

ВІДГУК

офіційного опонента завідувачки кафедри фізіології та патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету, доктора біологічних наук, професора **Гарбузової Вікторії Юріївни** на дисертаційну роботу **Колінько Людмили Михайлівни** «Роль NAD^+ -залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів у осіб із різною масою тіла», яка подана до спеціалізованої вченої ради ДФ 44.601.033 Полтавського державного медичного університету на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дисертації. Ожиріння є важливою медико-соціальною проблемою сьогодення. Останніми роками тенденція до розвитку підвищеної маси тіла та ожиріння зростає як у дітей, так і у підлітків, що значним чином відображається на здоров'ї дорослих осіб. Формування підвищеної маси тіла та ожиріння у осіб молодого віку може впливати на зміну якості життя, харчової поведінки, сприяти появі серцево-судинних ускладнень та формувати підґрунтя розвитку хронічного низькоінтенсивного запалення.

Однією з найчисленніших популяцій імунних клітин, які виявляються у жировій тканині, є макрофаги. Дослідження свідчать, що системне запалення, яке виникає у жировій тканині, супроводжується збільшенням представництва загальної популяції макрофагів. Завдяки своїй унікальній властивості – фенотипічній пластичності, макрофаги можуть набувати різний фенотип в залежності від сигналів мікрооточення. Мікросередовище, в яке надходять макрофаги, опосередковує формування прозапального M1 або протизапального M2 фенотипу з наступною імунною відповіддю. Зокрема, збільшення популяції макрофагів в жировій тканині при ожирінні супроводжується порушенням балансу за рахунок підвищення кількості макрофагів із фенотипом M1.

Активація макрофагів, процес поляризації, їх функціональна активність регулюються завдяки реалізації генетичних та епігенетичних механізмів. Наразі

відомо, що одним із важливих епігенетичних механізмів є посттрансляційна модифікація гістонових і негістонових білків шляхом їх деацетилювання за допомогою родини сиртуїнів SIRT1-7. Найбільшу увагу науковців привертає NAD⁺-залежна деацетилаза SIRT1, яка здатна опосередковувати можливість регуляції життєво важливих сигнальних шляхів, контролює активність цільових білків, деацетилює регулятори метаболізму, експресується в метаболічно активних клітинах, включаючи білу жирову тканину та здатна регулювати процес поляризації макрофагів.

Саме тому визначення регуляторної ролі NAD⁺-залежної деацетилази SIRT1 у процесах поляризації M1/M2 моноцитів/макрофагів у осіб з нормальною, підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня є своєчасним, важливим та актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною планових науково-дослідних робіт Полтавського державного медичного університету «Комплексне дослідження патогенетичної ролі субпопуляцій M1 та M2 макрофагів в розвитку хронічного обструктивного захворювання легень для розробки та обґрунтування персоналізованої терапії з врахуванням маси тіла», № ДР 0117U005252 та «Вивчення патогенетичної ролі циркадіанного молекулярного годинника в розвитку метаболічних захворювань і системного запалення та розробка методики лікування, що скерована на ці процеси», № ДР 0120U101166.

Достовірність і обґрунтованість наукових положень дисертації. Дослідження проводились на базі Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Полтавського державного медичного університету та виконані на належному науково-методичному рівні.

Основні положення, висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи Колінько Людмили Михайлівни обґрунтовані і викладені на підставі результатів власних обстежень 96 осіб обох статей віком 18-25 років. За показниками індексу маси тіла (ІМТ) були сформовані групи по 32 особи: з

нормальною (ІМТ 18,50-24,99 кг/м²), підвищеною масою (ІМТ 25,00-29,99 кг/м²) та ожирінням I ступеня (ІМТ 30,00-34,99 кг/м²). Всі групи були збалансовані за статтю. Співставлення груп дослідження було адекватним, групування вдалим і відповідало правилам проведення наукових досліджень.

Дисертаційне дослідження виконано з дотриманням морально-етичних норм та основних положень з питань біоетики згідно сучасних міжнародних і вітчизняних документів з біомедичних досліджень.

Дисертантом були використані антропометричні, функціональні дослідження, методи опитування. Експериментальна частина роботи проведена з моделюванням поляризації макрофагів *in vitro*, застосуванням сучасних та інформативних лабораторних методів дослідження - полімеразної ланцюгової реакції в режимі «реального часу» для визначення експресії генів, імуноферментного аналізу для визначення концентрації цитокінів та маркерів запалення. Використання математично-статистичного аналізу результатів підтверджує їх достовірність та високий рівень обґрунтованості представлених в роботі даних, сформульованих основних положень і висновків.

Наукова новизна досліджень та отриманих результатів. Відповідно до результатів дисертаційної роботи, вперше визначено регуляторну роль SIRT1 у поляризації M1/M2 моноцитів/макрофагів у осіб з нормальною, підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня та вперше досліджено рівень експресії SIRT1, STAT1 та STAT6 в моноцитах/макрофагах периферичної крові на різних етапах активації в залежності від маси тіла.

Крім того, вперше визначений достовірно вищий рівень експресії гена *sirt1* у клітинах, стимульованих IL-4 усіх досліджуваних груп та визначено його зростання відповідно до підвищення маси тіла із найбільшим значенням у осіб з ожирінням I ступеня у клітинах, стимульованих IL-4.

Отримані новітні дані стосовно зростання рівня експресії гена *sirt1* в динаміці інкубації клітин з формуванням позитивних кореляційних зв'язків рівня експресії при інкубації 3 та 7 діб у осіб з нормальною масою тіла у

клітинах, стимульованих IL-4, у осіб з підвищеною масою та ожирінням I ступеня, також і у клітинах, стимульованих LPS та γ IFN.

Вперше визначено максимальні рівні експресії гена *stat6* у клітинах осіб з нормальною масою при стимуляції LPS та γ IFN, у осіб з підвищеною масою та ожирінням – при стимуляції IL-4, та при порівнянні між групами у осіб з ожирінням у нестимульованих клітинах і в макрофагах, стимульованих LPS і γ IFN та IL-4 3 доби, та IL-4 7 діб. Вперше між експресією *sirt1* та *stat6* визначені позитивні високої та середньої сили зв'язки для клітин, стимульованих IL-4.

Дисертанткою вперше визначені достовірно нижчі значення співвідношення показників *stat1/stat6* у клітинах осіб з ожирінням I ступеня, стимульованих LPS та γ IFN та IL-4 протягом 3 діб, та стимульованих IL-4 протягом 7 діб.

Вперше показано, що у осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням зміна рівня експресії SIRT1 опосередковує зміну балансу експресії ядерних факторів транскрипції STAT1 і STAT6 у моноцитах та макрофагах із формуванням протизапального M2 фенотипу.

Отримані новітні дані стосовно достовірно вищої продукції IL-6 макрофагами, стимульованими LPS та γ IFN та достовірне збільшення рівня IL-10 у супернатантах клітин, стимульованих LPS та γ IFN у осіб з ожирінням I ступеня у порівнянні з групою з нормальною масою. Вперше продемонстровано формування зв'язків між експресією *stat1* і *stat6* у клітинах, стимульованих LPS та γ IFN та рівнем вчСРБ та TGF β 1у сироватці у осіб із різною масою тіла.

Доповнені дані стосовно розвитку недостатності функціональних можливостей серцево-судинної системи, зниження якості життя досліджених осіб зі збільшенням маси тіла. Отримані подальшого розвитку дані про наявність порушень харчової поведінки у осіб з різною масою тіла обох статей. Отримані додаткові дані, щодо достовірного перевищення енергетичної цінності харчового раціону осіб із підвищеною масою тіла та ожирінням I

ступеня обох статей, що сприяє формуванню позитивного енергетичного балансу між рекомендованим добовим споживанням енергії та енергетичною цінністю харчового раціону.

Практичне значення отриманих результатів. Слід відзначити, що результати дослідження даної дисертаційної роботи поглиблюють знання та обґрунтовують розуміння регуляторної ролі SIRT1 у поляризації M1/M2 моноцитів/макрофагів у осіб з нормальною, підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня.

Залежність рівнів експресії SIRT1, STAT1 та STAT6 в моноцитах/макрофагах периферичної крові на різних етапах активації від маси тіла доповнюють знання механізмів поляризації та розвитку низькоінтенсивного системного запалення при підвищенні маси тіла та ожирінні і є можливим раннім діагностичним критерієм виявлення процесів прекодиціювання моноцитів з формуванням про- або протизапального фенотипу. Дослідження рівня експресії NAD⁺-залежної деацетилази SIRT1 дозволить визначити групи ризику розвитку підвищеної маси тіла та ожиріння у молодих осіб, прогнозувати схильність до формування підвищеної маси тіла та ожиріння.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Результати дисертаційної роботи були впроваджені в навчальний та науковий процес кафедр фізіології та патофізіології Полтавського державного медичного університету, в навчальний процес кафедри нормальної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, в навчальний та науковий процес кафедри фізіології Дніпровського державного медичного університету, в матеріали лекцій та практичних занять кафедри фізіології з основами біоетики та біобезпеки Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, в навчальний процес кафедри фізіології ім. Я. Д. Кіршенבלата Буковинського державного медичного університету.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Результати дисертаційного дослідження повністю висвітлені у 16 наукових працях, із них 3 статті у фахових виданнях, затверджених Міністерством освіти і науки України, 1 стаття в українському виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Web of Science, 1 стаття у іноземному виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus (Грузія), 11 тез у збірниках наукових праць.

Характеристика розділів, оцінка змісту, оформлення та обсягу дисертації. Дисертаційна робота Колінко Людмили Михайлівни викладена українською мовою на 191 сторінці комп'ютерного набору та оформлена відповідно до вимог МОН України. Дана робота складається з анотації, переліку наукових праць здобувача, опублікованих за темою дисертації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, двох розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендації, списку використаних джерел (40 кирилицею та 212 латиницею). Робота ілюстрована 32 рисунками та 29 таблицями.

У вступній частині дисертації наводиться обґрунтування актуальності обраної теми з визначенням сутності наукової проблеми, визначені мета та завдання дослідження, висвітлені наукова новизна та практична значимість отриманих результатів, наведені дані щодо впровадження, публікації результатів у наукових працях та апробації матеріалів дослідження.

У розділі «Огляд літератури», який містить чотири підрозділи, розкриваються сучасні наукові дані стосовно процесу поляризації макрофагів, його особливостей за умов підвищеного надходження нутрієнтів. Автором наводиться інформація щодо NAD^+ -залежної деацетилази SIRT1, її участі в процесі поляризації, сучасні уявлення стосовно її регуляторної ролі. У підрозділах відображені основні наукові досягнення останніх років з даної теми. Огляд літератури є змістовним, підтверджує обізнаність та ґрунтовний характер роботи дисертанта з літературними першоджерелами.

У другому розділі «Матеріали та методи дослідження», представлена вичерпна інформація щодо етапів проведення дослідження, його дизайну, критеріїв відбору респондентів та подальшого формування груп. Вибрані дисертантом методи дослідження - антропометричні, функціональні, анкетування з використанням опитувальників для визначення якості життя, особливостей харчової поведінки, енергетичної цінності харчового раціону та її відповідності потребам в енергії, експериментальні, лабораторні та методи варіаційної статистики цілком обґрунтовані та сприяють вирішенню поставлених у роботі завдань. Розділ містить два підрозділи.

Третій розділ, який складається із чотирьох підрозділів, присвячений результатам антропометричних досліджень, визначення показників функціонального стану серцево-судинної системи, особливостям харчової поведінки осіб із різною масою тіла. Аналіз енергетичної цінності добового раціону та її відповідності потребам в енергії свідчить про формування позитивного енергетичного балансу у осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня. Розділ ілюстрований таблицями, графічним зображенням кореляційних зв'язків та завершується висновком, який узагальнює результати проведених досліджень.

Четвертий розділ містить два підрозділи та стосується результатів дослідження рівня експресії генів *sirt1*, *stat1* та *stat6* в моноцитах/макрофагах осіб досліджуваних груп в дослідах *in vitro* на різних етапах активації в залежності від маси тіла та визначення рівня про- та протизапальних цитокінів та маркерів запалення. Наводяться результати визначення співвідношення рівня експресії генів *stat1/stat6* для обґрунтування напряму процесу поляризації моноцитів/макрофагів. Автором визначено формування кореляційних взаємозв'язків між експресією генів *sirt1*, *stat6* та рівнями IL-6, IL-10 у супернатантах стимульованих клітин, TGF β 1, вчСРБ у сироватці крові досліджуваних осіб, представлено їх графічне зображення. Наприкінці розділу наведений узагальнюючий висновок.

У п'ятому розділі «Аналіз та узагальнення результатів» дисертантом проведені обґрунтоване обговорення та детальний аналіз власних даних, їх порівняння з результатами, отриманими іншими дослідниками. Даний розділ викладений послідовно, логічно, аргументоване викладення матеріалу підтверджує наукову ерудицію автора та глибоке розуміння досліджуваної проблеми.

Висновки дисертаційного дослідження сформульовані на підставі отриманих у дослідженні результатів, відображають основний зміст роботи та повністю відповідають положенням, сформульованим у меті та завданнях.

Список використаних літературних джерел оформлений відповідним чином, містить сучасні джерела, що відповідають тематиці роботи.

Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності. При вивченні матеріалів дисертаційної роботи, аналізу наукових публікацій дисертанта ознак плагіату, фальсифікацій чи інших порушень академічної доброчесності не виявлено.

Недоліки та зауваження до наукової роботи щодо змісту та оформлення. Дисертаційна робота Колінько Л.М. є завершеною науковою працею та цілком заслуговує на позитивну оцінку. Зміст дисертації відповідає темі дослідження і розкриває її суть, а отримані дані є новітніми, мають теоретичну та практичну значимість.

Принципових зауважень щодо змісту та оформлення дисертаційної роботи немає. У якості загальних зауважень слід відзначити наступні. Розділ «Огляд літератури» є завеликим, бажано його дещо скоротити. У Висновках деякі пункти, в яких наводяться результати антропометричних вимірювань, показників серцево-судинної системи, якості життя, можна б було об'єднати в один пункт з урахуванням завдань дослідження. Інколи у тексті зустрічаються поодинокі помилки стилістичного та технічного характеру, певна кількість таблиць перевантажена даними.

Але наведені зауваження не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи, та не знижують її наукову цінність.

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання, на які бажано отримати відповідь в порядку дискусії:

1. Показник рівня експресії гена *sirt1* при порівнянні між стимульованими клітинами на 7 добу інкубації менший, ніж на 3 добу. Чим це можна пояснити?
2. Як Ви можете інтерпретувати отримані результати щодо підвищення експресії гена *stat1* під впливом ІЛ-4, який, відповідно механізму дії, є індуктором поляризації за фенотипом М2, опосередковано впливом на експресію гена *stat6*?
3. Чому, на Вашу думку, у осіб з ожирінням співвідношення показників експресії генів *stat1/stat6* є максимально зниженим у порівнянні з особами з нормальною та підвищеною масою тіла?

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Колінько Людмили Михайлівни «Роль NAD⁺-залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів у осіб із різною масою тіла» виконана під керівництвом д.м.н., професора Весніної Людмили Едуардівни у Полтавському державному медичному університеті МОЗ України є самостійною завершеною науковою працею, яка містить теоретичне узагальнення результатів і нове вирішення актуального наукового завдання, яке полягає у визначенні регуляторної ролі NAD⁺-залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів за фізіологічних умов та за умов підвищеного надходження поживних речовин у осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня, що має важливе значення для сучасної біології.

За актуальністю теми, обсягом виконаних досліджень та отриманих результатів, достовірністю та обґрунтованістю отриманих висновків, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота «Роль NAD⁺-залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів у осіб із різною масою тіла» відповідає

вимогам «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019 року та «Вимогам до оформлення дисертації», затверджених наказом Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017 року, а її автор Колінько Людмила Михайлівна має необхідний рівень наукової кваліфікації і заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Завідувач кафедри фізіології та патофізіології
з курсом медичної біології Сумського
державного університету,
д.мед.н., професор

В.Ю. Гарбузова

