

Голові разової спеціалізованої
вченої ради ДФ 20.051.189
Карпатського національного університету
імені Василя Стефаника,
доктору біологічних наук,
професору Семчишин Галині Миколаївні

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, кандидата біологічних наук, доцента кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника Абрата Олександрівни Богданівни на дисертаційну роботу **Іваночка Мар'яна Васильовича** «Вплив препаратів броколі на антиоксидантні та енергетичні параметри мишей при споживанні кафетерійної їжі», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність обраної теми. Проблема ожиріння, метаболічних порушень та пов'язаного з ними оксидативного стресу залишається однією з найбільш актуальних у сучасній біології та біомедицині. Особливого значення набуває пошук природних харчових добавок, здатних коригувати порушення ліпідного обміну, запальні процеси та антиоксидантний захист організму. У цьому контексті препарати броколі розглядаються як перспективні об'єкти нутриціологічних досліджень завдяки високому вмісту біологічно активних сполук, зокрема глюкозинолатів та ізотиоціанатів, серед яких особливу увагу привертає сульфорафан. Дисертаційна робота Іваночка Мар'яна Васильовича виконана в руслі цих актуальних досліджень і присвячена системному вивченню впливу паростків та проростків броколі сорту Калабрезе на фізіологічні, біохімічні та молекулярні параметри лабораторних мишей за умов споживання раціону з високим вмістом жирів та легкозасвоюваних вуглеводів (так звана «кафетерійна їжа»). Робота поєднує елементи біохімії, нутриціології та молекулярної біології, а отримані результати мають як фундаментальне, так і потенційне прикладне значення.

Зв'язок теми дисертаційної роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконували впродовж 2022-2025 рр. в лабораторіях кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського (нині Карпатського) національного університету імені Василя Стефаника як частину наукової тематики кафедри. Робота фінансувалася у рамках проєкту Міністерства освіти і науки України «Корекція метаболічного синдрому

збагаченими сульфорафаном препаратами з проростків броколі» (№ держреєстрації – 0122U000894). Дисертант був офіційним співвиконавцем зазначеного проекту та брав безпосередню участь у виконанні його експериментальної частини.

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертаційне дослідження містить низку оригінальних наукових результатів. Особливістю роботи є використання саме цілісного рослинного матеріалу – паростків та проростків броколі, а не ізольованого сульфорафану, для оцінки впливу на метаболічні та антиоксидантні параметри за умов споживання кафетерійної їжі. Автором показано вибірковий вплив препаратів броколі на накопичення триацилгліцеролів у печінці мишей, встановлено зниження рівня ТАГ у плазмі крові при збільшенні вмісту проростків броколі у кафетерійному раціоні, а також нормалізацію активності окремих ферментів гліколізу у печінці при споживанні проростків броколі. На окрему увагу заслуговують дані щодо стимуляції глутатіон-залежних антиоксидантних систем та виявлених ознак протизапального впливу за результатами ПЛР-аналізу й гістологічного дослідження печінки.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати розширюють уявлення про біохімічні механізми впливу цілісного рослинного матеріалу броколі на метаболічні процеси і системи антиоксидантного захисту за умов споживання раціону з високим вмістом жирів та легкозасвоюваних вуглеводів. Встановлені ефекти проростків броколі щодо зниження накопичення ліпідів у печінці, стимуляції глутатіон-залежних ферментів та протизапального впливу на рівні транскрипції генів формують підґрунтя для подальших досліджень у галузі нутриціології та функціонального харчування. Результати роботи можуть бути використані при розробці наукових засад застосування рослинних харчових добавок у корекції метаболічних порушень, а також у навчальному процесі під час викладання дисциплін «Біологічно активні природні речовини», «Молекулярна біологія» та суміжних курсів у закладах вищої освіти.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень і висновків. Наукові положення та висновки дисертації ґрунтуються на власних експериментальних даних, одержаних у трьох незалежних серіях дослідів на мишах лінії C57BL/6J. Застосований методичний арсенал є широким і включає фізіологічні, морфометричні, гематологічні, біохімічні, молекулярно-біологічні та гістологічні підходи. Статистичний аналіз проведено з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA та тесту Тьюкі для множинних порівнянь. Досліди схвалені біоетичною комісією університету (PNU-2023-M-010 і PNU-2023-M-011) і відповідають вимогам Директиви 2010/63/ЄС. Отримані результати є відтворюваними, а висновки – такими, що логічно випливають з фактичного матеріалу.

Аналіз дисертаційної роботи

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел (292 найменування). Загальний обсяг – 216 сторінок, кількість рисунків – 45. Структура відповідає вимогам до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії.

Вступ. Написано чітко і лаконічно. Мета і завдання дослідження сформульовані конкретно і відповідають змісту роботи. Наукова новизна виписана детально і з достатнім рівнем специфічності. Практичне значення та особистий внесок здобувача окреслені прозоро.

Огляд літератури. Огляд охоплює широке коло актуальних зарубіжних публікацій з проблем ожиріння та метаболічних порушень, оксидативного стресу, ролі транскрипційного фактору Nrf2, біологічної активності сульфорафану та застосування препаратів броколі. Загальна структура розділу є доброю, однак він не позбавлений певних композиційних недоліків. Підрозділ 1.1, який присвячений загальній характеристиці ожиріння, є надмірно описовим і не повною мірою формує концептуальне підґрунтя для власного дослідження. Враховуючи, що значна частина експериментальної роботи виконана саме на печінці та корі головного мозку, видається доцільнішим розширити підрозділ 1.7 за рахунок системного аналізу сучасних даних щодо ролі цих органів у патогенезі метаболічних порушень. У підрозділі 1.2 кафетерійна їжа розглядається переважно в контексті ожиріння, тоді як акцент на метаболічних порушеннях як таких був би більш адекватним з огляду на реальні результати роботи, де вираженого збільшення маси тіла не спостерігало. Підрозділи 1.4 і 1.5 частково дублюють одне одного в описі механізму дії Nrf2, а підрозділ 1.5 мав би бути більш метаболічно орієнтованим – з акцентом на ролі Nrf2 у регуляції ліпідного та вуглеводного обміну, а не лише у відповіді на оксидативний стрес. Механізм активації Nrf2 повторно описується і в підрозділі 1.6, що дещо ускладнює цілісне сприйняття структури розділу. Нарешті, роль шляху Nrf2 у власному дослідженні залишається більш концептуально задекларованою, аніж підкріпленою прямими вимірюваннями. На цьому зупиняюся детальніше у розділі зауважень.

Матеріали і методи. Методичний розділ є одним з найбільш опрацьованих у дисертації. Методи описані детально і відтворено, а застосований комплекс підходів (від біохімічних і молекулярно-біологічних до гістологічних) є широким і адекватним поставленим завданням. Разом з тим, три серії експериментальних досліджень суттєво різняться між собою: у першій використовувалися десятимісячні миші (тривалість 14 тижнів), у двох наступних – восьмимісячні (20 і 16 тижнів відповідно). Різний вік

тварин і різна тривалість дослідів ускладнюють пряме міжсерійне порівняння результатів, що слід враховувати при узагальненні.

Результати та їх обговорення. Розділ результатів є найбільш об'ємною та інформаційно насиченою частиною дисертації. Автором досліджено широкий спектр фізіологічних, біохімічних, молекулярно-біологічних та гістологічних показників, що свідчить про значний обсяг виконаної експериментальної роботи. Водночас окремі частини розділу виглядають недостатньо інтегрованими у загальну концепцію дослідження. Зокрема, підрозділ 3.1, присвячений визначенню пігментів, вітамінів, проліну, крохмалю та інших біологічно активних речовин у препаратах броколі, містить значний обсяг аналітичних даних. Однак у подальшому ці результати лише частково використовуються для інтерпретації ефектів, виявлених у тваринних експериментах. У зв'язку з цим окремі фрагменти підрозділу справляють враження радше характеристики рослинного матеріалу та оптимізації умов аналізу, ніж концептуально необхідної частини дисертаційного дослідження.

Крім того, у низці випадків інтерпретація отриманих результатів є ширшою, ніж це безпосередньо впливає з представлених експериментальних даних. Зокрема, роль сигнального шляху Nrf2 у більшості випадків залишається гіпотетичною і не підкріплена прямими визначеннями самого фактору чи його активації. Аналогічно, окремі висновки щодо протизапального впливу препаратів броколі та їх ролі у корекції метаболічних порушень виглядають більш категоричними, ніж це безпосередньо впливає з представлених результатів.

При зіставленні результатів підрозділів 3.3 та 3.4 звертає на себе увагу неоднорідність окремих ефектів при додаванні 5% проростків броколі до кафетерійної дієти. Наприклад, ефекти щодо маси вісцеральної жирової тканини та активності параоксонази мали неоднаковий напрямок або вираженість між серіями. Автору варто було б більш розгорнуто обговорити причини цих розбіжностей, зокрема, роль різної тривалості експериментів та віку тварин.

Окремі зауваження до цього розділу також наведено у пункті запитань та зауважень.

Розділ узагальнення містить детальний аналіз отриманих результатів та демонструє значний обсяг проведеної автором аналітичної роботи. Слід відзначити наявність узагальнювальних схем, які полегшують сприйняття окремих напрямків дослідження. Водночас розділ значною мірою побудований за принципом послідовного повторного опису результатів окремих підрозділів, тоді як більш цінним виглядало б формування цілісної концептуальної моделі з акцентом на причинно-наслідкові зв'язки між виявленими метаболічними, антиоксидантними та молекулярними ефектами препаратів броколі.

Окремо слід відзначити, що у роботі недостатньо чітко інтегровано результати, отримані для паростків і проростків броколі. Попри значний обсяг представлених даних, у розділі узагальнення не сформульовано достатньо чітких висновків щодо принципових відмінностей між цими препаратами, їх відносної ефективності та можливих відмінностей механізмів дії. У зв'язку з цим окремі схеми та інтерпретації сприймаються дещо фрагментарно і не завжди формують єдину завершену концепцію роботи.

Висновки. Сформульовані дисертантом висновки є чітко структурованими, логічними та загалом відображають вирішення поставлених у роботі завдань. Разом з тим, аналізуючи їх зміст, варто висловити кілька зауважень.

Зокрема, в експериментальних розділах автором чітко показано, що препарати броколі не запобігали накопиченню вісцеральної жирової тканини і не усували гіперглікемію, спричинену тривалим кафетерійним харчуванням. Ці результати є суттєвими для об'єктивного визначення меж терапевтичної ефективності досліджуваної рослинної сировини, однак у фінальних висновках вони практично не знайшли свого відображення. Це певною мірою формує дещо однобічне і надмірно оптимістичне враження щодо реального характеру виявлених ефектів.

Крім того, у четвертому висновку використано занадто узагальнене формулювання: «вплинуло на зростання рівня відносної транскрипції факторів запалення», де відсутнє уточнення конкретних генів-мішеней та вектора регуляторних змін. Аналогічно, твердження щодо «зростання рівня регуляторів обміну вуглеводів» (або активності ключових ензимів) сформульовано розмито і воно не дає чіткого розуміння того про які саме молекулярні каскади та механізми йдеться.

Відсутність порушень академічної доброчесності. За результатами аналізу матеріалів дисертаційної роботи Іваночка Мар'яна Васильовича не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації даних.

Відомості щодо проведення біоетичної експертизи дисертації. Дослідження схвалене комісією з біоетики Карпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Оцінка мови і стилю викладення матеріалу дисертації. Мова і стиль викладення матеріалу дисертації загалом відповідають вимогам академічного письма. Текст написаний грамотно, із використанням коректної фахової термінології, виклад матеріалу є послідовним і логічним. Разом з тим, окремі фрагменти розділу результатів характеризуються дещо ускладненими синтаксичними конструкціями, що місцями ускладнює

сприйняття тексту. Загалом це не впливає на наукову цінність та позитивне враження від роботи.

Відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота виконана на належному методичному рівні та відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами), а також Наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 р. (зі змінами).

Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 24 праці: три статті у міжнародних рецензованих журналах, що індексуються у базах Scopus та Web of Science (квартилі Q2 і Q4 за класифікацією SCImago Journal), дві статті у фахових виданнях категорії «Б» та 19 тез доповідей наукових конференцій. Основні результати роботи достатньо повно відображені у відкритому науковому просторі.

Зауваження та запитання до дисертаційної роботи

1. У різних серіях експериментів здобувач використовував самців мишей лінії C57BL/6J різного віку – 8- та 10-місячних. Крім того, представлені у роботі серії дослідів суттєво відрізнялися за тривалістю: перша серія (з паростками броколі) тривала 14 тижнів, друга (оцінка дозозалежного ефекту проростків) – 20 тижнів, а третя (комплексна оцінка впливу проростків) – 16 тижнів. У зв'язку з цим хотілося б почути більш розгорнуте методологічне обґрунтування автора щодо необхідності зміни цих параметрів та того, якою мірою це могло впливати на інтерпретацію і зіставлення отриманих результатів.
2. Назва та концепція роботи активно спираються на активацію шляху Nrf2 сульфорафаном. Огляд літератури присвячений цьому регуляторному шляху. Проте у жодній серії дослідів не вимірювалися ні рівень білку Nrf2, ні його ядерна транслокація, ні активність ARE-залежних генів-мішеней Nrf2. Аналіз транскриптів не включав Nrf2 або його канонічних цільових генів (HO-1 (гемоксигенази-1), GCLC (глутаматцистеїнлігази)). Таким чином, залучення саме цього шляху є обґрунтованим припущенням, а не доведеним фактом.
3. **Контроль калорійності при додаванні броколі до їжі.** Додавання 2,5-10% проростків броколі до кафетерійної їжі змінювало калорійність та смакові якості раціону. При цьому зафіксоване зменшення споживання корму в окремих групах. Чи проводився перерахунок калорійності для всіх груп? Автор пояснює більший рівень ТАГ у плазмі чи знижену

активність параоксонази ефектом броколі, проте частина ефектів могла бути зумовлена різницею в загальному калорійному надходженні, а не біохімічними властивостями рослинного препарату.

4. У дисертації продемонстровано виражене накопичення триацилгліцеролів у печінці мишей за умов кафетерійного харчування. Водночас у підрозділі гістологічного аналізу автор зазначає, що ліпідних крапель у гепатоцитах виявлено не було. Така невідповідність між біохімічними та гістологічними даними потребує додаткового пояснення. Варто зазначити, що стандартне фарбування гематоксиліном-еозином не є достатньо чутливим методом для виявлення нейтральних ліпідів та ранніх проявів стеатозу, тоді як для цього зазвичай використовують спеціальні ліпідспецифічні методи забарвлення (Oil Red O, Sudan III/IV тощо). У зв'язку з цим виникає питання, чому за наявності підвищеного вмісту ТАГ у печінці не було застосовано додаткових гістохімічних методів підтвердження стеатозу.
5. У переліку методів зазначено проведення тесту «Відкрите поле». У третій серії (16 тижнів, серія з проростками броколі) у тексті результатів з'являються дані про рухову активність мишей. Проте ці показники відсутні у попередніх серіях. Чи проводився цей тест у всіх серіях? Яке обґрунтування для включення поведінкових показників у дисертацію, якщо їм не присвячено окремого підрозділу та інтерпретації?

Висловлені зауваження та запитання жодним чином не применшують наукової цінності представленої дисертаційної роботи та є стимулом для подальшого наукового осмислення отриманих результатів.

Висновок

Дисертаційна робота Іваночка Мар'яна Васильовича *«Вплив препаратів броколі на антиоксидантні та енергетичні параметри мишей при споживанні кафетерійної їжі»* є завершеною самостійною науковою працею. Вона характеризується широким і сучасним методичним арсеналом, містить оригінальні результати щодо вибіркового впливу цілісних препаратів броколі на метаболічні параметри, антиоксидантний захист і запальні процеси у мишей на моделі кафетерійного харчування.

Результати роботи широко висвітлені у відкритому науковому просторі та апробовані на профільних вітчизняних і міжнародних конференціях. Порушень академічної доброчесності та засад біоетики не виявлено.

Вважаю, що дисертація Іваночка Мар'яна за своєю актуальністю, об'ємом отриманих результатів, новизною та науково-практичною значимістю отриманих результатів відповідає вимогам передбаченим наказом Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017р. (зі

змiнами) «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а також «Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 (зі змінами), а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний рецензент:

доцент кафедри біохімії та біотехнології
Карпатського національного університету
імені Василя Стефаника
кандидат біологічних наук

Олександра АБРАТ