

## ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертацію **Караман Ганни Сергіївни** «Зміни рівня експресії генів, асоційованих з тривалістю життя у *Drosophila melanogaster*, в залежності від умов преімагінального розвитку», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю  
03.00.22 – молекулярна генетика

**Актуальність теми дисертації.** Дослідження факторів, що впливають на тривалість життя організмів, є важливим завданням сучасної науки. Особливо значущим є розуміння взаємозв'язку між ранніми стадіями та пізніми етапами життєвого циклу. Дослідження показують, що умови розвитку на ранніх етапах онтогенезу можуть мати тривалі наслідки для здоров'я та тривалості життя. Хоча існує безліч наукових даних стосовно старіння, багато аспектів цього процесу досі залишаються недостатньо вивченими. Використання *Drosophila melanogaster* як модельного організму дозволяє досліджувати вплив різних екологічних факторів на тривалість життя та експресію генів. Це важливо не лише для теоретичної науки, але й для практичних галузей, особливо медицини. *D. melanogaster* часто використовується в дослідженнях біологічних процесів, включаючи старіння. Було встановлено, що тривалість життя *D. melanogaster* залежить від факторів, таких як температура, раціон харчування та щільність популяції. Більшість досліджень зосереджена на впливі чинників на стадії імаго або протягом всього життя. Вивчення залежності між темпами старіння дорослих особин і факторами, що впливають на розвиток на преімагінальних стадіях, відбувається вперше. Це дозволяє перевірити гіпотезу про те, що екологічні фактори на ранніх стадіях сприяють виникненню епігенетичних модифікацій, які впливають на фенотип дорослих особин і експресію генів, пов'язаних із тривалістю життя *D. melanogaster*.

Метою роботи було з'ясувати вплив умов утримання *D. melanogaster* на стадії преімагінального розвитку (температура, рН, щільність популяції, концентрація кисню) на тривалість життя імаго та рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, асоційованих з тривалістю життя.

**Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була виконана на кафедрі загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетних науково-дослідних тем №11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакції організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № державної реєстрації 0111U004648) та № 16БФ036-01 «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (2016-2018 рр. № державної реєстрації 0116U002527).

**Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій.** Дисертація Караман Г.С. є завершеною науковою працею. Дослідження виконані на високому науково-методичному рівні. Застосовані методи молекулярно-генетичного аналізу, а також статистичної обробки даних є сучасними та загальноприйнятими у світовій практиці досліджень. Положення та висновки, які сформульовані у дисертації, ґрунтуються на великому експериментальному матеріалі.

**Оцінка змісту дисертації та її завершеності.** Дисертаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, узагальнення результатів, списку використаних джерел та додатку. Дисертацію викладено на 141 сторінках друкованого тексту. Список використаних джерел складається із 195 джерел.

У вступі автором дослідження обґрунтовується вибір теми дослідження. В «Огляді літератури» дається визначення терміну «старіння», описано методи оцінки старіння, фактори, що впливають на цей процес.

Також розглядається *D. melanogaster* як модельний об'єкт для вивчення факторів впливу на тривалість життя.

У другому розділі «Матеріали та методи дослідження» наведено загальні умови утримання *D. melanogaster* в рамках експерименту та маніпуляції з нею. У розділі 2.3. описаний молекулярно-генетичний аналіз, зокрема, виділення тотальної РНК, синтез кДНК, проведення ампліфікації методом кількісної ПЛР у реальному часі, розрахунок рівня експресії генів, статистична обробка отриманих результатів.

В розділі 3 описано вплив рН поживного середовища та концентрації кисню на преімагінальній стадії на тривалість преімагінального розвитку та життя імаго *D. melanogaster*. Було встановлено, що оптимальними умовами для найшвидшого розвитку є середовище з рН 5. Статистичний аналіз підтвердив наявність значущих розходжень у тривалості розвитку *D. melanogaster* між рН 5 та іншими досліджуваними значеннями рН.

Також було встановлено, що концентрація кисню в навколишньому середовищі під час розвитку *D. melanogaster* має статистично значущий вплив на тривалість життя особин на стадії імаго. Гіпероксія на етапі розвитку чинила негативний вплив на тривалість життя і самців і самок імаго *Drosophila*, а саме статистично достовірно зменшуючи її. В той час як розвиток за умови гіпоксії мав різний ефект впливу на показники тривалості життя для різних статей: у самок цей вплив сприяє виключно зменшенню як середньої, так і максимальної тривалості життя, а у самців максимальна тривалість життя статистично достовірно зросла в умовах гіпоксії.

Розділ 4 присвячений з'ясуванню впливу температури на личинковій стадії розвитку *D. melanogaster* на показники життєздатності та експресію генів, асоційованих зі старінням, у самців і самок імаго. Автором було встановлено, що температура навколишнього середовища суттєво впливає на тривалість преімагінального розвитку дрозофіл. Самці і самки імаго, які розвивалися при температурі 22,5 °С, мали максимальну масу тіла при вилупленні та найвищу тривалість життя як середню, так і максимальну, що,

ймовірно, пов'язано з оптимальними температурними умовами для активності ферментів, які сприяють повноцінному розвитку.

Визначення рівня експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок імаго, вирощених за умов різної температури на личинковій стадії розвитку показало, що у самців всіх досліджених груп не зафіксовано змін у експресії жодного з аналізованих генів. Натомість самки виявили варіабельність у рівнях експресії генів, яка була характерною для всіх досліджених генів та більш вираженою за температур, які значно відхилялися від фізіологічного оптимуму в 25 °C. Зокрема, в експериментальних групах самок, личинковий розвиток яких проходив за температур 20,0 °C та 30,0 °C, було зафіксовано значне та статистично достовірне зростання рівнів експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *mTor* порівняно з контрольною групою. Для гена *foxo*, при відсутності статистично значущих змін у рівні експресії, були встановлені порогові в сенсі статистичної значущості значення для аналогічних температурних умов.

В 5 розділі описано вплив щільності популяції личинок на показники життєздатності та експресію генів, асоційованих зі старінням, у самців і самок імаго. Продемонстровано, що за умов личинкового перенаселення (>3000 штук яєць на 100 мл поживного середовища), темп росту личинок плодкових мушок знижується, процес вилуплення розтягується і триває впродовж 5 днів замість доби, навіть враховуючи генетичну однорідність популяції. При цьому імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов підвищеної щільності, демонстрували суттєве зниження середньої маси тіла в порівнянні з контрольними особинами. Підсумовуючи отримані результати визначення відносного рівня експресії генів, можна відмітити, що у самок всіх аналізованих груп не спостерігалось зміни експресії по жодному з досліджуваних генів. В той час як самці продемонстрували зміну рівня експресії генів *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у відповідь на вплив високої щільності личинкової популяції. Лише для гена *Hsp70* вплив досліджуваного ефекту мав межовий характер.

На стор 104 наведено узагальнення результатів дослідження, а на стор 119 – висновки, які логічно підсумовують результати роботи. В цілому робота виконана на високому методичному та методологічному рівнях.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Результати дисертаційної роботи знайшли своє відображення у наукових працях, оприлюднених автором у рецензованих фахових виданнях. Авторка має 8 публікацій, з них 5 статей у фахових виданнях (одна з яких входить до бази даних *Scopus/WoS*), 3 тез доповідей за результатами міжнародних конференцій. Автореферат відображає основний зміст та структуру дисертації.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Проаналізовано вплив факторів навколишнього середовища (температури, щільності популяції, гіпоксії та гіпероксії, рівня рН поживного середовища) на преімагінальній стадії розвитку на показники життєздатності та тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster*. Вперше з'ясовано асоціацію отриманих змін тривалості розвитку та життя з рівнем експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок імаго *D. melanogaster*. Вперше показано ефект впливу гіпоксії та гіпероксії на преімагінальній стадії на тривалість розвитку та життя самців і самок імаго *D. melanogaster*. Вперше визначено ефект впливу різного рівня рН буферизованого поживного середовища на личинковій стадії розвитку на тривалість розвитку та життя самців і самок імаго *D. melanogaster*. Отримані результати дозволили знайти «фізіологічні оптимуми» для різних чинників навколишнього середовища під час преімагінального розвитку, які обумовлюють максимальний потенціал довголіття комах.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати можуть слугувати підґрунтям подальших досліджень механізмів старіння у тварин та людини. Оскільки досліджені у роботі гени є високо конзервативними, отримані дані можуть бути використані для прогнозування тривалості життя у людини і пошуку впливів на пренатальній стадії

онтогенезу для потенційного збільшення тривалості життя та покращення здоров'я людини або для мінімізації потенційно негативних наслідків змін профілів експресії генів на ранніх стадіях онтогенезу.

#### **Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.**

В цілому дисертація та автореферат написані грамотною мовою, прослідковується чіткість та логіка викладення матеріалу. В той же час є певні недоліки :

На Стор 52 зазначено, що комплект реагентів для виділення РНК складає: лізуючий розчин, розчин для відмивання 1, розчин для відмивання 3, розчин для відмивання 4, сорбент та РНК-буфер. Однак не вказаний виробник комплекта.

Така сама ситуація з комплектом реагентів для синтезу кДНК на матриці РНК на Стор 54.

Стор 55. «...значення вище 2,0 вказує на наявність домішок ДНК. В наших зразках РНК співвідношення  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  становило 1,8-2,0, що свідчило про відносно високу чистоту екстрагованої РНК». Не обов'язково, може бути і надлишок РНК.

Стор. 68 «... що відображає підвищену тривалість життя». Треба додати, що на стадії імаго.

Стор 96 «.... Репродуктивна активність самок представлена рівнем фекандильності, тобто середньої кількості відкладених самкою за добу», незрозуміло, чого саме?

#### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук**

Дисертація Караман Ганни Сергіївни «Зміни рівня експресії генів, асоційованих з тривалістю життя у *Drosophila melanogaster*, в залежності від умов преімагінального розвитку» є повноцінним завершеним науковим дослідженням, проведеним на високому рівні із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних та статистичних методів аналізу. Робота цілком

відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів...», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567, а її автор, Караман Ганна Сергіївна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,

доктор біологічних наук

старший науковий співробітник,

вчений секретар, завідувач відділу

популяційної генетики ДУ «Інститут харчової

біотехнології та геноміки НАН України»



Ярослав ПРКО