічна індукція автофагії *in vivo* може викликати подовження тривалості життя таких модельних організмів, як дріжджі, нематоди, мухи і миші [166]. Показано, що генетичні маніпуляції, спрямовані на посилення автофагії, можуть збільшити тривалість життя і здоров'я мишей [77]. Крім того, ефективність багатьох відомих антивікових стратегій, включаючи калорійне обмеження, інгибування mTORC1 або використання спермідину, значною мірою залежить від активності автофагії. При цьому, нокаут ключових генів автофагії нівелює їх позитивний вплив, що підкреслює центральну роль автофагічних процесів у цих втручаннях [167–169].

Упродовж останніх років було проведено низку наукових досліджень, які виявили здатність АКГ регулювати автофагію. Проте їх результати є суперечливими.

Кілька незалежних наукових груп стверджують, що АКГ інгибує автофагію. Зокрема, додавання попередника АКГ, диметил-альфа-кетоглютарату (ДМКГ), до клітинних культур людини або його внутрішньочеревне введення мишам ефективно пригнічує автофагію через анаплероз-залежне підвищення рівня ацетил-КоА, збільшуючи, таким чином, ацетилювання цитоплазматичних білків [165,170].

Однак повідомляється і про протилежний ефект, а саме, що АКГ індукує автофагію. В одному з досліджень стверджується, що додавання іншого попередника  $\alpha$ -кетоглютарату, октил-альфа-кетоглютарату (О-КГ), індукує автофагію як у клітинах людини, так і в *Caenorhabditis elegans*, оскільки він інгибує мітохондріальну АТФ-синтазу, а також mTORC1 [4].

Розглянуті вище розбіжності щодо впливу АКГ на автофагію, найімовірніше, можна пояснити суттєвими методологічними відмінностями,

зокрема використанням різних попередників  $\alpha$ -кетоглютарату. Диметил-альфа-кетоглютарат спричиняє інгибування автофагії за умов нестачі поживних речовин [171]. На противагу цьому, О-КГ (який, на відміну від ДМКГ, пригнічує дихання) може індукувати автофагію у вихідних умовах, без голодування [4]. Відомо також, що вплив попередників АКГ також залежить від їхніх ефектів на активацію HIF-1 $\alpha$ , зокрема ДМКГ пригнічує цей фактор, тоді як О-КГ не демонструє такого ефекту [172,173].

Ці результати підкреслюють складність впливу АКГ на автофагію та важливість подальших досліджень для з'ясування його механізмів дії.

## **1.6. Моделі викликання ожиріння у гризунів**

### **1.6.1. Їжа з високим вмістом жирів/вуглеводів**

Для індукції ожиріння та пов'язаних з ним патологій у модельних об'єктах переважно використовують їжу з високим вмістом жирів і/або вуглеводів (HF/HS) [174]. Такий тип харчування має високу валідність, оскільки зумовлює ті ж метаболічні наслідки, які спостерігаються у людей, наприклад, ожиріння, метаболічний синдром та інсулінорезистентність. HF/HS їжа передбачає годування тварин гранулами з високим вмістом поживних речовин, пов'язаних з ожирінням, таких як жири, олії і/або цукор та інші вуглеводи [175]. Основна перевага цієї їжі порівняно з іншими полягає в тому, що експериментатор має контроль над усіма поживними речовинами та енергією, яку отримує тварина. Наприклад, у HF/HS їжі можна визначити кількість, відсоток і тип білків, мінералів та вітамінів у кожній гранулі, а отже, і те, що споживає кожна тварина.

Однак, значним недоліком HF/HS їжі є те, що вона не імітує справжню поведінку людини. Люди не споживають постійно одну й ту ж ультраоброблену їжу з однаковим вмістом жирів і/або вуглеводів, як у HF/HS гранулах. Замість цього вони зазвичай обирають шкідливі продукти через їх смак, текстуру, новизну та різноманітність [176]. До того ж, ця їжа не зовсім точно відтворює

рівень споживання жирів людьми, оскільки HF/HS їжа часто містить більше жиру, ніж люди зазвичай споживають [177]. Для того, щоб імітувати сучасний поживний профіль фастфуду чи ультраобробленої їжі та вирішити проблему невідповідного рівня жирів, існують спеціальні HF/HS гранули, які часто називають "західною дієтою", з вищим вмістом вуглеводів і нижчим вмістом жирів, ніж традиційні HF/HS гранули [178]. Попри це, у дослідженнях, які використовують HF/HS їжу часто спостерігається зменшення споживання їжі тваринами, у порівнянні з іншими дослідженнями, де для індукції ожиріння використовують кафетерійний раціон. Це може бути пов'язано з браком різноманіття сенсорних властивостей HF/HS гранул. Було виявлено, що щури починають споживати менше калорій після кількох тижнів на HF/HS їжі. Однак, коли додавали нові фактори, наприклад, подавали їжу на різних тарілках або пропонували вибір між HF/HS і стандартним кормом, споживання калорій не знижувалося. Це вказує на те, що різноманітність і привабливість їжі мають важливе значення [179]. Досліджено, що смачна їжа може підвищувати апетит через активацію як сенсорних, так і винагороджувальних зон мозку, а також областей, що регулюють харчування. Тому зменшення споживання їжі тваринами на HF/HS можна пояснити саме одноманітністю і відсутністю сенсорної різноманітності [180].

Отже, попри те, що HF/HS їжа дозволяє контролювати всі поживні речовини та енергію, які отримують тварини, вона не має високої конструктивної валідності, оскільки не відтворює сучасний харчовий режим людей [181].

### **1.6.2. Кафетерійна їжа або кафетерійний раціон**

Кафетерійна їжа або кафетерійний раціон (КР) харчування передбачає надання лабораторним тваринам необмеженого доступу до різноманітних продуктів, що зазвичай вважаються нездоровими для людей. У цій моделі лабораторні гризуни споживають ті ж ультраоброблені, шкідливі, але смачні продукти, які споживають люди (наприклад, бекон, кекси та печиво) і які легко

можна придбати в супермаркетах чи ресторанах швидкого харчування. Саме тому цю модель також називають "дієтою шкідливої їжі", "супермаркетною дієтою" або "західною дієтою". Таким чином, КР відтворює певну схему проблемного споживання їжі людьми. Важливо, що вона також відображає оросенсорні властивості (такі як запах і текстура) та смакові якості продуктів, які стимулюють переїдання [181].

Переїдання та харчові переваги зумовлені не тільки харчовим складом їжі. При оцінці моделей, що індукують ожиріння, необхідно враховувати також і гедонічні властивості продуктів. На відміну від HF/HS їжі, КР враховує ці властивості, забезпечуючи оросенсорну реакцію на їжу разом із її поживними компонентами. Гедонічні властивості шкідливої їжі активують первинні та вторинні смакові зони кори головного мозку та стимулюють систему винагороди подібно до того, як це роблять наркотичні речовини [182].

КР як модель для індукції ожиріння демонструє високу валідність. Було доведено, що він не лише сприяє збільшенню маси тіла та ожирінню, а й викликає метаболічний синдром, важкі симптоми діабету, запалення печінки та інші метаболічні порушення [183,184]. Фактично, КР викликає ожиріння та пов'язані з ним метаболічні порушення й патології ефективніше, ніж HF/HS їжі [185].

Оскільки переїдання є важливим чинником у розвитку ожиріння, то модель, яка індукує ожиріння, повинна також викликати переїдання. Було досліджено, що КР дійсно провокує гіперфагію у гризунів, що аналогічно до спостережень за людьми, які споживають шкідливу їжу [186]. Дослідження, яке вивчало споживання енергії показало, що учасники, які харчувалися ультраобробленою їжею, споживали приблизно на 500 ккал більше на день порівняно з тими, хто дотримувався споживання необробленої їжі. Це відбувалося незважаючи на те, що обидві раціони мали однакову кількість калорій і поживних речовин. Таким чином, дослідження показало, що промислова обробка продуктів впливає на харчову поведінку, незалежно від їхнього складу [187].

Таким чином, КР є валідною моделлю, яка відтворює сучасну харчову систему, насичену шкідливими та ультраобробленими продуктами, оскільки вона складається саме з такого типу їжі. Крім того, КР є ефективною моделлю не тільки для вивчення метаболічних змін, а й для дослідження нейробіологічних та поведінкових змін [181].

## **1.7. Вплив висококалорійної їжі на мозок**

### **1.7.1. Взаємозв'язок між їжею з високим вмістом жиру та когнітивними функціями у тварин**

Дослідження показало, що у гризунів, які харчуються їжею з високим вмістом насичених жирних кислот, підвищується рівень маркерів запалення мозку [178]. Підвищена маса тіла та ожиріння можуть спричиняти неврологічні порушення. Ці дані свідчать про те, що надлишок жирової тканини має високу метаболічну активність і чутливий до вивільнення прозапальних медіаторів [188]. Крім того, дані попереднього дослідження також продемонстрували, що введення триацилгліцеролів погіршує довготривалу потенціацію гіпокампу [189]. Цікаво, що у мишей, які отримували їжу з високим вмістом жиру протягом лише одного дня, було цілком достатньо для того, аби викликати падіння продуктивності при виконанні завдань на епізодичну пам'ять [190]. Це дослідження також показало, що дефіцит пам'яті швидко відновлюється при переведенні мишей на їжу з низьким вмістом жиру з їжі з високим вмістом [190]. У дослідженні Вуді та Блайт [191], присвяченому гіперкалорійній їжі (з високим вмістом жирів і фруктози) та її впливу на когнітивне здоров'я, щури, яких годували їжею з високим вмістом жиру, демонстрували відносно більшу кількість жирових відкладень в організмі порівняно з групою з високим вмістом фруктози. Це дослідження також продемонструвало, що їжа з високим вмістом фруктози сприяє порушенню регуляції інсуліну, розвитку гіперліпідемії та погіршенню когнітивних функцій. Однак у щурів, яких годували їжею з високим

вмістом жирів, не спостерігалось явних когнітивних порушень [191]. Ці спостереження вказують на те, що окрема частина гіперкалорійної їжі може спричиняти негативний вплив на метаболічний синдром і когнітивні функції. На підтвердження цього, дослідження на тваринах показало, що висококалорійна їжа змінюють ліпідний та енергетичний обмін, подібно до клінічного діабету, з підвищенням рівня глюкози натщесерце та підвищенням рівня холестерину. Було показано, що гіперкалорійна їжа може погіршувати здатність до просторового навчання та синаптичну пластичність [192]. Ці несприятливі ефекти також були виявлені у щурів, яких годували їжею з високим вмістом жирів, що свідчить про те, що інсулінорезистентність є ймовірним медіатором когнітивного дефіциту, спричиненого висококалорійною їжею, зокрема так званою «західною дієтою» [193].

Як було показано раніше, харчування західного типу може спричиняти симптоми подібні до симптомів хвороби Паркінсона. Показано, що їжа з високим вмістом жирів підвищує чутливість дофамінергічних нейронів до нейротоксичності та посилює дофамінергічну дегенерацію у мишей, які отримували 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (MPTP) або 6-гідроксидопамін (6-OHDA) [194,195]. Прискорений розвиток термінальних локомоторних порушень,  $\alpha$ -синуклеїнопатії та астрогліозу спостерігався у трансгенних  $\alpha$ -синуклеїнових мишей, які отримували їжу з високим вмістом жирів протягом усього життя після відлучення від грудей [196].

Поведінковий тест відкритого поля є одним з найпопулярніших тестів для вимірювання тривожності у гризунів [197]. Різними науковцями було показано суперечливі результати тесту відкритого поля на мишах, що споживали висококалорійну їжу. Одні науковці показали, що висококалорійна їжа призводить до зниження тривожності у мишей [198], а інші показали протилежний результат, що така їжа може збільшувати тривожність [199]. Ймовірно, такі різні результати виходять через різну калорійність і склад експериментальних раціонів харчувань.

### 1.7.2. Оксидативний стрес спричинений надлишком калорій

Активация оксидативного стресу, асоційованого з ожирінням, ймовірно, пов'язане з наявністю надлишкової жирової тканини, оскільки адипоцити і преадипоцити є джерелом прозапальних цитокінів, включаючи фактор некрозу пухлини  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ), інтерлейкін- $1\beta$  (ІЛ- $1\beta$ ) та інтерлейкін-6 (ІЛ-6). Таким чином, ожиріння розглядається як стан хронічного запалення. Ці цитокіни є потужними стимуляторами вироблення АФК та активних форм азоту макрофагами і моноцитами, тому підвищення концентрації цитокінів може бути причиною оксидативного стресу. Жирова тканина також має секреторну здатність ангіотензину II, який стимулює активність оксидази нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФН). НАДФН-оксидаза є основним джерелом утворення АФК в адипоцитах [200].

Під час процесу мітохондріального та пероксисомального окислення жирних кислот в печінці можуть продукуватися вільні радикали, а отже, і АФК, що може призвести до змін мітохондріальної ДНК в окисному фосфорилуванні, яке відбувається в мітохондріях, спричиняючи структурні аномалії та виснаження АТФ [201]. Однак також можливо, що мітохондріальні аномалії є попередніми умовами, які сприяють надмірному виробленню АФК [201].

Ожиріння збільшує механічне навантаження і метаболізм міокарда, тому споживання кисню збільшується. Негативним наслідком підвищеного споживання кисню є утворення АФК у вигляді супероксиду, гідроксильного радикала та пероксиду водню, що виникають внаслідок посилення мітохондріального дихання і, звичайно, втрати електронів, які утворюються в електронтранспортному ланцюзі, що призводить до утворення супероксидного радикала [202].

Мітохондрії забезпечують клітину енергією, необхідною для майже всіх клітинних процесів, які в кінцевому підсумку дозволяють виконувати фізіологічні функції; крім того, вони відіграють центральну роль у загибелі клітин через механізм апоптозу. Дисфункція мітохондрій пов'язана з

різноманітними захворюваннями – від нейродегенеративних хвороб до діабету та старіння. Ожиріння виникає при порушеннях, які впливають на метаболізм мітохондрій, що сприяє утворенню АФК і розвитку оксидативного стресу. З іншого боку, запропоновано інший механізм, який передбачає вплив високого рівня ТАГ на функціонування мітохондріального дихального ланцюга, при якому внутрішньоклітинний рівень ТАГ, який також є високим, інгібує транслокацію аденіннуклеотидів і сприяє утворенню супероксиду [203].

Під час мітохондріального процесу окисного фосфорилування є невеликий відсоток електронів, які можуть передчасно відновлювати кисень, утворюючи потенційно токсичні вільні радикали, погіршуючи функцію мітохондрій. Крім того, за певних умов протони можуть знову потрапляти в мітохондріальний матрикс через різні білки-роз'єднувачі, впливаючи на контроль утворення вільних радикалів у мітохондріях [204]. Білки-роз'єднувачі мають амінокислотну послідовність, яка використовується для ідентифікації потенційних мітохондріальних переносників. На сьогоднішній день в мітохондріях ссавців описано три молекули: UCP-1, -2 і -3. UCP-1 бере участь у контролі адаптивного термогенезу і регуляції ваги. UCP-3, який у людини міститься лише в скелетних м'язах, схоже, впливає на теплопродукцію, але захищає мітохондрії від ліпотоксичності у випадках підвищених концентрацій вільних жирних кислот у матриксі, оскільки виводить їх у міжмембранний простір. Під час ожиріння збільшення вмісту вільних жирних кислот, який є токсичним для клітин підшлункової залози, чутливих до окислення, та індукує зміни у вивільненні інсуліну, може призвести до розвитку діабету 2 типу [203]. Потенційні ролі UCP-2 включають контроль синтезу АТФ, регуляцію метаболізму жирних кислот і, таким чином, контроль продукції АФК. Також припускають, що UCP-2 може мобілізувати АФК за межами мітохондріального матриксу [205].



## Розділ 2. Матеріали і методи

### 2.1. Умови утримання модельних організмів

#### 2.1.1. Умови утримання *D. melanogaster* та дизайн експерименту

У дослідженнях використовували *Drosophila melanogaster* лінії Canton S. Ця лінія була надана Блумінгтонським стоковим центром (Університет Індіани, США) та підтримувалася в лабораторії шляхом регулярного пересаджування на свіжі живильні середовища.

Мух утримували в стандартних умовах контрольованого середовища: при температурі 25°C, відносній вологості 55–60%, та регульованому фотоперіоді (12:12 год, світло:темрява). Ці параметри забезпечували оптимальні умови для розвитку та розмноження мух.

Для вирощування плодкових мух використовували живильне середовище, яке містило такі компоненти (мас. / об.):

- 5% сахарози — джерело легкодоступних вуглеводів для енергетичних потреб мух;

- 5% пекарських дріжджів — джерело білків, вітамінів групи В та інших мікроелементів;

- 6,1% кукурудзяної крупи — джерело складних вуглеводів та мікронутрієнтів;

- 1% агару — для створення гелеподібної консистенції середовища;

- 0,18% метилпарабену (ніпагіну) — як антисептик для запобігання розвитку небажаних мікроорганізмів.

Компоненти змішували у визначених пропорціях, додаючи до них дистильовану воду, після чого суміш піддавалася термічній обробці до однорідного стану. Після охолодження середовища до температури близько 50°C у нього додавали ніпагін, попередньо розчинений у 96% етанолі. Готове

середовище розливали у пластикові пробірки, після чого залишали для застигання та подальшого використання.

Мух вирощували в стандартних пластикових флаконах, заповнених приблизно 10 мл живильного середовища. Для запобігання висиханню середовища та забезпечення доступу повітря флакони закривали пористими поролоновими затичками.

Довгоживучу популяцію (або сублінію) мух отримали з батьківської лінії Canton S методом селекції особин, які найшвидше вилуплялися з лялечок. Імаго пересаджували на 1-2 дні на середовище (склад зазначено вище), для відкладки яєць. Далі мух елімінували, а середовище з яйцями залишали для розвитку і спостерігали за процесом лялькування. Коли з лялечок почали з'являтися імаго, то проводили селекцію протягом 1-2 днів. Усіх інших особин, які розвивались пізніше, елімінували. Таку процедуру проводили 5 поколінь.

Щойно вилуплених мух пересаджували на свіже середовище того ж складу, а мух у віці трьох днів розділяли за статтю. Наступного дня 4-денних самок мух пересаджували у демографічні клітки, що містили їжу наступного складу: 5% сахарози, 5% пекарських дріжджів, 1,2% агару та 0,18% метилпарабену (ніпагіну), і цю групу використовували як контроль. Для дослідних груп використовували аналогічне середовище із додаванням 10 мМ динатрієвої солі АКГ.

Всі групи мух утримувались на експериментальних середовищах протягом 3 тижнів. Їжу міняли кожні 2-3 дні. Далі мух анестезували протягом приблизно 1 хв діоксидом вуглецю, щоб розділити їх, і після відновлення на базовому середовищі протягом 24 годин використовували для фізіологічних досліджень або швидко заморожували в рідкому азоті для біохімічних вимірювань. Для отримання ізольованих мітохондрій та визначення їх респіраторних характеристик мух переносили у пластикову банку, яка знаходилася на льоді, не даючи їм піднятися на стінки банки до повного впадання в холодову кому.

### 2.1.2. Умови утримання *M. musculus* та дизайн експерименту

Лабораторні миші лінії *C57BL/6J* були отримані від професора Нани Войтенко (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, Київ, Україна) та розведені в умовах віварію кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Тварини утримувалися відповідно до стандартів гуманного поводження з лабораторними тваринами (принципи 3R) та рекомендацій Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту і Ради Європи щодо захисту тварин, які використовуються для наукових цілей.

Мишей утримували в умовах контрольованого середовища з 12-годинним світловим/темновим циклом (освітлення: 06:00–18:00), при температурі  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  та відносній вологості повітря 50–60%. Для вентиляції забезпечували адекватний обмін повітря в кімнаті утримання (10–15 циклів/годину).

Тварини розміщувалися в стандартних поліпропіленових клітках розміром  $365 \times 207 \times 140$  мм, обладнаних металевими сітчастими кришками. Наповнювачем слугував стерильний кукурудзяний гранульований підстил, який змінювали двічі на тиждень. Групове утримання (по 4–5 тварин у клітці) враховувало соціальні потреби мишей, що сприяло мінімізації стресу.

Усім групам тварин надавалося безперешкодний доступ до води, очищеної методом зворотного осмосу, та стандартного гранульованого корму для лабораторних гризунів «Rezon-1» (Київ, Україна), що містить 21,8% білку, 4,8% жиру, 69,5% вуглеводів та 3,9% клітковини (енергетична цінність: 10% калорійності з жиру). Їжа та вода надавалися *ad libitum*.

Регулярно проводилося візуальне оцінювання стану здоров'я тварин (стан шерсті, втрата ваги і зовнішні ознаки захворювань). Усі процедури були затверджені локальним етичним комітетом та відповідали етичним стандартам проведення експериментів на тваринах.

Для дослідження впливу висококалорійної їжі (ВКІ) з високим вмістом жирів та фруктози й АКГ на поведінку та біохімічні показники у корі головного

мозку використовували лише самців. П'ятимісячні миші були випадковим чином розподілені на чотири групи. Контрольних тварин продовжували годувати стандартним кормом для гризунів (10% ккал отримувалося з жиру), тоді як три експериментальні групи, позначені як «ВКІ», «АКГ» і «ВКІ + АКГ», перебували на відповідних режимах годування. Мишей з групи ВКІ годували з високим вмістом жиру та фруктози (45% ккал отримувалося з жиру, 15% ккал отримувалося з фруктози та 10% з білку). Група АКГ отримувала стандартний раціон з додаванням 1% динатрієвої солі АКГ у питну воду. Групі ВКІ+АКГ згодовували ВКІ і додавали 1% АКГ у питну воду. Обрана концентрація АКГ була використана в попередніх дослідженнях ожиріння у мишей [206,207]. ВКІ готували шляхом змішування (на 1 кг) 550 г стандартного корму, 250 г смальцю, 200 г фруктози та 10 мл жовчі в якості емульгатора, а потім розділяли на гранули вагою приблизно 10 г кожна. Ці гранули ВКІ замінювали щодня. Протягом двох місяців миші отримували експериментальний раціон.

Для дослідження впливу КР та АКГ на поведінку та біохімічні показники у корі головного мозку використовували лише самок. 39-тижневі миші були випадковим чином розподілені на дві групи: (1) контрольну, яку продовжували годувати стандартним кормом для гризунів, і (2) групу мишей, яких перевели на кафетерійний раціон (Рис. 2.1). Застосовували ротаційний кафетерійний раціон, що складався з семи різних варіацій харчування. Щодня миші отримували різну комбінацію продуктів, зберігаючи при цьому постійну калорійність та вміст макроелементів. Один і той самий набір раціонів повторювали кожні сім днів. Склад раціону, вміст поживних речовин та калорійність наведено в таблиці 2.1. Усі миші мали необмежений доступ до питної води. Після восьми тижнів годування мишей розділили на чотири групи (Рис. 2.1):

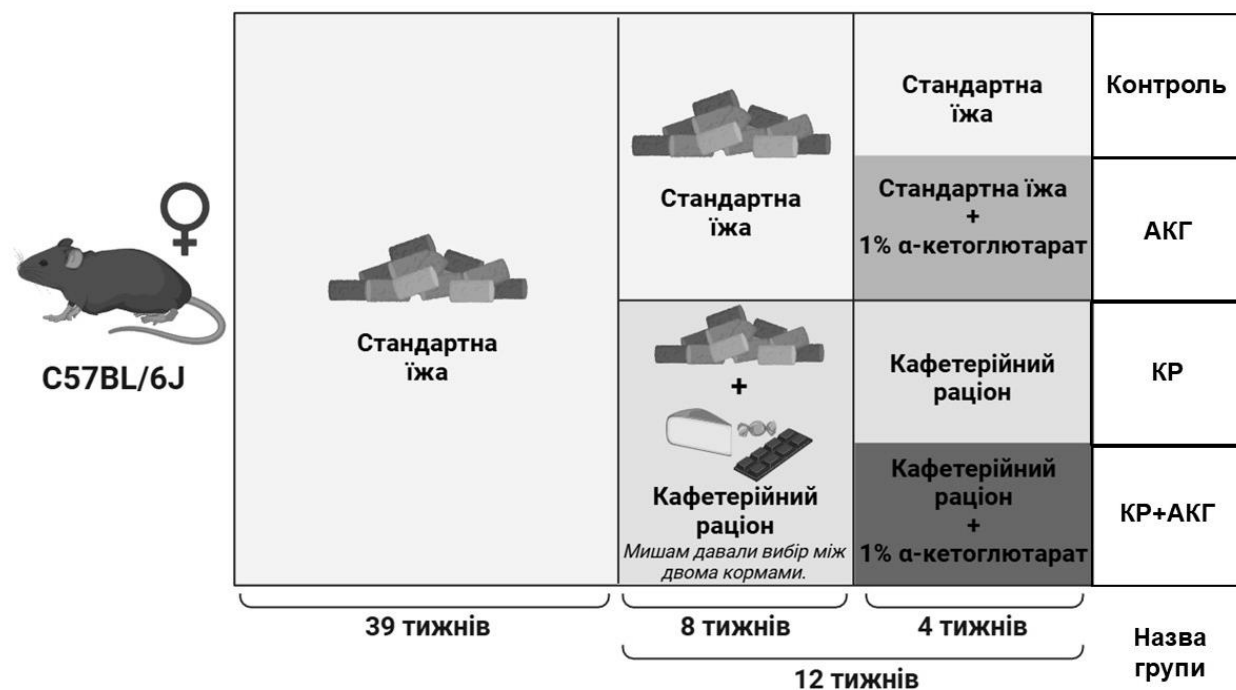
1. Контроль – група мишей, які продовжували споживати стандартну їжу (n = 5 мишей).
2. КР – група мишей, які продовжували споживати кафетерійний раціон (n = 5 мишей).

3. АКГ – група мишей на стандартному раціоні з 1% альфа-кетоглютарату натрію у питній воді (n = 4 миші).

4. КР+АКГ – група мишей на кафетерійному раціоні з 1% альфа-кетоглютарату натрію у питній воді (n = 4 миші).

Мишей утримували на цьому раціоні протягом наступних чотирьох тижнів. Обрана концентрація АКГ ґрунтувалася на попередніх дослідженнях [206,207].

На останньому тижні експерименту мишей піддавали тесту відкритого поля. Наступного дня тварин етаназували за допомогою вуглекислого газу та декапітації. Після цього розтинали мозок, виділяли кору головного мозку і заморожували її в рідкому азоті.



**Рис. 2.1. Схема експерименту**

Усі експериментальні протоколи були схвалені Комітетом з питань експериментів на тваринах Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника (Україна) і проведені відповідно до Директиви 2010/63/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року про захист тварин, які використовуються в наукових цілях.

Таблиця 2.1.

## Склад кафетерійного раціону (КР) харчування мишей

| Дні | Назва продукту                          | Жири (г)  | Вуглеводи (г) | Білки (г) | Калорії    |
|-----|---|-----------|---------------|-----------|------------|
| 1   | Сир «Звенигора» (50 г)                  | 14        | 0             | 11        | 166        |
|     | Шоколад «Рошен» (25 г)                  | 5         | 17            | 1         | 115        |
|     | Печиво «Рошен» (25 г)                   | 5         | 17            | 2         | 119        |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>24</b> | <b>34</b>     | <b>14</b> | <b>400</b> |
| 2   | Ковбаса «Costa Brava» (50 г)            | 15        | 3             | 11        | 189        |
|     | Вафлі Артек «Світоч» (25 г)             | 7         | 17            | 1         | 128        |
|     | Крекер «Сеньйор Батоніо» (25 г)         | 4         | 16            | 2         | 112        |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>26</b> | <b>36</b>     | <b>14</b> | <b>429</b> |
| 3   | Сир «Пирятин» (50 г)                    | 14        | 0             | 14        | 182        |
|     | Шоколад «Рошен» (25 г)                  | 5         | 17            | 1         | 115        |
|     | Батончик "Лайон" (25 г)                 | 6         | 17            | 1         | 123        |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>25</b> | <b>34</b>     | <b>16</b> | <b>420</b> |
| 4   | Ковбас «Добров» (50 г)                  | 15        | 1             | 8         | 162        |
|     | Кукурудз. палички "Своя Лінія" (25 г)   | 4         | 18            | 2         | 112        |
|     | Сухарики «Флінт» (25 г)                 | 3         | 18            | 3         | 106        |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>22</b> | <b>37</b>     | <b>13</b> | <b>380</b> |
| 5   | Сосиски «М'ясна лавка» (50 г)           | 12        | 2             | 6         | 135        |
|     | Арахіс солоний «Флінт» (25 г)           | 13        | 3             | 8         | 154        |
|     | Сухий сніданок «Своя Лінія» (25 г)      | 1         | 20            | 2         | 86         |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>26</b> | <b>25</b>     | <b>16</b> | <b>375</b> |
| 6   | Сир «Звенигора» (50 г)                  | 14        | 0             | 11        | 166        |
|     | Солодка соломка «Розумний вибір» (25 г) | 2         | 20            | 3         | 96         |
|     | Чіпси «Лейс» (25 г)                     | 8         | 13            | 2         | 132        |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>24</b> | <b>33</b>     | <b>16</b> | <b>394</b> |
| 7   | Ковбаса «Добров» (50 г)                 | 8         | 0             | 4         | 162        |
|     | Кукурудз. палички «Своя Лінія» (25 г)   | 8         | 36            | 3         | 112        |
|     | Арахіс солоний «Флінт» (25 г)           | 9         | 9             | 3         | 139        |
|     | <b>Загалом</b>                          | <b>25</b> | <b>45</b>     | <b>10</b> | <b>413</b> |

## **2.2. Поведінковий тест відкритого поля**

Тест відкритого поля проводили в полівінілхлоридній камері (40 × 40 см), яка була розділена на 16 квадратів розміром 10 × 10 см. Мишу розміщували у центрі камери і включали камеру. Експериментатор залишав приміщення, де проводився тест. Миша протягом 10 хв мала можливість вільно досліджувати камеру. Далі отримані відео аналізувалися за допомогою програмного забезпечення ToxTrac (версія 2.98), розроблене командою Магнуса Андерссона [208] (<https://sourceforge.net/projects/toxtrac/>), яке використовувалося для реєстрації рухової та тривожно-подібної активності. У даному тесті визначали загальну пройдену відстань, час, проведений у центральних квадратах (внутрішня зона), час латентності (період від моменту розміщення миші в центрі відкритої арени до моменту, коли вона залишає центральні квадрати, щоб досліджувати арену), а також кількість фекальних кульок, залишених мишею, щоб дослідити ознаки тривожної поведінки у мишей [209].

## **2.3. Визначення індукованої рухової активності**

Мух, які відновилися (протягом 24 годин) після наркозу вуглекислим газом, переносили в порожні скляні пробірки (по 10 мух на пробірку діаметром 1,3 см і висотою 15 см) для визначення негативної геотаксисної поведінки. Негативна поведінка геотаксису визначалася як активність лазіння, що визначається як відсоток мух, які піднялися принаймні на 5 см вгору по стінці скляної пробірки протягом 20 с після обережного постукування по дну пробірки [210]. Аналіз проводили тричі для кожного біологічного повтору та усереднювали.

## **2.4. Визначення стійкості до теплового стресу та голодування**

Для оцінки стійкості до теплового стресу двох мух переносили в порожні скляні флакони об'ємом 5 мл з ватними пробками і поміщали у водяну баню з

температурою 41°C. Спостерігали повну нерухомість мухи – тепловий параліч, і реєстрували час, необхідний для досягнення коми [211].

Для вимірювання стійкості до голодування групи з 9-10 мух переносили в пластикові флакони об'ємом 28 мл, що містили 5 мл дистильованої води, загущеної 1% агаром, і закривали ватними пробками для запобігання висиханню. Кількість загиблих мух реєстрували кожні 24 години, поки всі мухи не загинули.

## **2.5. Визначення рівня триацилгліцеролів, глюкози та глікогену**

Для визначення рівня триацилгліцеролів (ТАГ) заморожених мух гомогенізували у співвідношенні 1:50 (маса мг: об'єм мкл) у фосфатно-буферному розчині (PBS) (рН 7,4) з 0,05% тритону X-100. Одержані гомогенати нагрівали при 70°C протягом 10 хв для інактивації ендогенних ферментів.

Для визначення рівнів вільної глюкози та глікогену заморожених мух або кору головного мозку гомогенізували у співвідношенні 1:10 (мг маси : мкл об'єму) у PBS, а потім центрифугували (16100 g, 15 хв, 21°C). Для визначення рівня глікогену останній спочатку гідролізували до глюкози. Для цього 10 мкл надосадової рідини інкубували з амілоглюкозидазою (Sigma-Aldrich, №10115; 0,56 Од/мкл) протягом 2 годин при 37°C. Після інкубації у зразках вимірювали рівень глюкози. Рівень глікогену розраховували шляхом віднімання рівня вільної глюкози від рівня глюкози, отриманого після інкубації з амілоглюкозидазою. Рівні глюкози та ТАГ вимірювали за допомогою діагностичних наборів Товариства з обмеженою відповідальністю та науково-виробничого підприємства «Філісіт-Діагностика» (м. Дніпро, Україна), дотримуючись інструкцій виробника.

Принцип методу полягає в тому, що глюкоза під дією ферменту глюкозооксидази окислюється до глюконової кислоти з виділенням пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Пероксид водню, натомість, вступає в кольорову реакцію з хромогенними сполуками (фенолом та 4-амінофеназоном) під дією пероксидази з утворенням хіноніміну. Інтенсивність забарвлення розчину, зумовлена



концентрацією хіноніміну, пропорційна початковій концентрації глюкози у зразку. Цю інтенсивність вимірюють фотометрично на довжині хвилі 505 нм.

Метод визначення триацилгліцеролів ґрунтується на ферментативному розщепленні жирів і подальшій кольоровій реакції. Спочатку фермент ліпаза розщеплює триацилгліцероли на складові частини: гліцерол і жирні кислоти. Гліцерол фосфорилується ферментом гліцерокіназою, утворюючи гліцерил-3-фосфат. Гліцерил-3-фосфат окислюється ферментом гліцерофосфатоксидазою, при цьому утворюється пероксид водню. Саме пероксид водню є ключовим компонентом для подальшої кольорової реакції. Пероксид водню взаємодіє з 4-амінофеназоном та 4-хлорфенолом за участю ферменту пероксидази, утворюючи забарвлену сполуку – хінонімін. Інтенсивність забарвлення розчину, зумовлена концентрацією хіноніміну, пропорційна початковій концентрації триацилгліцеролів у зразку. Цю інтенсивність вимірюють фотометрично на довжині хвилі 505 нм.

## **2.6. Ферментативне визначення вільного глютамату в тканинах**

Метод визначення рівня вільного глютамату в тканинах був розроблений на основі раніше відомого методу визначення вільного лактату в крові [212]. Тканину кори головного мозку мишей гомогенізували в 0,5 М хлоридній кислоті у співвідношенні 1:10 (об:об) та центрифугували протягом 15 хв (13000 g, 4°C). Надосадову рідину нейтралізували 2 М КОН, знову центрифугували протягом 15 хв (13000 g, 4°C) і збирали надосадову рідину. Реакційна суміш являла собою 0,5 М гліцин-гідразиновий буфер (рН 9,5) з 2 мМ НАД<sup>+</sup>, 2 Од/мл глютамаатдегідрогенази та 50 мкл нейтралізованого супернатанту. Загальний об'єм реакційної суміші становив 1,25 мл. Вміст глютамату в корі головного мозку визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої на основі стандартних розчинів глютамату з концентраціями від 10 до 250 мкМ.

## 2.7. Визначення вмісту пероксидів ліпідів

Метод визначення вмісту пероксидів ліпідів (ПОЛ) з ксиленолом оранжевим ґрунтується на тому, що іони  $\text{Fe}^{2+}$  окислюються ПОЛ до іонів  $\text{Fe}^{3+}$ . Іони  $\text{Fe}^{3+}$  утворюють комплекс з ксиленолом оранжевим, який поглинає світло з максимумом в області 580 нм при низьких значеннях рН.

Гідропероксид кумену (ГПК) також здатний окислювати залізо в кислому середовищі. Якщо він додається у відомих концентраціях, його можна використати як внутрішній стандарт. В даному методі вміст ПОЛ розраховують в еквівалентах гідропероксиду кумену [213].

Зразки гомегенізували у співвідношенні 1:10 (для тканин кортексу мозку) або 1:20 (для мух) (маса мкг : мкл спирту) у 96% етанолі. Проби центрифугували в пластикових мікропробірках впродовж 10 хв, 10000 g, 4°C. Реакційна суміш містила 0,1 мМ ксиленолу оранжевого, 25 мМ  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,25 мМ  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 50 мкл супернатанту та була доведена водою до об'єму 1,5 мл. Одночасно з дослідними пробами готувати холосту пробу, яка містила аналогічний об'єм спирту замість супернатанту. Проби залишали інкубувати протягом 60 хв при кімнатній температурі. Як стандарт використовували ГПК. Після інкубації визначити оптичну густину проб при довжині хвилі 580 нм. Кількість окислених ліпідів виражали, як мкмоль еквіваленту ГПК на грам сирі маси (гсм) тканини.

## 2.8. Визначення вмісту тіолів

В основі методу визначення вмісту сульфгідрильних груп лежить реакція тіол-дисульфідного обміну. У ході реакції вивільнюється аніон 2-нітро-5-тіобензоатної кислоти (ДТНБ), який поглинає світло з максимумом при довжині хвилі 412 нм. Поглинання світла ДТНБ залежить від рН. Переважно реакцію проводять у лужному середовищі. Даний метод в цих умовах специфічний до сульфгідрильних груп і дуже чутливий. Тому він використовується для

визначення кількості сульфгідрильних груп у низькомолекулярних тіолах, нативних або денатурованих білках.

Зразки гомогенізували в охолодженому (4°C) середовищі гомогенізації (50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,0) і 0,5 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА)) у співвідношенні 1:10 (мкг дослідного зразка : мкл середовища гомогенізації) та центрифугували в закритих пластикових мікропробірках при 4°C, 10 хв, 10000 g.

Для визначення загального вмісту сульфгідрильних груп у пробірці послідовно додавали 1385 мкл калій-фосфатного буферу (100 мМ, рН 8,0), 75 мкл 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБ) (1 мМ), 40 мкл супернатанту. Проби інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі та вимірювали їх оптичну густину в пластиковій кюветі при  $\lambda=412$  нм. Паралельно готували холості проби з аналогічним об'ємом середовища гомогенізації замість супернатанту.

Для визначення низькомолекулярних тіолів білки слід відділити трихлороцтовою кислотою (ТХО). Для цього змішували супернатант з 30%-вою ТХО у співвідношенні 2:1. У пробірці послідовно додавали 1365 мкл Трис-НСІ (100 мМ, рН 9,0), 75 мкл ДТНБ (1 мМ), 60 мкл супернатанту. Інкубували 30 хв при кімнатній температурі та вимірювали оптичну густину в пластиковій кюветі при  $\lambda=412$  нм.

Вміст високомолекулярних тіолів вираховували як різницю між загальним вмістом тіолів та вмістом низькомолекулярних тіолів.

## **2.9. Визначення рівня відновленого і окисленого глутатіону**

Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) визначали шляхом вимірювання окислення GSH ДТНБ з утворенням жовтого похідного 5'-тіо-2-нітробензойної кислоти з максимумом поглинання при 414 нм [214]. Окислений глутатіон (GSSG) вимірювали, спочатку відновлюючи його до GSH за допомогою глутатіонредуктази, а потім вимірювали суму відновленого та окисленого глутатіону за допомогою ДТНБ, як описано вище. Потім

концентрацію GSSG розраховували шляхом віднімання GSH від суми GSH + GSSG.

## **2.10. Визначення активності гліколітичних ферментів, та НАДФН-залежних ферментів та глютаматдегідрогенази**

Для визначення активності гліколітичних та НАДФН-залежних ферментів заморожені тканини зважували та гомогенізували у співвідношенні 1:10 (об:об) у холодному гомогенізаційному середовищі, що містило 50 мМ імідазольного буфера (рН 7,5), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ), 1 мМ дитіотреїтолу, 20 мМ NaF і 150 мМ KCl. Потім гомогенати центрифугували (16 100 g, 15 хв, 4°C) на центрифuzі Eppendorf 5415 R (Гамбург, Німеччина), а супернатанти збирали і використовували для біохімічних аналізів. Активність гексокінази (ГК), фосфофруктокінази (ФФК) та піруваткінази (ПК) вимірювали у сполучених ферментативних реакціях шляхом моніторингу відновлення НАДФ<sup>+</sup> (ГК) або окислення НАДН (ФФК, ПК) при 340 нм.

Активність НАДФН-залежної ізоцитратдегідрогенази (ІДГ) та малатдегідрогенази (МДГ) вимірювали за відновленням НАДФ<sup>+</sup> при 340 нм [215].

Для визначення активності глютаматдегідрогенази (ГДГ), Г6ФДГ та лактатдегідрогенази (ЛДГ) зразки гомогенізували у співвідношенні 1:10 (об:об) у холодному гомогенізаційному середовищі, що містило 50 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА і 1 мМ ФМСФ. Активність лактатдегідрогенази вимірювали шляхом моніторингу окислення НАДН при 340 нм під час перетворення пірувату в лактат, а активність Г6ФДГ вимірювали шляхом моніторингу відновлення НАДФ<sup>+</sup> при перетворенні глюкозо-6-фосфату до 6-фосфоглюколактону.

Для ГДГ визначали НАД-залежну та НАДФ-залежну активності за відновним амінуванням АКГ [216] та окислювальним дезамінуванням глютамату відповідно [217]. НАД-специфічну активність ГДГ оцінювали за зменшенням поглинання НАДН при 340 нм у реакційній суміші, що містила 50 мМ буферу

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0), 100 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ , 160 мкМ НАДН, 10 мМ натрієвої солі АКГ та 50 мкл надосадової рідини у кінцевому об'ємі 1,0 мл. Дезамінувальну активність оцінювали за відновленням  $\text{НАДФ}^+$  при 340 нм у реакційній суміші, що містила 100 мМ трис-НСІ (pH 8,0), 20 мМ глютамат, 100 мкМ  $\text{НАДФ}^+$  та 60 мкл надосадової рідини в кінцевому об'ємі 1,0 мл. Холості зразки не містили надосадової рідини.

Для розрахунків активностей вищезгаданих ферментів використовували коефіцієнт екстинкції для НАД(Ф)Н  $6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Одиниця активності ферменту визначається як кількість ферменту, що споживає 1 мкмоль субстрату або генерує 1 мкмоль продукту за хвилину; активність виражається в міжнародних одиницях на міліграм розчинного білку (Од/мг білку).

Концентрацію розчинного білку визначали за допомогою методу Coomassie Brilliant blue G250 [218] з використанням спектрофотометра BioPhotometer UV/Vis (Eppendorf) і бичачого сироваткового альбуміну (BSA) як стандарту.

### **2.11. Визначення активності антиоксидантних ферментів**

Для визначення активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів заморожені зразки тканин гомогенізували 1:10 (об'ємні частки) у середовищі, що містило 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА і 1 мМ інгібітора протеази ФМСФ. Потім гомогенати центрифугували (16 100 g, 15 хв, 4°C) на центрифугу Eppendorf 5415 R (Гамбург, Німеччина), а супернатанти збирали і використовували для біохімічних аналізів. Активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів визначали спектрофотометричними методами, заснованими на реєстрації утворення аддукту GSH та 1-хлор-2,4-динітробензолу (ХДНБ) при 340 нм для аналізу GST, окислення  $\text{H}_2\text{O}_2$  при 240 нм для визначення каталази, окислення НАДФН при 340 нм для глутатіонпероксидази (ГП) та відновлення  $\text{НАДФ}^+$  для Г6ФДГ [215]. Активність NQO1 вимірювали за відновленням дикумаролчутливого 2,6-дихлорфеноліндофенолу (DCPIP) при 600 нм [219]. Реакційна суміш для визначення активності NQO1 містила 25 мМ

трис-НСІ (рН 7,5), 0,7 мг BSA, 0,2 мМ НАДН, 0,01% Tween-20, 40 мкМ DCPIP і 5-10 мкл супернатанту, що містив 43-87 мкг білку в кінцевому об'ємі 1 мл. Реакцію починали з додавання DCPIP і через дві хвилини після реєстрації зниження рівня DCPIP додавали 10 мкМ дикумаролу для пригнічення специфічної активності NQO1. Активність NQO1, що інгибується дикумаролом, розраховували, використовуючи коефіцієнт екстинкції  $21,0 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для DCPIP.

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали при 406 нм як інгібування окиснення кверцетину супероксид-аніоном [220] у середовищі, що містило (кінцеві концентрації) 30 мМ натрій-гліциновий буфер (рН 11,5), 0,3 мМ ЕДТА, 0,8 мМ (TEMED), 50 мкМ кверцетину та 1-30 мкл клітинного екстракту в кінцевому об'ємі 2,0 мл. Одиницю активності СОД визначали як кількість розчинного білка супернатанту, який інгибував максимальну швидкість окиснення кверцетину на 50%.

## **2.12. Нативний електрофорез у поліакриламідному гелі**

Для визначення активності ізоформ СОД, GST та ЛДГ використовували нативний електрофорез у поліакриламідному гелі. Процедура проводили за методом Девіса [221] з використанням 9%-вого розділяючого гелю.

Супернатанти, отримані як описано вище для антиоксидантних ферментів, змішували з середовищем, що містить 20% гліцеролу і 0,2% бромфенолового синього (1:1, v:v), і вносили в кожну лунку зразки, що містять 40 мкг загального білку для виявлення СОД.

Ідентифікацію ізоформ СОД проводили за методом Бошампа та Фрідовича [222]. Для визначення активності СОД гель інкубували в 36 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0), що містив 0,1% нітросинього тетразолію, протягом 20 хв при легкому перемішуванні. Потім гель переносили в розчин, що містив 36 мМ фосфатний буфер (рН 7,0), 0,2% тетраметилетилендіамін і 28 мкМ рибофлавін, на 10 хвилин при обережному перемішуванні. Потім гель залишали в розчині під ультрафіолетовим світлом до появи прозорих смуг на синьому фоні.

Для визначення активності GST гель інкубували в 100 мМ калій-фосфатному буфері (рН 6,5), що містить 4,5 мМ відновленого глутатіону, 1 мМ 1-хлор-2,4-динітробензолу та 1 мМ нітросинього тетразолію при 37°C протягом 10 хв при легкому перемішуванні. Потім гель промивали у воді і переносили в розчин, що містив 100 мМ трис-Cl (рН 9,6) і 3 мМ феназин-метосульфат, на 15 хв до появи білих смуг на синьому гелі [223].

Для визначення активності ЛДГ гель інкубували в 50 мл реакційної суміші, що містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 480 мг лактату літію, 16 мг NAD<sup>+</sup>, 2 мг феназин-метосульфату та 10 мг нітросинього тетразолію, протягом 15 хв до появи синіх смуг на гелі [224].

Відносну інтенсивність смуг оцінювали шляхом вимірювання густини за допомогою ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) (Schneider et al., 2012). Активність кожної ізоформи СОД оцінювали окремо і виражали у відсотках. За 100% приймали інтенсивність чотирьох смуг (для чотирьох експериментальних груп) однієї з ізоформ СОД. Аналізували фотографії з чотирьох незалежних повторень.

### **2.13. Прозорий нативний електрофорез (Clear native electrophoresis)**

Прозорий нативний електрофорез – це нативний електрофорез у поліакриламідному гелі з наступним фарбуванням у гелі для визначення активності комплексів мітохондріального дихального ланцюга [225]. Мітохондрії виділяли зі свіжої кори головного мозку (~80-100 мг). Перед аналізом мітохондрії повторно осаджували, а осад солюбілізували за допомогою дигітоніну (6 г/г білку) у буфері для зразків [225]. Зразки (70 мкг білку) проводили на неградієнтних гелях товщиною 1 мм, приготованих за методом, як описано у статті Луо [226]. Електродний буфер містив 50 мМ бісТрис і 50 мМ трицин (рН 6,8), а катодний буфер – ті ж компоненти, що й електродний буфер, з додаванням 20 мкг/мл Coomassie Brilliant Blue G-250. Білки пропускали через гель протягом 30 хв при 150 В у катодному буфері. Потім катодний буфер

замінювали на електродний буфер і продовжували процес електрофорезу протягом 150 хв при 250 В. Гелі фарбували для визначення активності суперкомплексів мітохондріального електронтранспортного ланцюга, що містить комплекс I, комплекс II, комплекс IV або комплекс V. Усі реакції, за винятком активності комплексу V, зупиняли додаванням 10% оцтової кислоти. Гелі фотографували та оцінювали площі піків за допомогою програми ImageJ [227]. Смуги на гелях були анотовані, як описано раніше [225].

#### 2.14. Полімеразна ланцюгова реакція з агарозним гелем електрофорезом

Рівні інформаційної рибонуклеїнової кислоти (іРНК) визначали за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією з подальшою детекцією продуктів в агарозному гелі. іРНК очищали за допомогою набору Monarch® Total RNA Miniprep (New England Biolabs (NEB), T2010). Оцінювали відносний рівень іРНК генів *Ugt37A2*, *GstD2*, *Cyp6a2* та *Tbp* (ТАТА-бокс-зв'язуючий білок) як референтного гена (Таблиця 2.2). Після фарбування бромистим етидієм гелі сканували і вимірювали інтенсивність смуг у довільних одиницях за допомогою програми ImageJ. Значення на графіку виражали як відношення рівня транскриптів експериментальних генів до рівня транскрипту гена *Tbp*.

**Таблиця 2.2.**

Олігонуклеотидні послідовності (праймери), використані в дослідженні для аналізу рівнів іРНК за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції з агарозним гелем електрофорезом.

| Ген            | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') |
|----------------|------------------------|------------------------|
| <i>Tbp</i>     | ССААГСГТАТГГГГААСТТГ   | СТГГСАГСАГАААГТАТГС    |
| <i>Ugt37A2</i> | ГСТТГГСТГГТТАСАГСТС    | ГСАТГТТГГГАТСАТСАССГ   |
| <i>GstD2</i>   | ССГСГТТТГГАТТТСТСГАС   | ААСГТГГАГАСАГТГГАСАГ   |
| <i>Cyp6a2</i>  | АССАСГТАГТСГТТГАГГГ    | ГГСАГСТААСГТАСАГААТСС  |



## 2.15. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (RT-qPCR) проводили з використанням системи AriaMx (Agilent Technologies, Inc.). РНК виділяли з 11-14 мг кори головного мозку мишей за допомогою набору Monarch® Total RNA Miniprep Kit (T2010, New England Biolabs) відповідно до інструкцій виробника. Кількісне визначення ізольованої РНК проводили на спектрофотометрі DeNovix® DS-11 FX+ (DeNovix Inc., Wilmington, DE, США). Зразки розводили до досягнення концентрації близько 300-400 нг/мкл РНК для всіх зразків. Синтез кодуєчої ДНК (кДНК) проводили за допомогою набору ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (E6560, New England Biolabs), дотримуючись інструкцій виробника (стандартний протокол) з використанням рандомізованої суміші праймерів, що входить до набору. Шістнадцяту частину реакції синтезу кДНК використовували для ПЛР за допомогою Luna® Universal qPCR Master Mix (E3003, New England Biolabs). 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 планшета (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-карбоксіфлуоресцеїну (6-FAM) та 6-карбоксі-X-родаміну (ROX). Сигнали флуоресценції зразків нормалізували до рівнів флуоресценції, що детектуються ROX-каналом. Відносну зміну рівня експресії іРНК розраховували методом  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  [228], використовуючи значення  $Cq$  для експресії генів RPLP0 (кодує 60S кислий рибосомний білок P0) або RPL27 (кодує 60S рибосомний білок L27) як референсні. Олігонуклеотидні послідовності (див. табл. 2.3) були виготовлені компанією Metabion International AG (Штайнкірхен, Німеччина).

Таблиця 2.3.

Олігонуклеотидні послідовності (праймери), використані в дослідженні для аналізу рівнів іРНК за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

| Ген             | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') |
|-----------------|------------------------|------------------------|
| <i>RPLP0</i>    | AGGACCTCACTGAGATTCGG   | GAAGGAGGTCTTCTCGGGTC   |
| <i>RPL27</i>    | TCAGGGACCCAGCTTTGAAG   | TCCCTGTCTTGTATCGCTCC   |
| <i>PDK4</i>     | GTCCTTCCTTGACCCCAGTAG  | CCAAAACCAGCCAAAGGGG    |
| <i>GADD45A</i>  | TGGTGACCAACCCACATTCA   | CGGGAGATTAATCACGGGCA   |
| <i>RICTOR</i>   | CGCTCGTGGCCAGGTATTAT   | GGATCTACACTGAGCAGGGC   |
| <i>STK11</i>    | CCTACTCCGAGGCATGTTGG   | AGCTGTGCTGCCTAATCTGT   |
| <i>BNIP3</i>    | ACACCACTCTGTCTGAGGAAG  | TGCTGAGAGTAGCTGTGCG    |
| <i>TFEB</i>     | TGCTGAAGGTGCAGTCCTAC   | CCGAGGTGGACAGTACGTG    |
| <i>DDIT3</i>    | CCCAGGAAACGAAGAGGAAGAA | GGATGTGCGTGTGACCTCT    |
| <i>ATG5</i>     | TGTGCTTCGAGATGTGTGGT   | ATTCAGGGGTGTGCCTTCA    |
| <i>BECN1</i>    | CCAGGAACTCACAGCTCCAT   | ACCATCCTGGCGAGTTTCAA   |
| <i>SQSTM1</i>   | CTACCGCGATGAGGATGGG    | CACAGATCACATTGGGGTGC   |
| <i>GSTM3</i>    | TATGGACACCCGCATACAGC   | GCTTCATTTTCTCAGGGATGGC |
| <i>GNMT</i>     | GCCAGACTGCAAAGGCTGT    | TGTGGGCTTTGTTGTTGACTG  |
| <i>PPARGC1A</i> | CTCTGGAAGTGCAGGCCTAA   | GCCTTGGGTACCAGAACAAC   |
| <i>UGDH</i>     | TGCATGGAAATTCTCCAACCCT | AGATCGGCTTCTCTGATGGC   |

## 2.16. Статистичний аналіз

Для аналізу результатів дослідження та їхнього графічного представлення застосовували програмне забезпечення GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Сан-Дієго, Каліфорнія, США, <https://www.graphpad.com>). Перевірку даних на нормальний розподіл здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Розрахунки константи інгібування ( $K_{50}$ ) швидкості реакції окислення кверцетину, що використовували для оцінки активності супероксиддисмутази (СОД), виконували за допомогою програми «Kinetics». Як основні статистичні показники використовували середнє арифметичне (M) та похибку середнього арифметичного (SEM).

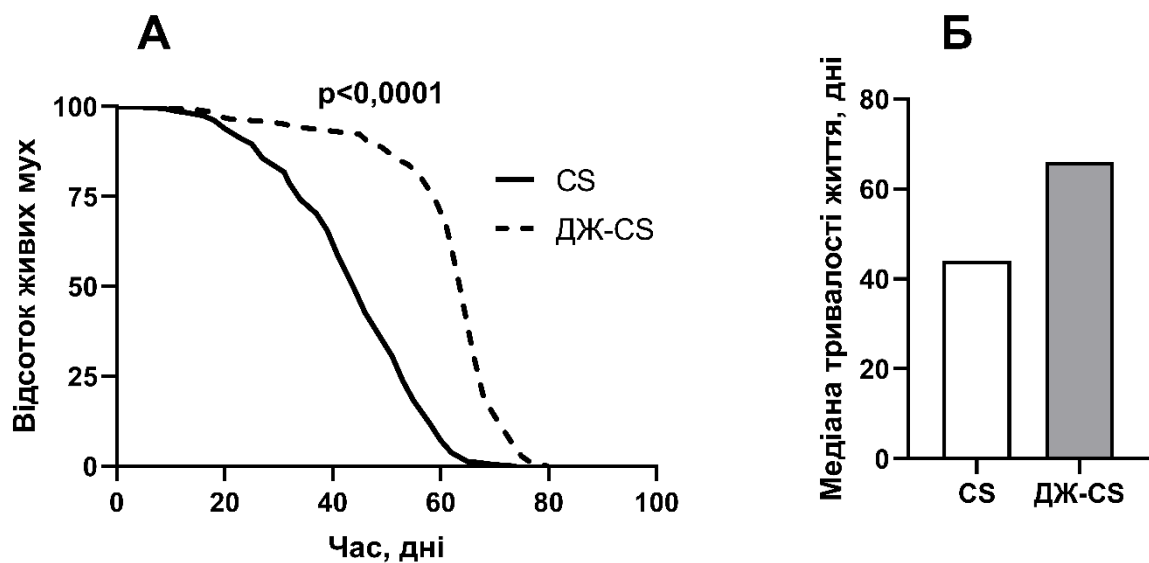
Для аналізу даних по тривалості життя плодових мух використовували лог-ранк тест (Log-rank test). Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) використовувався для порівняння середніх значень між двома або більше групами. Для порівняння груп, розподіл даних яких був нормальним, використовували параметричні критерії, а саме: критерій Стюдента для порівняння двох непарних вибірок і критерій Дункана для множинних порівнянь. Порівняння груп, дані яких не мали нормального розподілу, здійснювали за допомогою непараметричного критерію Данна. Рівень статистичної значущості для всіх тестів встановлювався на рівні  $p < 0,05$ .

### Розділ 3. Результати досліджень

#### 3.1. Ефекти екзогенного альфа-кетоглютарату на фізіологічні та біохімічні показники в тілі довгоживучої сублінії *D. melanogaster*

##### 3.1.1. Вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на тривалість життя

У дослідженні використовували довгоживучу популяцію мух, яка була відібрана протягом п'яти поколінь з батьківської популяції Canton-S (далі позначається як ДЖ-CS) і жила довше, ніж вихідна лінія (Рис. 3.1А), маючи середню тривалість життя 66 днів на стандартному живильному середовищі (5Д:5С, 5% дріжджів, 5% сахарози) (Рис. 3.1Б).

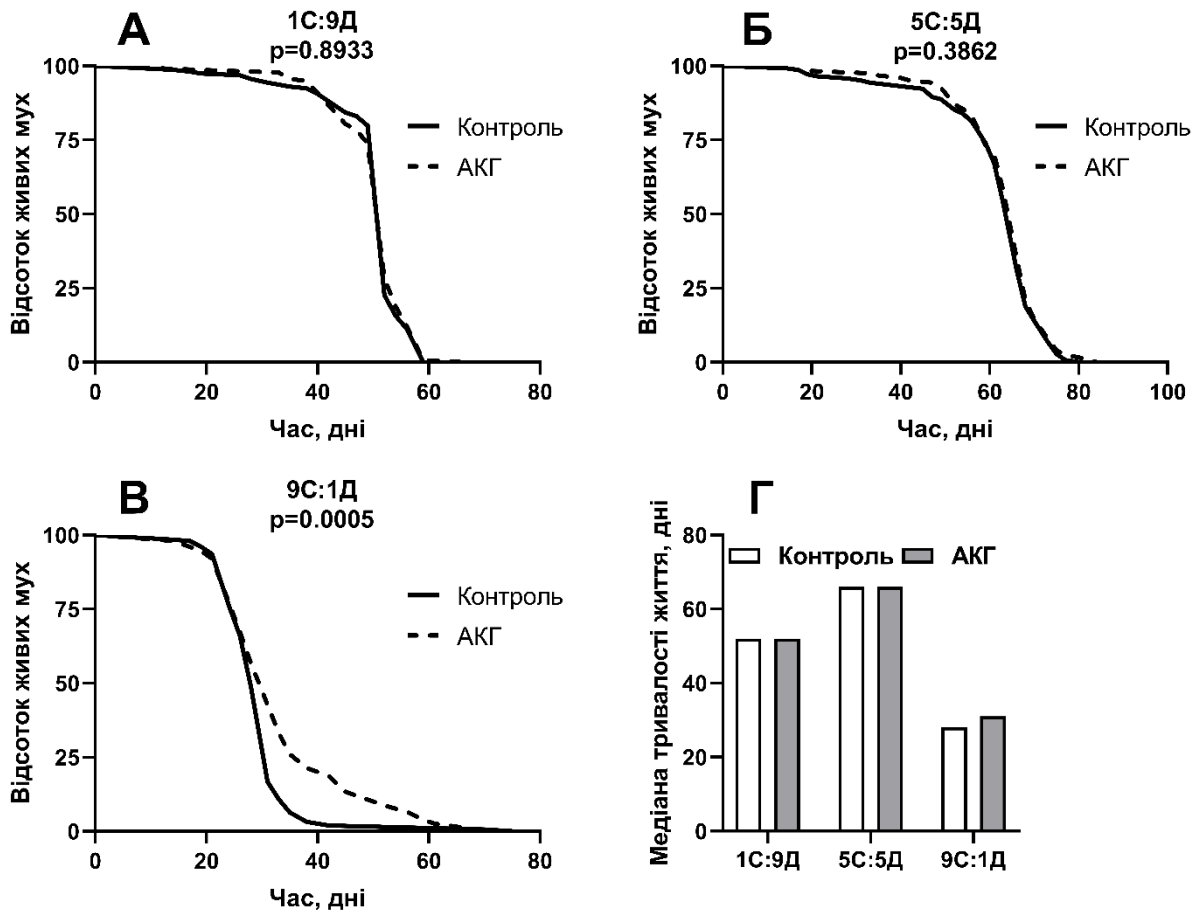


**Рис. 3.1.** Тривалість життя (А) батьківської популяції мух лінії Canton-S (CS) та довгоживучої популяції мух (ДЖ-CS). (Б) Медіана тривалості життя батьківської (CS) та довгоживучої популяції мух (ДЖ-CS). Відмінності між тривалістю життя були проаналізовані за допомогою лог-ранк тесту. Розмір вибірки становив 143 особини для сублінії ДЖ-CS і 473 особини для лінії Canton-S.

На тривалість життя може впливати співвідношення макроелементів [211]. Втручання, спрямовані на подовження тривалості життя, можуть не продовжити або навіть скоротити тривалість життя на середовищі з високим співвідношенням білків до вуглеводів [229–231]. Натомість, нестача білків може посилювати пролонгуючі ефекти деяких препаратів [229]. У цьому дослідженні досліджувався вплив АКГ на тривалість життя мух сублінії ДЖ-С на середовищах з різним співвідношенням дріжджів (Д; як багатого на білки поживного компонента) та сахарози (С).

Додавання до раціону 5Д:5С 10 мМ АКГ не впливало на тривалість життя (Рис. 3.2Б) та медіану тривалості життя (Рис. 3.2Г) довгоживучих самок мух Canton-S (ДЖ-С).

Контрольні групи (без АКГ) мали меншу тривалість життя на живильному середовищі із співвідношенням 1С:9Д та 9С:1Д порівняно з тими, що споживали середовище 5Д:5С (Рис. 3А-В). Зокрема, споживання середовища 1С:9Д та 9С:1Д скорочувало медіану тривалості життя мух приблизно на 21% та 58% відповідно (Рис. 3.2Г). Додавання 10 мМ АКГ до живильного середовища 1С:9Д не впливало на тривалість життя мух (Рис. 3.2А). Однак на середовищі 9С:1Д АКГ збільшував середню тривалість життя самок на 11% (Рис. 3.2В-Г). Незважаючи на те, що виявлено ефект АКГ на середовищі 9С:1Д, останнє не є фізіологічним для плодкових мух, оскільки воно містить низькі концентрації білку. Незважаючи на відсутність впливу на тривалість життя на середовищі 5Д:5С, АКГ може змінювати біохімічні та фізіологічні характеристики мух. Вимірювання цих показників у мух, які харчувалися стандартним середовищем, дало б змогу з'ясувати, на які параметри може вплинути АКГ у довгоживучій сублінії. Таким чином, фізіологічні та біохімічні параметри були виміряні у мух, які споживали стандартне живильне середовище.

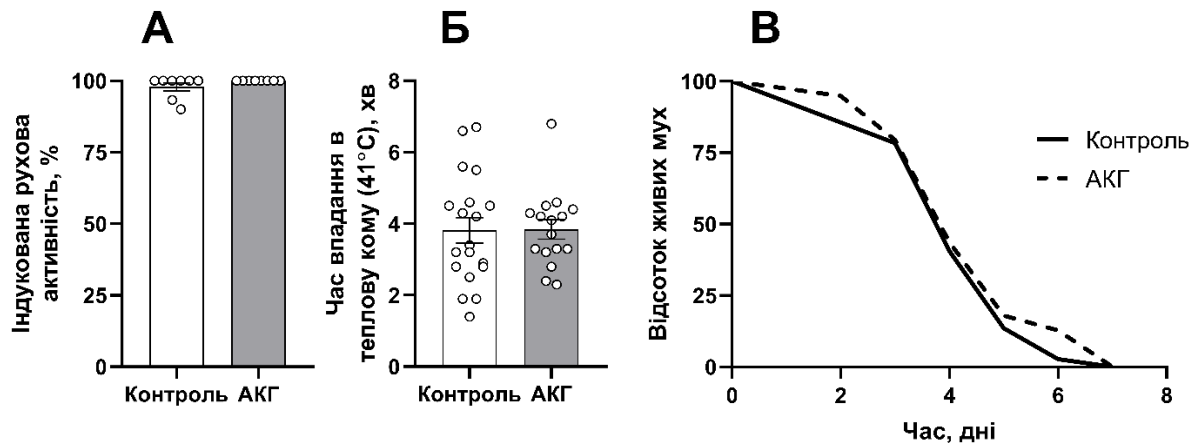


**Рис. 3.2.** Тривалість життя довгоживучої популяції самок мух лінії Canton-S на середовищах з (А) 1% сахарози + 9% дріжджів (1С:9Д), (Б) 5% сахарози + 5% дріжджів (5С:5Д), (В) 9% сахарози + 1% дріжджів (9С:1Д) та (Г) їх медіана тривалості життя. Відмінності між тривалістю життя були проаналізовані за допомогою лог-ранк тесту. Розмір вибірки становив 124-159 особин.

### 3.1.2. Вплив АКГ на рухову активність, стійкість до теплового шоку та голодування у довгоживучої сублінії *D. melanogaster*

Після цього було оцінено, чи може АКГ впливати на функціональне старіння у мух ДЖ-CS. Як маркери функціонального старіння використовували індуквану рухову активність та стійкість до теплового шоку і голодування.

Самки ДЖ-CS середнього віку (25-денні), яких годували стандартним середовищем (5С:5Д) з 10 мМ АКГ, суттєво не відрізнялися від контрольних мух за індукованою руховою активністю, стійкістю до теплового шоку та голодування (Рис. 3.3)



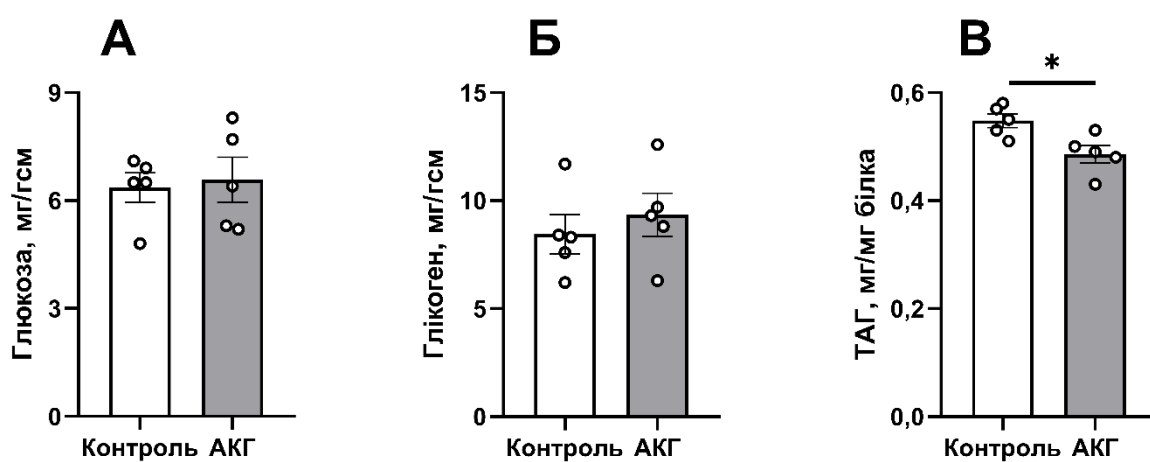
**Рис. 3.3.** Індукована рухова активність, стійкість до теплового стресу і голодування у 25-денних самок *D. melanogaster* ДЖ-CS, яких годували 5С:5Д середовищем (контрольна група) або 5С:5Д середовищем з додаванням 10 мМ АКГ (група АКГ) протягом трьох тижнів, починаючи з 4-денного віку. (А) Індукована рухова активність (n = 8 повторів по 9-10 мух у кожному), (Б) час впадання в теплову кому (9 і 8 пар мух з трьох незалежних повторів були протестовані для контрольної групи і групи, що отримувала АКГ, відповідно), і (В) виживання під час голодування (n = 37-39 мух з трьох незалежних повторів). Дані представлені як середнє значення ± стандартна помилка середнього (SEM).

### 3.1.3. Вплив АКГ на рівень запасних метаболітів у довгоживучій сублінії *D. melanogaster*

АКГ може активувати деякі метаболічні шляхи у довгоживучій популяції *D. melanogaster*. Зокрема, можна очікувати активації сигнального шляху, керованого АМФК. Рівні накопичувальних метаболітів, таких як глікоген і ТАГ, є легко вимірюваними маркерами активності сигнального шляху АМФК,

оскільки АМФК пригнічує біосинтетичні процеси, такі як синтез глікогену, і активує катаболічні процеси, такі як гліколіз і розщеплення накопичувальних ліпідів [232].

Споживання мухами живильного середовища, що містить АКГ, не впливало на рівні вільної глюкози та глікогену (Рис. 3.4А, Б). Водночас, рівень ТАГ був на 11,4% нижчим у групі, що отримувала АКГ, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.4В).



**Рис. 3.4.** Рівні вільної глюкози (А), глікогену (Б) та триацилгліцеролів (В) у 25-денних самок *D. melanogaster* лінії ДЖ-CS, які споживали стандартне середовище (5С:5Д, контрольна група) або середовище з додаванням 10 мМ АКГ. \*Значимо відрізняються від контрольних значень за t-критерієм Стьюдента,  $p < 0,05$ .

### 3.1.4. Вплив АКГ на активність гліколітичних, антиоксидантних та споріднених ферментів

Щоб перевірити, чи впливає АКГ на інтенсивність катаболічних шляхів, визначали активність ключових ферментів гліколізу. Додавання до їжі 10 мМ АКГ не впливало на активність ГК, ФФК, ПК та ЛДГ (табл. 3.1)



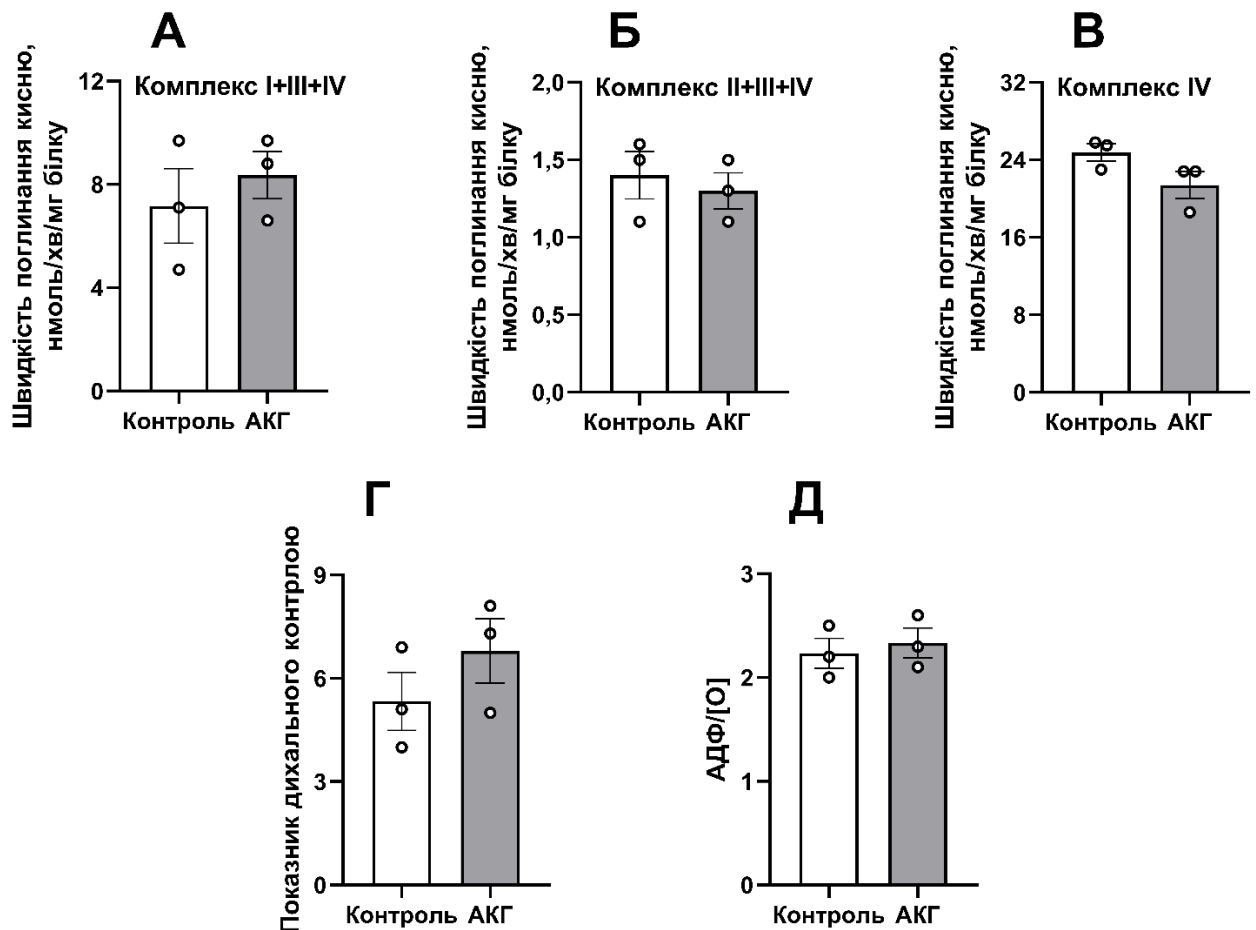
**Таблиця 3.1.**

Активність гліколітичних ферментів та ГДГ у самок *D. melanogaster* ДЖ-С5, які протягом трьох тижнів споживали стандартне середовище 5С:5Д (контрольна група) та 5С:5Д з 10 мМ АКГ

|                                   | Контроль  | АКГ       |
|-----------------------------------|-----------|-----------|
| Гексокіназа, мОд/мг білку         | 182±14    | 190±14    |
| Фосфофруктокіназа, мОд/мг білку   | 48,6±3,6  | 51,8±12,2 |
| Піруваткіназа, Од/мг білку        | 2,56±0,18 | 2,46±0,18 |
| Лактатдегідрогеназа, мОд/мг білку | 24,7±2,5  | 23,8±2,8  |
| НАД-залежна ГДГ, мОд/мг білку     | 54,4±8,9  | 45,0±2,5  |
| НАДФ-залежна ГДГ, мОд/мг білку    | 17,5±3,3  | 15,0±1,6  |

Споживання мухами середовища з додаванням АКГ не впливало на активність ГДГ у лінії ДЖ-С5 (табл. 3.1). Це може свідчити про те, що вплив АКГ на мух ДЖ-С5 може бути не опосередкований АМФК або що активність мішеней АМФК у мух ДЖ-С5 вже була встановлена на максимумі.

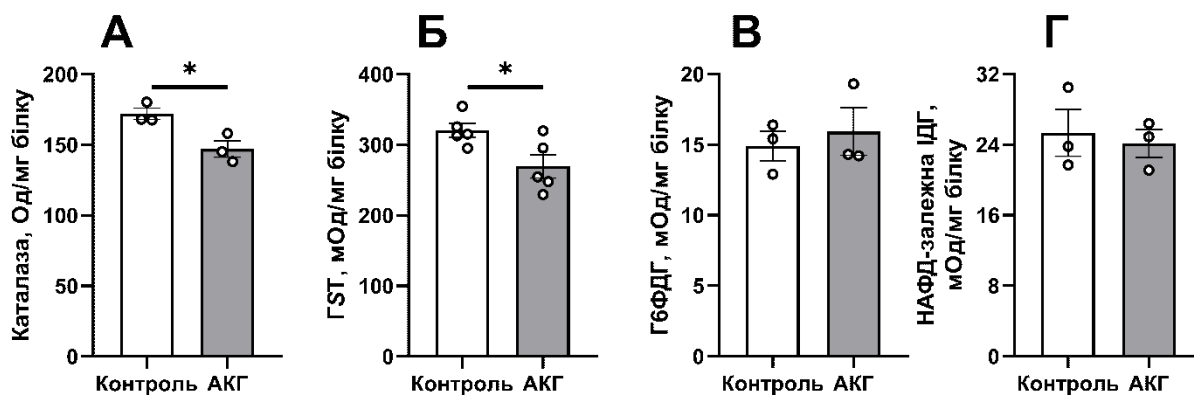
Також не спостерігалось жодного впливу їжі з додаванням АКГ на швидкість споживання кисню мітохондріями ДЖ-С5 мух (Рис. 3.5А-Д).



**Рис. 3.5.** Швидкість (А) НАДН-зв'язаного споживання кисню, (Б) сукцинат-зв'язаного споживання кисню і (В) тетраметилфенілендіамін-зв'язаного споживання кисню мітохондріями, ізольованими з 25-денних самок *D. melanogaster* сублінії ДЖ-СS, яких годували стандартною їжею (5С:5Д, контрольна група) або тією самою їжею з додаванням 10 мМ АКГ. (Г) Контроль дихання та (Д) співвідношення АДФ/О. Дані представлені як середнє значення  $\pm$  SEM. У кожному повторі використовували близько 100 мух.

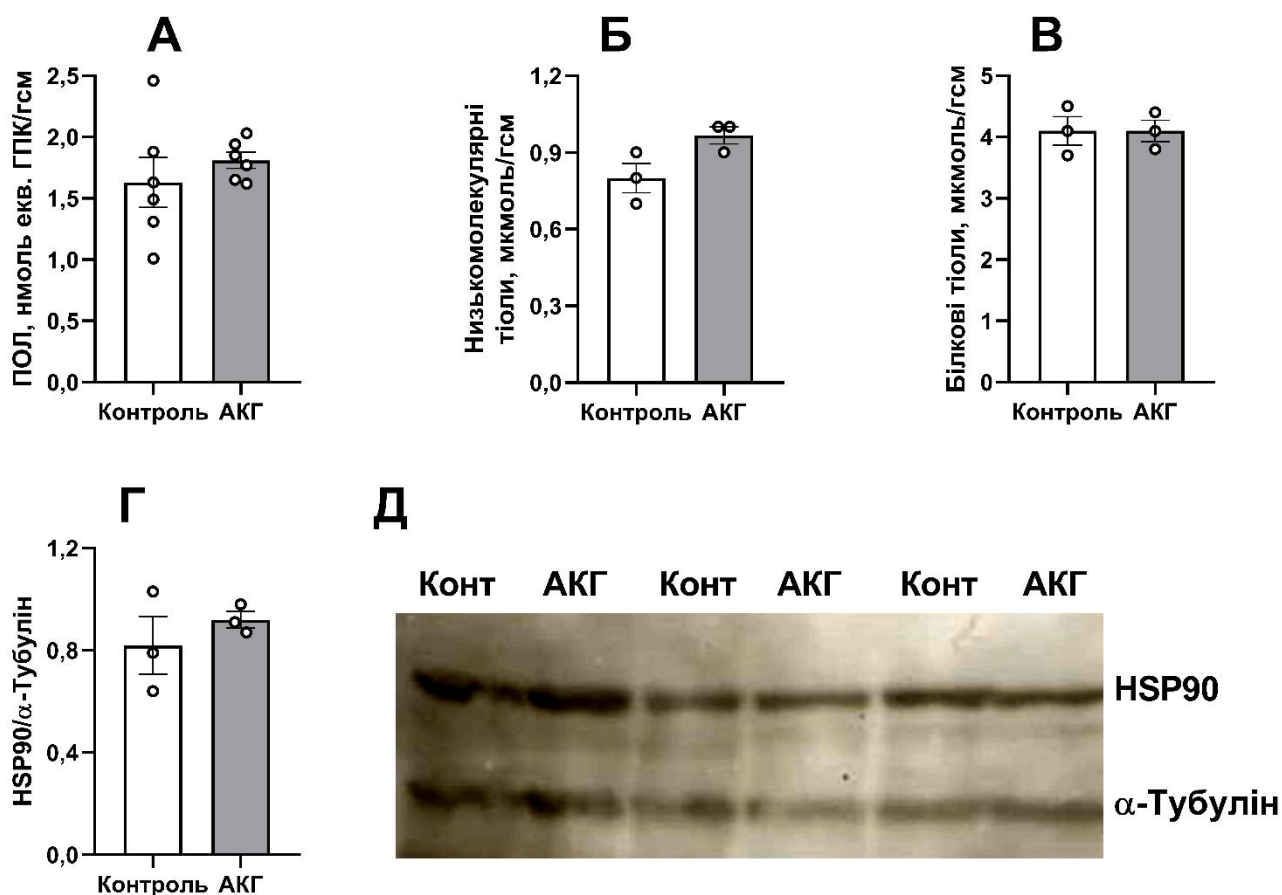
За певних умов АКГ може індукувати утворення АФК. Було проведено оцінку активності антиоксидантних та супутніх ферментів, а також рівня показників оксидативного стресу у 25-денних самок ДЖ-СS. Активність антиоксидантних ферментів, каталази та GST, була нижчою у мух, які споживали живильне середовище з додаванням АКГ (Рис. 3.6А, Б). Зокрема, активність

каталази була на 14,5% нижчою (Рис. 3.6А), а активність GST – на 16% нижчою у мух, які споживали АКГ (Рис. 3.5Б), ніж у контрольній групі.



**Рис. 3.6.** Активність (А) каталази, (Б) GST, (С) Г6ФДГ та (Г) НАДФН-залежної ІДГ у 25-денних самок *D. melanogaster* сублінії ДЖ-С5, які споживали стандартне середовище (5С:5Д, контрольна група) або середовище з додаванням 10 мМ АКГ. Дані представлені як середнє значення  $\pm$  SEM. У кожному повторі використовували близько 20 мух. \*Значимо відрізняються від контрольних значень за t-критерієм Стьюдента,  $p < 0,05$ .

Ферменти, що відновлюють НАДФ<sup>+</sup>, виробляють кофактор для глутатіон- і тіоредоксинредуктаз і є важливими для антиоксидантного захисту. Ключова реакція пентозофосфатного шляху, що каталізується Г6ФДГ, є важливим джерелом НАДФН, який також продукується НАДФ<sup>+</sup>-залежною ІДГ. Споживання середовища з АКГ не впливало на активність Г6ФДГ та НАДФ-залежної ІДГ (Рис. 3.6В, Г).



**Рис. 3.7.** Маркери оксидативного стресу та рівень HSP90 у 25-денних самок *D. melanogaster* сублінії ДЖ-CS, які споживали стандартне середовище (5С:5Д, контрольна група) або середовище, доповнене 10 мМ АКГ: А – рівень пероксидів ліпідів, Б – рівень низькомолекулярних тіолів, В – рівень білкових тіолів, Г – рівень HSP90, Д – репрезентативне фото вестерн-блоту HSP90. Дані представлені як середнє значення  $\pm$  SEM. У кожному повторі використовували близько 20 мух.

Їжа з АКГ не впливала на рівні пероксидів ліпідів (Рис. 3.7А) та рівні низькомолекулярних тіолів (Рис. 3.7Б) і білкових тіолів (Рис. 3.7В), а також на рівні HSP90 (Рис. 3.7Г, Д), шаперону, який допомагає розщеплювати окисно-модифіковані білки [233,234].

### 3.1.5. Вплив АКГ на активацію експресії генів-мішеней для Nrf2

Геропротекторні та антиоксидантні властивості деяких речовин можуть бути спричинені через активацію Nrf2 системи. Тому для перевірки того, чи може АКГ впливати на Nrf2, визначено рівні транскриптів генів *Ugt37A2*, *GstD2* та *Сурба2*, що є мішенями для цього транскрипційного фактору.



Рис. 3.8. (А) Відносні рівні іРНК досліджуваних генів в організмі 25-денних мух, яких годували контрольною їжею та їжею з додаванням 10 мМ АКГ і (Б) репрезентативні ПЛР-гелі. \*Значимо відрізняються від контрольних значень за t-критерієм Стьюдента,  $p < 0,05$ .

Їжа з 10 мМ АКГ, призводила до збільшення рівня іРНК гену *Сурба2* у 2,8 рази порівняно з контрольною групою (Рис. 3.8). Водночас, рівні транскриптів генів *Ugt37A2* та *GstD2* в особин контрольної групи та групи, яка споживала їжу з АКГ, суттєво не відрізнялася.

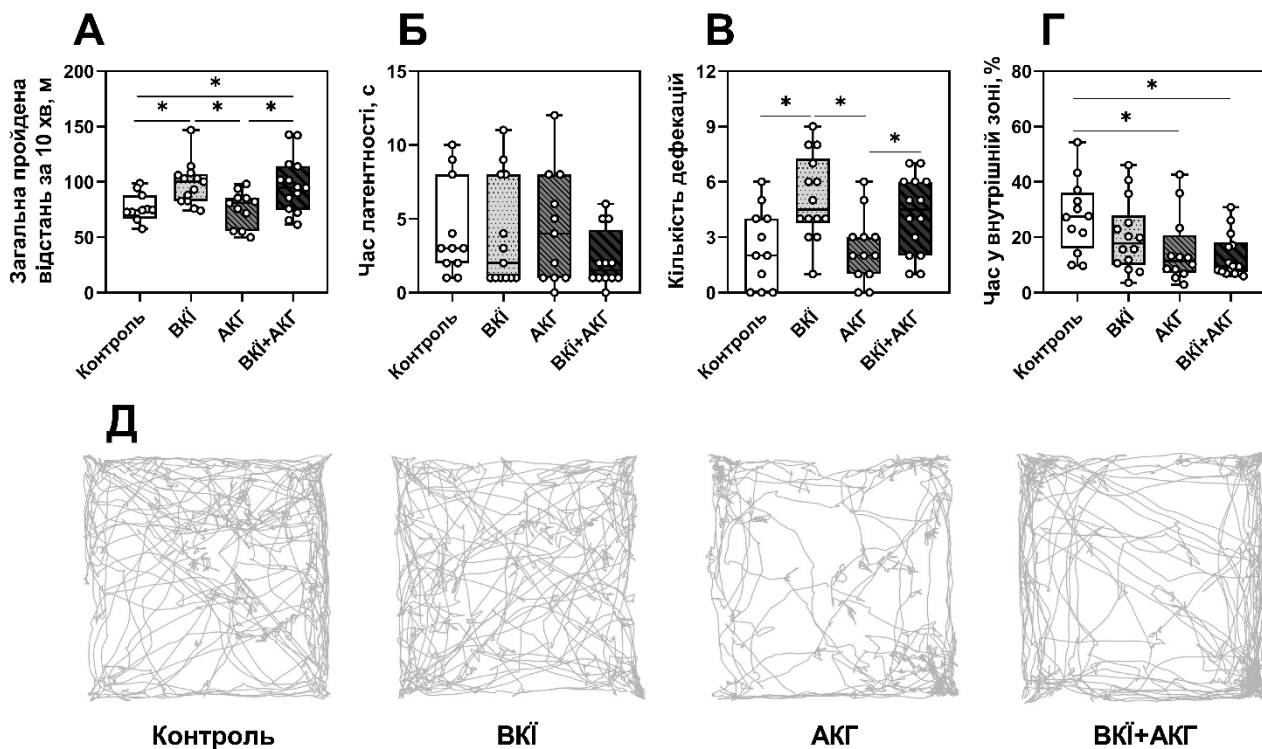
Дослідження впливу АКГ на *D. melanogaster* дозволило вивчити базові механізми дії цієї сполуки в контексті оксидативного стресу, антиоксидантного захисту та енергетичного метаболізму в умовах різних харчових режимів. Однак, через те, що мушки є безхребетними і їхня фізіологія значно відрізняється від ссавців, для перевірки отриманих результатів на більш складній моделі було залучено лабораторних мишей. Це дозволило оцінити вплив АКГ на біохімічні процеси у корі головного мозку та поведінкові реакції, що є важливим для розуміння геропротекторного потенціалу АКГ у більш складних організмів.

Таким чином, поєднання цих двох модельних систем дозволило отримати більш повну картину впливу АКГ на організми різного рівня організації, що є важливим для розуміння можливих механізмів дії цієї сполуки та її потенційного застосування у біомедицині.

### **3.2. Вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на когнітивні функції та біохімічні показники у корі головного мозку мишей на фоні висококалорійної їжі з високим вмістом жирів і фруктози**

#### **3.2.1. Дані поведінки з поведінкового тесту відкритого поля**

У тесті відкритого поля оцінювали такі поведінкові параметри, як загальна відстань, пройдена за час тестування (10 хв), час латентності, який вказує на час виходу з центрального квадрата після початку тесту, загальний час, проведений у центральних квадратах (внутрішня зона), і кількість фекальних кульок, залишених мишею під час тесту.



**Рис. 3.9. Поведінка в тесті відкритого поля.** Мишей лінії *C57BL/6J* годували стандартною їжею (контрольна група,  $n = 12$  мишей), їжею з високим вмістом жиру та фруктози (група ВКІ,  $n = 14$  мишей), стандартною їжею з 1% АКГ у питній воді (група АКГ,  $n = 12$  мишей) або їжею з високим вмістом жиру та фруктози з 1% АКГ у питній воді (група ВКІ+АКГ,  $n = 14$  мишей) протягом 8 тижнів. (А) Загальна пройдена відстань, (Б) затримка до виходу з центрального квадрата, (В) кількість дефекацій, (Г) час перебування у внутрішніх (центральных) квадратах та (Д) репрезентативні фотографії траєкторій руху мишей. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з тестом Крускала-Уолліса з подальшим тестом Данна.

Миші, які споживали ВКІ, пройшли на 29% більшу відстань під час тесту, ніж контрольні миші, тоді як за цим показником миші, які споживали АКГ, не відрізнялися від контрольних (Рис. 3.9А). Миші в групі ВКІ + АКГ демонстрували таку ж рухливість, як і в групі, що отримувала ВКІ, і долали на 27% більшу відстань, ніж контрольна група. ВКІ, АКГ або ВКІ + АКГ не

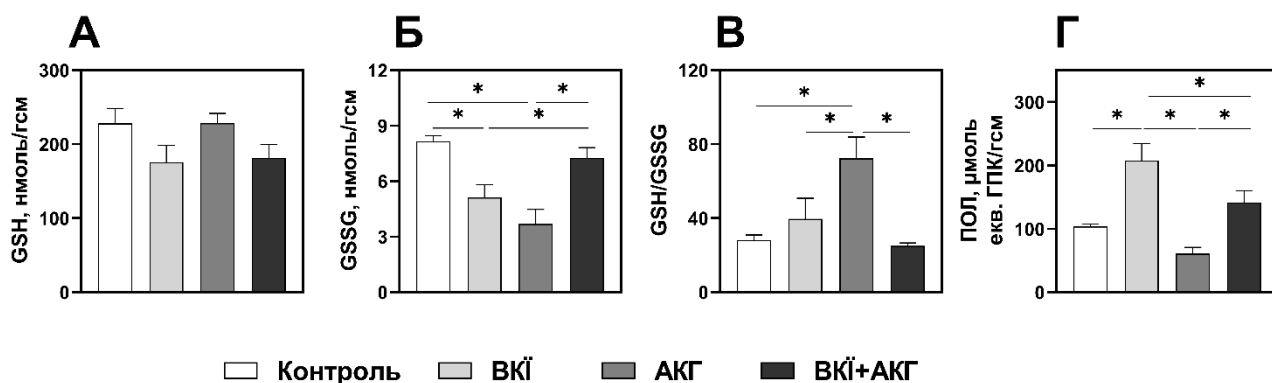
впливали на час затримки для виходу з центральної зони (центральных квадратів); однак група ВКІ + АКГ показала тенденцію до швидшого виходу з центральної зони (Рис. 3.9Б). Результати щодо кількості дефекацій були подібними до результатів щодо загальної відстані. Зокрема, миші, які споживали ВКІ, залишили в 2,1 рази більше фекальних кульок, ніж контрольна група, тоді як контрольна група та група АКГ мали однакову кількість дефекацій (Рис. 3.9В). Миші, які споживали ВКІ + АКГ, залишили більшу кількість фекальних кульок порівняно з контрольною групою та групою АКГ, але ця різниця була статистично значущою лише порівняно з мишами, які споживали АКГ (Рис. 3.9В). Водночас миші, які споживали ВКІ, показали лише тенденцію до зменшення часу, проведеного у внутрішній зоні, групи АКГ і ВКІ+АКГ проводили у внутрішній зоні на 45% і 52% менше часу, відповідно, порівняно з контрольними мишами (Рис. 3.9Г). Крім того, миші всіх експериментальних груп уникали повторних перетинів центральных квадратів порівняно з контрольною групою (Рис. 3.9Д).

### **3.2.2. Показники оксидативного стресу в корі головного мозку мишей**

Параметри оксидативного стресу в корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ, АКГ або їх комбінацію, не впливають на рівень GSH (Рис. 3.10А), але впливають на рівень GSSG (Рис. 3.10Б) у корі головного мозку мишей. Зокрема, у корі головного мозку мишей, які отримували лише ВКІ або АКГ, рівень GSSG був на 37% та 55% нижчим, відповідно, порівняно з контрольною групою. У групі ВКІ + АКГ рівні GSSG не відрізнялися від контрольних значень і були в 1,4 і 1,9 рази вищими, ніж у групі, що отримувала ВКІ, і групі, що отримувала АКГ, відповідно (Рис. 3.10Б). У групі АКГ співвідношення GSH/GSSG було значимо вищим порівняно з іншими групами, зокрема у 2,5 та 2,9 рази перевищувало відповідні показники у контрольній групі та групі ВКІ + АКГ (Рис. 3.10В). Споживання ВКІ призводило до підвищення рівня ПОЛ у 2 рази, тоді як у мишей, які споживали АКГ, спостерігалася



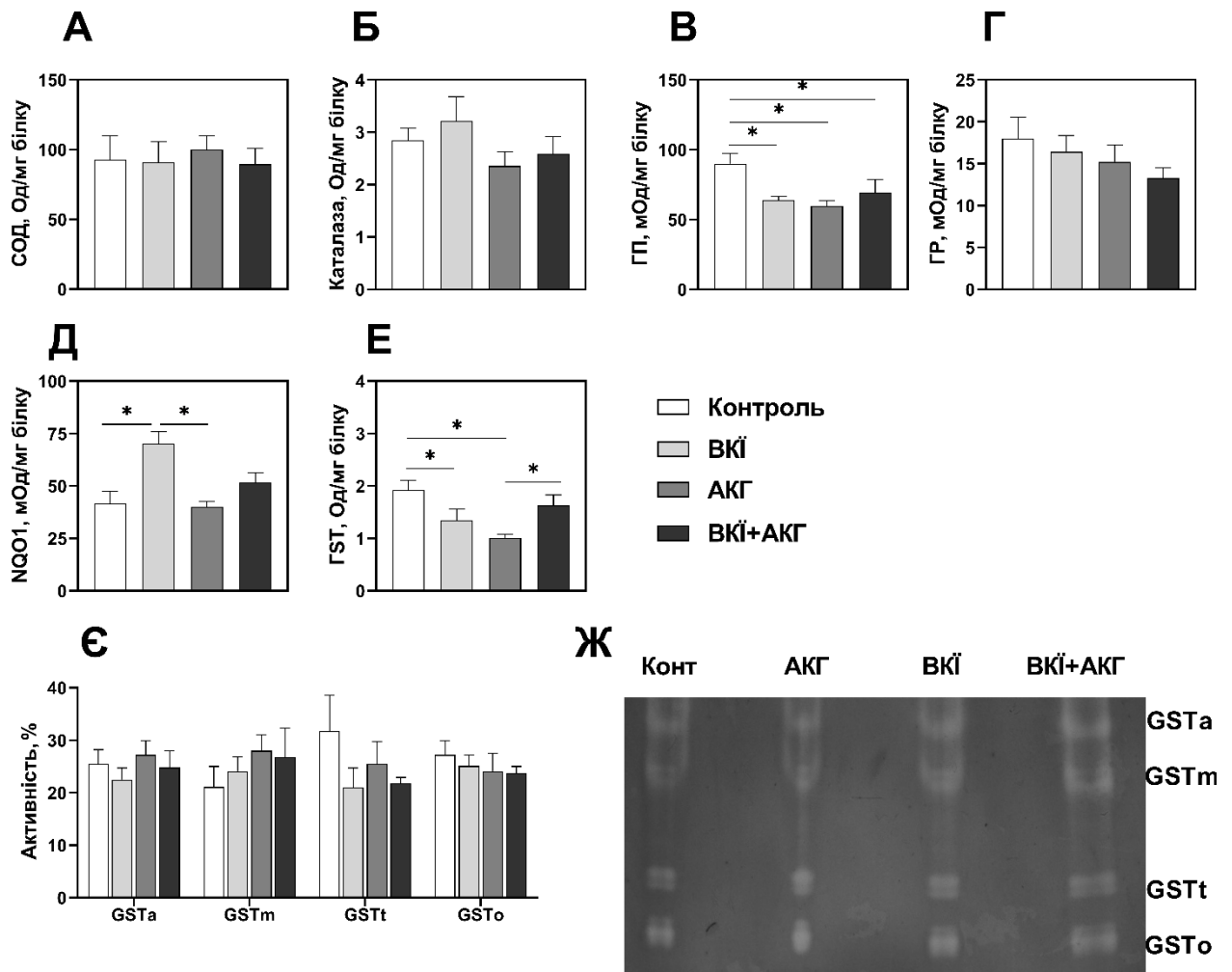
тенденція до зниження рівня ПОЛ порівняно з контрольною групою. Додавання АКГ до ВКІ запобігало підвищенню рівня ПОЛ, і в цій групі рівень ПОЛ не відрізнявся від контрольних значень (Рис. 3.10Г).



**Рис. 3.10. Маркери оксидативного стресу в корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які отримували ВКІ, АКГ або їх комбінацію.** (А) Рівні відновленого глутатіону (GSH) та (Б) окисленого глутатіону (GSSG), (В) співвідношення GSH/GSSG та (Г) рівні пероксидів ліпідів (ПОЛ). Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM від 5 до 6 мишей у кожній групі. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

На активність СОД і каталази в корі головного мозку мишей не впливали ВКІ, АКГ або їх поєднання (Рис. 3.11А, Б). У мишей, що споживали висококалорійну їжу або альфа-кетоглутарат або їх комбінацію значимо знижували активність ГП на 29%, 33% та 23%, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.11В). ВКІ, АКГ або їх суміш не впливали на активність ГР (Рис. 3.11Г) та активність НАДФН-продукуючих ферментів – Г6ФДГ, ІДГ та МДГ (табл. 3.2). На активність NQO1 впливала лише ВКІ, вона була на 67% вищою в корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ, ніж у контрольних мишей (Рис. 3.11Д). Активність GST була на 71%, 34% і 23% нижчою в групах ВКІ, АКГ і ВКІ + АКГ порівняно з контрольною групою (Рис.

3.11E), але не було достовірних відмінностей в інтенсивності смуг GST на електрофореграмах (Рис. 3.11Є, Ж).



**Рис. 3.11.** Активність антиоксидантних та споріднених ферментів у корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які отримували ВКІ, АКГ або їх комбінацію. Активність (А) супероксиддисмутази (СОД), (Б) каталази, (В) глутатіонпероксидази (ГП), (Г) глутатіонредуктази (ГР), (Д) NAD(P)H:хінооксидоредуктази 1 (NQO1) та (Е) глутатіон-S-трансферази (GST); (Є) активність GST в гелі та (Ж) репрезентативна електрофореграма ізоферментів GST. Дані представлені як середнє ± SEM від 6 до 7 мишей у групі. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

### 3.2.3. Рівень глюкози, активність гліколітичних ферментів та мітохондріальних дихальних комплексів

ВКІ, АКГ та їх комбінація не мали суттєвого впливу на рівень глюкози (табл. 3.2). На активність ГК впливав лише АКГ – вона була на 22% нижчою, ніж у контрольній групі (Рис. 3.12А). Порівняно з групою ВКІ та групою ВКІ + АКГ, миші, які споживали АКГ, показали на 41% нижчу активність ГК (Рис. 3.12А).

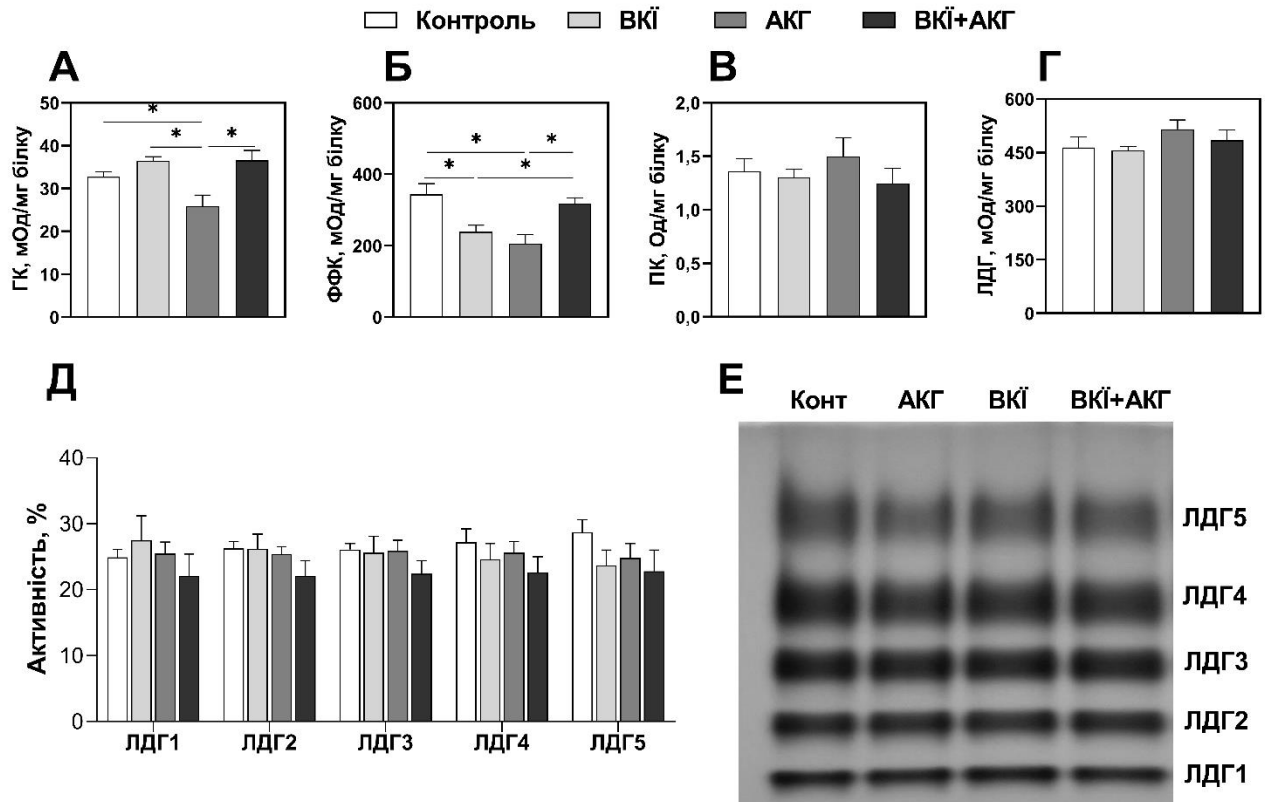
**Таблиця 3.2.**

Рівень глюкози та активність НАДФН-продукуючих ферментів у корі головного мозку мишей лінії C57BL/6J, яких годували стандартною їжею (контрольна група), їжею з високим вмістом жирів і фруктози (група ВКІ), стандартною їжею з 1% АКГ у питній воді (група АКГ) або їжею з високим вмістом жирів і фруктози з 1% АКГ у питній воді (група ВКІ+АКГ) протягом 8 тижнів.

|                     | Контроль  | ВКІ       | АКГ       | ВКІ+АКГ   |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Глюкоза, мкмоль/гсм | 753±151   | 795±136   | 743±136   | 804±137   |
| Г6ФДГ, мОд/мг білку | 19,5±3,8  | 26,5±2,2  | 20,1±2,3  | 22,1±2,3  |
| МДГ, мОд/мг білку   | 10,9±1,0  | 7,73±0,52 | 9,56±0,97 | 11,2±2,3  |
| ІДГ, мОд/мг білку   | 3,22±0,51 | 2,95±0,44 | 3,49±0,40 | 2,62±0,43 |

Дані представлені як середнє ± SEM від 5 до 7 мишей у кожній групі. Рівень глюкози виражали в мкмоль на грам сирої маси (гсм).

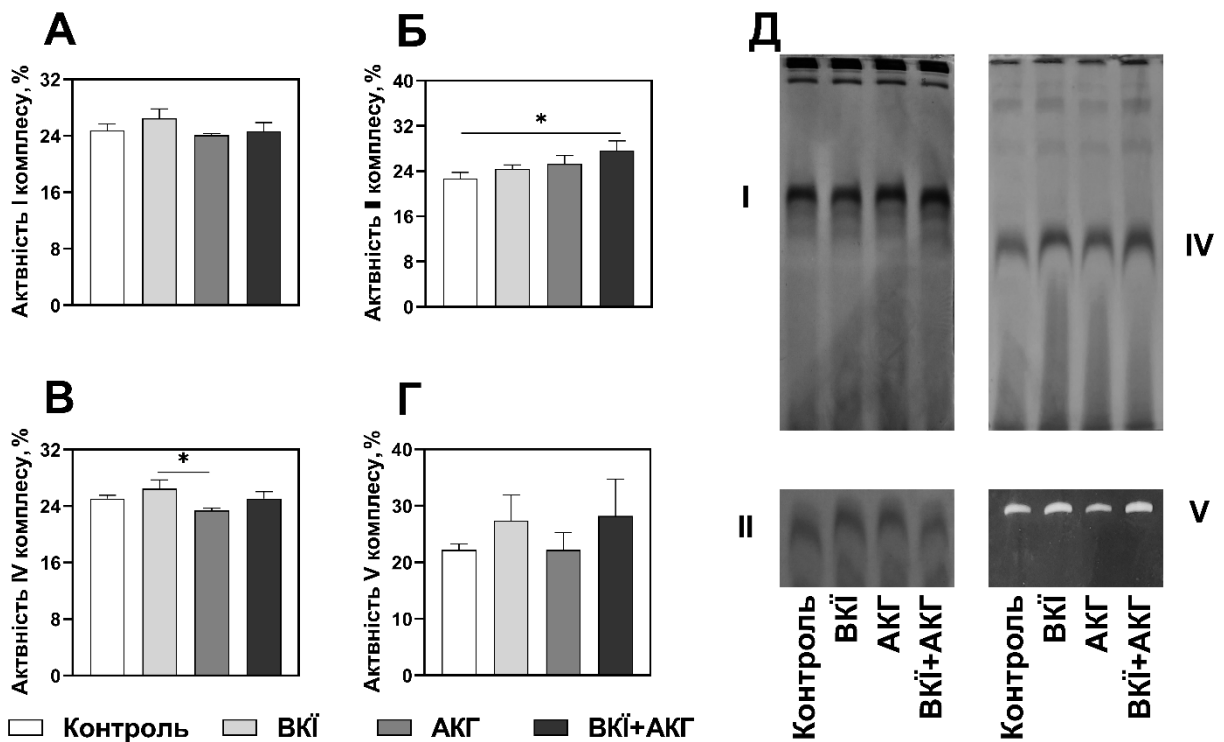
У мишей, які споживали лише ВКІ та АКГ, активність ФФК була нижчою порівняно з контрольною групою, на 30% та 40%, відповідно. У корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ + АКГ, активність ФФК була подібною до контрольної групи і на 33% та 54% вищою, ніж у корі головного мозку мишей, які споживали лише ВКІ та АКГ (Рис. 3.12Б). Ні загальна активність ЛДГ, ні активність ізоферментів ЛДГ не залежали від ВКІ, АКГ або їх комбінації в корі головного мозку мишей (Рис. 3.12Г-Е).



**Рис. 3.12.** Активність ключових ферментів гліколізу в корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які отримували ВКІ, АКГ або їх комбінацію. (А) Активність гексокінази (ГК), (Б) активність фосфофруктокінази (ФФК), (В) піруваткінази (ПК), (Г) загальна активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), (Д) активність ЛДГ в гелі та (Е) репрезентативна електрофореграма ізоферментів ЛДГ. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM від 5 до 7 мишей у групі. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

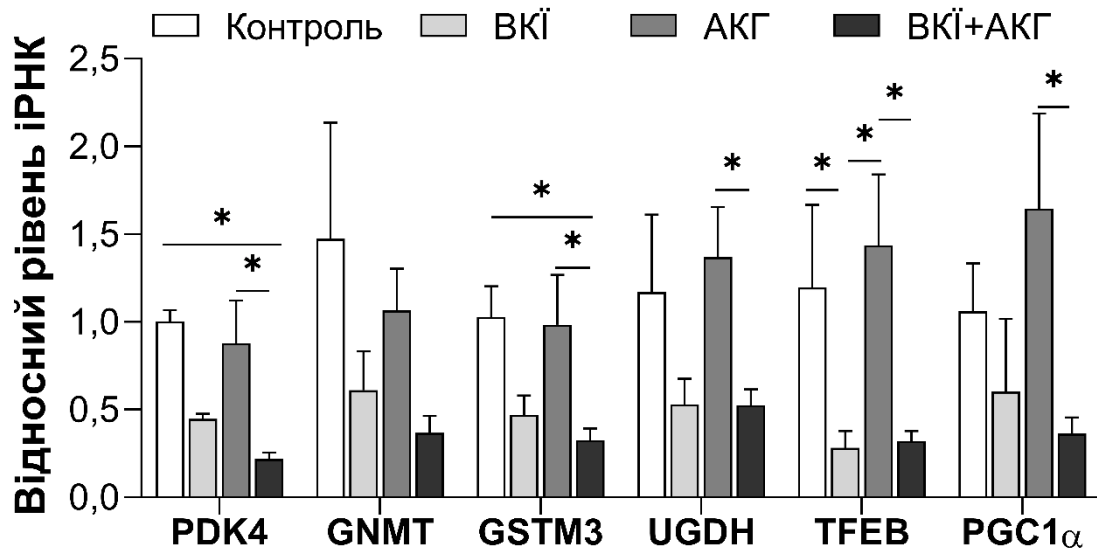
Для візуалізації ферментативної активності комплексів дихального ланцюга мітохондрій та її напівкількісної оцінки використовували прозорий нативний електрофорез. Досліджувані групи не відрізнялися за показниками активності мітохондріальних дихальних комплексів I і V та мали деякі відмінності в активності комплексів II і IV (Рис. 3.13). Крім того, слід звернути увагу на деякі тенденції. У корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ, активність усіх

комплексів мала тенденцію до збільшення порівняно з контрольною групою. У групі, що споживала АКГ, спостерігалася тенденція до зниження активності комплексів I, IV і V і тенденція до збільшення активності сукцинатдегідрогенази комплексу II. У групі ВКІ + АКГ активність комплексу II була на 22% більшою порівняно з контрольною групою, а активність АТФ-ази комплексу V мала тенденцію до збільшення.



**Рис. 3.13.** Активність комплексів електронтранспортного ланцюга мітохондрій, ізолюваних з кори головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які споживали ВКІ, АКГ або їх комбінацію у гелі. Активність (А) комплексу I, (Б) комплексу II, (В) комплексу IV, (Г) комплексу V та (Д) репрезентативні гелі. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM від 4 мишей у кожній групі. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

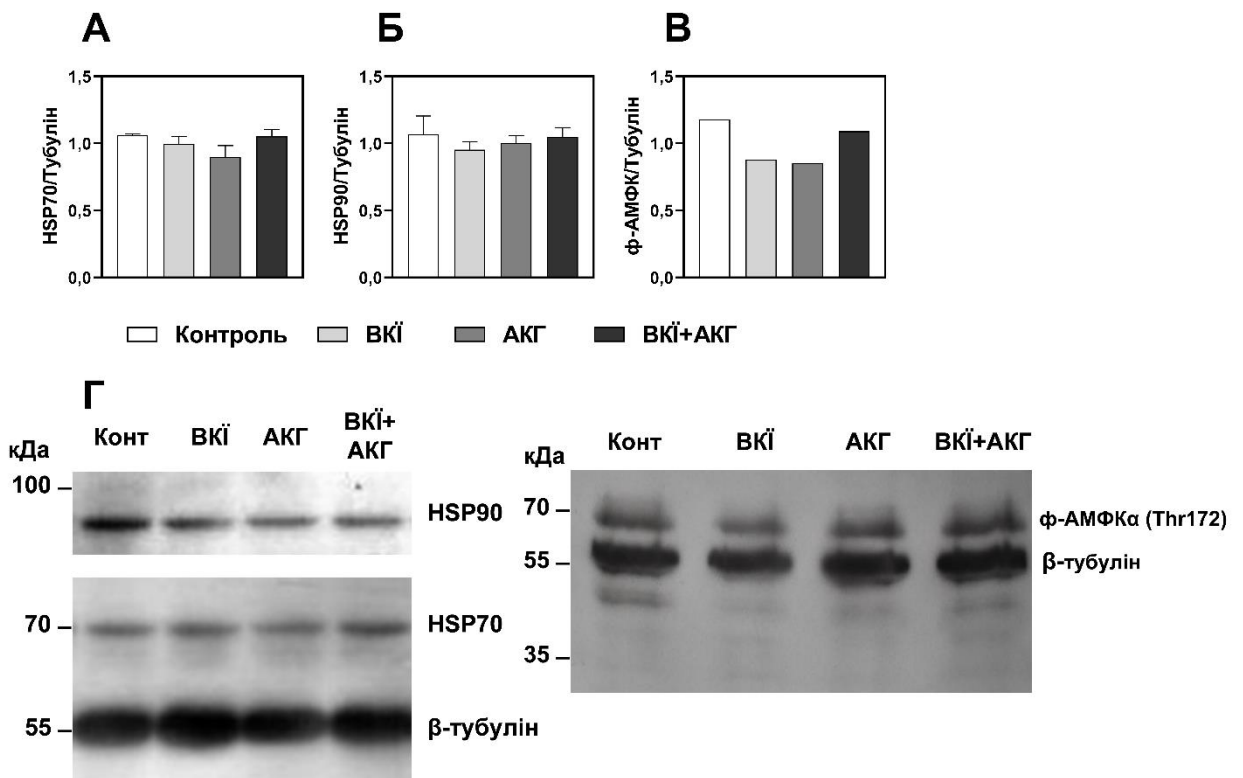
### 3.2.4. Експресія мішеней Nrf2, регуляторів метаболізму, мітохондріального біогенезу та автофагії



**Рис. 3.14.** Рівні іРНК транскриптів у корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які споживали ВКІ, АКГ або їх комбінацію. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM від трьох мишей у кожній групі. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

У корі головного мозку мишей також визначали відносний стаціонарний рівень іРНК деяких генів, пов'язаних з енергетичним метаболізмом та антиоксидантним захистом, шляхом вимірювання відповідних рівнів іРНК та білків. За допомогою RT-qPCR виміряли рівні іРНК наступних генів: *PDK4* (піруватдегідрогеназа кіназа 2), *GSTM3* (глутатіонтрансфераза Му 3), *GNMT* (гліцин-N-метилтрансфераза), *UGDH* (UDP-глюкозо-6-дегідрогеназа), *TFEB* (транскрипційний фактор EB) та *PGC1 $\alpha$*  (коактиватор рецептора, що активується проліфератором пероксисом-1 $\alpha$ ) (Рис. 3.14). Рівні транскриптів *PDK4*, *GNMT* та *PGC1 $\alpha$*  були нижчими в усіх дослідних групах порівняно з контрольною групою.

У групах, які споживали АКГ та ВКІ + АКГ, рівень іРНК *PDK4* був нижчим порівняно з групою, яка споживала ВКІ. Рівень транскрипту *GSTM3* був нижчим у групах, які споживали ВКІ та ВКІ + АКГ, і був подібним до контрольних значень у групі АКГ. Рівні транскриптів *UGDH* і *TFEB* були підвищені в корі головного мозку групи, що отримувала АКГ, і мали тенденцію до зростання в групі, що отримувала ВКІ.



**Рис. 3.15.** Вестерн-блот аналіз відносних рівнів HSP70, HSP90 та фосфо-АМФК у корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6*, які споживали ВКІ, АКГ або їх комбінацію. (А) відносні рівні HSP70 ( $n = 3$ ), (Б) HSP90 ( $n = 3$ ) і (В) фосфорильованого АМФК ( $n = 1$ ), (Г) репрезентативні вестерн-блоти HSP70, HSP90 та ф-АМФК $\alpha$ . Для визначення HSP70 та HSP90 у кожену смугу вносили 15 мкг загального білку, а для ф-АМФК – 50 мкг загального білку. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM від трьох мишей у кожній групі. \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

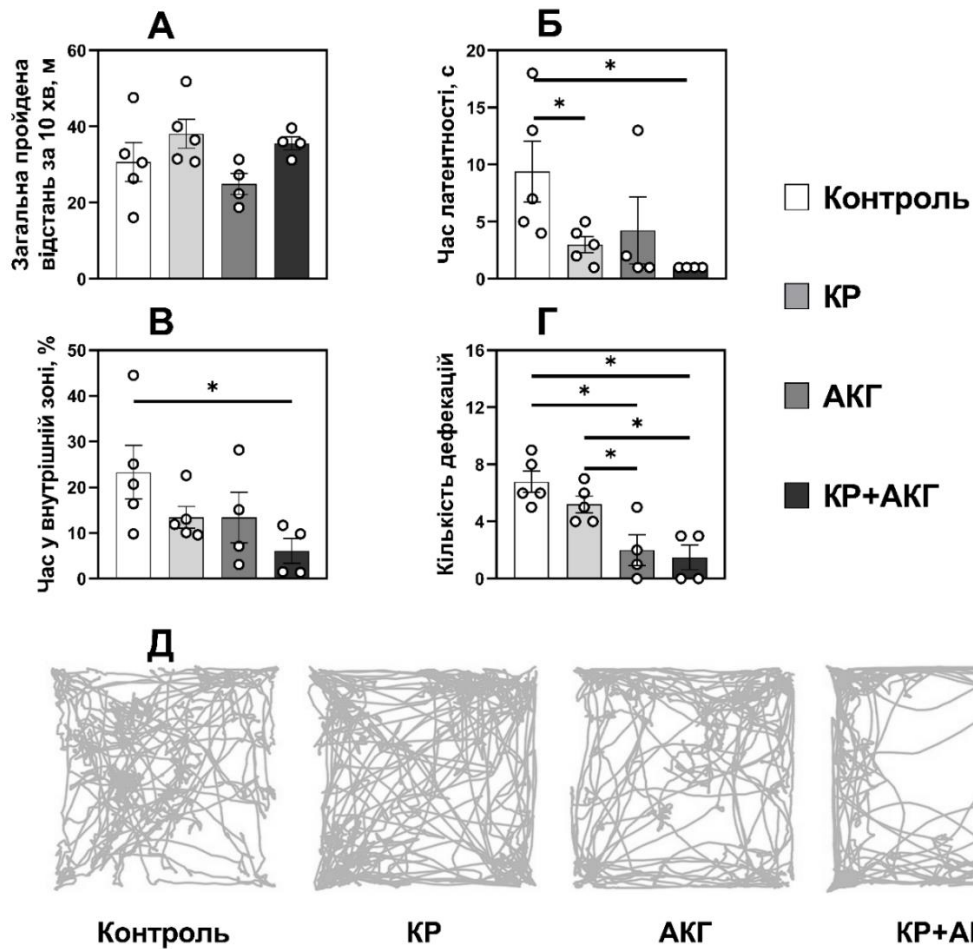
Використовуюючи процедуру вестерн-блот, оцінили відносні рівні білків теплового шоку, HSP70 і HSP90, важливих цитопротекторних білків в умовах оксидативного стресу, а також рівні фосфо-АМФ-активованої протеїнкінази (ф-АМФК), активної форми регуляторної кінази, що бере участь в енергетичному обміні. Між досліджуваними групами не було виявлено відмінностей у рівнях HSPs та ф-АМФК, але рівні всіх трьох білків мали тенденцію до зниження у мишей, які споживали АКГ, а HSP70 та HPS90 мали тенденцію до зниження у групі, яка споживала ВКІ, порівняно з контролем (Рис. 3.15).

### **3.3. Вплив альфа-кетоглутарату на активність автофагії та про-/антиоксидантний статус у корі головного мозку мишей на фоні кафетерійного раціону**

#### **3.3.1. Вплив кафетерійного раціону та альфа-кетоглутарату на поведінку мишей**

Для оцінки тривожності мишей використовували тест відкритого поля. Визначали загальну відстань, пройдену за час тестування (10 хв), час латентності, який вказує на час виходу з центрального квадрата після початку тесту, загальний час, проведений у центральних квадратах (внутрішня зона), і кількість фекальних кульок, залишених мишею під час тесту. На загальну пройдену відстань суттєво не впливали ні КР, ні АКГ, ні їх комбінація (Рис. 3.16А). Миші, які споживали КР і КР+АКГ, показали на 68% і 89% коротший час латентності, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.16Б). Але Водночас, миші, які споживали КР+АКГ, проводили на 71% менше часу у внутрішній зоні відкритого манежу, тоді як інші експериментальні групи показали лише схожу тенденцію порівняно з контрольною групою (Рис. 3.16В, Д). Миші груп АКГ і КР+АКГ залишали на 71% і 78% менше фекальних кульок, ніж відповідні контрольні миші (Рис. 3.16Г).



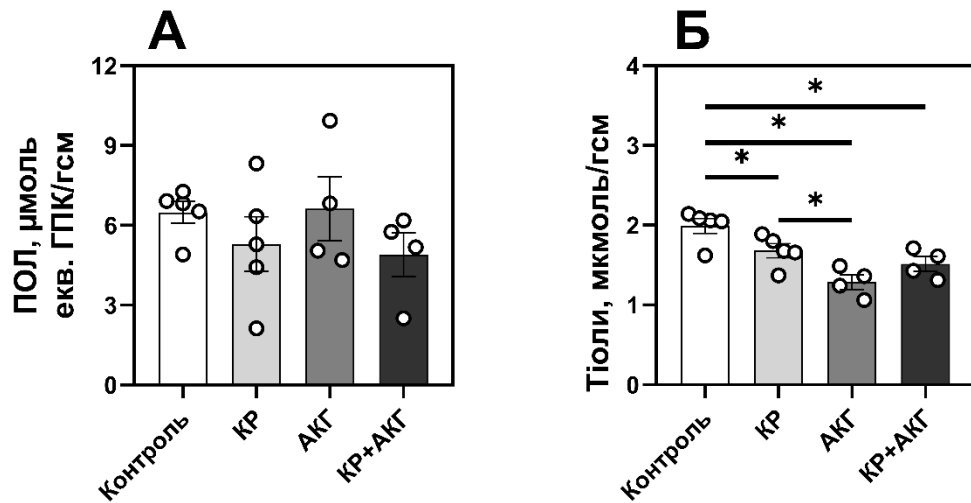


**Рис. 3.16.** Тест відкритого поля для мишей, які споживали кафетерійний раціон з додаванням АКГ: (А) загальна пройдена відстань, (Б) затримка до виходу з центрального квадрата, (В) час, проведений у внутрішніх квадратах, (Г) кількість фекальних кульок та (Д) репрезентативні траєкторії руху мишей. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$ ). \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

### 3.3.2. Кафетерійний раціон доповнений альфа-кетоглутаратом сприяє зниженню загального вмісту тіолів та активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів у корі головного мозку мишей

На рівень ПОЛ, маркерів окислення ліпідів, не впливали ні КР, ні АКГ, ні їхня комбінація (Рис. 3.17А). Рівень тіолових груп у корі головного мозку мишей,

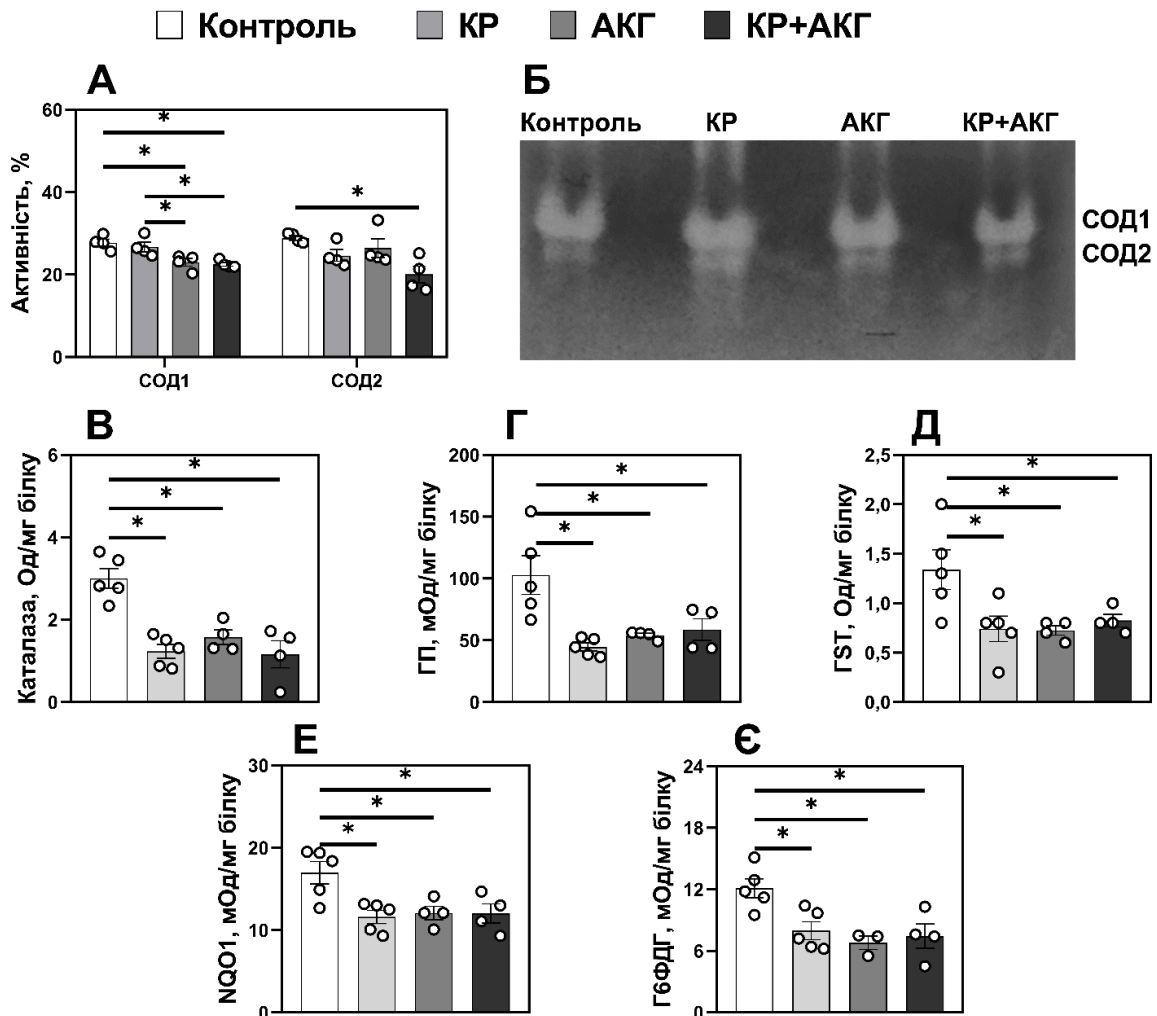
які споживали КР, АКГ або КР+АКГ, був на 16%, 35% та 24% нижчим, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.17Б).



**Рис. 3.17. Маркери оксидативного стресу в корі головного мозку мишей лінії C57BL/6J, які споживали контрольну їжу, КР, АКГ та КР+АКГ:** (А) рівні пероксидів ліпідів (ПОЛ) та (Б) рівні загальних тіолів. Дані представлені як середнє ± SEM (n = 5-6). \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

Активність СОД1 не залежала від КР, але була нижчою на 17% та 19% у мишей груп АКГ та КР+АКГ, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.18А). Активність СОД2 була на 31% нижчою лише у мишей групи КР+АКГ порівняно з контрольною групою (Рис. 3.18А). Активність інших первинних антиоксидантних ферментів, каталази та ГП, була нижчою в корі головного мозку мишей, які споживали експериментальну їжу, на 43-61% порівняно з контрольною групою (Рис. 3.18В, Г). Активність GST була нижчою у мишей груп КР, АКГ або КР+АКГ на 43%, 45% і 40%, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.18Д). Активність NQO1 також була нижчою в усіх дослідних групах порівняно з контролем на 29-31% (Рис. 3.18Е). Крім того, активність Г6ФДГ, ферменту, який виробляє НАДФН для відновлення глутатіону, була на

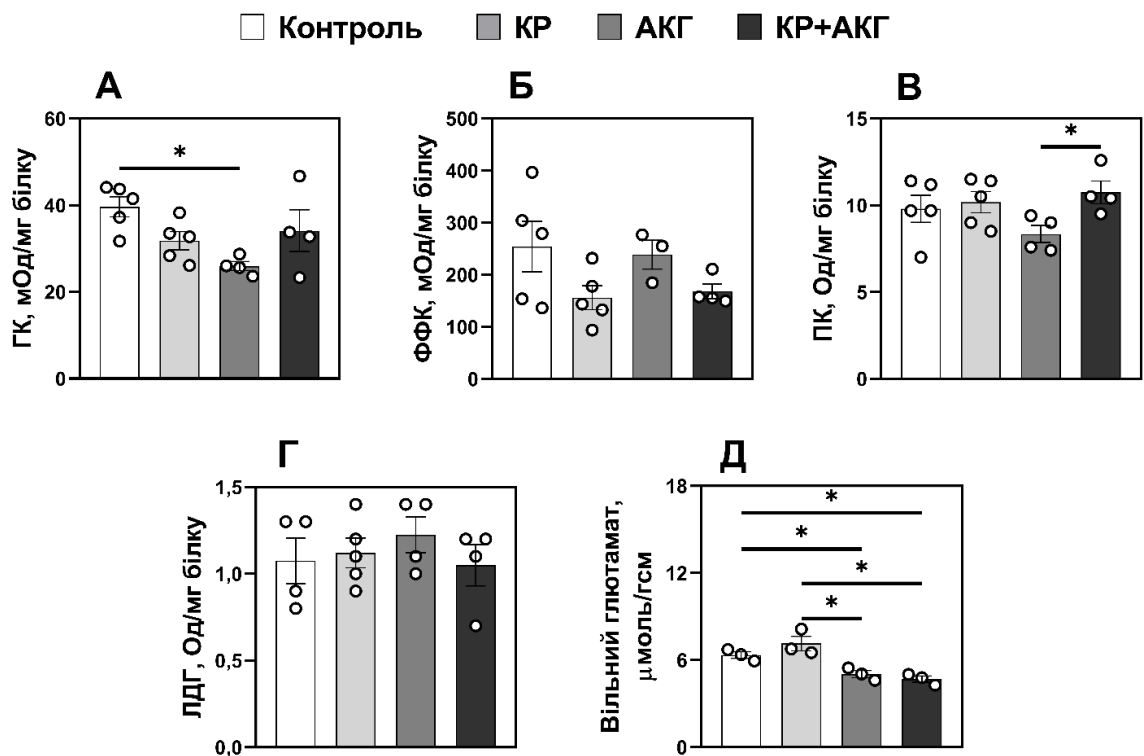
34%, 28% і 39% нижчою у мишей, які споживали КР, АКГ і КР+АКГ, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.18Є).



**Рис. 3.18.** Активність антиоксидантних та споріднених ферментів у корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які споживали контрольну їжу, КР, АКГ або КР+АКГ. (А) Активність різних ізоферментів СОД у гелі та (Б) репрезентативні зображення гелів, забарвлених за активністю СОД; активність (В) катапази, (Г) глутатіонпероксидази (ГП), (Д) глутатіон-S-трансферази (GST), (Е) НАД(Ф)Н-хінооксидоредуктази (NQO1) та (Є) глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ). Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM ( $n = 3-5$ ). \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

### 3.3.3. Їжа з додаванням альфа-кетоглютарату сприяє зниженню активності гексокінази та рівня вільного глютаму в корі головного мозку мишей

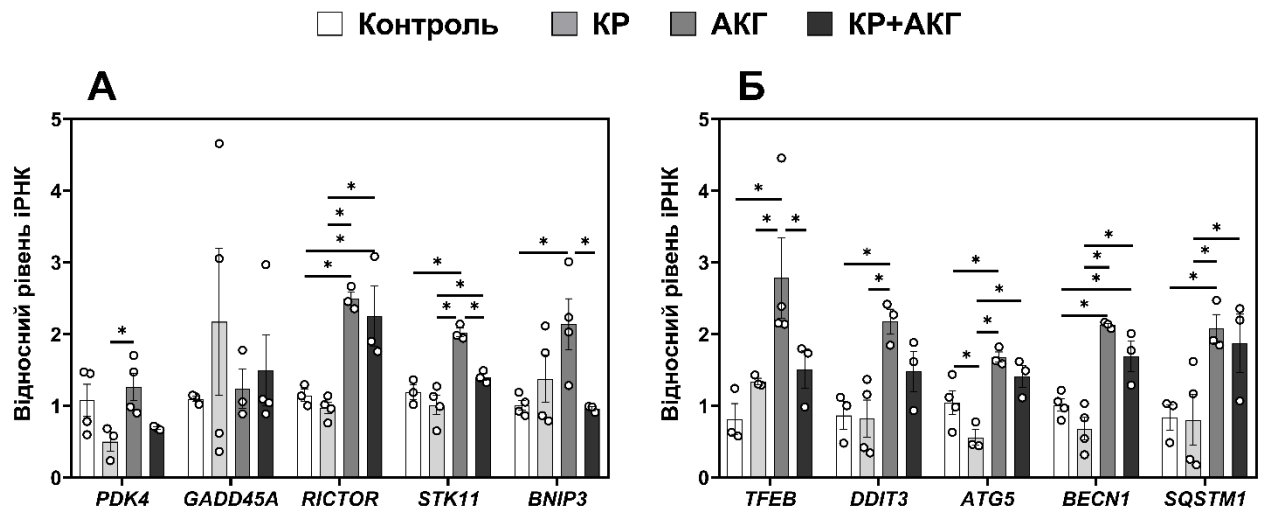
Активність гексокінази була на 35% нижчою в корі головного мозку мишей, які споживали АКГ, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.19А). Споживання КР, АКГ або КР+АКГ не мало суттєвого впливу на активність ФФК, ПК та ЛДГ (Рис. 3.19Б-Г). Рівень вільного глютаму в корі головного мозку мишей, які споживали АКГ та КР+АКГ, був на 21% нижчим, ніж у контрольній групі.



**Рис. 3.19.** Активність ключових гліколітичних ферментів та концентрація вільного глютаму в корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J*, які споживали контрольну їжу, КР, АКГ або КР+АКГ: (А) гексокіназа (ГК), (Б) фосфогруктокіназа (ФФК), (В) піруваткіназа (ПК), (Г) лактатдегідрогеназа (ЛДГ) та (Д) концентрація вільного глютаму. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM ( $n = 3-5$ ). \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з одностороннім ANOVA з подальшим тестом Дункана для множинних порівнянь.

### 3.3.4. Їжа з додаванням альфа-кетоглютарату збільшує рівень транскриптів генів, пов'язаних з автофагією

Жоден з експериментальних режимів харчування суттєво не впливав на стаціонарний рівень іРНК генів *PDK4* та *GADD45A* в корі головного мозку мишей. Однак споживання АКГ сприяло збільшенню рівня транскриптів генів *RICTOR*, *STK11* та *BNIP3* у 2,2, 1,7 та 2,1 рази, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.20А). Рівень транскрипту гену *RICTOR* був удвічі вищим, ніж у мишей КР+АКГ.



**Рис. 3.20. (А) Відносні рівні іРНК мішеней факторів форкхедбоксу O, які беруть участь у регуляції вуглеводного обміну (*PDK4*, *RICTOR*, *STK11*), репарації ДНК (*GADD45A*) та автофагії (*BNIP3*). (Б) Відносний рівень іРНК генів, пов'язаних з автофагією. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM (n=3-4). \*Значимо відрізняються ( $p < 0,05$ ) між групами згідно з тестом Дункана.**

У групі АКГ спостерігали вищі рівні іРНК генів *TFEB*, *DDIT3*, *ATG5*, *BECN1* та *SQSTM1* у 1,6-3,4 рази порівняно з контрольною групою (Рис. 3.20Б). Крім того, рівень іРНК гена *BECN1* був у 1,7 рази вищим у мишей, які споживали КР+АКГ. Рівень іРНК гена *ATG5* був на 46% нижчим у мишей, які споживали КР, порівняно з контрольною групою.

## Розділ 4. Аналіз та узагальнення результатів

### 4.1. Вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на тривалість життя, оксидативний стрес і метаболічні процеси у *D. melanogaster*

#### 4.1.1. Тривалість життя довгоживучої сублінії *D. melanogaster* на живильних середовищах з різним співвідношенням білків і вуглеводів та вплив на неї АКГ

Попередні дослідження показали, що екзогенний АКГ збільшує тривалість життя нематоди *C. elegans* та плодової мухи *D. melanogaster* у дозозалежний спосіб. Для *C. elegans* максимальне продовження середньої тривалості життя спостерігали на живильному середовищі, що містила 8 мМ АКГ [4]. Вирощування самок *D. melanogaster* лінії Dahomey на дріжджово-цукровому середовищі (10% дріжджів, 5% сахарози), що містило 5 мкМ АКГ, збільшило тривалість їхнього життя на 8,54% порівняно з тривалістю життя контрольної групи [149]. У дослідженні Лилик і колег самки Canton-S, яких вирощували з личинкової стадії на стандартному раціоні (5% дріжджів, 5% сахарози) з додаванням 10 мМ АКГ, жили на 23% довше, ніж самки, яких годували стандартним раціоном [5]. Середня тривалість життя самок у контрольній групі становила  $46,4 \pm 0,8$  днів, а у групі, що споживала АКГ зросла до  $57,1 \pm 1,0$  днів [5]. Загалом, середня тривалість життя штаму Canton-S коливається від 50 до 70 днів [235–237], залежно від умов культивування. У цьому дослідженні когорта штаму, відібраного з батьківського штаму Canton-S, жили близько 70 днів, що довше, ніж у вихідної лінії. Не спостерігалось продовження тривалості життя внаслідок споживання АКГ, що спостерігалось раніше. Єдиний ефект екзогенного АКГ на збільшення тривалості життя у мух спостерігався при споживанні їжі з низьким співвідношенням білків до вуглеводів, де АКГ продовжував тривалість життя старих мух. Подібні результати для низькобілкових раціонів харчування були отримані й іншими дослідниками

[211,238,239]. Позитивний вплив АКГ на тривалість життя мух при споживання їжі з низьким вмістом білку можна пояснити здатністю АКГ стимулювати всмоктування амінокислот у кишківнику [240] або збільшувати швидкість синтезу амінокислот [241] для задоволення потреб організму.

Відсутність ефекту продовження тривалості життя при споживанні АКГ у довгоживучих популяціях мух, які харчувалися 5С:5Д, вказує на те, що дієтичні підходи, які використовуються для продовження тривалості життя, мають певні обмеження.

#### **4.1.2. Вплив АКГ на локомоторну активність, тепловий шок та стійкість до голодування довгоживучої сублінії *D. melanogaster***

У попередніх дослідженнях додавання АКГ значно покращувало локомоторну активність та стійкість до теплового стресу мух середнього віку ліній w<sup>1118</sup> та Canton-S [5,9].

Проте, 97-100% як 25-денних контрольних мух, так і мух, яких годували АКГ, піднімалися на 5 см протягом 20 с, що є відносно високими показниками лазіння для *D. melanogaster* цього віку (Рис. 3.3). До 25-добового віку у 40-50% мух стандартних лабораторних ліній знижується локомоторна активність і вони стають нездатними підніматися на 5 см вгору за 20 с по стінці скляної пробірки [231]. Однак на активність лазіння може впливати низка факторів. У цьому дослідженні мух утримували в демографічних клітках, і їх тестували один раз за життя. Тому мухи в цьому дослідженні не зазнавали хронічного стресу, спричиненого регулярним тестуванням. Оскільки не спостерігалось значного зниження активності лазіння у мух ДЖ-СS середнього віку, можна припустити, що довголіття лінії супроводжується менш різким віковим зниженням функціональної активності порівняно зі звичайною лінією дикого типу.

#### **4.1.3. Вплив АКГ на рівень запасних метаболітів у довгоживучої сублінії *D. melanogaster***

Зниження рівня ТАГ може свідчити про активацію АМФК сигнального шляху, що призводить до пригнічення біосинтезу ТАГ, активації їх гідролізу та подальшого окиснення гліцеролу і жирних кислот [3]. Подібний ефект також спостерігався раніше у роботі Байляк та колег [9].

#### **4.1.4. Вплив АКГ на активність гліколітичних, антиоксидантних та пов'язаних ферментів**

Окрім енергетичної ролі, АКГ бере участь у метаболізмі амінокислот [3,242]. Тому було визначено активність ГДГ, субстратом якої є АКГ. На моделі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* було виявлено, що АКГ активує НАДФН-залежну активність ГДГ [243]. Також було встановлено, що експресія гену, що кодує глютаматдегідрогеназу регулюється ядерним дихальним фактором 2 (Nrf-2), гомолог якого кодується геном *Delg* у *D. melanogaster* [244]. Натомість, було встановлено, що активність Nrf-2 регулюється АМФК у скелетних м'язах мишей [245]. Однак поточні результати показують, що харчування, що містить АКГ, не впливало ні на НАДН-, ні на НАДФН-залежну ГДГ у довгоживучої сублінії мух (табл. 3.1). Це свідчить про те, що АКГ може не опосередковувати свої ефекти через АМФК сигнальний шлях, як було показано раніше [4].

У цьому дослідженні споживання їжі з додаванням АКГ протягом життя призводило до зниження активності каталази та GST, які відповідають за антиоксидантний захист та детоксикацію ксенобіотиків. Пригнічення активності каталази АКГ у дорослих мух вже спостерігалось в попередніх дослідженнях [9]. Однак ефект може залежати від віку мух, стадії розвитку, на якій вони споживають АКГ, та лінії плодової мухи [9]. Показано, що GST пригнічується препаратами перцю чилі, що продовжує тривалість життя *D. melanogaster*



[246,247]. Також було показано, що різні ізоферменти GST можуть по-різному регулюватися і залежати від циркадних ритмів [248].

Однак мітохондріальні АФК можуть знешкоджуватися безпосередньо екзогенним АКГ [249]. Своєю чергою, це може призводити до послаблення сигнального шляху Nrf2, який регулює експресію генів, що кодують низку антиоксидантних ферментів, зокрема GST [250].

Активация експресії гена *Сурба2* за допомогою АКГ дозволила припустити, що останній може впливати на Nrf2. Однак їжа, що містила АКГ, не впливала на експресію інших встановлених мішеней Nrf2. Це означає, що АКГ може впливати на інші транскрипційні регулятори відповіді на ксенобіотики, ніж Nrf2. Зокрема, було виявлено, що ген *Сурба2* регулюється ядерним рецептором DHR96, гомологом людського рецептора вагітності X та конститутивного рецептора андростану [251]. Раніше було показано, що DHR96 бере участь у метаболізмі ТАГ і може бути частково залучений до регуляції тривалості життя [252,253].

Поточні дані показують, що АКГ не продовжує тривалість життя довгоживучих *D. melanogaster* і суттєво не впливає на енергетичний метаболізм, а саме на гліколіз та окисне фосфорилування. Розведення в лабораторних умовах може призвести до того, що шляхи, які регулюють тривалість життя, будуть задіяні майже до максимуму, залишаючи лише обмежений «простір» для продовження тривалості життя. Попередні дослідження показали, що розведення ліній *D. melanogaster* в лабораторних умовах призводило до скорочення тривалості життя [254]. Однак отримано протилежний результат, який нагадує селекцію довгоживучих ліній з особин з пізнім розмноженням [255]. Було показано, що втручання, які продовжують тривалість життя і мають глибокий вплив на стандартні лабораторні лінії, можуть викликати помірні ефекти на когорти довгожителів [256]. У цьому дослідженні бачимо кілька ознак ефекту АКГ, зокрема, продовження тривалості життя мух за умов білкового голодування (Рис. 3.2В), що свідчить про можливу активацію автофагії. Крім того, АКГ знижував рівень ТАГ (Рис. 3.4В), що свідчить про зміщення рівноваги

між анаболічними та катаболічними процесами. Однак ці фізіологічні та метаболічні ефекти АКГ не є достатніми для запобігання смерті більшості населення в похилому віці.

#### **4.1.5. Узагальнення про вплив екзогенного альфа-кетоглютарату на тривалість життя, фізіологічні та біологічні показники у *D. melanogaster***

Це дослідження демонструє, що додавання АКГ не впливало на тривалість життя довгоживучої сублінії *D. melanogaster* на стандартному живильному середовищі з 5% сахарози і 5% дріжджів, але збільшувало тривалість життя цих мух на раціоні з низьким співвідношенням білку до вуглеводів (9% сахарози і 1% дріжджів). Самки мух середнього віку, яких годували 5С:5Д з додаванням 10 мМ АКГ, не відрізнялися від контрольної групи за індукованою руховою активністю, стійкістю до теплового стресу та голодування, рівнями глюкози та глікогену, активністю гліколітичних ферментів, НАДФН-залежних дегідрогеназ та глютаматдегідрогенази, а також маркерами оксидативного стресу, пероксидів ліпідів та тіолів. Однак АКГ призводив до зниження активності антиоксидантних ферментів, каталази та GST, а також до зниження рівня ТАГ в організмі самок мух порівняно з контрольною групою. Таким чином, АКГ суттєво не впливав на шляхи енергетичного метаболізму, а саме гліколіз та окисне фосфорилування, але пригнічував антиоксидантний захист та накопичення запасних ліпідів у довгоживучих *D. melanogaster*.

## 4.2. Вплив альфа-кетоглютарату на когнітивні функції та біохімічні показники у корі головного мозку мишей на фоні висококалорійної їжі з високим вмістом жирів і фруктози

### 4.2.1. Поведінковий тест відкритого поля

Дослідження, спрямоване на вивчення впливу висококалорійної їжі (ВКІ) на рухову активність мишей, виявило несподівані результати. Замість сповільнення рухів, як очікувалося, ВКІ призвела до їхнього посилення (Рис. 3.9А і Д). Це свідчить про те, що жир або фруктоза, або обидва ці компоненти, можуть стимулювати фізичну активність. Водночас, АКГ показав тенденцію до сприяння тривожній поведінці (Рис. 3.9Г, Д). Парадоксально, але АКГ бере участь як у деградації, так і в синтезі  $\gamma$ -аміномасляної кислоти (ГАМК), яка зв'язується з ГАМК-рецепторами, надаючи анксиолітичну дію [257]. Альфа-кетоглютарат є субстратом для ГАМК-трансамінази, яка перетворює ГАМК на семіальдегід бурштинової кислоти (семіальдегід сукцинату). Одночасно АКГ є попередником для синтезу ГАМК за допомогою глутаматдегідрогенази та глутаматдекарбоксилази. Останній метаболічний шлях, таким чином, може пояснювати схильність АКГ викликати тривожну поведінку.

Дані щодо поведінки групи, яку годували ВКІ, дещо відрізняються від раніше опублікованих. Зокрема, попередні дослідження виявили, що ВКІ схиляє мишей до меншої рухливості і до того, що вони тримаються в периферійних зонах поля [258]. Багато досліджень виявили, що їжа з високим вмістом жирів знижує дослідницьку поведінку мишей [259], хоча нещодавно було виявлено, що їжа з високим вмістом жирів може також підвищувати дослідницьку активність [198]. Дійсно, їжа і поведінка можуть впливати один на одного. Наприклад, тварини, які не мають апетиту і споживають відносно невелику кількість їжі, можуть не зазнати суттєвого впливу їжі з високим вмістом жирів. Це частково стосується мишей групи ВКІ, які споживали приблизно на чверть менше їжі, ніж контрольні миші, незважаючи на те, що отримували на 14% більше калорій [206].

Крім того, активні тварини можуть частково перетворювати спожиті метаболіти в конвертовану енергію (наприклад, АТФ) і, як наслідок, менше накопичувати метаболічні запаси. Саме це може бути причиною ефектів, оскільки миші, які отримували ВКІ у експерименті, суттєво не набирали вагу, незважаючи на підвищений вміст ТАГ та глікогену в печінці [206]. Крім того, ВКІ дійсно може забезпечувати мозок і тіло енергією, сприяючи вищій активності тварин. Певні поживні речовини можуть метаболізуватися мікробіотою кишківника і виводитися з організму, що призводить до збільшення кількості фекальних кульок (Рис. 3.9В). Тим не менш, необхідні додаткові дослідження, щоб з'ясувати, чи є підвищена дефекація у мишей, яких годували ВКІ, функцією метаболізму або функцією пізнання.

#### **4.2.2. Показники оксидативного стресу, антиоксидантні та пов'язані з ними ферменти**

Очікувалося, що при споживанні ВКІ може збільшуватися рівень маркерів оксидативного стресу та активність антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів у корі головного мозку мишей, оскільки ожиріння часто супроводжується розвитком оксидативного стресу [260]. Однак, отримані результати показали, що лише рівень ПОЛ, маркера оксидативного стресу, був вищим у корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ (Рис. 3.10Г). Це може бути пов'язано з тим, що надлишок вільних жирних кислот у раціоні може індукувати НАДФН-оксидази, таким чином сприяючи окисленню мембранних ліпідів і, певною мірою, запасних ліпідів [261].

Серед антиоксидантних ферментів першої (СОД, каталаза, глутатіонпероксидаза) та другої (GST, NQO1) ліній захисту лише активність NQO1, ферменту, пов'язаного з антиоксидантним захистом, була вищою в корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ (Рис. 3.11Д). Підвищена активність NQO1 узгоджується з підвищеним рівнем ПОЛ у мишей, які споживали ВКІ, оскільки NQO1 може опосередковано сприяти завершенню ланцюга

пероксидного окислення ліпідів з утворенням ПОЛ (Рис. 3.10Г). Проте, ці дані не дозволяють ідентифікувати регуляторний шлях, який може призвести до збільшення експресії NQO1 на ВКІ. Фермент перебуває під регуляцією таких транскрипційних факторів, як Nrf2 та рецептор ароматичних вуглеводнів [98]. Однак активність декількох встановлених мішеней Nrf2, таких як GST і ГП, насправді була нижчою у мишей, які споживали ВКІ або АКГ, порівняно з групою, яка харчувалася стандартним кормом.

Єдиним антиоксидантним ефектом АКГ було збільшення співвідношення GSH/GSSG у групі, що споживала АКГ (Рис. 3.10Б, В). Це було досягнуто за рахунок зниження рівня GSSG, але не за рахунок підвищення рівня відновленого глутатіону (Рис. 3.10А). Рівень GSSG може знижуватися за рахунок його інтенсивного виведення з клітин за допомогою білку множинної лікарської резистентності 1 [262]. Ген, що кодує цей білок, є однією з мішеней Nrf2. Однак, як можна побачити з поточних результатів, встановлені мішені Nrf2 диференційовано регулюються в мозку мишей за допомогою ВКІ або харчування, доповненого АКГ. Тим не менш, це не скасовує можливої активації відтоку GSSG за допомогою білку 1, оскільки його експресія може бути індукована іншими транскрипційними регуляторами, ніж Nrf2 [263]. Зниження рівня GSSG може також свідчити про більшу участь інших тіолвмісних антиоксидантів, таких як тіоредоксини та глутаредоксини, у детоксикації АФК на тлі ВКІ та АКГ. Зокрема, було показано, що експресія тіоредоксин-взаємодіючого білку (TXNIP), супресора тіоредоксинів, пригнічується пальмітиноювою кислотою [264]. Цікаво, що АКГ також блокує активацію експресії TXNIP білком, що зв'язує вуглеводний елемент відповіді [265]. Нарешті, зниження рівня GSSG у мишей, які споживали їжу з додаванням АКГ, узгоджується з низькою активністю GST та ГП у корі головного мозку мишей, які споживали АКГ, оскільки вони роблять значний внесок у пул GSSG.

### 4.2.3. Ферменти, що належать до шляхів енергетичного обміну

Це дослідження показало зниження активності ФФК, одного з ключових гліколітичних ферментів, у корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ або їжу з додаванням АКГ (Рис. 3.12Б). Було показано, що ФФК можна інгибувати шляхом О-зв'язаного N-ацетилглюкозамілювання (O-GlcNAcylation) в декількох типах ракових клітинних ліній [266], а жирні кислоти сприяють O-GlcNAcylation в багатьох тканинах [267]. Однак також повідомлялося, що їжа з високим вмістом жирів пригнічує O-GlcNAcylation в мозку мишей [268]. Їжа, яку давали експериментальним мишам в цьому дослідженні, може сприяти O-GlcNAcylation, зокрема через наявність жирних кислот, які забезпечують ацетил-коензим А для утворення N-ацетилглюкозаміну. Крім того, харчова фруктоза є джерелом фруктозо-6-фосфату, початкового метаболіту шляху біосинтезу гексозаміну, який продукує N-ацетилглюкозамін. Трансамінування АКГ призводить до утворення глютамату, який в подальшому може перетворюватися на глютамін, проміжний продукт шляху біосинтезу гексозаміну.

### 4.2.4. Рівні іРНК мішеней Nrf2, регуляторів метаболізму, мітохондріального біогенезу та автофагії

Усі експериментальні раціони харчування призводили до зниження рівня транскриптів генів, що кодують піруватдегідрогеназу кіназу 4 (PDK4), гліцин-N-метилтрансферазу (GNMT) та рецептор  $\gamma$ -коактиватор  $1\alpha$  проліфератора пероксисом (PGC- $1\alpha$ ), порівняно з контролем (Рис. 3.14). PDK4 та PGC- $1\alpha$ , є важливими регуляторами метаболізму. PDK4 інгибує піруватдегідрогеназу шляхом фосфорилування, тим самим знижуючи надходження пірувату в цикл Кребса [269]. Нижчий рівень транскрипту PDK4 може свідчити про вплив як ВКІ, так і раціон харчування з додаванням АКГ на секрецію інсуліну. Це було частково підтверджено дослідженням на печінці, де спостерігалось подібне

зниження рівня іРНК гену *PDK4* і тенденція ВКІ до зниження фосфо-АМФК (активованої форми) [206].

*PGC-1 $\alpha$*  активує мітохондріальний біогенез та  $\beta$ -окислення жирних кислот [270]. Ген, який кодує *GNMT*, є мішенню *Nrf2*, і його менший рівень транскрипту в корі головного мозку мишей, які споживали експериментальну їжу, узгоджується з нижчою активністю ГП і GST в корі головного мозку мишей, які споживали таку ж їжу. Однак структура рівня транскрипту *GSTM3* не відповідає структурі активності GST (Рис. 3.11E і Рис. 3.14). Щоб перевірити, скільки ізоферментів GST беруть участь в активності GST, провели електрофорез в нативному гелі з подальшим фарбуванням активності (Рис. 11Є і Ж). Було виявлено, що патерн активності *GSTM*, згідно з даними денситометрії, повторює патерн експресії *GSTM3* (Рис. 3.14). Експресія UDP-глюкозодегідрогенази (*UGDH*), мішені ароматичного вуглеводневого рецептора, також була вищою в корі щурів групи АКГ (Рис. 3.14). Цікаво, що гени, які кодують *UGDH* (фермент, який бере участь у біосинтезі глікозаміногліканів) і *TFEB* (транскрипційний фактор, який регулює автофагію і мітохондріальний біогенез), обидва активуються в корі тварин, які отримували АКГ. Також було виявлено, що *UGDH* є однією з прямих мішеней *TFEB* [271].

Збільшення рівня транскриптів генів *TFEB* та *UGDH* в корі мишей, які отримували АКГ, свідчить про можливу стимуляцію АКГ автофагії в клітинах кори головного мозку. Обидва фактори, *TFEB* і *UGDH*, пов'язані з автофагією [272,273]. Також з автофагією може бути пов'язане зниження активності гексокінази в корі головного мозку мишей, які споживали АКГ. Було показано, що гексокіназа 1, експресована у мозку, є мішенню для убіквітинування, пов'язаного з автофагією [274].

#### **4.2.5. Узагальнення про вплив альфа-кетоглютарату на когнітивні функції та біохімічні показники у корі головного мозку мишей на фоні їжі з високим вмістом жирів і фруктози**

Результати свідчать про неоднозначність режимів харчування з високим вмістом жирів. Незважаючи на те, що такі раціони можуть стимулювати накопичення ліпідів, не всі вони сприяють ожирінню. ВКІ з високим вмістом жирів та фруктози та їжа з додаванням АКГ призводила до пригнічення ферментів, які здійснюють глутатіонзалежну детоксикацію ксенобіотиків та продуктів пероксидного окислення ліпідів, а саме ГП та GST. Споживання мишами їжі, доповненої АКГ, також призводило до зниження рівня окисненого глутатіону за відсутності суттєвих змін у рівні відновленого глутатіону. Натомість, ВКІ сприяла пероксидному окисленню ліпідів, але водночас зумовлювала підвищення активності NQO1. Таким чином, представлені тут дані свідчать про пригнічення деяких мішеней Nrf2, таких як ГП і GST, під впливом ВКІ або харчування доповненого АКГ, тоді як активація NQO1 під впливом ВКІ і маркерів автофагії, таких як TFEB, під впливом АКГ. Як ВКІ, так і їжа з додаванням АКГ, а також їх поєднання сприяли зниженню рівнів транскриптів PDK4 (важливого регулятора потоку циклу ТСА), гліцин-N-метилтрансферази, PGC-1 $\alpha$  (важливого регулятора мітохондріального біогенезу та  $\beta$ -окиснення). Водночас спостерігали незначні зміни активності комплексів мітохондріального дихального ланцюга.

Досліджувані раціони також викликали зміни в поведінці мишей. Зокрема, ВКІ стимулювала локомоторну активність мишей, тоді як їжа з додаванням АКГ виявляла схильність до стимуляції тривожно-подібної поведінки.



### **4.3. Вплив альфа-кетоглютарату на активність автофагії та про-/антиоксидантний статус у корі головного мозку мишей на фоні кафетерійного раціону**

#### **4.3.1. Поведінкові реакції у мишей, що споживали кафетерійний раціон доповнений АКГ**

У деяких дослідженнях загальну відстань, пройдену мишею у відкритому полі, інтерпретують як міру тривожної поведінки. Чим більшу відстань пододала тварина, тим менш тривожною можна її вважати [275,276]. Це припущення підтверджується дослідженнями, в яких анксиолітичні препарати збільшували загальну відстань, пройдену твариною в тесті на відкритому повітрі [277].

Оцінка впливу КР на фізіологічні параметри, такі як фізична активність і дослідницька поведінка, була однією з основних цілей цього дослідження. Ані КР, ані їжа, доповнена АКГ, суттєво не вплинули на загальну відстань, пройдену в тесті відкритого поля (Рис. 3.16А). Хоча можна помітити, що миші, яких годували кафетерійним раціоном, виявилися дещо активнішими, ніж контрольні миші та миші, яких годували АКГ. Це відповідає даним інших досліджень, в яких КР не мав різкого впливу на фізичну активність модельних гризунів [188,278]. Однак у цьому випадку миші, які споживали КР з АКГ (КР+АКГ), демонстрували нижчу дослідницьку поведінку, надаючи перевагу зовнішнім квадратам арени (Рис. 3.16В). Таким чином, таку їжу можна розглядати як анксиогенну. Крім того, седативний ефект у мишей, які споживали АКГ, можна виключити на основі зменшення кількості фекальних кульок, залишених цими тваринами (Рис. 3.16Г). Натомість, більша кількість фекальних кульок інтерпретується як тривожна поведінка [209].

Також схоже на те, що КР і АКГ демонструють синергізм у своєму впливі на дослідницьку поведінку. Попередні дослідження роблять різні висновки щодо здатності КР сприяти тривожній поведінці [181]. Це може бути результатом різних протоколів, що використовуються для оцінки поведінкових ознак. Дійсно,

було показано, що можна отримати протилежні результати залежно від віку та статі тварин [181]. У дослідженні з ВКІ та АКГ впливають на поведінку мишей у спосіб, подібний до того, який бачимо в цьому дослідженні. Зокрема, миші, які споживали їжу з АКГ, також мали тенденцію уникати внутрішньої зони відкритого поля [279].

Анксиогенні ефекти раціону харчування з АКГ можуть бути опосередковані прямим залученням АКГ до метаболізму нейромедіаторів, таких як глутамат і ГАМК. Він також може діяти опосередковано, примушуючи трансамінування лейцину та інших амінокислот, які активують механічний мішень-рапаміцинказний комплекс 1 (TORC1). Як наслідок, він може знижувати активність TORC1. Раніше було виявлено, що зниження активності TORC1 може сприяти виникненню симптомів тривоги [280].

Крім того, АКГ слугує кофактором для РНК-деметилаз, таких як FTO (білок, асоційований з жировою тканиною та ожирінням), ALKBH5 (гомолог alkB 5), KDM6A або KDM6B. Таким чином, їжа з додаванням АКГ може сприяти підвищенню активності цих ферментів. Показано, що деметилювання N6-метиладенозину в інформаційній РНК (іРНК) у мозку щурів сприяє тривожній поведінці, тоді як метилювання викликає протилежний ефект [281].

#### **4.3.2. Вплив кафетерійного раціону з додаванням альфа-кетоглутарату на активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів**

Багато досліджень показали, що КР є стимулятором оксидативного стресу та запалення [282,283]. Дослідження, в яких вивчався ВКІ, показали, що вираженість оксидативного стресу та його прояв може сильно залежати від тканини [206,279]. Дані показують, що ВКІ збільшує інтенсивність оксидативного стресу в печінці, спричиняючи значно вищу активність антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів, а також вищі рівні пероксидів ліпідів [206]. З іншого боку, лише деякі з цих прооксидантних ефектів спостерігалися в корі головного мозку. Наприклад, ВКІ сприяє підвищенню

рівня ПОЛ у корі головного мозку та збільшенню активності NQO1, але знижує активність GST та ГП [279]. Проте зниження активності GST у корі головного мозку мишей, які споживали ВКІ, відображалося на транскрипційному рівні, проте не було характерним для всіх ізоферментів GST [279]. Отже, кора головного мозку може бути менш чутливою до дієтичних втручань та інших методів лікування, ніж інші органи.

Стійкість кори головного мозку до втручань, які потенційно можуть призвести до розвитку оксидативного стресу, також підтверджується дослідженнями на моделі щурів. Дослідження Żebrowska та колег показало, що їжа з високим вмістом білку індукувала оксидативний стрес у корі головного мозку та гіпоталамусі щурів, причому кора головного мозку була менш чутливою до нього [284]. Подібні дані також були отримані для мишей лінії *C57BL/6*, яких годували їжею з високим вмістом холестеролу [285]. Зокрема, їжа з високим вмістом холестеролу знижувала активність СОД і не впливала на активність каталази в корі головного мозку [285]. Зниження експресії гена *SOD1* також спостерігали в корі головного мозку мишей, які споживали їжу з високим вмістом жирів [286].

Поточні дані свідчать про зниження активності каталази, ГП, GST, NQO та Г6ФДГ у корі головного мозку мишей, що споживали кафетерійний раціон, альфа-кетоглютарат та їх комбінацію (Рис. 3.18). Нижча (порівняно з контролем) активність Г6ФДГ у корі головного мозку мишей, які споживали КР та АКГ (Рис. 3.18Є), може відображати здатність цих раціонів харчування прискорювати вікову втрату активності цього ферменту [287]. З іншого боку, КР може бути багата на стероїди (наприклад, холестерол), які, натомість, пригнічують експресію Г6ФДГ через петлю негативного зворотного зв'язку, опосередковану білками, що зв'язують стерольні регуляторні елементи [288]. Експресія Г6ФДГ також може бути опосередкована TORC1 [288]. Як було згадано вище, АКГ може запобігати активації TORC1, сприяючи трансамінуванню амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Таким чином, раціон, що містить АКГ, може

послаблювати активацію TORC1 у багатьох тканинах, включаючи кору головного мозку, сприяючи, таким чином, слабшій індукції експресії Г6ФДГ.

Зниження активності антиоксидантних ферментів також може бути спричинене згаданими епігенетичними модифікаціями іРНК відповідних генів, які можуть стимулюватися АКГ. Усі ферменти, активність яких вимірювали в цьому дослідженні, є мішенями транскрипційного фактору Nrf2. Було показано, що зниження метилювання N6-аденозину іРНК Nrf2 знижує її стабільність [289].

Найімовірніше, зниження активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів у поєднанні з нижчими рівнями загальних тіолів у всіх трьох експериментальних групах без різниці в рівнях ПОЛ в експериментальних групах порівняно з контролем (Рис. 3.17А) може відображати меншу інтенсивність оксидативного стресу в корі головного мозку в цих групах.

#### **4.3.3. Вплив кафетерійного раціону з додаванням альфа-кетоглутарату на активність ключових гліколітичних ферментів**

Поведінка тварин пов'язана з енергетичним метаболізмом мозку, в якому гліколіз відіграє одну з основних ролей. Проміжні продукти гліколізу, такі як піруват, фосфоенолпіруват, лактат та інші, також можуть відігравати важливу роль у прозапальних процесах, в тому числі тих, що можуть бути спровоковані смачною, багатою на жири їжею. Натомість, ключові гліколітичні ферменти також є мішенями окислювальної модифікації [290]. З поточних та попередніх досліджень, кора мозку мишей, які споживали АКГ, характеризується нижчою активністю ГК, ключового гліколітичного ферменту, порівняно з контролем. Подібно до Г6ФДГ, ГК також може залежати від сигнального шляху TORC1 [291]. Її експресія також індукується HIF-1, у деяких типах клітин і тканин [292,293]. Було показано, що HIF-1 інгибується АКГ [154,294].

#### 4.3.4. Вплив кафетерійного раціону доповненого альфа-кетоглутаратом на експресію генів, що регулюють вуглеводний обмін та автофагію

Обидва раціони, базова і КР, при додаванні АКГ сприяли підвищенню транскриптів генів, пов'язаних з автофагією, а саме *TFEB*, *DDIT3*, *SQSTM1*, *RICTOR*, *BNIP3*, *BECN1* і *ATG5* (Рис. 3.20А, Б). Подібний вплив АКГ на рівень транскрипту *TFEB* у корі головного мозку спостерігався і в попередньому дослідженні з ВКІ.

Ці дані підтверджують ідею про те, що АКГ може сприяти автофагії на біохімічному рівні, запобігаючи активації TORC1 амінокислотами з розгалуженим ланцюгом [295]. Кіназа mTOR є відомим інгібітором автофагії, який безпосередньо фосфорилує білки, що беруть участь в автофагії, а також транскрипційні фактори (наприклад, *TFEB*), пов'язані з регуляцією автофагії [295].

Однак АКГ може також активувати автофагію на епігенетичному та транскрипційному рівнях, впливаючи на метилювання РНК та факторів транскрипції. Метилювання пригнічує як автофагію, так і АМФК [296]. Натомість, було показано, що АКГ-залежні деметилази, такі як *FTO* та *ALKBH5*, деметилюють N6-метиладенозинів ділянки іРНК, що кодують гени, пов'язані з автофагією, такі як *TFEB* та *ATG5* [296]. Також було показано, що автофагія регулюється метилюванням/деметилюванням гістонів [297]. Показано, що гістонові деметилази, такі як *KDM6B* (*JMJD3*), які потребують АКГ як ко-субстрат, також активують автофагію [297].

У цьому дослідженні вимірювали рівні транскриптів генів *TFEB* та *DDIT3*, транскрипційних факторів, мішенями яких є гени, пов'язані з автофагією. Такі гени, як *ATG5*, *BECN1* та *SQSTM1* є прямими мішенями *TFEB* [271]. У моделях культивованих клітин було виявлено, що *DDIT3* також може регулювати експресію *SQSTM1* [298,299]. Також бачимо, що їжа, доповнена АКГ, сприяла

активації декількох мішеней транскрипційних факторів forkhead box O (FOXO), а саме *RICTOR*, *STK11* та *BNIP3*, але не *GADD45A* (Рис. 3.20А).

Кілька досліджень показали, що їжа з високим вмістом жирів пригнічує експресію генів, пов'язаних з автофагією. Зокрема, їжа з високим вмістом жирів пригнічувала експресію Beclin-1 (кодується геном *BECN1*, експресію якого оцінювали в даному дослідженні) та *Atg5* у мишей лінії *C57BL/6J* [300,301]. Цікаво, що експресія *SQSTM1* (також відомого як p62) була продемонстрована як така, що регулюється їжею з високим вмістом жирів (Li et al., 2022; Yi et al., 2024). Це дослідження показало зменшення рівня транскрипту гену *ATG5* під впливом КР (Рис. 3.20Б). КР не впливав на рівень транскрипту гену *SQSTM1*, але також не скасовував індукцію експресії *SQSTM1* під впливом АКГ, на відміну від зменшення рівня транскриптів генів *STK11*, *TFEB* та *BNIP3* (Рис. 3.20А, Б). Таким чином, виявлено подібності (зменшення рівня транскрипту гену *ATG5*) та відмінності (відсутність значного впливу на рівень транскриптів генів *BECN1* та *SQSTM1*) між КР та їжею з високим вмістом жирів.

#### **4.3.5. Зв'язок між поведінкою та автофагією в корі головного мозку: можливі ефекти АКГ та кафетерійного раціону**

Автофагія також тісно пов'язана з функціонуванням мозку та поведінкою. Показано, що нейрони гіпокампа хворих на шизофренію експресують Beclin-1 на нижчих рівнях, ніж нейрони здорових людей [302]. Було виявлено, що пригнічення автофагії за допомогою їжі з високим вмістом жирів у гіпокампі мишей пов'язане з тривожною поведінкою [300]. Зокрема, миші, які споживали їжу з високим вмістом жирів, проходили меншу відстань і рідше перетинали внутрішню зону, ніж особини, яких годували стандартним кормом [300].

У цьому дослідженні показано, що АКГ стимулює експресію генів, пов'язаних з автофагією, у корі головного мозку (Рис. 3.20А, Б). Однак він також сприяє зниженню дослідницької активності мишей, посилюючи ефект КР

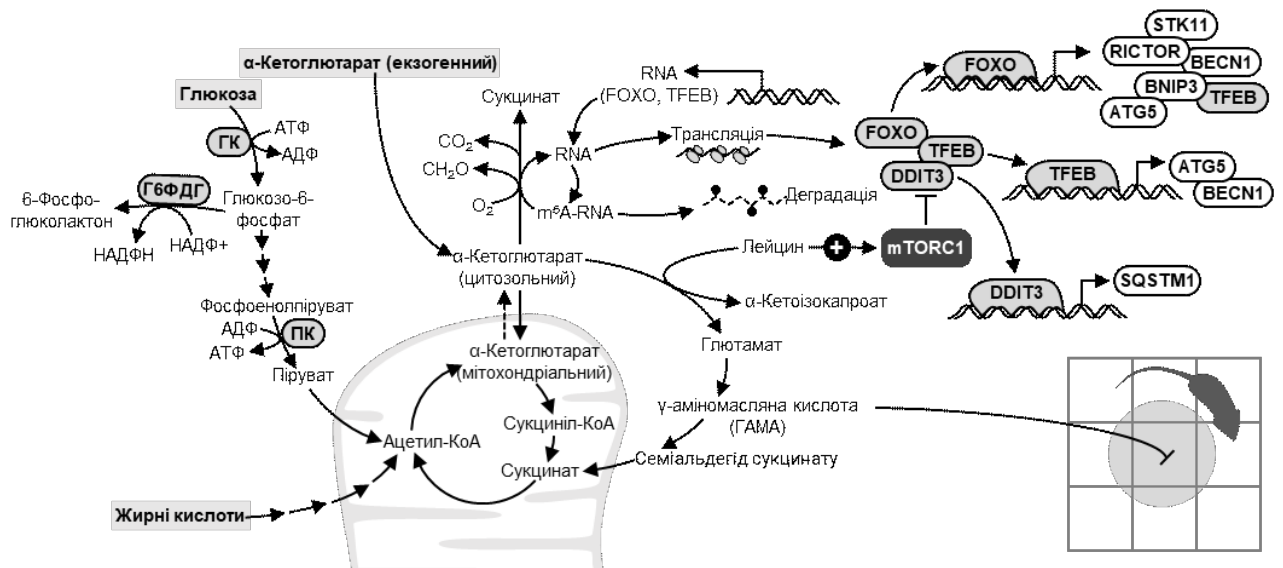
(Рис. 3.16). Це свідчить про те, що тривожно-подібна поведінка може не мати зворотної кореляції з автофагією в корі головного мозку.

Можна припустити, що АКГ може діяти як речовина, що може сприяти як тривозі, так і седації. Ця кетокислота є попередником як стимулюючих (глутамат), так і гальмівних (ГАМК) нейромедіаторів [303]. Синтез обох попередників критично залежить від проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот, включаючи АКГ, а також від ацетил-коензиму А (ацетил-КоА) [303]. Останнє може пояснити, чому кафетерійний раціон може поглиблювати вплив АКГ на локомоторну активність мишей у тесті на відкритому повітрі. Дійсно, споживання цієї їжі призводить до споживання більшої кількості вуглеводів і жирів порівняно зі стандартною їжею. Вуглеводи та жири метаболізуються в печінці, а метаболіти спрямовуються на синтез глікогену та АТФ у гепатоцитах. Певна частина метаболітів витрачається на утворення кетокислот і кетонових тіл, які в подальшому перетворюються на ацетил-КоА в астроцитах [303]. Таким чином, ацетил-КоА, на утворення якого витрачаються харчові жири та вуглеводи, може підживлювати утворення додаткових порцій АКГ у циклі трикарбонових кислот.

#### **4.3.6. Узагальнення про вплив альфа-кетоглутарату на активність автофагії та про-/антиоксидантний статус у корі головного мозку мишей на фоні кафетерійного раціону**

Кафетерійні раціони були розроблені для моделювання індукованого їжею ожиріння та метаболічних порушень у гризунів. Вони також підходять для тестування підходів до лікування метаболічних порушень. У цьому дослідженні було розглянуто питання про те, як КР і природний метаболіт, АКГ, можуть впливати на вуглеводний обмін, антиоксидантні та автофагічні реакції нервових клітин, а також як вони можуть впливати на поведінку тварин. Ці дані показують, що короточасний КР знижує антиоксидантний захист у корі головного мозку мишей лінії *C57BL/6J* середнього віку. Однак доповнення їжі АКГ сприяє

розвитку тривожної поведінки. КР і АКГ адитивно впливають на поведінку мишей, що призводить до зниження дослідницької активності мишей. Найсильнішим ефектом АКГ є індукція генів, пов'язаних з автофагією, у корі головного мозку. Припускається, що дію АКГ, яку спостерігали на поведінку і клітинні функції, може бути опосередкована активацією АКГ-залежних гідроксилаз і деметилаз. Поживні речовини кафетерійного раціону можуть посилювати цю дію, підтримуючи пул АКГ.



**Рис. 4.1. Можливе пояснення впливу висококалорійної їжі та АКГ на рівень транскриптів генів, що пов'язані з автофагією, та поведінку мишей.**



## **Розділ 5. Узагальнення про вплив альфа-кетоглутарату на модельні організми: плодкових мух і лабораторних мишей**

Екзогенний альфа-кетоглутарат (АКГ) демонструє різноманітний вплив на фізіологічні показники, метаболічні шляхи та поведінкові реакції залежно від виду модельного організму або раціону харчування. У плодової мухи АКГ не впливає на тривалість життя на стандартному живильному середовищі, проте продовжує життя мух на раціоні з низьким співвідношенням білків до вуглеводів. Незважаючи на відсутність значної різниці у показниках енергетичного метаболізму (гліколіз, окисне фосфорилування), АКГ спричиняє зниження активності антиоксидантних ферментів, таких як каталаза та глутатіон-S-трансфераза, а також рівня триацилгліцеридів у мух.

У мишей АКГ також впливає на антиоксидантний захист та метаболічні шляхи, особливо в умовах високожирового чи кафетерійного раціону. АКГ пригнічує активність ферментів, відповідальних за глутатіонзалежну детоксикацію (глутатіонпероксидаза та глутатіон-S-трансфераза), хоча суттєво не впливає на рівень відновленого глутатіону. Одночасно він активує маркери автофагії (наприклад, TFEB) та знижує експресію генів, які пов'язані з енергетичним метаболізмом, таких як *PDK4* і *PGC-1 $\alpha$* , що може свідчити про регуляцію мітохондріального біогенезу та окиснення жирних кислот. АКГ також сприяє розвитку тривожної поведінки та знижує дослідницьку активність у мишей.

Спільними шляхами впливу АКГ у мух і мишей є його здатність модулювати антиоксидантні процеси, енергетичний метаболізм та регуляцію ключових клітинних функцій. В обох видах АКГ пригнічує антиоксидантний захист через зниження активності ферментів, що вказує на розвиток оксидативного стресу. Водночас у мишей і мух АКГ впливає на ліпідний метаболізм, сприяючи зниженню накопичення триацилгліцеридів або активації процесів автофагії. Такий вплив може бути опосередкований його роллю як

кофактора для ферментів, залежних від  $\alpha$ -кетокислот, зокрема тих, що беруть участь у регуляції енергетичних та сигнальних шляхів.

Отже, АКГ є багатофункціональним метаболітом, здатним до специфічної регуляції фізіологічних та біохімічних процесів, яка залежить від виду, дієтичного фону та умов експерименту.

## Висновки

Отримані результати свідчать проте, АКГ продовжує тривалість життя довгоживучої *D. melanogaster* в умовах обмеження доступності білків, але не за збалансованого вмісту білків і вуглеводів у дієті. Споживання АКГ послаблює антиоксидантний захист, не впливаючи суттєво на енергетичний метаболізм як у мух, так і мишей на тлі базової їжі. Водночас, АКГ викликає тривожну поведінку у мишей на тлі базового та висококалорійного раціону. Ключові ефекти АКГ включають збільшення відносного стаціонарного рівня іРНК генів, які пов'язані з автофагією, у корі головного мозку мишей. Разом, результати свідчать про те, що геропротекторні та стрес-протекторні властивості альфа-кетоглутарату залежать від складу їжі та фізіологічних особливостей модельних тварин.

1. Споживання екзогенного альфа-кетоглутарату не впливало на тривалість життя самок довгоживучої сублінії *D. melanogaster* на стандартному середовищі (5% сахарози і 5% дріжджів), але збільшувало тривалість життя на середовищах з низьким вмістом білку і високим вмістом сахарози (9% сахарози і 1% дріжджів).

2. Споживання живильного середовища з АКГ у концентрації 10 мМ зменшувало рівень запасних ліпідів та активності деяких антиоксидантних ферментів у тілі 25-денних самок довгоживучої сублінії *D. melanogaster*. Проте це не впливало на стійкість мух до дії стресорів, рухову активність, активність ферментів обміну вуглеводів і роботу комплексів дихального ланцюга, а також на маркери оксидативного стресу у тілі цих мух.

3. Споживання 1% розчину альфа-кетоглутарату призводило до розвитку тривожної поведінки у самців і самок мишей на тлі споживання базової їжі та двох висококалорійних раціонів – їжі з високим вмістом жиру та фруктози та кафетерійного раціону. Тривожна поведінка мишей виражалась у зменшеній дослідницькій активності мишей у тесті відкритого поля.

4. Споживання 1% альфа-кетоглютарату знижувало активність антиоксидантних ферментів у корі головного мозку самок мишей на фоні кафетерійної і базової їжі, а також активності глутатіон-залежних ферментів у самців на тлі базової їжі. Альфа-кетоглютарат практично не впливав на рівень маркерів оксидативного стресу, а саме пероксидів ліпідів і відновленого глутатіону, у корі головного мозку за жодного з апробованих раціонів.

5. Альфа-кетоглютарат суттєво не впливав на активність ферментів вуглеводного обміну та комплексів мітохондріального електронтранспортного ланцюга у корі головного мозку мишей на тлі базової та висококалорійної їжі.

6. Споживання 1% альфа-кетоглютарату збільшувало рівень транскриптів генів продукти експресії яких залучені до активації автофагії у корі головного мозку мишей за споживання базової їжі, але при споживанні мишами кафетерійного раціону і 1% альфа-кетоглютарату ці ефекти не були виявлені.

### Список використаних джерел

1. Cornelissen G. Altered Circadian Energy Metabolism and Chronobiological Risk Factors of Chronic Diseases. In: *The Role of Functional Food Security in Global Health* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2024 Sep 29]. p. 513–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012813148000030X>
2. WHO. Ageing and health [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
3. Bayliak MM, Lushchak VI. Pleiotropic effects of alpha-ketoglutarate as a potential anti-ageing agent. *Ageing Research Reviews*. 2021 Mar 1;66:101237.
4. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Diep S, Lomenick B, Meli VS, Monsalve GC, Hu E, Whelan SA, Wang JX, Jung G, Solis GM, Fazlollahi F, Kaweeteerawat C, Quach A, Nili M, Krall AS, Godwin HA, Chang HR, Faull KF, Guo F, Jiang M, Trauger SA, Saghatelian A, Braas D, Christofk HR, Clarke CF, Teitell MA, Petrascheck M, Reue K, Jung ME, Frand AR, Huang J. The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*. 2014 Jun 19;510(7505):397–401.
5. Lylyk MP, Bayliak MM, Shmihel HV, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Effects of alpha-ketoglutarate on lifespan and functional aging of *Drosophila melanogaster* flies. *UkrBiochemJ*. 2018 Nov 19;90(6):49–61.
6. Shahmirzadi AA, Edgar D, Liao CY, Hsu YM, Lucanic M, Shahmirzadi AA, Wiley CD, Gan G, Kim DE, Kasler HG, Kuehnemann C, Kaplowitz B, Bhaumik D, Riley RR, Kennedy BK, Lithgow GJ. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. *Cell metabolism*. 2020 Sep 1;32(3):447.
7. Le Thuc O, García-Cáceres C. Obesity-induced inflammation: connecting the periphery to the brain. *Nat Metab*. 2024 Jul;6(7):1237–52.
8. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*. 2012 Feb 15;7(5):376.
9. Bayliak MM, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochyńska OM, Semchyshyn OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Dietary alpha-ketoglutarate promotes higher

protein and lower triacylglyceride levels and induces oxidative stress in larvae and young adults but not in middle-aged *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2017 Feb 1;204:28–39.

10. Morgan TH. Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*. 1910 Jul 22;32(812):120–2.

11. Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM, Roberts DM. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*. 2015 Nov 11;201(3):815.

12. O’Grady PM. Chapter 80 - *Drosophila melanogaster*. In: Resh VH, Cardé RT, editors. *Encyclopedia of Insects (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2009 [cited 2024 Oct 23]. p. 301–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741448000898>

13. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YHC, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Miklos, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, Pablos B de, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina

NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RDC, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000 Mar 24;287(5461):2185–95.

14. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*. 2013 Jan 1;12(1):8–21.

15. Gao Y, Cheng X, Tian Y, Yuan Z, Fan X, Yang D, Yang M. Nutritional Programming of the Lifespan of Male *Drosophila* by Activating FOXO on Larval Low-Nutrient Diet. *Nutrients*. 2023 Jan;15(8):1840.

16. Regan JC, Partridge L. Gender and longevity: Why do men die earlier than women? Comparative and experimental evidence. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013 Aug 1;27(4):467–79.

17. Carazo P, Green J, Sepil I, Pizzari T, Wigby S. Inbreeding removes sex differences in lifespan in a population of *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett*. 2016 Jun;12(6):20160337.

18. Malick LE, Kidwell JF. The effect of mating status, sex and genotype on longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1966 Jul;54(1):203–9.

19. Rovenko BM, Kubrak OI, Gospodaryov DV, Perkhulyn NV, Yurkevych IS, Sanz A, Lushchak OV, Lushchak VI. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 2015 Aug 1;79:42–54.

20. Rovenko BM, Perkhulyn NV, Gospodaryov DV, Sanz A, Lushchak OV, Lushchak VI. High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2015 Feb 1;180:75–85.
21. Standley A, Xie J, Lau AW, Grote L, Gifford AJ. Working with Miraculous Mice: *Mus musculus* as a Model Organism. *Curr Protoc*. 2024 Oct;4(10):e70021.
22. Tanaka T. The relationships between litter size, offspring weight, and behavioral development in laboratory mice *Mus musculus*. *Mammal Study*. 2004;29(2):147–53.
23. Phifer-Rixey M, Nachman MW. Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *eLife*. 2015 Apr 15;4:e05959.
24. Chinwalla AT, Cook LL, Delehaunty KD, Fewell GA, Fulton LA, Fulton RS, Graves TA, Hillier LW, Mardis ER, McPherson JD, Miner TL, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Pepin KH, Pohl CS, Ponce TC, Schultz B, Thompson J, Trevaskis E, Waterston RH, Wendl MC, Wilson RK, Yang SP, An P, Berry E, Birren B, Bloom T, Brown DG, Butler J, Daly M, David R, Deri J, Dodge S, Foley K, Gage D, Gnerre S, Holzer T, Jaffe DB, Kamal M, Karlsson EK, Kells C, Kirby A, Kulbokas EJ, Lander ES, Landers T, Leger JP, Levine R, Lindblad-Toh K, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, Meldrim J, Meldrim J, Mesirov JP, Nicol R, Nusbaum C, Seaman S, Sharpe T, Sheridan A, Singer JB, Santos R, Spencer B, Stange-Thomann N, Vinson JP, Wade CM, Wierzbowski J, Wyman D, Zody MC, Birney E, Goldman N, Kasprzyk A, Mongin E, Rust AG, Slater G, Stabenau A, Ureta-Vidal A, Whelan S, Ainscough R, Attwood J, Bailey J, Barlow K, Beck S, Burton J, Clamp M, Clee C, Coulson A, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Davies J, Eyraas E, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Hunt A, Jones M, Joy A, Leonard S, Lloyd C, Matthews L, McLaren S, McLay K, Meredith B, Mullikin JC, Ning Z, Oliver K, Overton-Larty E, Plumb R, Potter S, Quail M, Rogers J, Scott C, Searle S, Shownkeen R, Sims S, Wall M, West AP, Willey D, Williams S, Abril JF, Guigó R, Parra G, Agarwal P, Agarwala R, Church DM, Hlavina W, Maglott DR, Sapojnikov V, Alexandersson M, Pachter L,



Antonarakis SE, Dermitzakis ET, Reymond A, Ucla C, Baertsch R, Diekhans M, Furey TS, Hinrichs A, Hsu F, Karolchik D, Kent WJ, Roskin KM, Schwartz MS, Sugnet C, Weber RJ, Bork P, Letunic I, Suyama M, Torrents D, Zdobnov EM, Botcherby M, Brown SD, Campbell RD, Jackson I, Bray N, Couronne O, Dubchak I, Poliakov A, Rubin EM, Brent MR, Flicek P, Keibler E, Korf I, Batalov S, Bult C, Frankel WN, Carninci P, Hayashizaki Y, Kawai J, Okazaki Y, Cawley S, Kulp D, Wheeler R, Chiaromonte F, Collins FS, Felsenfeld A, Guyer M, Peterson J, Wetterstrand K, Copley RR, Mott R, Dewey C, Dickens NJ, Emes RD, Goodstadt L, Ponting CP, Winter E, Dunn DM, von Niederhausern AC, Weiss RB, Eddy SR, Johnson LS, Jones TA, Elnitski L, Kolbe DL, Eswara P, Miller W, O'Connor MJ, Schwartz S, Gibbs RA, Muzny DM, Glusman G, Smit A, Green ED, Hardison RC, Yang S, Haussler D, Hua A, Roe BA, Kucherlapati RS, Montgomery KT, Li J, Li M, Lucas S, Ma B, McCombie WR, Morgan M, Pevzner P, Tesler G, Schultz J, Smith DR, Tromp J, Worley KC, Lander ES, Abril JF, Agarwal P, Alexandersson M, Antonarakis SE, Baertsch R, Berry E, Birney E, Bork P, Bray N, Brent MR, Brown DG, Butler J, Bult C, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Collins FS, Copley RR, Couronne O, Cawley S, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, Dermitzakis ET, Dewey C, Mouse Genome Sequencing Consortium, Genome Sequencing Center:, Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research:, European Bioinformatics Institute:, Wellcome Trust Sanger Institute, Research Group in Biomedical Informatics, Bioinformatics, National Center for Biotechnology Information, Department of Mathematics, Division of Medical Genetics, Center for Biomolecular Science and Engineering, EMBL, UK MRC Mouse Sequencing Consortium, Lawrence Berkeley National Laboratory, Department of Computer Science, School of Computer Science, The Jackson Laboratory, Laboratory for Genome Exploration, Affymetrix Inc., Departments of Statistics and Health Evaluation Sciences, National Human Genome Research Institute, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Department of Electrical Engineering, Department of Human Anatomy and Genetics, Department of Human Genetics, Howard Hughes Medical Institute and Department of Genetics, Departments of Biochemistry and

Molecular Biology and Computer Science and Engineering, Department of Computer Science and Engineering, Baylor College of Medicine, The Institute for Systems Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry and Biochemistry, Departments of Genetics and Medicine and Harvard-Partners Center for Genetics and Genomics, Department of Statistics, US DOE Joint Genome Institute, Cold Spring Harbor Laboratory, Wellcome Trust, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Genome Therapeutics Corporation, Bioinformatics Solutions Inc., Department of Molecular and Human Genetics, Department of Biology, Members of the Mouse Genome Analysis Group. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002 Dec;420(6915):520–62.

25. Susser M, Stein Z. Eras in Epidemiology [Internet]. Oxford University Press; 2009 [cited 2024 Nov 18]. Available from: <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195300666.001.0001/acprof-9780195300666>

26. Hickman M, Cairns J. The Centenary of the One-Gene One-Enzyme Hypothesis. *Genetics*. 2003 Mar 1;163(3):839–41.

27. Paigen K. One Hundred Years of Mouse Genetics: An Intellectual History. I. The Classical Period (1902-1980). *Genetics*. 2003 Jan 1;163(1):1–7.

28. Our History [Internet]. The Jackson Laboratory. [cited 2024 Oct 23]. Available from: <https://www.jax.org/about-us/history>

29. Brinster R. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 1981 Nov;27(1):223–31.

30. Costantini F, Lacy E. Introduction of a rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line. *Nature*. 1981 Nov;294(5836):92–4.

31. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987 Nov 6;51(3):503–12.

32. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul;292(5819):154–6.

33. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985 Sep;317(6034):230–4.
34. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1262–78.
35. Silver LM. *Mouse Genetics Concepts and Applications* [Internet]. Oxford University Press; New York, NY; 1995 [cited 2024 Dec 7]. Available from: <https://academic.oup.com/book/50910>
36. Justice MJ, Dhillon P. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Dis Model Mech*. 2016 Feb;9(2):101–3.
37. Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE, The Mouse Genome Database Group. The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Research*. 2015 Jan 28;43(D1):D726–36.
38. Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes*. 2019 Aug;43(8):1491–2.
39. Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell*. 2007 Jan 12;128(1):9–13.
40. Crawley JN. *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2007 [cited 2024 Dec 7]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470119055>
41. Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health*. 2016;2016(1):170–6.
42. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2731–8.
43. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015 Mar;54(2):120–32.

44. Leung C, Jia Z. Mouse Genetic Models of Human Brain Disorders. *Front Genet* [Internet]. 2016 Mar 23 [cited 2024 Dec 8];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2016.00040/full>
45. Russell SWM, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare. 1959;
46. Kenyon C. The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011 Jan 12;366(1561):9–16.
47. Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*. 2016 Apr;15(2):196–207.
48. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993 Dec 2;366(6454):461–4.
49. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate Protein. *Science*. 2001 Apr 6;292(5514):104–6.
50. Bartke A. Growth hormone and aging: A challenging controversy. *CIA*. 2008 Dec;Volume 3:659–65.
51. Brown-Borg HM, Rakoczy SG, Wonderlich JA, Rojanathammanee L, Kopchick JJ, Armstrong V, Raasakka D. Growth hormone signaling is necessary for lifespan extension by dietary methionine. *Aging Cell*. 2014 Dec;13(6):1019–27.
52. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 2015 Mar 26;161(1):106–18.
53. Rera M, Bahadorani S, Cho J, Koehler CL, Ulgherait M, Hur JH, Ansari WS, Lo T, Jones DL, Walker DW. Modulation of Longevity and Tissue Homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 Homolog. *Cell Metabolism*. 2011 Nov 2;14(5):623–34.
54. Mukherjee S, Basar MA, Davis C, Duttaroy A. Emerging functional similarities and divergences between *Drosophila* Spargel/dPGC-1 and mammalian PGC-1 protein. *Front Genet* [Internet]. 2014 Jul 10 [cited 2024 Aug 6];5. Available

from:

<https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2014.00216/full>

55. Kusama S, Ueda R, Suda T, Nishihara S, Matsuura ET. Involvement of *Drosophila* Sir2-like genes in the regulation of life span. *Genes Genet Syst*. 2006;81(5):341–8.
56. Hoffmann J, Romey R, Fink C, Yong L, Roeder T. Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging*. 2013 Apr 29;5(4):315–27.
57. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Nov 9;101(45):15998–6003.
58. Wagner AE, Piegholdt S, Rabe D, Baenas N, Schloesser A, Eggersdorfer M, Stocker A, Rimbach G. Epigallocatechin gallate affects glucose metabolism and increases fitness and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30568–78.
59. Piegholdt S, Rimbach G, Wagner AE. The phytoestrogen prunetin affects body composition and improves fitness and lifespan in male *Drosophila melanogaster*. *FASEB j*. 2016 Feb;30(2):948–58.
60. Hwangbo DS, Gersham B, Tu MP, Palmer M, Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*. 2004 Jun 3;429(6991):562–6.
61. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Long-Lived *Drosophila* with Overexpressed dFOXO in Adult Fat Body. *Science*. 2004 Jul 16;305(5682):361–361.
62. Giannakou ME, Goss M, Jacobson J, Vinti G, Leivers SJ, Partridge L. Dynamics of the action of *dFOXO* on adult mortality in *Drosophila*. *Aging Cell*. 2007 Aug;6(4):429–38.
63. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended Life-Span and Stress Resistance in the *Drosophila* Mutant *methuselah*. *Science*. 1998 Oct 30;282(5390):943–6.

64. Ja WW, West AP, Delker SL, Bjorkman PJ, Benzer S, Roberts RW. Extension of *Drosophila melanogaster* life span with a GPCR peptide inhibitor. *Nat Chem Biol*. 2007 Jul;3(7):415–9.
65. Gimenez LED, Ghildyal P, Fischer KE, Hu H, Ja WW, Eaton BA, Wu Y, Austad SN, Ranjan R. Modulation of methuselah expression targeted to *Drosophila* insulin-producing cells extends life and enhances oxidative stress resistance. *Aging Cell*. 2013 Feb;12(1):121–9.
66. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar;168(6):960–76.
67. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast. *Science*. 1991 Aug 23;253(5022):905–9.
68. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology*. 2004 May;14(10):885–90.
69. Kaeberlein M, Powers RW, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients. *Science*. 2005 Nov 18;310(5751):1193–6.
70. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F. Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*. 2003;426(6967):620.
71. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA. Rapamycin-Induced Insulin Resistance Is Mediated by mTORC2 Loss and Uncoupled from Longevity. *Science*. 2012 Mar 30;335(6076):1638–43.
72. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*. 2010 Jan;11(1):35–46.
73. Emran S, Yang M, He X, Zandveld J, Piper MDW. Target of rapamycin signalling mediates the lifespan-extending effects of dietary restriction by essential amino acid alteration. *Aging*. 2014 May 19;6(5):390–8.

74. Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JWO, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, Warren A, Huang X, Pichaud N, Melvin RG, Gokarn R, Khalil M, Turner N, Cooney GJ, Sinclair DA, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ. The Ratio of Macronutrients, Not Caloric Intake, Dictates Cardiometabolic Health, Aging, and Longevity in Ad Libitum-Fed Mice. *Cell Metabolism*. 2014 Mar;19(3):418–30.
75. Swindell WR. Meta-Analysis of 29 Experiments Evaluating the Effects of Rapamycin on Life Span in the Laboratory Mouse. *GERONA*. 2016 Aug 12;glw153.
76. Taylor RC, Dillin A. Aging as an Event of Proteostasis Collapse. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011 May 1;3(5):a004440–a004440.
77. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun;153(6):1194–217.
78. Selman C, Tullet JMA, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, Claret M, Al-Qassab H, Carmignac D, Ramadani F, Woods A, Robinson ICA, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Partridge L, Gems D, Withers DJ. Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Signaling Regulates Mammalian Life Span. *Science*. 2009 Oct 2;326(5949):140–4.
79. Johnson EC, Kazgan N, Bretz CA, Forsberg LJ, Hector CE, Worthen RJ, Onyenwoke R, Brenman JE. Altered Metabolism and Persistent Starvation Behaviors Caused by Reduced AMPK Function in *Drosophila*. Hassan BA, editor. *PLoS ONE*. 2010 Sep 20;5(9):e12799.
80. Stenesen D, Suh JM, Seo J, Yu K, Lee KS, Kim JS, Min KJ, Graff JM. Adenosine Nucleotide Biosynthesis and AMPK Regulate Adult Life Span and Mediate the Longevity Benefit of Caloric Restriction in Flies. *Cell Metabolism*. 2013 Jan;17(1):101–12.
81. Ulgherait M, Rana A, Rera M, Graniel J, Walker DW. AMPK Modulates Tissue and Organismal Aging in a Non-Cell-Autonomous Manner. *Cell Reports*. 2014 Sep;8(6):1767–80.
82. Burkewitz K, Morante I, Weir HJM, Yeo R, Zhang Y, Huynh FK, Ilkayeva OR, Hirschey MD, Grant AR, Mair WB. Neuronal CRTC-1 Governs

Systemic Mitochondrial Metabolism and Lifespan via a Catecholamine Signal. *Cell*. 2015 Feb;160(5):842–55.

83. Howell JJ, Hellberg K, Turner M, Talbott G, Kolar MJ, Ross DS, Hoxhaj G, Saghatelian A, Shaw RJ, Manning BD. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metabolism*. 2017 Feb;25(2):463–71.

84. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):132–41.

85. Heintz C, Doktor TK, Lanjuin A, Escoubas CC, Zhang Y, Weir HJ, Dutta S, Silva-García CG, Bruun GH, Morante I, Hoxhaj G, Manning BD, Andresen BS, Mair WB. Splicing factor 1 modulates dietary restriction and TORC1 pathway longevity in *C. elegans*. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):102–6.

86. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metabolism*. 2016 Jun;23(6):1060–5.

87. Cabreiro F, Au C, Leung KY, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T, Weinkove D, Schuster E, Greene NDE, Gems D. Metformin Retards Aging in *C. elegans* by Altering Microbial Folate and Methionine Metabolism. *Cell*. 2013 Mar;153(1):228–39.

88. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, De Cabo R. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 2013 Jul 30;4(1):2192.

89. Slack C, Foley A, Partridge L. Activation of AMPK by the Putative Dietary Restriction Mimetic Metformin Is Insufficient to Extend Lifespan in *Drosophila*. Roman G, editor. *PLoS ONE*. 2012 Oct 16;7(10):e47699.

90. 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 U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9926–30.

91. Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, Osanai H, Nishikawa K, Katoh Y, Takagi Y, Yamamoto M. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes to Cells*. 2002;7(8):807–20.

92. An JH, Blackwell TK. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev*. 2003 Aug 1;17(15):1882–93.

93. Mohler J, Vani K, Leung S, Epstein A. Segmentally restricted, cephalic expression of a leucine zipper gene during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev*. 1991 Mar;34(1):3–9.

94. Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol*. 2005 Jan;25(1):162–71.

95. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013 Jan 18;1(1):45–9.

96. Cuadrado A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ $\beta$ -TrCP. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015 Nov 1;88:147–57.

97. Yu C, Xiao JH. The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging. Rupasinghe HPV, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 Jan;2021(1):6635460.

98. Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biology*. 2021 May 1;41:101950.

99. 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 Dec 1;129(1):77–97.

100. Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004 Nov 2;555(1):149–71.

101. Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC, Ross D. The Reduction of  $\alpha$ -Tocopherolquinone by Human NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase: The Role of  $\alpha$ -Tocopherolhydroquinone as a Cellular Antioxidant. *Mol Pharmacol*. 1997 Aug 1;52(2):300–5.

102. Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Research*. 2015 Nov 30;75(23):5001–7.

103. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Jan 30;98(3):1188–93.

104. Asher G, Lotem J, Kama R, Sachs L, Shaul Y. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Mar 5;99(5):3099–104.

105. Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, McMahon M, Sun C, Moffat GJ, Wolf CR, Yamamoto M. 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 Feb 1;28(2):33–41.

106. Wen H, Yang H ji, An YJ, Kim JM, Lee DH, Jin X, Park S woo, Min KJ, Park S. Enhanced Phase II Detoxification Contributes to Beneficial Effects of Dietary Restriction as Revealed by Multi-platform Metabolomics Studies. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Mar;12(3):575–86.

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

108. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013 May 1;1830(5):3143–53.
109. Shenvi SV, Smith E, Hagen TM. Identification of age-specific Nrf2 binding to a novel antioxidant response element locus in the Gclc promoter: a compensatory means for the loss of glutathione synthetic capacity in the aging rat liver? *Aging Cell*. 2012;11(2):297–304.
110. Solis WA, Dalton TP, Dieter MZ, Freshwater S, Harrer JM, He L, Shertzer HG, Nebert DW. Glutamate–cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*. 2002 May 1;63(9):1739–54.
111. S H, K T, A M, M Y, T S. Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 2017 Jan 6 [cited 2022 Dec 13];38(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29240881/>
112. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell*. 2012 Jul 10;22(1):66–79.
113. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 2014 Dec 5;224:164–75.
114. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial Role of Nrf2 in Regulating NADPH Generation and Consumption. *Toxicological Sciences*. 2011 Oct 1;123(2):590–600.
115. Fu J, Xiong Z, Huang C, Li J, Yang W, Han Y, Paiboonrungruan C, Major MB, Chen KN, Kang X, Chen X. Hyperactivity of the transcription factor Nrf2 causes metabolic reprogramming in mouse esophagus. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Jan 1;294(1):327–40.
116. Uruno A, Yagishita Y, Katsuoka F, Kitajima Y, Nunomiya A, Nagatomi R, Pi J, Biswal SS, Yamamoto M. Nrf2-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Glycogen Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*. 2016 May 16;36(11):1655–72.

117. He F, Antonucci L, Yamachika S, Zhang Z, Taniguchi K, Umemura A, Hatzivassiliou G, Roose-Girma M, Reina-Campos M, Duran A, Diaz-Meco MT, Moscat J, Sun B, Karin M. NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. *Journal of Hepatology*. 2020 Jun 1;72(6):1182–95.
118. Morsli S, Bellantuono I. The use of geroprotectors to prevent multimorbidity: Opportunities and challenges. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021 Jan;193:111391.
119. Trendelenburg AU, Scheuren AC, Potter P, Müller R, Bellantuono I. Geroprotectors: A role in the treatment of frailty. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2019 Jun;180:11–20.
120. Rayson A, Boudiffa M, Naveed M, Griffin J, Dall’Ara E, Bellantuono I. Geroprotectors and Skeletal Health: Beyond the Headlines. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 9;10:682045.
121. Wang R, Yu Z, Sunchu B, Shoaf J, Dang I, Zhao S, Caples K, Bradley L, Beaver LM, Ho E, Löhr CV, Perez VI. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell*. 2017 Jun;16(3):564–74.
122. Piskovatska V, Stefanyshyn N, Storey KB, Vaiserman AM, Lushchak O. Metformin as a geroprotector: experimental and clinical evidence. *Biogerontology*. 2019 Feb;20(1):33–48.
123. Joma N, Bielawski P, Saini A, Kakkar A, Maysinger D. Nanocarriers for natural polyphenol senotherapeutics. *Aging Cell*. 2024 May;23(5):e14178.
124. Calado CMSDS, Manhães-de-Castro R, Da Conceição Pereira S, Da Silva Souza V, Barbosa LNF, Dos Santos Junior OH, Lagranha CJ, Juárez PAR, Torner L, Guzmán-Quevedo O, Toscano AE. Resveratrol Reduces Neuroinflammation and Hippocampal Microglia Activation and Protects Against Impairment of Memory and Anxiety-Like Behavior in Experimental Cerebral Palsy. *Mol Neurobiol*. 2024 Jun;61(6):3619–40.

125. Liu S, Zheng Z, Ji S, Liu T, Hou Y, Li S, Li G. Resveratrol reduces senescence-associated secretory phenotype by SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway in gut of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2018 Sep;80:473–9.
126. Iside C, Scafuro M, Nebbioso A, Altucci L. SIRT1 Activation by Natural Phytochemicals: An Overview. *Front Pharmacol*. 2020 Aug 7;11:1225.
127. Zhou DD, Luo M, Huang SY, Saimaiti A, Shang A, Gan RY, Li HB. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. Teodoro AJ, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 Jan;2021(1):9932218.
128. Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*. 2021 Jan 5;26(1):229.
129. Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Experimental Gerontology*. 2010 Oct;45(10):763–71.
130. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LeBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorronsoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. 2015 Aug;14(4):644–58.
131. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, Oberg AL, Birch J, Salmonowicz H, Zhu Y, Mazula DL, Brooks RW, Fuhrmann-Stroissnigg H, Pirtskhalava T, Prakash YS, Tchkonina T, Robbins PD, Aubry MC, Passos JF, Kirkland JL, Tschumperlin DJ, Kita H, LeBrasseur NK. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun*. 2017 Feb 23;8(1):14532.
132. Sandireddy R, Yerra VG, Komirishetti P, Areti A, Kumar A. Fisetin Imparts Neuroprotection in Experimental Diabetic Neuropathy by Modulating Nrf2 and NF- $\kappa$ B Pathways. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Aug;36(6):883–92.

133. DiNicolantonio JJ, Bhutani J, O’Keefe JH. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Open Heart*. 2015 Oct;2(1):e000327.

134. Hanefeld M, Schaper F. Acarbose: oral antidiabetes drug with additional cardiovascular benefits. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2008 Feb;6(2):153–63.

135. Harrison DE, Strong R, Alavez S, Astle CM, DiGiovanni J, Fernandez E, Flurkey K, Garratt M, Gelfond JAL, Javors MA, Levi M, Lithgow GJ, Macchiarini F, Nelson JF, Sukoff Rizzo SJ, Slaga TJ, Stearns T, Wilkinson JE, Miller RA. Acarbose improves health and lifespan in aging HET3 mice. *Aging Cell*. 2019 Apr;18(2):e12898.

136. Sandalova E, Goh J, Lim ZX, Lim ZM, Barardo D, Dorajoo R, Kennedy BK, Maier AB. Alpha-ketoglutarate supplementation and Biological age in middle-aged adults (ABLE)—intervention study protocol. *GeroScience*. 2023 May 23;45(5):2897–907.

137. Legendre F, MacLean A, Appanna VP, Appanna VD. Biochemical pathways to  $\alpha$ -ketoglutarate, a multi-faceted metabolite. *World J Microbiol Biotechnol*. 2020 Jul 20;36(8):123.

138. Rex Sheu K, Blass JP. The  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999 Nov;893(1):61–78.

139. Zdzisińska B, Żurek A, Kandefer-Szerszeń M. Alpha-Ketoglutarate as a Molecule with Pleiotropic Activity: Well-Known and Novel Possibilities of Therapeutic Use. *Arch Immunol Ther Exp*. 2017 Feb;65(1):21–36.

140. Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Spanaki C. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology*. 2017 Feb 8;6(1):11.

141. Pérez-Arellano I, Carmona-Álvarez F, Martínez AI, Rodríguez-Díaz J, Cervera J. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Science*. 2010 Mar;19(3):372–82.

142. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*. 1998 Nov 15;336(1):1–17.
143. Guo L, Chen S, Ou L, Li S, Ye ZN, Liu HF. Disrupted Alpha-Ketoglutarate Homeostasis: Understanding Kidney Diseases from the View of Metabolism and Beyond. *DMSO*. 2022 Jun;Volume 15:1961–74.
144. Kostiuchenko O, Lushnikova I, Kowalczyk M, Skibo G. mTOR/ $\alpha$ -ketoglutarate-mediated signaling pathways in the context of brain neurodegeneration and neuroprotection. *BBA Advances*. 2022;2:100066.
145. Tran KA, Dillingham CM, Sridharan R. The role of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent proteins in pluripotency acquisition and maintenance. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Apr;294(14):5408–19.
146. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids*. 2016 Sep;48(9):2067–80.
147. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016 Jan;24(1):1–8.
148. Meng X, Liu H, Peng L, He W, Li S. Potential clinical applications of alpha-ketoglutaric acid in diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2022 Mar 2;25(5):151.
149. Su Y, Wang T, Wu N, Li D, Fan X, Xu Z, Mishra SK, Yang M. Alpha-ketoglutarate extends *Drosophila* lifespan by inhibiting mTOR and activating AMPK. *Aging (Albany NY)*. 2019 Jun 26;11(12):4183–97.
150. Wu F, Xie X, Li G, Bao D, Li H, Wu G, Lai Y, Xing Y, Ouyang P, Chen G, Wang Z, Lai C. AKG induces cell apoptosis by inducing reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and by suppressing PI3K / AKT / mTOR - mediated autophagy in renal cell carcinoma. *Environmental Toxicology*. 2023 Jan;38(1):17–27.
151. Wang L, Yi D, Hou Y, Ding B, Li K, Li B, Zhu H, Liu Y, Wu G. Dietary Supplementation with  $\alpha$ -Ketoglutarate Activates mTOR Signaling and Enhances Energy Status in Skeletal Muscle of Lipopolysaccharide-Challenged Piglets. *The Journal of Nutrition*. 2016 Aug;146(8):1514–20.

152. Naeini SH, Mavaddatiyan L, Kalkhoran ZR, Taherkhani S, Talkhabi M. Alpha-ketoglutarate as a potent regulator for lifespan and healthspan: Evidences and perspectives. *Experimental Gerontology*. 2023 May;175:112154.
153. Knowles HJ, Mole DR, Ratcliffe PJ, Harris AL. Normoxic Stabilization of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  by Modulation of the Labile Iron Pool in Differentiating U937 Macrophages: Effect of Natural Resistance–Associated Macrophage Protein 1. *Cancer Research*. 2006 Mar 1;66(5):2600–7.
154. Hoang M, Joseph JW. The role of  $\alpha$ -ketoglutarate and the hypoxia sensing pathway in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell function. *Islets*. 2020 Sep 2;12(5):108–19.
155. Ryan DG, Yang M, Prag HA, Blanco GR, Nikitopoulou E, Segarra-Mondejar M, Powell CA, Young T, Burger N, Miljkovic JL, Minczuk M, Murphy MP, Von Kriegsheim A, Frezza C. Disruption of the TCA cycle reveals an ATF4-dependent integration of redox and amino acid metabolism. *eLife*. 2021 Dec 23;10:e72593.
156. Yuan Y, Zhu C, Wang Y, Sun J, Feng J, Ma Z, Li P, Peng W, Yin C, Xu G, Xu P, Jiang Y, Jiang Q, Shu G.  $\alpha$ -Ketoglutaric acid ameliorates hyperglycemia in diabetes by inhibiting hepatic gluconeogenesis via serpin1e signaling. *Sci Adv*. 2022 May 6;8(18):eabn2879.
157. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J Neurosci*. 2004 Sep 8;24(36):7779–88.
158. Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med [Internet]*. 2019 May 8 [cited 2024 Dec 1]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2019.4188>
159. Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase. *J Neurosci*. 2004 Sep 8;24(36):7771–8.



160. Liu S, He L, Yao K. The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. *Biomed Res Int*. 2018 Mar 21;2018:3408467.
161. Whillier S, Garcia B, Chapman BE, Kuchel PW, Raftos JE. Glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. *The FEBS Journal*. 2011 Sep;278(17):3152–63.
162. Cheng D, Zhang M, Zheng Y, Wang M, Gao Y, Wang X, Liu X, Lv W, Zeng X, Belosludtsev KN, Su J, Zhao L, Liu J.  $\alpha$ -Ketoglutarate prevents hyperlipidemia-induced fatty liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress by activating the AMPK-pgc-1 $\alpha$ /Nrf2 pathway. *Redox Biology*. 2024 Aug;74:103230.
163. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85(1):685–713.
164. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Jun;19(6):349–64.
165. Mariño G, Pietrocola F, Kong Y, Eisenberg T, Hill JA, Madeo F, Kroemer G. Dimethyl  $\alpha$ -ketoglutarate inhibits maladaptive autophagy in pressure overload-induced cardiomyopathy. *Autophagy*. 2014 May 20;10(5):930–2.
166. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and Aging. *Cell*. 2011 Sep;146(5):682–95.
167. Bagherniya M, Butler AE, Barreto GE, Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Research Reviews*. 2018 Nov;47:183–97.
168. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2015 Jan 2;125(1):25–32.
169. Madeo F, Eisenberg T, Büttner S, Ruckenstuhl C, Kroemer G. Spermidine: A novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy*. 2010 Jan;6(1):160–2.
170. Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, Schroeder S, Pendl T, Harger A, Niso-Santano M, Zamzami N, Scoazec M, Durand S, Enot DP, Fernández ÁF, Martins I, Kepp O, Senovilla L, Bauvy C, Morselli E, Vacchelli E, Bennetzen M, Magnes C, Sinner F, Pieber T, López-Otín C, Maiuri MC,

Codogno P, Andersen JS, Hill JA, Madeo F, Kroemer G. Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Molecular Cell*. 2014 Mar;53(5):710–25.

171. Baracco EE, Castoldi F, Durand S, Enot DP, Tadic J, Kainz K, Madeo F, Chery A, Izzo V, Maiuri MC, Pietrocola F, Kroemer G.  $\alpha$ -Ketoglutarate inhibits autophagy. *Aging*. 2019 Jun 7;11(11):3418–31.

172. Durán RV, MacKenzie ED, Boulahbel H, Frezza C, Heiserich L, Tardito S, Bussolati O, Rocha S, Hall MN, Gottlieb E. HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids. *Oncogene*. 2013 Sep;32(38):4549–56.

173. Hou P, Kuo CY, Cheng CT, Liou JP, Ann DK, Chen Q. Intermediary Metabolite Precursor Dimethyl-2-Ketoglutarate Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  by Inhibiting Prolyl-4-Hydroxylase PHD2. Singh B, editor. *PLoS ONE*. 2014 Nov 24;9(11):e113865.

174. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, De Angelis MH, Schürmann A, Bakhti M, Klingenspor M, Heiman M, Cherrington AD, Ristow M, Lickert H, Wolf E, Havel PJ, Müller TD, Tschöp MH. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Mar;14(3):140–62.

175. Small L, Brandon AE, Turner N, Cooney GJ. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2018 Mar 1;314(3):E251–65.

176. McCrickerd K, Forde CG. Sensory influences on food intake control: moving beyond palatability. *Obesity Reviews*. 2016 Jan;17(1):18–29.

177. Vadiveloo M, Scott M, Quatromoni P, Jacques P, Parekh N. Trends in dietary fat and high-fat food intakes from 1991 to 2008 in the Framingham Heart Study participants. *Br J Nutr*. 2014 Feb 28;111(4):724–34.

178. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ. Cognitive impairment following high fat diet consumption is

associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology*. 2010 Feb 26;219(1–2):25–32.

179. La Fleur SE, Luijendijk MCM, Van Der Zwaal EM, Brans MAD, Adan RAH. The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. *Int J Obes*. 2014 May;38(5):643–9.

180. Leigh SJ, Lee F, Morris MJ. Hyperpalatability and the Generation of Obesity: Roles of Environment, Stress Exposure and Individual Difference. *Curr Obes Rep*. 2018 Mar;7(1):6–18.

181. Lalanza JF, Snoeren EMS. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2021 Mar;122:92–119.

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

183. Mucellini AB, Goularte JF, De Araujo Da Cunha AC, Caceres RC, Noschang C, Da Silva Benetti C, Silveira PP, Sanvitto GL. 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 Apr 28;111(8):1499–506.

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

185. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1109–17.

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

187. Hall KD, Ayuketah A, Brychta R, Cai H, Cassimatis T, Chen KY, Chung ST, Costa E, Courville A, Darcey V, Fletcher LA, Forde CG, Gharib AM, Guo J, Howard R, Joseph PV, McGehee S, Ouwerkerk R, Rasinger K, Rozga I, Stagliano M, Walter M, Walter PJ, Yang S, Zhou M. Ultra-Processed Diets Cause Excess

Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism*. 2019 Jul;30(1):67-77.e3.

188. Ferreira A, Castro JP, Andrade JP, Dulce Madeira M, Cardoso A. Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2018 Nov;155:197–207.

189. Contreras A, Del Rio D, Martínez A, Gil C, Morales L, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N. Inhibition of hippocampal long-term potentiation by high-fat diets: is it related to an effect of palmitic acid involving glycogen synthase kinase-3? *NeuroReport*. 2017 Apr 12;28(6):354–9.

190. McLean FH, Grant C, Morris AC, Horgan GW, Polanski AJ, Allan K, Campbell FM, Langston RF, Williams LM. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Sci Rep*. 2018 Aug 10;8(1):11976.

191. Woodie L, Blythe S. The differential effects of high-fat and high-fructose diets on physiology and behavior in male rats. *Nutritional Neuroscience*. 2018 May 28;21(5):328–36.

192. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008 Nov;18(11):1085–8.

193. Greenwood CE, Winocur G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiology of Aging*. 2005 Dec;26(1):42–5.

194. Bousquet M, St-Amour I, Vandal M, Julien P, Cicchetti F, Calon F. High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. *Neurobiology of Disease*. 2012 Jan;45(1):529–38.

195. Sharma S, Taliyan R. High fat diet feeding induced insulin resistance exacerbates 6-OHDA mediated neurotoxicity and behavioral abnormalities in rats. *Behavioural Brain Research*. 2018 Oct;351:17–23.

196. Rotermund C, Truckenmüller FM, Schell H, Kahle PJ. Diet-induced obesity accelerates the onset of terminal phenotypes in  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*. 2014 Dec;131(6):848–58.

197. Carter M, Shieh J. Chapter 2 - Animal Behavior. In: Carter M, Shieh J, editors. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cited 2024 Oct 23]. p. 39–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005118000022>
198. Yoshizaki K, Asai M, Hara T. High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test. *Nutrients*. 2020 Jul 9;12(7):2036.
199. Evans AK, Saw NL, Woods CE, Vidano LM, Blumenfeld SE, Lam RK, Chu EK, Reading C, Shamloo M. Impact of high-fat diet on cognitive behavior and central and systemic inflammation with aging and sex differences in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2024 May;118:334–54.
200. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and Systemic Oxidative Stress: Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. *ATVB*. 2003 Mar;23(3):434–9.
201. Ramanathan R, Ali AH, Ibdah JA. Mitochondrial Dysfunction Plays Central Role in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *IJMS*. 2022 Jun 30;23(13):7280.
202. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011 May;12(5):3117–32.
203. Monteiro R, Azevedo I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators of Inflammation*. 2010;2010:1–10.
204. Martínez JA. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem*. 2006 Dec;62(4):303–6.
205. Maiese K, Daniela Morhan S, Zhong Chong Z. Oxidative Stress Biology and Cell Injury During Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *CNR*. 2007 Feb 1;4(1):63–71.
206. Bayliak MM, Vatashchuk MV, Gospodaryov DV, Hurza VV, Demianchuk OI, Ivanochko MV, Burdyliuk NI, Storey KB, Lushchak O, Lushchak VI. 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 Dec;1866(12):130226.

207. Tian Q, Zhao J, Yang Q, Wang B, Deavila JM, Zhu MJ, Du M. Dietary alpha-ketoglutarate promotes beige adipogenesis and prevents obesity in middle-aged mice. *Aging Cell*. 2020;19(1):e13059.

208. 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 Mar;9(3):460–4.

209. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *JoVE*. 2015 Feb 6;(96):52434.

210. Bayliak MM, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochnyńska OM, Manyukh OV, Pierzynowski SG, Lushchak VI. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner. *Journal of Thermal Biology*. 2016 Aug 1;60:1–11.

211. Lushchak OV, Gospodaryov DV, Rovenko BM, Glovyak AD, Yurkevych IS, Klyuba VP, Shcherbij MV, Lushchak VI. Balance Between Macronutrients Affects Life Span and Functional Senescence in Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2012 Feb 1;67A(2):118–25.

212. Brandt RB, Siegel SA, Waters MG, Bloch MH. Spectrophotometric assay for d-(–)-lactate in plasma. *Analytical Biochemistry*. 1980 Feb 1;102(1):39–46.

213. 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 Apr;87(2):108–14.

214. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006 Dec;1(6):3159–65.

215. Bayliak MM, Sorochnyńska OM, Kuzniak OV, Gospodaryov DV, Demianchuk OI, Vasylyk YV, Mosiichuk NM, Storey KB, Garaschuk O, Lushchak

VI. Middle age as a turning point in mouse cerebral cortex energy and redox metabolism: Modulation by every-other-day fasting. *Experimental Gerontology*. 2021 Mar;145:111182.

216. Doherty D. [119] l-glutamate dehydrogenases (yeast). In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1970 [cited 2024 Oct 23]. p. 850–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687971172941>

217. Harper CJ, Hayward D, Kidd M, Wiid I, Van Helden P. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol*. 2010;10(1):138.

218. 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 May;72(1–2):248–54.

219. Shen A, Kim HJ, Oh GS, Lee SB, Lee S, Pandit A, Khadka D, Sharma S, Kim SY, Choe SK, Yang SH, Cho EY, Shim H, Park R, Kwak TH, So HS. Pharmacological stimulation of NQO1 decreases NADPH levels and ameliorates acute pancreatitis in mice. *Cell Death Dis*. 2018 Dec 18;10(1):5.

220. Lushchak V, Semchyshyn H, Mandryk S, Lushchak O. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005 Sep;441(1):35–40.

221. Davis BJ. DISC ELECTROPHORESIS - II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS\*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 Dec 16;121(2):404–27.

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

223. Das L, Vinayak M. Long Term Effect of Curcumin in Restoration of Tumour Suppressor p53 and Phase-II Antioxidant Enzymes via Activation of Nrf2 Signalling and Modulation of Inflammation in Prevention of Cancer. Sethi G, editor. *PLoS ONE*. 2015 Apr 10;10(4):e0124000.

224. Lushchak VI. [Isolation and characterization of lactate dehydrogenase from white fin muscles of the skate *Raja clavata*]. *Ukr Biokhim Zh* (1978). 1990;62(6):38–42.
225. Jha P, Wang X, Auwerx J. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE). *Current Protocols in Mouse Biology*. 2016 Mar;6(1):1–14.
226. Luo X, Wu J, Jin Z, Yan L. Non-Gradient Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *CP Protein Science* [Internet]. 2017 Feb [cited 2023 Apr 25];87(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpps.21>
227. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671–5.
228. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
229. Gospodaryov DV, Strilbytska OM, Semaniuk UV, Perkhulyn NV, Rovenko BM, Yurkevych IS, Barata AG, Dick TP, Lushchak OV, Jacobs HT. Alternative NADH dehydrogenase extends lifespan and increases resistance to xenobiotics in *Drosophila*. *Biogerontology*. 2020;21(2):155–71.
230. Gospodaryov DV, Lushchak OV, Rovenko BM, Perkhulyn NV, Gerards M, Tuomela T, Jacobs HT. *Ciona intestinalis* NADH dehydrogenase NDX confers stress-resistance and extended lifespan on *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014 Nov;1837(11):1861–9.
231. Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Jafari M, Lushchak VI, Lushchak OV. Lifespan extension and delay of age-related functional decline caused by *Rhodiola rosea* depends on dietary macronutrient balance. *Longev Healthspan*. 2013 Dec;2(1):5.
232. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*. 2017 Jun;66(6):789–800.



233. Szyller J, Bil-Lula I. Heat Shock Proteins in Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury and Benefits from Physical Exercises: A Review to the Current Knowledge. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6678457.

234. Tower J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Experimental Gerontology*. 2011 May;46(5):355–62.

235. Malacrida S, De Lazzari F, Mrakic-Sposta S, Vezzoli A, Zordan MA, Bisaglia M, Menti GM, Meda N, Frighetto G, Bosco G, Dal Cappello T, Strapazzon G, Reggiani C, Gussoni M, Megighian A. Lifespan and ROS levels in different *Drosophila melanogaster* strains after 24 h hypoxia exposure. *Biol Open*. 2022 Jun 29;11(6):bio059386.

236. Ormerod KG, LePine OK, Abbineni PS, Bridgeman JM, Coorsen JR, Mercier AJ, Tattersall GJ. *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. *Fly (Austin)*. 2017 Mar 9;11(3):153–70.

237. Qiu S, Xiao C, Meldrum Robertson R. Different age-dependent performance in *Drosophila* wild-type Canton-S and the white mutant w<sup>1118</sup> flies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2017 Apr 1;206:17–23.

238. Klepsatel P, Procházka E, Gáliková M. Crowding of *Drosophila* larvae affects lifespan and other life-history traits via reduced availability of dietary yeast. *Experimental Gerontology*. 2018 Sep;110:298–308.

239. Tatar M, Post S, Yu K. Nutrient control of *Drosophila* longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Oct;25(10):509–17.

240. Lambert BD, Filip R, Stoll B, Junghans P, Derno M, Hennig U, Souffrant WB, Pierzynowski S, Burrin DG. First-Pass Metabolism Limits the Intestinal Absorption of Enteral  $\alpha$ -Ketoglutarate in Young Pigs. *The Journal of Nutrition*. 2006 Nov 1;136(11):2779–84.

241. Yao K, Yin Y, Li X, Xi P, Wang J, Lei J, Hou Y, Wu G. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells. *Amino Acids*. 2012 Jun;42(6):2491–500.

242. Mele S, Martelli F, Lin J, Kanca O, Christodoulou J, Bellen HJ, Piper MDW, Johnson TK. *Drosophila* as a diet discovery tool for treating amino acid disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 2023 Feb;34(2):85–105.
243. Bayliak MM, Hrynkiv OV, Knyhynytska RV, Lushchak VI. Alpha-ketoglutarate enhances freeze–thaw tolerance and prevents carbohydrate-induced cell death of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 2018 Jan;200(1):33–46.
244. Tiefenböck SK, Baltzer C, Egli NA, Frei C. The *Drosophila* PGC-1 homologue Spargel coordinates mitochondrial activity to insulin signalling. *EMBO J.* 2010 Jan 6;29(1):171–83.
245. Garcia-Roves PM, Osler ME, Holmström MH, Zierath JR. Gain-of-function R225Q Mutation in AMP-activated Protein Kinase  $\gamma$ 3 Subunit Increases Mitochondrial Biogenesis in Glycolytic Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Dec;283(51):35724–34.
246. Semaniuk UV, Gospodaryov DV, Strilbytska OM, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Burdyliuk NI, Storey KB, Bayliak MM, Lushchak O. Chili-supplemented food decreases glutathione- *S* -transferase activity in *Drosophila melanogaster* females without a change in other parameters of antioxidant system. *Redox Report.* 2022 Dec 31;27(1):221–9.
247. Semaniuk UV, Gospodaryov DV, Strilbytska OM, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Burdyliuk NI, Storey KB, Bayliak MM, Lushchak O. Chili pepper extends lifespan in a concentration-dependent manner and confers cold resistance on *Drosophila melanogaster* cohorts by influencing specific metabolic pathways. *Food Funct.* 2022;13(15):8313–28.
248. Wong KC, Jayapalan JJ, Subramanian P, Ismail MN, Abdul-Rahman PS. Label-free quantitative mass spectrometry analysis of the circadian proteome of *Drosophila melanogaster* lethal giant larvae mutants reveals potential therapeutic effects of melatonin. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2023 Jun;113(2):e22008.
249. Bayliak MM, Shmihel HV, Lylyk MP, Vytvytska OM, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Alpha-ketoglutarate attenuates toxic effects of sodium

nitroprusside and hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 Sep;40(2):650–9.

250. 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 Feb 1;228:18–28.

251. King-Jones K, Horner MA, Lam G, Thummel CS. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila*. *Cell Metabolism*. 2006 Jul 1;4(1):37–48.

252. Afschar S, Toivonen JM, Hoffmann JM, Tain LS, Wieser D, Finlayson AJ, Driege Y, Alic N, Emran S, Stinn J, Froehlich J, Piper MD, Partridge L. Nuclear hormone receptor DHR96 mediates the resistance to xenobiotics but not the increased lifespan of insulin-mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Feb 2;113(5):1321–6.

253. Sieber MH, Thummel CS. The DHR96 Nuclear Receptor Controls Triacylglycerol Homeostasis in *Drosophila*. *Cell Metabolism*. 2009 Dec;10(6):481–90.

254. Spencer CC, Howell CE, Wright AR, Promislow DEL. Testing an ‘aging gene’ in long-lived *Drosophila* strains: increased longevity depends on sex and genetic background. *Aging Cell*. 2003 Apr;2(2):123–30.

255. Luckinbill LS, Arking R, Clare MJ, Cirocco WC, Buck SA. Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 1984 Sep;38(5):996–1003.

256. Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL. Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Science*. 2000 Dec 15;290(5499):2137–40.

257. Ghit A, Assal D, Al-Shami AS, Hussein DEE. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021 Dec;19(1):123.

258. Han J, Nepal P, Odelade A, Freely FD, Belton DM, Graves JL, Maldonado-Devincci AM. High-Fat Diet-Induced Weight Gain, Behavioral Deficits, and Dopamine Changes in Young C57BL/6J Mice. *Front Nutr*. 2021 Jan 20;7:591161.
259. Abbott KN, Arnott CK, Westbrook RF, Tran DMD. The effect of high fat, high sugar, and combined high fat-high sugar diets on spatial learning and memory in rodents: A meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019 Dec;107:399–421.
260. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 26;16(1):378–400.
261. Fu D, Lu J, Yang S. Oleic/Palmitate Induces Apoptosis in Human Articular Chondrocytes via Upregulation of NOX4 Expression and ROS Production. *Ann Clin Lab Sci*. 2016 Jul;46(4):353–9.
262. Cole SPC, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006 Aug;27(8):438–46.
263. Adachi T, Nakagawa H, Chung I, Hagiya Y, Hoshijima K, Noguchi N, Kuo MT, Ishikawa T. Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *J Exp Ther Oncol*. 2007;6(4):335–48.
264. Panse M, Kluth O, Lorza-Gil E, Kaiser G, Mühlbauer E, Schürmann A, Häring HU, Ullrich S, Gerst F. Palmitate and insulin counteract glucose-induced thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression in insulin secreting cells via distinct mechanisms. Wagner B, editor. *PLoS ONE*. 2018 May 29;13(5):e0198016.
265. Kaadige MR, Looper RE, Kamalanaadhan S, Ayer DE. Glutamine-dependent anapleurosis dictates glucose uptake and cell growth by regulating MondoA transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Sep;106(35):14878–83.

266. Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, Peters EC, Driggers EM, Hsieh-Wilson LC. Phosphofructokinase 1 Glycosylation Regulates Cell Growth and Metabolism. *Science*. 2012 Aug 24;337(6097):975–80.
267. Lockridge A, Hanover JA. A nexus of lipid and O-Glcnac metabolism in physiology and disease. *Front Endocrinol*. 2022 Aug 30;13:943576.
268. Zuliani I, Lanzillotta C, Tramutola A, Barone E, Perluigi M, Rinaldo S, Paone A, Cutruzzolà F, Bellanti F, Spinelli M, Natale F, Fusco S, Grassi C, Di Domenico F. High-Fat Diet Leads to Reduced Protein O-GlcNAcylation and Mitochondrial Defects Promoting the Development of Alzheimer's Disease Signatures. *IJMS*. 2021 Apr 3;22(7):3746.
269. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond)*. 2014 Dec;11(1):10.
270. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J*. 2015 Feb;282(4):647–72.
271. Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics*. 2011 Oct 1;20(19):3852–66.
272. Kageyama S, Saito T, Obata M, Koide R, Ichi, Ichimura Y, Komatsu M. Negative Regulation of the Keap1-Nrf2 Pathway by a p62/Sqstm1 Splicing Variant. *Molecular and Cellular Biology*. 2018 Jan;38(7).
273. Saito T, Kuma A, Sugiura Y, Ichimura Y, Obata M, Kitamura H, Okuda S, Lee HC, Ikeda K, Kanegae Y, Saito I, Auwerx J, Motohashi H, Suematsu M, Soga T, Yokomizo T, Waguri S, Mizushima N, Komatsu M. Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1. *Nat Commun*. 2019 Apr 5;10(1):1567.
274. Okatsu K, Iemura S, Ichiro, Koyano F, Go E, Kimura M, Natsume T, Tanaka K, Matsuda N. Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the

Parkin ubiquitin ligase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 Nov;428(1):197–202.

275. Bouwknecht JA, Paylor R. Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents. *Behavioural Pharmacology*. 2008 Sep;19(5–6):385–402.

276. Nautiyal KM, Tritschler L, Ahmari SE, David DJ, Gardier AM, Hen R. A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. *Neuropsychopharmacol*. 2016 Nov;41(12):2941–50.

277. Thompson T, Grabowski-Boase L, Tarantino LM. Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2015 Jun;133:7–17.

278. Cigarroa I, Lalanza JF, Caimari A, Del Bas JM, Capdevila L, Arola L, Escorihuela RM. Treadmill Intervention Attenuates the Cafeteria Diet-Induced Impairment of Stress-Coping Strategies in Young Adult Female Rats. López Lluch G, editor. *PLoS ONE*. 2016 Apr 21;11(4):e0153687.

279. Demianchuk O, Vatashchuk M, Gospodaryov D, Hurza V, Ivanochko M, Derkachov V, Berezovskyi V, Lushchak O, Storey KB, Bayliak M, Lushchak VI. High-fat high-fructose diet and alpha-ketoglutarate affect mouse behavior that is accompanied by changes in oxidative stress response and energy metabolism in the cerebral cortex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2024 Jan;1868(1):130521.

280. Chen Y, Guan W, Wang ML, Lin XY. PI3K-AKT/mTOR Signaling in Psychiatric Disorders: A Valuable Target to Stimulate or Suppress? *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2024 Feb 1;27(2):pyae010.

281. Kanarik M, Liiver K, Školnaja M, Teino I, Org T, Laugus K, Shimmo R, Karelson M, Saarma M, Harro J. Effect of RNA m<sup>6</sup>A methyltransferase activation by a low molecular weight compound on anxiety- and depression-related behaviours, monoamine neurochemistry and striatal gene expression in the rat [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 30]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.01.08.574593>

282. Giovana Maciel Reis C, Rocha-Gomes A, Escobar Teixeira A, Gomes De Oliveira D, Mainy Oliveira Santiago C, Alves Da Silva A, Regina Riul T, De Jesus Oliveira E. Short-term Cafeteria Diet Is Associated with Fat Mass Accumulation, Systemic and Amygdala Inflammation, and Anxiety-like Behavior in Adult Male Wistar Rats. *Neuroscience*. 2023 Apr;515:37–52.

283. Teixeira D, Ceconello AL, Partata WA, De Fraga LS, Ribeiro MFM, Guedes RP. The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. *Nutritional Neuroscience*. 2019 Apr 3;22(4):284–94.

284. Żebrowska E, Maciejczyk M, Żendzian-Piotrowska M, Zalewska A, Chabowski A. High Protein Diet Induces Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortex and Hypothalamus. *IJMS*. 2019 Mar 28;20(7):1547.

285. Keser H, Girit OB, Abidin SA, Bilgin MD, Alver A, Abidin İ. Sensory-motor performance and neurochemical effects in the cerebral cortex of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice fed a high-cholesterol diet. *Acta Neurobiol Exp*. 2023 Apr 24;83(1):1–9.

286. Hou J, Jeon B, Baek J, Yun Y, Kim D, Chang B, Kim S, Kim S. High fat diet-induced brain damaging effects through autophagy-mediated senescence, inflammation and apoptosis mitigated by ginsenoside F1-enhanced mixture. *Journal of Ginseng Research*. 2022 Jan;46(1):79–90.

287. Bayliak MM, Gospodaryov DV, Lushchak VI. Homeostasis of carbohydrates and reactive oxygen species is critically changed in the brain of middle-aged mice: Molecular mechanisms and functional reasons. *BBA Advances*. 2023;3:100077.

288. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Molecular Cell*. 2010 Jul;39(2):171–83.

289. Wang K, Wang G, Li G, Zhang W, Wang Y, Lin X, Han C, Chen H, Shi L, Reheman A, Li J, Li Z, Yang X. m6A writer WTAP targets NRF2 to accelerate

bladder cancer malignancy via m6A-dependent ferroptosis regulation. *Apoptosis*. 2023 Apr;28(3–4):627–38.

290. Lushchak VI, Duszenko M, Gospodaryov DV, Garaschuk O. Oxidative Stress and Energy Metabolism in the Brain: Midlife as a Turning Point. *Antioxidants*. 2021 Oct 28;10(11):1715.

291. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ*. 2015 Feb;22(2):248–57.

292. Gwak GY, Yoon JH, Kim KM, Lee HS, Chung JW, Gores GJ. Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *Journal of Hepatology*. 2005 Mar;42(3):358–64.

293. Mergenthaler P, Kahl A, Kamitz A, Van Laak V, Stohlmann K, Thomsen S, Klawitter H, Przesdzing I, Neeb L, Freyer D, Priller J, Collins TJ, Megow D, Dirnagl U, Andrews DW, Meisel A. Mitochondrial hexokinase II (HKII) and phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA15) form a molecular switch governing cellular fate depending on the metabolic state. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jan 31;109(5):1518–23.

294. Tennant DA, Frezza C, MacKenzie ED, Nguyen QD, Zheng L, Selak MA, Roberts DL, Dive C, Watson DG, Aboagye EO, Gottlieb E. Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death. *Oncogene*. 2009 Nov 12;28(45):4009–21.

295. Mann G, Mora S, Madu G, Adegoke OAJ. Branched-chain Amino Acids: Catabolism in Skeletal Muscle and Implications for Muscle and Whole-body Metabolism. *Front Physiol*. 2021 Jul 20;12:702826.

296. Ma Q, Long S, Gan Z, Tettamanti G, Li K, Tian L. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Autophagy. *Cells*. 2022 Jan 27;11(3):441.

297. Metur SP, Lei Y, Zhang Z, Klionsky DJ. Regulation of autophagy gene expression and its implications in cancer. *Journal of Cell Science*. 2023 May 15;136(10):jcs260631.



298. Alegre F, Moragrega ÁB, Polo M, Marti-Rodrigo A, Esplugues JV, Blas-Garcia A, Apostolova N. Role of p62/SQSTM1 beyond autophagy: a lesson learned from drug-induced toxicity *in vitro*. *British J Pharmacology*. 2018 Feb;175(3):440–55.
299. Wang S, Ma X, Guo J, Li F, Chen T, Ma W, He C, Wang H, He H. DDIT3 antagonizes innate immune response to promote bovine alphaherpesvirus 1 replication via the DDIT3-SQSTM1-STING pathway. *Virulence*. 2022 Dec 31;13(1):514–29.
300. Li Y, Cheng Y, Zhou Y, Du H, Zhang C, Zhao Z, Chen Y, Zhou Z, Mei J, Wu W, Chen M. High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Experimental Neurology*. 2022 Feb;348:113949.
301. Yi W, Chen F, Yuan M, Wang C, Wang S, Wen J, Zou Q, Pu Y, Cai Z. High-fat diet induces cognitive impairment through repression of SIRT1/AMPK-mediated autophagy. *Experimental Neurology*. 2024 Jan;371:114591.
302. Merenlender-Wagner A, Malishkevich A, Shemer Z, Udawela M, Gibbons A, Scarr E, Dean B, Levine J, Agam G, Gozes I. Autophagy has a key role in the pathophysiology of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2015 Feb;20(1):126–32.
303. Andersen JV, Schousboe A, Verkhratsky A. Astrocyte energy and neurotransmitter metabolism in Alzheimer's disease: Integration of the glutamate/GABA-glutamine cycle. *Progress in Neurobiology*. 2022 Oct;217:102331.

## Додатки

## Додаток А

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ  
ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ****Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:**

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

1. Demianchuk O., Vatashchuk M., Gospodaryov D., Hurza V., Ivanochko M., Derkachov V., Berezovskyi V., Lushchak O., Storey K.B., Bayliak M., & Lushchak V.I. High-fat high-fructose diet and alpha-ketoglutarate affect mouse behavior that is accompanied by changes in oxidative stress response and energy metabolism in the cerebral cortex. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. 2024. № 1868(1). 130521. Q1

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130521>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85180010013&origin=resultslist>

2. Demianchuk O., Lylyk M., Balatskiy V., Gospodaryov D., & Bayliak M. Alpha-ketoglutarate supplementation in long-lived *Drosophila melanogaster*: Impact on lifespan and metabolic responses. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2024. № 116(1). e22116. Q2

DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.22116>

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85192910713&origin=resultslist>

*Фахові видання України (категорія Б)*

3. Demianchuk O.I. & Gospodaryov D.V. Alpha-ketoglutarate induces nuclear receptors rather than nrf2 in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Biotechnologia acta*. 2024. № 17(2). P. 27-28.

DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech17.02.027>

URL: <https://biotechnology.kiev.ua/index.php/en/journal-archive-en/2024-en/2024-no2-en/alpha-ketoglutarate-induces-nuclear-receptors-rather-than-nrf2-in-the-fruit-fly-drosophila-melanogaster-demianchuk-o-i-gospodaryov-d-v>

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Demianchuk O.I., Lylyk M.P., Bayliak M.M. Effect of alpha-ketoglutarate on pro-/antioxidant status in middle-aged *Drosophila melanogaster* // *The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the russian invaders (Kyiv, from 15 th to 17 th of June 2022). – P. 100.

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

2. Дем'янчук О.І., Лилик М.П., Шмігель Г.В., Господарьов Д.В., Байляк М.М. Вплив екзогенного альфа-кетоглутарату на тривалість життя та антиоксидантний захист *Drosophila melanogaster* // *III міжнародна науково-практична Інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (м. Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 161-162.

URL: [https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy\\_iii\\_konferentsii\\_kafedry\\_biotekhnolohii\\_nfau\\_.pdf](https://biotech.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2024/02/tezy_iii_konferentsii_kafedry_biotekhnolohii_nfau_.pdf)

3. Дем'янчук О., Лилик М., Господарьов Д. Вплив екзогенного альфа-кетоглутарату на метаболічні показники у тілі *Drosophila melanogaster* // *VIII Міжнародної конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології»* (м. Івано-Франківськ, 27–29 червня 2023 р.). – С. 27.

URL: <https://kbb.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/28/2023/06/0032-abstract-book-degb-2023.pdf>

4. Дем'янчук О., Ватащук М., Гурза В., Шмігель Г., Байляк М. Вплив дієти з високим вмістом жирів і фруктози та екзогенного альфа-кетоглутарату на про-/антиоксидантний статус в корі головного мозку мишей // *XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених*, присвячена 100-річчю від дня

народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (м. Львів, 18–19 травня 2023 р.) – С. 56.

URL: [https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2023/2/AB\\_2023\\_25\\_2.pdf](https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2023/2/AB_2023_25_2.pdf)

5. Demianchuk O., Dodon D., Gospodaryov D., Bayliak M. Effect of alpha-ketoglutarate and cafeteria diet on antioxidant enzymes and markers of autophagy in the cerebral cortex of mice // *XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 18-20 квітня 2024 р.) – С. 75-76.

URL: <https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biologhii-2024-2.pdf>

6. Дем'янчук О., Ватащук М., Господарьов Д., Лушак В., Байляк М. Вплив альфа-кетоглютарату на поведінку мишей, окисно-відновний баланс та автофагію в корі головного мозку на тлі кафетерійної дієти // *XXII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених*, присвячена 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава ФЕДОРУКА (м. Львів, 19–20 вересня 2024 р.) – С. 139

URL: [https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2024/3/AB\\_2024\\_26\\_3.pdf](https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2024/3/AB_2024_26_3.pdf)



Міністерство освіти і науки України  
**Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника**

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

10.12.2024 № 03.04-29/20

На № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_

Довідка

про впровадження результатів дисертаційного дослідження  
**Дем'янчука Олега Ігоровича** на тему  
**«Вплив альфа-кетоглутарату на дрозоділ та мишей: параметри поведінки, оксидативного стресу та енергетичного обміну»**  
 представлено на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
 за спеціальністю 091 Біологія

Матеріали наукового дослідження Дем'янчука Олега Ігоровича впроваджені та використовуються в освітньому процесі кафедри біохімії та біотехнології факультету природничих наук Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Результати роботи використовуються для підготовки лекцій і практичних занять із загального курсу «Біологічно активні природні речовини» (результати досліджень включені в тему «Альфа-кетоглутарат як харчовий додаток» – 2 год лекційних і 2 год практичних); «Молекулярна нейробіологія» (результати досліджень включені в теми «Енергетичний метаболізм мозку» – 2 год лекційних і 2 год практичних).

З огляду на високий науковий рівень дисертації Дем'янчука О.І. й актуальність наукової проблематики роботи, стверджуємо про доцільність впровадження його результатів у практику закладів вищої освіти України.

Довідку про апробацію та впровадження результатів дослідження Дем'янчука О.І. затверджено на засіданні кафедри біохімії та біотехнології (протокол №7 від 28 листопада 2024 року).

Перший проректор

Завідувачка кафедри  
 біохімії та біотехнології



*(Handwritten signature)*

Валентина ЯКУБІВ

Марія БАЙЛЯК