

**Голові спеціалізованої вченої ради
ДФ 44.601.033 у Полтавському державному медичному університеті
доктору біологічних наук, професору,
завідувачу кафедри клінічної анатомії і оперативної хірургії
Білашу Сергію Михайловичу**

ВІДГУК

**офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора, завідувача
кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка**

Сківки Лариси Михайлівни

**на дисертацію Колінько Людмили Михайлівни на тему: «Роль NAD^+ -
залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів у
осіб із різною масою тіла», подану до захисту на здобуття ступеня доктора
філософії за спеціальністю 091-Біологія**

Актуальність обраної теми дисертації

Метаболічна пластичність фагоцитів є одним з основних механізмів, залучених в ініціацію і резолюцію локальних і тканинних, асептичних та інфекційних запальних процесів. Зважаючи на той факт, що запалення є важливим компонентом патофізіології багатьох захворювань, поляризована активація фагоцитів розглядається як перспективна мішень для таргетного контролю перебігу запальних процесів як деструктивного, так і репаративного характеру у профілактиці та лікуванні запальних хвороб. Ожиріння – один з патологічних станів, ключовим компонентом патофізіології якого є метазапалення. Епідемічний характер поширення ожиріння та його виключна роль у розвитку серцево-судинної патології, діабету, онкологічної патології та багатьох інших захворювань ставлять його у розряд важливих медико-соціальних проблем, вивчення яких є прерогативним медико-біологічним науковим напрямком. Розробка методів профілактики і лікування ожиріння потребує глибокого знання молекулярних механізмів цього патологічного стану, у т.ч. тригерних чинників та сигнальних шляхів, залучених у поляризовану

активацію фагоцитів у структурі асоційованого з надмірною вагою метазапалення. Сиртуїни - NAD⁺-залежні епігенетичні та метаболічні регулятори – відіграють важливу роль у підтримці клітинного гомеостазу, виконуючи роль біоенергетичних сенсорів. Згідно численних літературних даних, розвиток запалення послідовно пов'язує імунні, метаболічні та мітохондріальні біоенергетичні мережі, у яких сиртуїни виступають важливими біорегуляторами. Гострі/хронічні запальні процеси пов'язані зі зміненим гліколізмом і окисненням жирних кислот, принаймні частково, через NAD⁺-залежну функцію сиртуїнів. Зсув балансу між анаболічним гліколізмом і окисненням жирних кислот лежить в основі метаболічної пластичності фагоцитів. Біоенергетика поляризованої активації фагоцитів може розглядатися як перспективна мішень для контролю цього процесу, а сиртуїни – як новий клас спрямованих регуляторів запалення та імунітету. Саме цим важливим питанням присвячена дисертаційна робота Людмили Михайлівни Колінко і саме вони визначають високий ступінь її актуальності за теоретичними і практичними аспектами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана на базі Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Полтавського державного медичного університету в рамках науково-дослідних робіт за темами: «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.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність

Результати дисертаційного дослідження Л.М. Колінько є достовірними та об'єктивними. На основі всебічного аналізу літературних даних за обраною проблематикою дисертанткою логічно визначено основні етапи роботи, згруповані у дві частини. Перша частина, присвячена всебічному аналізу біоенергетичного статусу осіб з нормальною і підвищеною масою тіла, включала: дослідження взаємозв'язку між антропометричними показниками та психофізіологічними константами, що характеризують якість життя, у осіб з нормальною та надмірною вагою; вивчення особливостей функціонування серцево-судинної системи у осіб з підвищеною вагою порівняно з учасниками дослідження з нормальними ваговими показниками і відсутністю ожиріння; аналіз відповідності енергетичної цінності добового раціону харчування у осіб з нормальною та надмірною вагою розрахунковим енергетичним потребам організму; порівняльне дослідження випадків та патернів порушень харчової поведінки у осіб з нормальним та порушеним біоенергетичним статусом. Друга частина, присвячена дослідженню особливостей регуляторної ролі SIRT1 у процесах поляризованої активації фагоцитів осіб з нормальним та порушеним біоенергетичним статусом, включала: порівняльну оцінку конститутивної та стимульованої експресії генів *sirt1* та регульованих нею транскрипційних факторів *stat1* та *stat6* в умовах індукованої поляризованої активації *in vitro* мононуклеарних фагоцитів периферичної крові осіб з нормальною та надмірною вагою; дослідження цитокінового профілю мононуклеарних фагоцитів периферичної крові в умовах поляризованої активації *in vitro* у осіб з різними аліментарними характеристиками, а також сироваткових рівнів маркерних молекул системного запалення у осіб з нормальною та надмірною вагою. Комплексні методологічні підходи дозволили авторці вичерпно реалізувати поставлені мету та завдання дисертаційного дослідження: встановити відмітні характеристики поляризованої активації мононуклеарних фагоцитів периферичної крові *in vitro* в залежності від особливостей енергетичного статусу організму, а також провести порівняльне дослідження патернів залучення SIRT1 та регульованих нею транскрипційних факторів STAT1 і STAT6, котрі є

ключовими компонентами сигнальних шляхів, які визначають класичну та альтернативну метаболічну поляризацію фагоцитів, у осіб з нормальною та надмірною вагою. Статистична обробка та математичний аналіз отриманих результатів проведені з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням.

Слід зазначити, що результати дисертаційного дослідження Людмили Михайлівни Колінько узгоджуються з даними зарубіжних дослідницьких груп, які працюють у науковому напрямку, що вивчається. В оглядовій роботі Patricia S. Pardo та Aladin M. Boriek (Медичний коледж Бейлора, Х'юстон, США), опублікованій у 2020 р., яка узагальнює сучасні експериментальні дані і клінічні спостереження щодо ролі сиртуїнів, зокрема SIRT1, у патофізіології метазапалення, асоційованого з інфламейджингом і розвитком ожиріння, підкреслюється різноплановість порушення кількісних та функціональних показників цього епігенетичного регулятора біоенергетичних процесів у клітині, у т.ч. конститутивна надекспресія гену *sirt1* в умовах підвищеного рівня пластичних і енергетичних ресурсів, описана у роботі здобувачки. У роботі So Youn Park et al., 2018 (Департамент медицини Пусанського національного університету, Південна Корея) на прикладі експериментальної моделі ревматоїдного артриту переконливо доводиться перспективність терапевтичного впливу на активацію сиртуїнів з метою контролю метазапалення. Привабливість SIRT1 як мішені для терапевтичного впливу з метою контролю запального компоненту засвідчена у публікаціях, присвячених розробці методології таргетного лікування серцево-судинної патології, метаболічного синдрому, деяких автоімунних хвороб тощо. У публікаціях кількох наукових груп (Shintaro Yamaguchi et al., 2019, Медична школа Вашингтонського університету, Сент-Луїс, Міссурі, США; Borut Poljsak et al., 2019, Люблянський університет, Словачія; Prashant Regmi et al., 2018, Університет Аделаїди, Австралія та ін.) підкреслюється важливість і недослідженість таймінгу регуляторного впливу SIRT1 на сигнальні шляхи фагоцитів і фібробластів, асоційовані зі стресовими

впливами, у т.ч. й за дії прозапальних чинників, які стали одним з аспектів дисертаційного дослідження Л.М.Колінько.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи

У дисертаційній роботі Л.М. Колінько дістав подальшого розвитку науковий напрямок, присвячений вивченню ролі епігенетичного та метаболічного регулятора SIRT1 у поляризованій активації моноклеарних фагоцитів – важливих ефektorних клітин локальних і системних запальних процесів. Розширено існуючі уявлення стосовно надекспресії SIRT1, асоційованої з ожирінням – показано, що не лише ожиріння, а й надмірна вага асоційовані з надекспресією гену цього сиртуїну, встановлено феномен як конститутивної, так і індукованої цитокінами та агоністом патерн-розпзнавальних рецепторів надекспресії SIRT1 в умовах підвищеного надходження енергоресурсів. Виявлено відмінності у характері поляризованої активації моноклеарних фагоцитів периферичної крові *in vitro* за умов дії традиційних тригерів їх класичного та альтернативного метаболічного зсуву у осіб з нормальним та порушеним біоенергетичним статусом.

Важливим аспектом новизни дисертаційного дослідження Л.М.Колінько, котрий заслуговує гідної оцінки, є виявлений феномен підвищеного синтезу прозапального цитокіну – інтерлейкіну 6 – моноклеарними фагоцитами осіб з ожирінням в умовах дії активаторів класичної метаболічної поляризації на тлі надекспресії у цих клітинах SIRT1. Це є переконливим доказом на користь одного з гіпотетичних механізмів метазапалення, асоційованого з розвитком ожиріння, який наразі широко дискутується в літературі: порушення функцій SIRT1 на тлі її підвищеної експресії. Доказове встановлення цього феномену авторкою окреслює напрямки дослідження його молекулярних механізмів, у першу чергу, можливість посттрансляційних модифікацій, тригери яких доцільно шукати серед медіаторів порушення енергетичного обміну, у т.ч. й тих, що з'являються н початкових стадіях розвитку ожиріння. Сдячи з результатів

дисертаційної роботи, не виключена також наявність негативного дозозалежного взаємозв'язку між активністю (функцією) SIRT1 і рівнем надходження (NAD⁺).

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів дисертаційної роботи

Прерогативним є теоретичне значення результатів дисертаційного дослідження Л.М.Колінько, оскільки авторкою надано експериментальні докази для розшифрування одного з важливих механізмів розвитку метазапалення, пов'язаного з розладами системи сиртуїнів, у т.ч. у сигналінгу поляризованої активації фагоцитів – порушення їх функцій на тлі конститутивної та індукованої надекспресії. Виявлений феномен має важливе фундаментальне значення, зважаючи на виключну медико-соціальну значимість патологічних станів, асоційованих з метазапаленням: інфламейджингу та ожиріння.

Практична значимість матеріалів дисертаційної роботи полягає, у першу чергу, у можливості їх використання у навчальному процесі здобувачів вищої освіти освітнього ступеня магістр та доктор філософії у структурі дисциплін імунологічного, біохімічного та молекулярно-біологічного профілю. Крім того, результати дисертаційного дослідження обґрунтовують перспективність розробки засобів і методології контролю метазапалення, мішенню яких є SIRT1.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях

Основні положення та висновки дисертації Л.М. Колінько оприлюднені на одинадцяти всеукраїнських фахових наукових та науково-практичних форумах, у тому числі й з міжнародною участю, а також опубліковані у п'яти фахових періодичних виданнях біомедичного профілю, у тому числі у часописі, що індексується міжнародною наукометричною базою даних SCOPUS.

Оцінка змісту дисертації

Дисертація Людмили Михайлівни Колінько побудована за загальноприйнятою схемою. Робота викладена на 191 сторінці друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, двох рубрифікованих розділів результатів власних досліджень, їх

аналізу та узагальнення, висновків, списку цитованої літератури, що налічує 252 посилання, більшість яких датовані останніми десятима роками, та додатків. Опис та узагальнення результатів власних досліджень у роботі вичерпно проілюстровані 28 рисунками та 17 таблицями, що значно полегшує сприйняття матеріалу. Структура дисертації повністю відповідає окресленим меті і завданням дослідження. Аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушення авторкою вимог академічної доброчесності.

Анотація не містить інформації, яка була б відсутньою у рукописі дисертації. Анотацію та текст рукопису дисертації оформлено відповідно до вимог діючого Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167. Дисертаційне дослідження Л.М. Колінько містить посилання на згадані авторкою у тексті джерела інформації у разі цитування ідей, розробок, тверджень, відомостей. Авторкою дотримано вимоги норм законодавства про авторське право: надано повну і достовірну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методики досліджень.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації

У процесі ознайомлення з дисертацією у порядку дискусії до авторки виникли деякі зауваження і запитання.

Зауваження:

1. Формулювання положень наукової новизни дисертаційної роботи перевантажене другорядними деталями, що істотно ускладнює сприйняття квінтесенції написаного.
2. У методичній частині не зазначено чіткі критерії виключення для формування груп обстежених осіб.
3. У методичній частині або у додатках до неї варто було деталізувати критерії, за якими учасники дослідження були віднесені до однієї групи фізичної активності з КФА 1,4 (сфера зайнятості, наприклад).
4. У підрозділі методичного розділу, що стосується виділення і культивування фагоцитів, бракує багатьох важливих деталей: не зазначено компонент

середовища культивування первинної культури моноцитів, який забезпечував диференціювання клітин на макрофаги; відсутній опис повного складу середовища культивування, зокрема перелік і концентрація антибіотиків, джерело ростових факторів і його частка у складі середовища; відсутні назва і виробник приладу для культивування клітин; відсутня вказівка на те, який рівень життєздатності клітин у культурі вважали задовільним і прийнятним для проведення подальших досліджень.

5. Інформацію стосовно сироваткового рівня медіаторів системного метазапалення vCPRB та $\text{TGF}\beta 1$ в учасників дослідження доцільно було надати перед розділом, що стосується вивчення функціональної поляризації фагоцитів, а не після нього, оскільки зазначені біологічно активні медіатори можуть виконувати функцію праймування метаболізму циркулюючих фагоцитів.
6. Дослідження деяких кореляційних зв'язків у роботі є не зовсім обґрунтованим. Наприклад, рисунки 3.3.1 та 3.3.2, що відображають взаємозв'язки між показниками основного обміну і рекомендованого добового споживання енергії з одного боку та масою тіла у жінок - з іншого, фактично ілюструють правильність розрахунку авторами рекомендованого добового споживання енергії і є неінформативними.
7. До складу груп обстеження авторкою обґрунтовано включено осіб різної статі, зважаючи на статеву диверсифікацію як процесу ожиріння, так і імунної реактивності. Однак, аналіз отриманих даних у контексті статевої диверсифікації є фрагментарним і частіше зводиться до констатації фактів.
8. У розділі аналізу та узагальнення результатів фігурує обговорення деяких елементів особливостей харчового раціону учасників дослідження, які не описані детально у розділі результатів.

Запитання:

1. Який метод рандомізації застосовували при формуванні груп обстежених осіб?

2. За якими морфологічними критеріями верифікували диференціювання моноцитів на макрофаги?
3. Рис.3.3.5 – у яких одиницях вимірювали «показниками загальної кількості спожитих продуктів» і наскільки придатний такий показник для дослідження кореляційного зв'язку між ним та показниками артеріального тиску?

Усі висловлені зауваження стосуються переважно стилістики рукопису, не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Колінько Людмили Михайлівни на тему: «Роль NAD^+ -залежної деацетилази SIRT1 в M1/M2 поляризації моноцитів/макрофагів у осіб із різною масою тіла» є самостійним, завершеним науковим дослідженням, результати якого забезпечують розв'язання актуального наукового завдання в галузі науки 09 Біологія: встановлення характеру порушення регуляторної ролі SIRT1 у процесах поляризованої активації моноклеарних фагоцитів периферичної крові в умовах підвищеного надходження поживних речовин у осіб з підвищеною масою тіла та ожирінням I ступеня.

Дисертаційна робота Л.М.Колінько відповідає спеціальності 091-Біологія та вимогам Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167, а її авторка Людмила Михайлівна Колінько заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, професор

Лариса СКІВКА

ПІСЬМО
ВЧЕРНІ
КАРАУЛЬНИК Н.В.
10.01.2021р

