

## АНОТАЦІЯ

*Колінько Л.М.* Роль  $\text{NAD}^+$ -залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів у осіб із різною масою тіла. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» (091 Біологія). - Полтавський державний медичний університет МОЗ України, Полтава, 2021.

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і розв'язання актуального наукового завдання, яке полягає у визначенні регуляторної ролі  $\text{NAD}^+$ -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.

Макрофаги є центральними медіаторами індукованого ожирінням запалення у жировій тканині. Залежно від мікросередовища, макрофаги можуть набувати як класично активований фенотип M1, так і альтернативно активований M2. Аналіз новітніх даних свідчить про існування більш складного сценарію, коли спектр станів макрофагів перевищує поляризацію тільки за M1/M2 фенотипами, зокрема, при ожирінні та цукровому діабеті 2 типу, що потребує подальших досліджень. Підвищена маса тіла та ожиріння є наслідком енергетичного дисбалансу між калоріями, які споживає та витрачає людина. Серед факторів, які здатні впливати на енергетичний дисбаланс виділяють представників родини сіртуїнів SIRT1-7. Зокрема, SIRT1, впливаючи на поляризацію макрофагів, може здійснювати контроль за пригніченням субпопуляції M1, стимулюючи активацію M2 макрофагів та впливати на регуляцію запалення жирової тканини у відповідь на індуктори - жирні кислоти, гіпоксію, стрес ендоплазматичного ретикулуму.

Саме тому постало питання, яким чином зміна активності  $\text{NAD}^+$ -залежної деацетилази SIRT1 опосередковує зміну напрямку поляризації

моноцитів/макрофагів в бік про- або протизапального фенотипу за умов нормального та підвищеного надходження нутрієнтів.

У дослідженні взяли участь 96 осіб віком від 18 до 25 років. Відповідно до дизайну на першому етапі були використані антропометричні, функціональні дослідження, методи опитування.

На другому етапі в дослідах *in vitro* проведено виділення та культивування моноцитів периферичної крові. Стимуляцію моноцитів проводили ліпополісахаридом *E. coli* (LPS) і  $\gamma$ -інтерфероном ( $\gamma$ IFN) для індукції поляризації за фенотипом M1 та інтерлейкіном-4 (IL-4) для індукції поляризації за фенотипом M2. Визначення експресії генів *sirt1*, *stat1*, *stat6* проводили на 3 та 7 добу інкубації клітин методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі «реального часу», концентрацію IL-6, IL-10 у супернатанті клітин, високочутливого C-реактивного білка (вчСРБ) та трансформуючого фактору росту  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) у сироватці крові методом твердофазного імуоферментного аналізу.

Антропометричні дослідження на першому етапі показали достовірно вищі показники маси тіла, індекса маси тіла (ІМТ), окружності талії (ОТ), окружності стегон (ОС) у осіб обох статей з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня, ніж у осіб контрольної групи ( $p < 0,05$ ). Співвідношення окружності талії до окружності стегон (ОТ/ОС) було на 10,13% вищим у чоловіків з ожирінням I ступеня в порівнянні з особами контрольної групи ( $p < 0,05$ ). У осіб чоловічої статі з підвищеною масою тіла відсоток жирової маси тіла (%ЖМТ) на 76,85%, із ожирінням I ступеня на 112,77% достовірно більше, ніж у групі контролю. У жінок із підвищеною масою тіла даний показник на 56,35%, з ожирінням I ступеня на 74,57% більше, ніж у групі контролю ( $p < 0,05$ ).

За даними опитувальника оцінки якості життя Medical Outcomes Study 36 Item Short Form Health Status (SF-36) визначено зниження якості життя з підвищенням маси тіла. Особливо значне зниження показників рольового фізичного та рольового емоційного функціонування, психічного здоров'я спостерігалось у осіб жіночої статі, рольового фізичного функціонування,

життєздатності та рольового емоційного функціонування у осіб чоловічої статі ( $p < 0,05$ ). Отримані дані підтверджуються формуванням достовірних кореляційних зв'язків середньої сили між показниками якості життя та антропометричними показниками.

Показники серцево-судинної системи: частота серцевих скорочень (ЧСС), систолічний артеріальний тиск (САТ), діастолічний артеріальний тиск (ДАТ) та середній гемодинамічний тиск (СГТ) у осіб з ожирінням I ступеня обох статей в стані спокою були достовірно вищими у порівнянні з особами контрольної групи. Після проби з навантаженням визначено достовірне підвищення рівня ЧСС, САТ та СГТ у осіб чоловічої статі та ЧСС у осіб жіночої статі із підвищеною масою тіла. У осіб з ожирінням обох статей спостерігалось підвищення показників ЧСС, САТ та СГТ, ДАТ у осіб жіночої статі та пульсовий тиск (ПТ) у осіб чоловічої статі ( $p < 0,05$ ).

Індекс Робінсона був достовірно вищим у осіб чоловічої статі з підвищеною масою тіла на 13,88%, у осіб з ожирінням I ступеня на 19,17%, жіночої статі з ожирінням вищим на 16,90% у порівнянні з особами контрольної групи, що свідчить про недостатність функціональних можливостей серцево-судинної системи.

Визначено, що у осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня фактичне споживання енергії перевищувало добові потреби відповідно до рівня основного обміну та коефіцієнта фізичної активності. У осіб чоловічої статі з підвищеною масою енергетична цінність харчового раціону у робочий день на 16,02%, у вихідний день на 26,47%, у осіб з ожирінням у робочий день на 20,09%, у вихідний на 33,92% достовірно перевищувала показник рекомендованого добового споживання енергії. У жінок з підвищеною масою тіла енергетична цінність харчового раціону у вихідний день достовірно перевищувала показник добового споживання енергії на 24,46%, у осіб з ожирінням I ступеня у робочий день на 10,48%, у вихідний на 37,28%.

За опитувальниками Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) та Three factor eating questionnaire-R18 (TFEQ-R18) порушення харчової поведінки

спостерігалось у осіб обох статей усіх груп. За DEBQ показник обмежувального типу переважав у осіб чоловічої та жіночої статі з ожирінням I ступеня. Показник емоціогенного типу у осіб з ожирінням I ступеня чоловічої статі був на 26,03% меншим від даних контрольної групи. Зміни харчової поведінки подібного спрямування отримані за опитувальником TFEQ-R18.

На другому етапі проведено дослідження експресії SIRT1, транскрипційних факторів перетворювачів сигналів та активаторів транскрипції 1 та 6 (STAT1, STAT6) в моноцитах/макрофагах периферичної крові досліджуваних осіб.

Рівень експресії гена *sirt1* у клітинах, стимульованих IL-4 був вищим у осіб усіх досліджуваних груп. Максимальне значення рівня експресії гена *sirt1* визначені у осіб з ожирінням I ступеня у клітинах, стимульованих IL-4 1,084 (0,574 - 5,650)  $2^{-\Delta Ct}$  та 0,877 (0,819 - 1,650)  $2^{-\Delta Ct}$  відповідно при інкубації 3 та 7 діб. Продемонстровано формування позитивних кореляційних зв'язків рівня експресії гена *sirt1* 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 у клітинах, стимульованих LPS і  $\gamma$ IFN та IL-4.

Рівень експресії гена *stat6* був максимально виражений у клітинах осіб з нормальною масою при стимуляції LPS та  $\gamma$ IFN, у осіб з підвищеною масою та ожирінням – при стимуляції IL-4. При порівнянні між групами достовірно вищий рівень експресії *stat6* визначений у осіб з ожирінням у нестимульованих клітинах і в макрофагах, стимульованих за профілем M1 та M2 3 доби та M2 7 діб. Найбільший рівень зростання експресії *stat6*, як і *sirt1* відбувався за умов стимуляції IL-4. Між експресією *sirt1* та *stat6* визначені позитивні високої та середньої сили зв'язки для клітин, стимульованих IL-4, що підтверджує регуляторний вплив SIRT1 та сприяння поляризації в напрямку формування M2 фенотипу моноцитами периферичної крові осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня, що опосередковано підсиленням експресії гена *stat6*.

Найнижчі значення співвідношення показників *stat1/stat6* визначені у клітинах осіб з ожирінням I ступеня, стимульованих LPS і  $\gamma$ IFN та IL-4 протягом

3 діб. Величина *stat1/stat6* у клітинах осіб з ожирінням, стимульованих ІЛ-4 протягом 7 діб була достовірно нижче, ніж у осіб з нормальною масою.

За нашими даними у супернатантах клітин, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN осіб з ожирінням рівень ІЛ-6 був достовірно вищим за показники осіб з нормальною масою. Кореляційним аналізом показаний негативний зв'язок секреції ІЛ-6 та експресії SIRT1 у клітинах, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN ( $r = -0,838, p=0,013$ ).

Виявлено достовірне збільшення продукції ІЛ-10 клітинами, стимульованими LPS та  $\gamma$ IFN у осіб з ожирінням I ступеня у порівнянні з групою з нормальною масою та зниження клітинами, стимульованими ІЛ-4 у осіб з підвищеною масою у порівнянні з особами з нормальною масою тіла.

Рівень вчСРБ в сироватці осіб з ожирінням I ступеня достовірно перевищував даний показник у осіб з нормальною та підвищеною масою тіла. У осіб з ожирінням рівень TGF $\beta$ 1 був достовірно вищим на 82,19% у порівнянні із особами з нормальною масою тіла та на 46,36% у порівнянні з особами з підвищеною масою тіла. Кореляційний аналіз показав формування позитивного зв'язку експресії *stat1* у клітинах, стимульованих LPS і  $\gamma$ IFN та вчСРБ у сироватці ( $r = 0,673, p = 0,039$ ) у осіб з підвищеною масою тіла; позитивного зв'язку експресії *stat6* у клітинах, стимульованих LPS і  $\gamma$ IFN 7 діб та TGF $\beta$ 1 у сироватці ( $r = 0,685, p = 0,035$ ) у осіб з ожирінням на противагу негативному зв'язку *stat1* у клітинах, стимульованих LPS і  $\gamma$ IFN 7 діб та TGF $\beta$ 1 у сироватці ( $r = -0,640, p = 0,026$ ) у осіб з нормальною масою тіла.

Отримані результати свідчать, що в моноцитах периферичної крові осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня SIRT1 реалізує регуляторну роль, опосередковану сигнальним каскадом фактора транскрипції STAT6 зі спрямуванням формування поляризації у бік протизапального фенотипу. Достовірно вищий рівень експресії гена *sirt1* у нестимульованих клітинах, за умов стимуляції та її приріст за термін інкубації свідчить про можливе прекодиціювання моноцитів периферичної крові, яке забезпечує протидію формуванню прозапального фенотипу до рекрутування моноцитів у жирову

тканину. Даний вплив відбувається у осіб з підвищеною масою тіла та легким ожирінням, без ознак метаболічної патології за наявності незначних достовірних змін маркерів системного запалення. Визначення елементів, які беруть участь і впливають на результати сигнальної трансдукції, має важливе значення не тільки для розуміння основних принципів діяльності макрофагів, а також для розробки засобів терапії, опосередкованої моделюванням поляризаційного статусу макрофагів.

### **Наукова новизна отриманих результатів.**

Вперше визначена регуляторна роль  $NAD^+$ -залежної деацетилази SIRT1 у поляризації M1/M2 моноцитів/макрофагів у осіб з нормальною, підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня. Вперше досліджений рівень експресії SIRT1, STAT1 та STAT6 в моноцитах/макрофагах периферичної крові на різних етапах активації в залежності від маси тіла.

Вперше визначений достовірно вищий рівень експресії гена *sirt1* у клітинах, стимульованих IL-4, ніж у клітинах, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN осіб усіх досліджуваних груп. Вперше визначено зростання рівня експресії гена *sirt1* відповідно до підвищення маси тіла. Найбільші значення експресії гена *sirt1* визначені 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  $\gamma$ IFN.

Вперше показано, що рівень експресії гена *stat6* максимально виражений у клітинах осіб з нормальною масою при стимуляції LPS та  $\gamma$ IFN, у осіб з підвищеною масою та ожирінням – при стимуляції IL-4. При порівнянні між групами достовірно вищий рівень експресії *stat6* визначений у осіб з ожирінням у нестимульованих клітинах і в макрофагах, стимульованих LPS і  $\gamma$ IFN та IL-4 3 доби, та IL-4 7 діб.

Вперше показаний найбільший рівень зростання експресії *stat6*, як і *sirt1* у макрофагах, стимульованих ІЛ-4. Між експресією *sirt1* та *stat6* визначені позитивні високої та середньої сили зв'язки для клітин, стимульованих ІЛ-4.

Вперше визначені достовірно нижчі значення співвідношення показників *stat1/stat6* у клітинах осіб з ожирінням І ступеня, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN та ІЛ-4 протягом 3 діб та стимульованих ІЛ-4 протягом 7 діб порівняно з особами з нормальною масою.

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 ІЛ-6 макрофагами, стимульованими LPS та  $\gamma$ IFN осіб з ожирінням порівняно з особами з нормальною масою та формування негативного зв'язку секреції ІЛ-6 та експресії SIRT1 у клітинах, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN ( $r = -0,838$ ,  $p = 0,013$ ).

Вперше показано достовірне збільшення рівня ІЛ-10 у супернатантах клітин, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN у осіб з ожирінням І ступеня у порівнянні з групою з нормальною масою та зниження в супернатантах клітин, стимульованих ІЛ-4 у осіб з підвищеною масою у порівнянні з особами з нормальною масою тіла.

Вперше продемонстровано формування зв'язків між експресією *stat1* і *stat6* у клітинах, стимульованих LPS та  $\gamma$ IFN та рівнем вчСРБ та TGF $\beta$ 1 у сироватці у осіб із різною масою тіла.

Доповнені дані стосовно розвитку недостатності функціональних можливостей серцево-судинної системи із збільшенням маси тіла на основі достовірного підвищення показника індексу Робінсона у осіб чоловічої статі з підвищеною масою тіла та у осіб з ожирінням І ступеня обох статей.

Отримані додаткові дані стосовно зниження якості життя зі збільшенням маси тіла з особливо значним зниженням показників рольового фізичного функціонування, рольового емоційного функціонування та психічного здоров'я

у осіб жіночої статі, показників рольового фізичного функціонування, життєздатності та рольового емоційного функціонування у осіб чоловічої статі.

Отримали подальшого розвитку дані про наявність порушень харчової поведінки у осіб з нормальною, підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня обох статей та формування взаємозв'язків між показниками типів порушень харчової поведінки та антропометричними показниками у осіб з нормальною, підвищеною масою та ожирінням I ступеня обох статей.

Отримані додаткові дані, які свідчать що енергетична цінність харчового раціону осіб із підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня обох статей достовірно перевищує енергетичну цінність раціону осіб контрольної групи та сприяє формуванню позитивного енергетичного балансу між рекомендованим добовим споживанням енергії та енергетичною цінністю харчового раціону.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

Результати роботи поглиблюють знання та обґрунтовують розуміння регуляторної ролі  $\text{NAD}^+$ -залежної деацетилази SIRT1 у поляризації M1/M2 моноцитів/макрофагів у осіб з нормальною, підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня.

Отримані новітні дані стосовно залежності рівня експресії SIRT1, STAT1 та STAT6 в моноцитах/макрофагах периферичної крові, які знаходяться на різних етапах активації від маси тіла доповнюють знання стосовно механізмів поляризації та розвитку низькоінтенсивного системного запалення при підвищенні маси тіла та ожирінні. Визначення даних показників є можливим раннім діагностичним критерієм виявлення процесів прекодиціювання моноцитів з формуванням про- або протизапального фенотипу.

Визначення рівня експресії  $\text{NAD}^+$ -залежної деацетилази SIRT1 дозволить визначити групи ризику розвитку підвищеної маси тіла та ожиріння у молодих осіб та прогнозувати схильність до формування підвищеної маси тіла та ожиріння, та може бути основою розробки засобів терапії, опосередкованої моделюванням поляризаційного статусу макрофагів.



**Ключові слова:** моноцити, макрофаги, поляризація макрофагів, NAD<sup>+</sup>-залежна деацетилаза SIRT1, ядерні фактори транскрипції STAT1, STAT6, підвищена маса тіла, ожиріння I ступеня.

## SUMMARY

Kolinko L. M. The role of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 in M1/M2 monocyte/macrophage polarization in individuals with different body mass. – *Qualification research work (manuscript)*.

Dissertation for a Doctor of Philosophy Degree, Specialty 091 “Biology” (03.00.13 – Human and Animal Physiology). – Poltava State Medical University, the Ministry of Health of Ukraine, Poltava, 2021.

This dissertation presents a theoretical generalization and contributes to solving one of pressing scientific issues that consists in determining the regulatory role of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 in M1/M2 monocyte/macrophage polarization under physiological conditions and under the increased nutrient intake in overweight individuals and individuals having class I obesity.

Macrophages are known as central mediators of obesity-induced inflammation in adipose tissue. Depending on the microenvironment, macrophages can acquire both the classical M1 phenotype activation and alternative M2 activation. Analysis of the recent data suggests a more complex scenario where the spectrum of macrophage states exceeds the polarization only by M1/M2 phenotypes, and, in particular, in obesity and type 2 diabetes that requires further in-depth research. Increased body weight and obesity result from an energy imbalance between the calories a person consumes and expends. Among the factors that can affect the energy imbalance there are SIRT1-7 sirtuin family members. For instance, SIRT1, by impacting the macrophage polarization, can control the suppression of the M1 subpopulation, thus, stimulating the M2 macrophage activation, and influence the regulation of adipose tissue inflammation in response to inducers including fatty acids, hypoxia, and endoplasmic reticulum stress. Therefore, the question has been raised about how the change in the activity of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 mediates the change in the direction of

monocyte/macrophage polarization towards the pro- or anti-inflammatory phenotype under the conditions of normal and increased nutrient intake.

The study involved 96 people aged from 18 to 25 years. According to the study design, at the first stage, anthropometric measurements, functional investigation, and surveys were carried out.

At the second stage, *in vitro* experiments, peripheral blood monocytes were isolated and cultured. Monocyte stimulation was performed with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) and  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ IFN) to induce M1 phenotype polarization, and by interleukin-4 (IL-4) to induce M2 phenotype polarization. Determination of *sirt1*, *stat1*, *stat6* gene expression was performed on the 3rd and 7th days of cell incubation by polymerase chain reaction in real time; the IL-6, IL-10 concentrations was detected from cell supernatant, serum highly sensitive c-reactive protein (hsCRP) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Anthropometric measurements at the first stage of the study demonstrated significantly higher rates of body weight, BMI (body mass index), waist circumference (WC), hip circumference (HC) in both male and female participants with overweight and class I obesity compared with the control group ( $p < 0,05$ ). The waist/hip circumference ratio was by 10.13% higher in men with class I obesity compared with the controls ( $p < 0.05$ ). In overweight males, the body fat percentage was by 76.85% higher compared with the control; the body fat percentage in the males with class I obesity was by 112.77% significantly higher than in the control group. In overweight women and those with class I obesity, these values were by 56.35% and 74.57% higher respectively, compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

The SF-36 (Outcomes Study 36 Item Short Form Health Status) survey findings pointed out a decrease in the quality of life with the increase in body weight. A particularly considerable fall in role physical and role emotional wellbeing, deterioration of mental health was observed in the female individuals; the male participants showed the similar patterns, including fading viability ( $p < 0.05$ ). The data

obtained are confirmed by the reliable correlations of medium strength between quality of life indicators and anthropometric measurements.

Cardiovascular parameters including heart rate (HR), systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), and mean arterial pressure (MAP) in the individuals with class I obesity of both sexes at rest were significantly higher compared to the control group. After the exercise test, there was a significant increase in the HR, SAP and MAP in overweight men, while overweight women were found as having increased heart rate only. The subjects of both sexes with obesity had increased HR, SAP and MAP; nevertheless, elevated DAP was registered in the women only, and increased pulse pressure (PP) was registered in the men ( $p < 0.05$ ).

The Robinson index was significantly higher in the overweight men by 13.88%, and by 19.17% in the men with class I obesity; this index in the female individuals with obesity was higher by 16.90% compared with controls that suggests the lack of cardiovascular functionality.

The results obtained have shown that the actual energy consumption of overweight individuals or those having class I obesity exceeds the daily based on the ratio between the level of basal metabolism and the coefficient of physical activity. The energy value of the diet for the overweight men on workdays was by 16.02% higher, and by 26.47% higher over weekends compared to the recommended daily energy intake. The energy value of the diet for the men with obesity significantly exceeds the recommended daily energy intake by 20.09% on workdays, and by 33.92% over weekend. In the overweight women, the energy value of the diet over weekend significantly exceeded the daily energy consumption and was by 24.46% higher; the energy intake in the women with class I obesity was by 10.48% higher on workdays, and by 37.28% higher over weekend compared to the recommended energy values.

According to the DEBQ and TFEQ-R18 questionnaires, eating disorders were observed in both sexes of all groups. According to DEBQ, the restrictive type was predominant in the males and females with class I obesity. The rate of emotional type in the males with class I obesity was by 26.03% lower than in the control group. The

similar findings demonstrating the changes in eating behaviour were obtained from the TFEQ-R18 questionnaire.

At the second stage, the expression of SIRT1, transcription factors of signal transducers and activators of transcription 1 and 6 (STAT1, STAT6) in monocytes/macrophages of peripheral blood of the subjects were studied.

The level of *sirt1* gene expression in IL-4-stimulated cells was higher in all study groups. The maximum value of the *sirt1* gene expression was found out in the individuals with class I obesity under the cell stimulation with IL-4  $1.084 (0.574 - 5.650) 2^{-\Delta Ct}$ , and  $0.877 (0.819 - 1.650) 2^{-\Delta Ct}$ , respectively after 3 and 7 days of incubation. There has been revealed the positive correlations between the level of the *sirt1* gene expression after the 3 and 7 day incubation in the individuals with normal body weight in IL-4-stimulated cells, as well as in the overweight individuals and those with obesity in the cells stimulated with LPS, and with  $\gamma$ IFN and IL-4.

The *stat6* gene was maximally expressed in the LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells of the individuals with normal body weight, and in the IL-4-stimulated cells of the overweight individuals and those having obesity. When compared between the groups, a significantly higher *stat6* expression was detected in the individuals with obesity in unstimulated cells and in macrophages stimulated by M1 and M2 after 3 days and by M2 after 7 days. The highest growth in *stat6* expression, as well as in *sirt1* expression, occurred under the IL-4 stimulation. Positive high- and medium-strength correlation for IL-4-stimulated cells was found between *sirt1* and *stat6* expression that confirming the regulatory effect of SIRT1 and promoting polarization toward M2 phenotype formation in peripheral blood monocytes of overweight and obese individuals that is determined by enhancing the *stat6* gene expression.

The lowest values of the ratio between *stat1/stat6* were determined in the individuals with class I obesity in the cells stimulated with LPS, and with  $\gamma$ IFN and IL-4 after 3 days. The value of *stat1/stat6* in the in IL-4-stimulated cells of obese individuals after 7 days was significantly lower than in the individuals with normal body weight.

According to our findings, in the supernatants of LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells of the obese individuals there were significantly higher IL-6 levels compared with the individuals with normal body weight. Correlation analysis showed a negative association between IL-6 secretion and SIRT1 expression in LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells ( $r = -0.838$ ,  $p = 0.013$ ).

There has been found a significant increase in IL-10 production by LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells in the obese individuals compared to the normal weight group and a decrease in IL-4-stimulated cells in overweight individuals compared to the normal weight individuals.

The level of blood serum HSCRP in the individuals with class I obesity significantly exceeded this values of the normal body weight and overweight individuals. In the individuals with obesity, the TGF $\beta$ 1 level was significantly higher by 82.19% compared to the normal body weight individuals, and by 46.36% higher compared to the overweight individuals. Correlation analysis demonstrated a positive relationship between *stat1* expression in LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells and serum HSCRP ( $r = 0.673$ ,  $p = 0.039$ ) in the overweight individuals; positive correlation between *stat6* expression in LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells after 7 days and serum TGF $\beta$ 1 ( $r = 0.685$ ,  $p = 0.035$ ) in the obese individuals as opposed to the negative *stat1* correlation between LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells after 7 days and serum TGF $\beta$ 1 ( $r = -0,640$ ,  $p = 0,026$ ) in the subjects with normal body weight.

The results obtained suggest that in peripheral blood monocytes of the overweight individuals and those having obesity, SIRT1 implements a regulatory role mediated by the signalling cascade of STAT6 transcription factor with directing the polarization towards the anti-inflammatory phenotype. Significantly higher levels of *sirt1* gene expression in unstimulated cells, under stimulation conditions, and its increase during the incubation period indicate a possible preconditioning of peripheral blood monocytes that counteracts the formation of pro-inflammatory phenotype before monocyte recruiting into adipose tissue. This effect occurs in the overweight people and those with mild obesity, who have no signs of metabolic pathology in the presence of minor significant changes in systemic inflammation markers. Identifying the

elements involved and impacting the results of signal transduction is of great importance not only for better understanding the basic principles of macrophage functioning, but also for developing therapies mediated by modelling the polarization macrophage status.

### **Scientific novelty of the results obtained.**

This study has yielded the number of important new findings. The study is the first to have determined the regulatory role of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 in the polarization of M1/M2 monocytes/macrophages in the individuals with normal body weight, overweight and those having class I obesity. It has been the first attempt to investigate the expression level of SIRT1, STAT1 and STAT6 in peripheral blood monocytes/macrophages at different stages of activation depending on body weight.

The dissertation has revealed a significantly higher level of *sirt1* gene expression in IL-4-stimulated cells compared to LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells in all study groups as well as demonstrated an increase in the *sirt1* gene expression level depending on the body weight gaining. The highest values of *sirt1* gene expression are found in the IL-4-stimulated cells of the individuals with class I obesity.

Recent data on the increase in the expression level of the *sirt1* gene in the dynamics of cell incubation with the formation of positive correlations between the expression level during incubation 3 and 7 days in individuals with normal body weight in IL-4-stimulated cells, in individuals with increased weight and obesity I degree, also in LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells.

This research is the first to have demonstrated the *stat6* gene is expressed at the highest level in the LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells of the people with normal body weight, and in the IL-4-stimulated cells of the overweight people and those with obesity. When compared between the groups, a significantly higher level of *stat6* expression has been found in the unstimulated cells and in LPS- and  $\gamma$ IFN-, and IL-4-stimulated macrophages after 3 days and in IL-4-stimulated macrophages after 7 days in the individuals with obesity.

For the first time, the highest *stat6* and *sirt1* expression has been revealed in the IL-4-stimulated macrophages. There has been found out a positive high- and medium-strength correlation for IL-4-stimulated cells between *sirt1* and *stat6* expression.

Significantly lower *stat1/stat6* ratios have been first discovered in the LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells and IL-4-stimulated cells after for 3 days and in the IL-4-stimulated cells after 7 days in the individuals with class I obesity compared to the normal weight subjects.

This research has clearly shown that in overweight people and those with obesity, the changes in the SIRT1 expression mediate the changes in the balance between the expression of nuclear transcription factors STAT1 and STAT6 in monocytes and macrophages towards the formation of anti-inflammatory M2 phenotype.

This study represents new data on significantly higher IL-6 production by LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated macrophages in the obese individuals compared to normal-weight individuals, and on the formation of a negative correlation between IL-6 secretion and SIRT1 expression in LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells ( $r = -0.838$ ,  $p = 0.013$ ).

The research has been the first demonstrated a significant increase in IL-10 level in supernatants of the LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells in the people with class I obesity compared to the normal weight group, and a decrease in supernatants of the IL-4-stimulated cell in the overweight subjects compared to normal weight individuals.

The results obtained demonstrate the correlation between *stat1* and *stat6* expression in LPS- and  $\gamma$ IFN-stimulated cells and HSCRP and TGF $\beta$ 1 levels in individuals of different body weights.

This study provides the additional data on the development of cardiovascular functional capacity deterioration parallel to weight gaining that is supported by the significant increase in the Robinson's index values in the overweight male individuals and in the people of both sexes with class I obesity. This dissertation also provides some data on declining the quality of life with increasing body weight with particularly significant reductions in role physical functioning, role emotional functioning and

mental health in the female individuals, and indicators of role physical functioning, viability, and role emotional functioning in the male subjects.

The dissertation has broadened the knowledge about the presence of eating disorders in normal body weight people, overweight people and those with class I obesity of both sexes and the formation of relationships between indicators of types of eating disorders and anthropometric parameters in people of both sexes with normal weight, overweight, and class I obesity.

This study provides the additional data showing the energy value of the diet for overweight people and those with class I obesity of both sexes significantly exceeds the energy value of the diet for control groups, and thus, contributes to the formation of a positive energy balance between recommended daily energy intake and energy value of the diet.

#### **The practical significance of the results obtained.**

The results obtained add substantially providing strong evidence, to better understanding of the regulatory role of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 in the M1/M2 monocytes/macrophages polarization in the individuals with normal body weight, overweight and class I obesity.

New data obtained on the dependence of the expression of SIRT1, STAT1 and STAT6 in peripheral blood monocytes/macrophages, which are at different stages of activation on body weight, contribute to the knowledge of the mechanisms of polarization and the development of low-grade systemic inflammation associated with weight gaining and obesity. Determination of these indicators can be used early diagnostic criterion for detecting the processes of monocyte preconditioning with the further formation of pro- or anti-inflammatory phenotype.

Determining the expression of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 enables to identify risk groups for overweight and obesity in young people and to predict the predisposition to overweight and obesity, moreover, it can serve as a basis for the elaboration of therapies mediated by modelling the polarization status of macrophages.



**Key words:** monocytes, macrophages, macrophage polarization, NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1, nuclear transcription factors STAT1, STAT6, weight gain, class I obesity.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Дослідження якості життя молодих осіб з різною масою тіла. Вісник проблем біології та медицини. 2019;4(153):366–372. *(Здобувачем проведені аналіз літературних джерел, антропометричні вимірювання, оцінка карт спостережень, опитування, статистична обробка даних, підготовка статті до друку).*
2. Колінько ЛМ. Зміни харчової поведінки у молодих осіб із різної масою тіла. [Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії](#). 2020;2(70):138-144.
3. Kolinko LM, Vesnina LE. Energy value of dietary intake and its conformity to daily needs in young people. Світ медицини та біології. 2020;2(72):165-170. *(Здобувачем проведені опитування, розрахунок показників, статистична обробка даних, підготовка статті до друку).*
4. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Функціональний стан серцево-судинної системи у молодих осіб із різною масою тіла. Вісник проблем біології та медицини. 2020;4(158):389–394. *(Здобувачем проведені визначення показників серцево-судинної системи, розрахунок показників, статистична обробка даних, підготовка статті до друку).*
5. Kolinko L, Shlykova O, Izmailova O, Vesnina L, Kaidashev I. SIRT1 contributes to polarization of peripheral blood monocytes by increasing stat6 expression in young people with overweight and low-risk obesity. Georgian Med News. 2021;4(313):102–112. *(Здобувачем проведені виконання експериментальної частини, аналіз даних лабораторних досліджень, статистична обробка, підготовка статті до друку).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Весніна ЛЕ, Боряк ХР, Колінько ЛМ. Вплив підвищеної маси тіла на якість життя у молодих осіб. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених «Медична наука – 2018»; 2018 лист. 16; Полтава. Полтава: УМСА; 2018, с. 43. *(Здобувачем проведені антропометричні вимірювання, опитування, статистична обробка даних, оформлення тексту публікації).*
7. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Дослідження відповідності енергетичної цінності харчового раціону молодих осіб потребам в енергії. XV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса; 2019 квіт. 9–11; Львів. Львів; 2019, с. 152–153. *(Здобувачем проведені опитування, розрахунок показників, статистична обробка даних, оформлення тексту публікації).*
8. Колінько ЛМ, Соколенко ВМ, Весніна ЛЕ. Зміни показників якості життя у молодих осіб в залежності від маси тіла. Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка. Фізіологічний журнал. Київ. 2019;3 (65):94–95. *(Здобувачем проведені антропометричні вимірювання, опитування, статистична обробка даних, оформлення тексту публікації).*
9. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Визначення частки жиру в організмі молодих осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня. Матеріали XVII з'їзду Всеукраїнського Лікарського Товариства з міжнародною участю. 2019 лист. 14–16; Полтава. Полтава: УМСА; 2019, с. 193. *(Здобувачем проведені антропометричні вимірювання, розрахунок показників, статистична обробка даних, оформлення тексту публікації).*
10. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Особливості харчової поведінки у молодих осіб із різною масою тіла Матеріали Всеукраїнської конференції з міжнародною участю. Медико-біологічні аспекти та мультидисциплінарна

- інтеграція в концепції здоров'я людини; 2020 квіт. 9–11; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2020, с. 98–99. *(Здобувачем проведені опитування, статистична обробка даних, оформлення тексту публікації)*).
11. Колінько ЛМ. Вплив підвищеної маси тіла та ожиріння на стан серцево-судинної системи та енергетичний потенціал. Матеріали V міжнародної наукової конференції. Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології; 2020 жовт. 1-2; Дніпро. Дніпро: «Ліра»; 2020, с. 48-49.
  12. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Взаємозв'язок антропометричних показників з показниками функціонального стану серцево-судинної системи у осіб із різною масою тіла. Матеріали XIV всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»; 2020 лист. 20; Запоріжжя. Запоріжжя; 2020, с. 94-95. *(Здобувачем проведені розрахунок та аналіз показників, статистична обробка даних, оформлення тексту публікації)*).
  13. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Взаємозв'язок показників енергетичної цінності харчового раціону та функціонального стану серцево-судинної системи у осіб з різною масою тіла. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю до Всесвітнього дня здоров'я 2021 р. Клінічна та профілактична медицина. 2021;1(15):103. *(Здобувачем проведені розрахунок та аналіз показників, статистична обробка даних)*).
  14. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Особливості експресії *sirt1* в моноцитах/макрофагах периферичної крові осіб із різною масою тіла. Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів; 2021 квіт. 9–11; Львів. Львів: ТОВ «Ромус-поліграф»; 2021, с. 207–208. *(Здобувачем проведені виконання експериментальної частини, аналіз даних лабораторних досліджень статистична обробка, оформлення тексту публікації)*).
  15. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Особливості продукції цитокінів моноцитами/макрофагами периферичної крові осіб із різною масою тіла.

Матеріали III науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»; 2021 трав. 12; Харків. Харків: НФаУ; 2021, с. 95. *(Здобувачем проведені виконання експериментальної частини, аналіз даних лабораторних досліджень, статистична обробка, оформлення тексту публікації).*

16. Колінько ЛМ, Весніна ЛЕ. Експресія *stat1* та *stat6* в моноцитах/макрофагах молодих осіб із різною масою тіла. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 140-річчю з дня народження академіка О. О. Богомольця; 2021 трав. 21; Київ. Київ: НМУ імені О.О. Богомольця; 2021, с. 110. *(Здобувачем проведені виконання експериментальної частини, аналіз даних лабораторних досліджень, статистична обробка, оформлення тексту публікації).*