

**Голові спеціалізованої вченої ради
ДФ 20.051.116
Прикарпатського національного
університету імені Василя Стефаника
доктору біологічних наук,
професору Семчишин Галині Миколаївні
(76018, м. Івано-Франківськ,
вул. Шевченка, 57)**

ВІДГУК

офіційного опонента,
доктора біологічних наук, професора,
члена-кореспондента Національної академії аграрних наук України,
директора Інституту біології тварин НААН України,

Салиги Юрія Тарасовича

на дисертаційну роботу **Дем'янчука Олега Ігоровича**
**«Вплив альфа-кетоглутарату на дрозофіл та мишей: параметри поведінки,
оксидативного стресу та енергетичного обміну»,**
подану на здобуття ступеня доктора філософії в галузі
знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Дослідження впливу екзогенних метаболітів на фізіологічні, поведінкові та біохімічні процеси в організмі набуває все більшого значення у сучасній біохімії. Альфа-кетоглутарат (АКГ) є проміжним метаболітом циклу трикарбонових кислот, що бере участь у регуляції енергетичного метаболізму, антиоксидантного захисту та сигнальних шляхів, пов'язаних зі старінням і стресовими станами. АКГ розглядається як перспективний геропротектор і дієтична добавка, однак його вплив на живі організми, зокрема в контексті поведінкових реакцій,

оксидативного стресу та енергетичного балансу, залишається вивченим недостатньо.

Враховуючи глобальні демографічні зміни та зростання частки населення старшого віку, актуальність досліджень, спрямованих на з'ясування молекулярно-біологічних, біохімічних і фізіологічних механізмів, що лежать в основі тривалості життя та визначають його якість, є незаперечною. АКГ може потенційно модулювати оксидативний стрес, функціонування мітохондрій та сигнальні шляхи, пов'язані з процесами старіння та метаболічних порушень. Відомо, що АКГ збільшує тривалість життя нематод (*Caenorhabditis elegans*) і *Drosophila melanogaster*, проте вплив цієї сполуки на більш складні модельні організми, зокрема мишей (*Mus musculus*), потребує подальших досліджень.

Поєднання експериментів на *Drosophila melanogaster* та мишах у даній роботі дозволяє оцінити як загальні закономірності дії АКГ, так і його специфічні ефекти на рівні енергетичного обміну, антиоксидантного статусу та поведінки. Особливо важливим є вивчення впливу АКГ в умовах зміненого метаболізму, наприклад, за наявності ожиріння чи оксидативного стресу, що має велике значення для розробки терапевтичних стратегій у боротьбі зі старінням та асоційованими з ним патологіями.

Таким чином, тема дисертаційної роботи є актуальною, оскільки вона спрямована на розширення уявлень про біологічні механізми дії АКГ, що може мати як фундаментальне, так і прикладне значення.

Зміст роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій. Дисертаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг роботи 173 сторінки. Вона містить 24 рисунки, 5 таблиць, 2 додатки і список використаних джерел з 303 найменувань. Структура дисертації є логічною, відповідає меті та завданням дослідження, що забезпечує цілісність, системність, послідовність викладу матеріалу та доведеність результатів.

У **вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми, зв'язок дисертаційної роботи з науковим планом науково-дослідних робіт Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, сформульовано мету, завдання, об'єкт та предмет дослідження, описано використані методи, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів дисертації, зазначено особистий внесок здобувача, апробацію результатів дослідження, публікації та структуру дисертації.

У **першому розділі** наведено огляд сучасної літератури, присвяченої використанню *Drosophila melanogaster* і лабораторних мишей як модельних організмів у біомедичних дослідженнях. Детально розглянуто переваги та обмеження цих моделей, їхню роль у вивченні тривалості життя, а також вплив ключових сигнальних шляхів (інсулінового, mTOR, AMPK та Keap1-Nrf2) на процеси старіння. Особливу увагу приділено геропротекторам та ролі альфа-кетоглутарату (АКГ) у регуляції метаболічних процесів.

Другий розділ присвячено опису матеріалів і методів дослідження. Описано умови утримання модельних організмів, експериментальні дизайни та методи оцінки фізіологічних, біохімічних та молекулярних параметрів. Наведено методики визначення рівня триацилгліцеролів, глюкози, глікогену, окисно-відновного статусу, активності антиоксидантних ферментів та експресії генів, залучених у регуляцію метаболізму та автофагії. Також детально описано поведінкові тести, що використовувалися для оцінки когнітивних функцій у мишей.

Третій розділ містить результати експериментальних досліджень щодо впливу екзогенного альфа-кетоглутарату на модельні організми. Продемонстровано, що АКГ не впливає на тривалість життя, стійкість до стресових факторів, активність ферментів, що беруть участь в обміні вуглеводів, та функціонування компонентів дихального ланцюга, але призводить до зниження активності деяких антиоксидантних ферментів у *Drosophila melanogaster*. Досліджено його роль у регуляції метаболізму мишей,

зокрема на тлі висококалорійної їжі, включаючи вплив на когнітивні функції, оксидативний стрес, рівень глюкози та активність ключових ферментів.

Четвертий розділ містить аналіз та узагальнення отриманих результатів. Проведено порівняльний аналіз ефектів АКГ у плодових мушок і мишей, розглянуто можливі механізми його дії через сигнальні шляхи, пов'язані з антиоксидантним захистом та автофагією. Обговорено вплив різних дієтичних стратегій та харчових добавок на тривалість життя та когнітивні функції.

У **п'ятому розділі** узагальнено результати дослідження та сформовано науково обґрунтовані висновки щодо впливу альфа-кетоглутарату на модельні організми. Обґрунтовано перспективи використання АКГ як потенційного геропротектора та засобу для корекції метаболічних порушень.

Висновки роботи логічно випливають із отриманих експериментальних даних та є добре обґрунтованими. Вони узгоджуються з сучасними науковими уявленнями про механізми старіння та метаболічної регуляції.

Список використаних джерел містить посилання на роботи провідних українських та іноземних вчених, а також висвітлює першоджерела використаних методик дослідження.

У **додатках** розміщено список публікацій здобувача за темою дисертації, відомості про апробацію результатів дисертації, а також довідку про впровадження результатів дисертаційної роботи в освітній процес Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Наукова новизна дослідження. У дисертаційній роботі вперше отримано експериментальні дані щодо впливу екзогенного альфа-кетоглутарату на поведінкові реакції, оксидативний стрес та енергетичний обмін у модельних організмів (*Drosophila melanogaster* та мишей) в умовах різних дієтичних режимів. На відміну від попередніх досліджень, які переважно фокусувалися на метаболічній ролі АКГ, у даній роботі комплексно проаналізовано його вплив на молекулярні механізми регуляції антиоксидантного статусу, автофагії та ліпідного метаболізму, а також на тривалість життя та когнітивні функції.

Вперше показано, що екзогенний АКГ не впливає на тривалість життя та функціональне старіння мух *D. melanogaster* за споживання збалансованого раціону, але сприяє збільшенню тривалості життя довгоживучої сублінії на середовищах з низьким вмістом білків та високим вмістом сахарози. Це відкриття розширює уявлення про роль АКГ у метаболічній адаптації до дефіциту білка та його потенційну геропротекторну дію в умовах зміненого живлення.

Також вперше встановлено, що АКГ викликає тривожну поведінку у мишей, незалежно від статі, як на тлі стандартного раціону, так і при споживанні висококалорійної їжі (високожирового, фруктозного та кафетерійного раціонів). Виявлено, що АКГ впливає на про-/антиоксидантний баланс у корі головного мозку мишей, знижуючи активність антиоксидантних ферментів та активуючи автофагію, що може мати значення у контексті регуляції нейродегенеративних процесів. Водночас встановлено, що при висококалорійних дієтах ці ефекти АКГ зменшуються, що вказує на можливу взаємодію між метаболічними стратегіями організму та його відповіддю на екзогенний АКГ.

Дослідження вдосконалює підходи до оцінки ефективності АКГ у корекції метаболічних порушень, спричинених надмірним споживанням висококалорійної їжі. Зокрема, уточнено механізми його антиоксидантної дії, а також його вплив на експресію генів, пов'язаних із метаболізмом ліпідів та автофагією. Отримані результати мають значний потенціал для розробки нових дієтичних стратегій, спрямованих на уповільнення процесів старіння та запобігання метаболічним порушенням.

Достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій. Достовірність отриманих результатів забезпечується застосуванням сучасних методів дослідження, що відповідають меті та завданням роботи. Дослідження базується на достатньому обсязі експериментальних даних, отриманих у ході коректно спланованих експериментів, з використанням адекватних

статистичних методів обробки отриманих даних. Також дослідження було схвалено комісією з біоетики Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Повнота відображення в опублікованих роботах наукових положень, висновків та результатів. Основні положення, висновки та результати дисертаційної роботи отримали належну апробацію та відображені в опублікованих наукових працях. За матеріалами дослідження опубліковано 3 наукові статті, зокрема 1 стаття – у фаховому виданні України категорії «Б», а 2 статті – у міжнародних рецензованих журналах, що індексуються у базах даних Scopus та Web of Science. Крім того, результати дослідження були апробовані на 6 наукових конференціях різного рівня, включаючи міжнародні та всеукраїнські заходи.

Зміст, обсяг і кількість друкованих праць відповідають чинним вимогам Міністерства освіти і науки України щодо публікацій основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертація виконана в рамках наукової тематики кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника та є частиною проєкту «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 безпосередньо проводив частину експериментальних досліджень. Окремі аспекти роботи реалізовано в межах фінансування Міністерства освіти і науки України за проєктами «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).

Відомості про дотримання академічної доброчесності. У тексті дисертації та наукових публікаціях Дем'янчука О.І. відсутні порушення академічної доброчесності, наявні посилання на джерела інформації у разі використання ідей, тверджень та інших відомостей, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право, а також надано достовірну інформацію про результати наукової діяльності, використані методики досліджень і джерел інформації. У дисертаційній роботі не виявлено ознак академічного плагіату.

Оцінка мови і стилю викладення матеріалу дисертації. Дисертація написана українською мовою відповідно до вимог академічного письма. Текст роботи відзначається чіткістю, логічністю та достатнім рівнем наукового стилю. Автор демонструє здатність до аналізу отриманих даних, використовуючи сучасні методологічні підходи та відповідну термінологію.

Структура дисертації є послідовною, що сприяє цілісному сприйняттю матеріалу. Ілюстративний матеріал, представлений у вигляді таблиць та рисунків, доповнює основний зміст роботи та підсилює його наочність. Дисертаційна робота оформлена відповідно до вимог наказу МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами) «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Поряд із зазначеним, до мови і стилю викладення матеріалу дисертації є зауваження, які висвітлені нижче.

Зауваження до змісту та тексту дисертації, запитання.

Оцінюючи дисертаційну роботу загалом позитивно, слід наголосити на окремих зауваженнях щодо її змісту та оформлення, а також поставити низку запитань.

1. Текст дисертаційної роботи має певні недоліки у термінології, стилістиці і граматиці його викладу. Зокрема, дисертант не завжди дотримується прийнятої до офіційного вжитку наукової термінології: використовує термін «ферменти» замість «ензими», «білки» замість

«протеїни», «глутатіон» замість правильного «глутатіон», «кетоглутарат» замість правильного «кетоглутарат» тощо. Зустрічається багато неграмотних виразів, зокрема: «широко використовуваних» замість «тих, які широко використовуються», «найбільш поширених» замість «найпоширеніших» і тому подібне. Певні вирази взагалі звучать дивно: «Миша зробила безпрецедентний внесок у численні наукові відкриття та досягнення в різних галузях» (ст. 30), «Кисневий режим клітини також не залишається без уваги АКГ» (ст. 53) та інші. Незрозуміло чому дисертант, пише: «у вивченні молекулярних, фізіологічних та поведінкових аспектів...», адже поведінкові аспекти входять до фізіологічних і їх окреме відокремлення в роботі є некоректним.

2. У вступі слід було приділити більше уваги формулюванню основних положень дисертаційної роботи, зокрема потребують розширення твердження щодо практичного значення отриманих результатів та можливість їх екстраполяції на людину.
3. Розділ «Огляд літератури» за своїм обсягом не має перевищувати 20% від основного тексту дисертаційної роботи, проте автор не дотримався цієї вимоги. У той же час літературний огляд перенасичений загальновідомою інформацією, особливо стосовно застосування мишей у біологічних дослідженнях. Дисертант подає багато історичної інформації, дуже детально описує переваги застосування мишей у біологічних експериментах, що може бути доцільним у науково-популярній статті, лекції для студентів тощо, але не у дисертаційній роботі. Також, приділяючи надто багато уваги саме мишам, дисертант непропорційно мало подає інформації про дрозофіл. Огляд літератури водночас недостатньо розкриває біохімічні, фізіологічні і молекулярно-біологічні аспекти досліджуваної проблематики.

4. Добре відомо з літератури і це підтверджується дисертаційними дослідженнями, що АКГ впливає на антиоксидантні ферменти, оксидативний стрес та енергетичний метаболізм. Причому, вплив альфа-кетоглутарату може бути різнонапрямленим. Проте, детальні біохімічні й молекулярні механізми цього впливу залишаються розкритими недостатньо. Наприклад, глибший аналіз сигнальних шляхів міг би суттєво посилити аргументацію щодо нейропротекторних ефектів АКГ.
5. Робота складається з двох серій експериментів, які важко поєднуються – вплив альфа-кетоглутарату (АКГ) на тривалість життя та метаболізм плодових мух довгоживучої сублінії та вплив АКГ на метаболізм стандартних мишей на тлі висококалорійної їжі.
6. Для повнішої оцінки впливу АКГ на нейрокогнітивні функції мишей необхідно розширити спектр поведінкових тестів, включивши до них тести на навчання та пам'ять.
7. У кінці кожного підрозділу розділу «Результати досліджень» слід наводити бібліографічні дані публікацій у яких були оприлюднені отримані результати. Дисертант цього не робить, на жаль.
8. Підсумок і висновки дисертаційної роботи не дають чіткого розуміння чи досягнуто дисертантом основної мети роботи, чи отримані результати з впливу альфа-кетоглутарату на організм дрозофіл і мишей достатні для рекомендацій із його застосування на практиці? І головне – чим саме автор може пояснити сформований ним основний підсумок, «що АКГ продовжує тривалість життя довгоживучої *D. melanogaster* в умовах обмеження доступності білків, але не за збалансованого вмісту білків і вуглеводів у дієті», що є основним?

Проте, висловленні мною зауваження суттєво не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи Дем'янчука О.І. і носять здебільшого рекомендаційний характер

Загальний висновок. Дисертаційна робота Дем'янчука Олега Ігоровича «Вплив альфа-кетоглутарату на дрозоділ та мишей: параметри поведінки, оксидативного стресу та енергетичного обміну» за актуальністю теми, обсягом виконаних досліджень, науковою і практичною цінністю отриманих результатів і висновків, формою викладу є оригінальним авторським дослідженням, що відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 р. (зі змінами) «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 (зі змінами)).

Подана дисертаційна робота є завершеною працею, в якій отримано нові обґрунтовані результати, що мають наукову новизну, теоретичне та практичне значення, а її автор Дем'янчук Олег Ігорович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НААН України,
директор Інституту біології тварин
НААН України

Юрій САЛИГА