

## О Т З Ы В

### ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Мелконяна Артура Мушеговича на тему: “Сдвиги микрофлоры кишечника и метаболизма L-аргинина в лейкоцитах больных сахарного диабета первого типа”, представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.00.03 – “Внутренние болезни”.

Сахарный диабет 1 типа (СД 1 типа) является одним из самых распространенных аутоиммунных эндокринных заболеваний среди детей и подростков. В основе болезни – аутоиммунная деструкция  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, приводящая к абсолютной инсулиновой недостаточности. СД1 типа – это иммунологически опосредованное заболевание, развивающееся у генетически предрасположенных лиц. Доказана роль факторов внешней среды [инфекции – врожденная краснуха, энтеровирусная инфекция в Скандинавии, ротавирусная инфекция] в значительном повышении риска развития СД1 типа.

Была высказана гипотеза о том, что раннее введение коровьего молока увеличивает риск развития СД1 типа. Экспериментальные исследования молочной смеси без добавления коровьего молока показали, что данная ограниченная диета может снижать количество цитоплазматических аутоантител к островковым клеткам. Более того, исследования в Германии указывают на то, что раннее (< 3 месяцев) введение в рацион злаков может увеличить аутоиммунные реакции против островковых клеток.

В этом смысле изучение сдвигов микрофлоры кишечника и его влияние на иммунный ответ, представляют, без сомнения, научно-практический интерес.

Изложенные выше соображения доказывают актуальность диссертационного исследования.

Название темы соответствует выполненному исследованию. Цель – изложена ясно и обоснованно. Задачи исследования – сформулированы в последовательном соответствии с целью работы.

Диссертация изложена в традиционном, классическом стиле. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов. Список литературы

состоит из 187 источников на армянском, русском и английском языках. Объем компьютерного текста составляет 107 страниц, 8 таблиц, 16 рисунков, приложения.

В главе I – обзор литературы – дается подробное описание состояния вопроса на момент выполнения исследования. Объем материала главы I составляет четверть общего компьютерного текста работы.

Изложены современные представления патогенеза СД1 типа.

Самым подробным образом изложена концепция сдвигов микрофлоры кишечника в патогенезе болезни.

Приводятся данные литературы, касающиеся состояния микрофлоры кишечника, начиная с рождения.

Особый акцент сделан на влияние сдвигов микрофлоры кишечника на системный иммунный ответ. Указано, что лейкоциты, проникая из кровотока в ткани, включая поджелудочную железу, могут непосредственно участвовать в повреждении  $\beta$ -клеток. Обсуждается роль облигатных микроорганизмов (*E.coli*, *Lactobacillus spp.* и др.) и патогенов (*Candida spp.*, *S. aureus* и др.) в патогенезе развития СД1 типа.

Обсуждается роль аргиназы (A) и NO-синтазы (NOS), участвующих в метаболизме L-аргинина, которая задействована в патогенетических механизмах развития СД1 типа. Потому, неудивительно, что в диссертационном исследовании изучены изменения в КМ и активности цитоплазматической и митохондриальной форм аргиназы и уровня стабильных метаболитов оксида азота в лейкоцитах крови пациентов с СД1 типа.

Подробный анализ обзора литературы позволяет высказать мнение о том, что автор работы полностью владеет современным состоянием вопроса по данной тематике.

Глава II – Материалы и методы. За период 01.03.2017г. – 01.04.2019г в перекрестное клиническое обследование включены 108 больных и 108 здоровых людей в возрасте от 5 до 25 лет. Лица обеих групп соответствуют друг другу по возрасту, полу, биомеханизму родов и продолжительности грудного вскармливания – что важно для достоверной доказательности полученных результатов.

Причем, группа больных (n=108) была разделена на подгруппы: 1) с первичным обнаружением диабета в зависимости от продолжительности (до года) и более 1 года; 2) компенсированные и декомпенсированные пациенты (по уровню HbA1c); 3) по возрасту.

Помимо HbA1c в плазме крови, проводили анализ КМ в лаборатории инфекционной больницы "Норк".

Исследования: цитоплазматическая и митохондриальная фракции лейкоцитов; активность аргиназы; стабильных метаболитов оксида азота в безбелковых пробах – заслуживают особого внимания.

Спектр выполненных исследований – однозначно – позволяет судить о качестве выполненного исследования.

### Глава III. Результаты исследования.

У больных СД1 типа выявлены нарушения микрофлоры кишечника и метаболизма L-аргинина в лейкоцитах крови и плазме. Уровень облигатных микроорганизмов (*E. Coli*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp* и др.) снижался с одновременным возрастанием патогенов (*Candida spp.*, *Clostridium spp.*, *S. aureus* и др.). Установлена прямая корреляция между показателем HbA1c и количеством *Candida spp.* и *S. aureus*. Инсулинотерапия оказывала лишь некоторое влияние на качественный и количественный состав кишечной микрофлоры, независимо от продолжительности болезни (до 10 лет).

В лейкоцитах периферической крови больных с дебютом СД1 типа (до 0,5 года) возрастала активность обеих изоформ аргиназы: цитоплазматической (A1) и митохондриальной (A2). При длительном течении СД1 типа (в среднем 5,5 лет) у препубертатных девочек инсулинотерапия не влияла на активность A1 изоформы, только частично снижая активность A2. В тоже время, Мелконяном А. М. установлено, что инсулинотерапия у молодых девушек (12-25 лет) больных СД1 типа, нормализовала активность обеих изоформ. Между тем, диссертант пришел к выводу о том, что во всех возрастных группах лиц мужского пола больных СД1 типа, инсулинотерапия не влияла на повышенную активность изоформ аргиназы лейкоцитов.

Данное положение является для меня важным и интересным и хотелось получить объяснения на сей счет.

Выполненное исследование показало, что у девочек препубертатного возраста уровень NO/нитритов в цитоплазме и митохондриях значимо снижался, а в старшей возрастной группе лиц женского пола он не изменялся в цитоплазме; уменьшался в митохондриях независимо от продолжительности СД1 типа и терапии инсулином. Между тем, диссертант установил, что у мальчиков допубертатного возраста при манифестации болезни, субклеточное содержание NO/нитритов повышено в лейкоцитах, при отсутствии таковых у сверстников старшего возраста.

То есть, вновь автор получил различные данные по концентрации NO/нитритов, в зависимости от возраста и пола пациентов больных СД1 типа.

Наконец, Мелконяном А. М. получены данные, свидетельствующие о том, что у препубертатных девочек больных СД1 типа концентрация L-аргинина снижалась в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов, вне зависимости от продолжительности диабета, в то время как, у их сверстниц старшего возраста таковых изменений практически не наблюдалось. Между тем, у мальчиков допубертатного возраста, больных СД1 типа, содержание L-цитрулина оставалось неизменным, независимо от продолжительности СД1 типа и инсулинотерапии. Тогда как, у их старших сверстников, больных СД1 типа, субклеточный уровень L-цитрулина был понижен только при дебюте СД1 типа с нормализацией при длительной инсулинотерапии.

В целом по главе III – Результаты исследования - получены интересные данные, представляющие, в первую очередь, научный интерес.

Раздел Обсуждение. Ключевым моментом в разделе – обсуждение, на мой взгляд, представляется то, что половые и возрастные различия в показателях цитрулина и нитритов в лейкоцитах пациентов с СД1 типа в некоторой степени отражают явления полового диморфизма эндотелиальной NOS человека. В то время как в плазме крови изменения внутриклеточных превращений L-аргинина были незначительны.

По сумме данных можно заключить, что при СД1 типа обнаружены изменения кишечной микробиоты, которые в цитоплазме и митохондриях циркулирующих лейкоцитов сопровождаются сдвигами аргиназной активности и нитриргического ответа, зависящими от пола и полового созревания, длительности болезни и инсулинотерапии.

В **Заключении** – подытоживаются результаты полученных данных, свидетельствующие, вне всякого сомнения, о высокой убедительности полученных результатов.

**Выводы и практические рекомендации** логично вытекают из диссертации и являются ее естественным завершением.

**Автореферат** диссертации полностью отражает суть выполненной работы.

В работе имеются отдельные стилистические недочеты, недостатки, ошибки. Некоторые предложения громоздки, их смысл с трудом воспринимается. Отдельные таблицы можно было легче воспроизвести. Указанные недостатки можно без всякого ущерба устранить; они ни в коей мере не умаляют и не снижают организационную и научно-практическую ценность диссертации.

Считаю необходимым получить ответы на следующие вопросы:

1. Почему во всех возрастных группах лиц мужского пола больных СД1 типа, в отличие от своих молодых сверстниц (12-25 лет) пациентов СД1 типа, инсулинотерапия не влияла на повышенную активность изоформ аргиназы лейкоцитов?
2. Почему у мальчиков допубертатного возраста больных СД1 типа при манифестации болезни субклеточное содержание NO/нитритов повышено в лейкоцитах, в отличие от сверстников старшего возраста больных СД1 типа?
3. Приведите дозы базис-болюсной инсулинотерапии у больных СД1 типа и в какой степени достигалась компенсация углеводного обмена у них?

Диссертационная работа Мелконяна А. М. является самостоятельным исследованием, в котором автор принимал самое непосредственное участие. Совокупность полученных данных, сформулированные на их основе положения и практические рекомендации позволяют заключить, что результаты исследования найдут применение в решении данной важной проблемы внутренних болезней.

В заключение считаю, что диссертационная работа Мелконяна А. М. на тему: "Сдвиги микрофлоры кишечника и метаболизма L-аргинина в лейкоцитах больных сахарным диабетом 1 типа", представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.03 – "внутренние болезни", по актуальности разрабатываемого вопроса, научной новизне полученных данных и значимости практических рекомендаций отвечает требованиям ВАК РА, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а диссертант заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук.

Официальный оппонент

д.м.н., профессор

Зам. председателя специализированного совета



Нерсесян С. А.

"Подпись д.м.н., профессора Нерсесяна С. А.

заверяю"

Ученый секретарь ЕрГМУ им. М. Гераци

д.м.н., профессор



Авакян Т.Г.

26.07.2021,