

## ОТЗЫВ

официального оппонента, д.м.н., проф. Бутолина Евгения Германовича о диссертационной работе Соколовой Ксении Викторовны на тему «Патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа», представленной на соискании ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

**Актуальность избранной темы.** Исследование патофизиологических механизмов развития сахарного диабета, биохимических сдвигов в метаболических процессах при данной патологии, безусловно, является актуальным направлением в изучении фундаментальных основ развития сахарного диабета.

Широкая распространенность сахарного диабета второго типа, на долю которого по данным статистики приходится 90-95 % всех случаев диабета, неуклонно увеличивающееся количество больных, существенное снижение качества жизни, инвалидизация обуславливают актуальность изучения патогенетических механизмов сахарного диабета 2 типа и необходимость поиска новых подходов к его лечению. Известно, что ведущими механизмами в развитии сахарного диабета второго типа являются инсулинорезистентность и относительная недостаточность инсулина, которая компенсируется гиперсекрецией инсулина в  $\beta$ -клетках, что приводит к их истощению и снижению функции. Развивающаяся дисфункция  $\beta$ -клеток, по данным ряда авторов (S.S. Schwartz и соавт., 2016) является одним из ведущих механизмов в патогенезе сахарного диабета 2 типа. В тоже время ряд исследований последних лет позволяет констатировать, что дисфункция  $\beta$ -клеток может быть частично компенсирована образованием новых инсулин-продуцирующих клеток, расположенных вне островков Лангерганса. Механизмы, способствующие образованию инсулин-позитивных внеостровковых клеток, изучены недостаточно и до конца неизвестны, однако наличие доказательств участия макрофагов в образовании инсулин-продуцирующих клеток свидетельствует о макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы. Так, доказано, что, во-первых, развитие сахарного диабета второго типа сопровождается макрофагальной инфильтрацией поджелудочной железы, во-вторых, активность макрофагов влияет на пролиферацию  $\beta$ -клеток островков Лангерганса и, в-третьих, макрофаги способны сами вырабатывать фактор стволовых клеток и способствовать миграции стволовых клеток в поврежденные органы.

В диссертационной работе К.В. Соколовой проведено исследование на крысах с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа с целью выяснения морфо-функциональных характеристик внеостровковых инсулиноцитов, некоторых патофизиологических механизмов макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы и возможной их коррекции аминофталгидразидом натрия.

Таким образом, тема диссертационного исследования Соколовой Ксении Викторовны носит фундаментальный характер. Безусловно, тема актуальна для выяснения роли макрофагов в обеспечении процессов инсулинопродукции при экспериментальном сахарном диабете 2 типа, а также возможных способах коррекции активности макрофагов при данной патологии и работы в этой области способствую решению одной из важных задач медицины и биологии.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** В ходе реализации цели исследования, заключающейся в выявлении отдельных патофизиологических механизмов макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете 2 типа и при коррекции активности макрофагов аминофталгидразидом натрия, автором было поставлено и решено ряд научных задач.

Работа является самостоятельно выполненным научным исследованием, проведенным на адекватном доказательном уровне. Объем научных исследований достаточен. Проведено экспериментальное исследование на 126 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 12-13 недель, из которых 16 животных было использовано для апробации модели сахарного диабета 2 типа. В качестве экспериментальной модели диабета использовалась стрептозотоцин-никотинамидная модель, которая воспроизводит сахарный диабет 2 типа, характеризующийся развитием стабильной умеренной гипергликемией, уменьшением количества  $\beta$ -клеток, снижением продукции инсулина и нарушенной толерантностью к глюкозе. Введение никотинамида частично снижает избыточное повреждение  $\beta$ -клеток, вызванное стрептозотоцином.

В работе использованы как классические, так и современные методы исследования: биохимические (уровень гликемии и гликированного гемоглобина), гематологические (подсчет общего количества лейкоцитов), методы иммуноферментного анализа (определение инсулина, кортикостерона, фактора некроза опухолей, фактора стволовой клетки, гамма-интерферона, трансформирующего фактора роста), иммуногистохимические (для выявления

инсулина и проинсулина, рецепторов фактора роста тучных и стволовых клеток, белка, экспрессируемого на мембране макрофагов, фактора транскрипции Pdx1). Полученные данные статистически обработаны с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Office Excel 2007 и Origin Pro 9.0, графическое представление данных произведено в GraphPad Prism 7.0.

По итогам диссертационной работы сформулировано 6 выводов, соответствующих материалам исследования и отражающих поставленные задачи. Кроме того, автором обоснованы практические рекомендации, в том числе по использованию аминоталгидразида натрия в профилактике и возможной коррекции сахарного диабета 2 типа.

Таким образом, объем экспериментального материала, адекватная выбранная модель сахарного диабета 2 типа, примененные современные методы исследований, проведенный статистический анализ не позволяют усомниться в обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертационной работе К.В. Соколовой.

**Достоверность и новизна исследований полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Дизайн исследования, тщательный анализ и адекватная статическая обработка полученных данных не вызывает сомнений в достоверности полученных результатов, на основании которых были сформулированы выводы и практические рекомендации.

Результаты экспериментальных исследований позволили автору проанализировать и раскрыть отдельные аспекты патофизиологических механизмов макрофагальной регуляции образования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы у крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа. Новизна наследования подтверждена публикациями в изданиях, рецензируемых ВАК и индексируемых в международных наукометрических базах, в том числе в Scopus и Web of Science, а также поддержкой РНФ (2 гранта).

Содержащиеся в работе данные получены автором лично или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы: постановка цели и задач исследования, выбор методов и методик исследования, проведение экспериментов, статистическая обработка полученных данных, оценка и анализ результатов экспериментов, написание научных работ, оформление диссертации и автореферата. Основные положения и результаты исследования были доложены и обсуждены на научных форумах различного уровня, в том числе международных.

**Значимость для науки и практики полученных автором результатов.** Полученные результаты диссертационной работы носят фундаментальный

характер. Проведенное экспериментальное исследование позволило существенно пополнить знания о некоторых аспектах патофизиологических механизмов регуляции образования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при сахарном диабете 2 типа и роль в этих процессах макрофагов. Автором впервые дана морфо-функциональная характеристика субпопуляций инсулин-позитивных клеток ацинусов и эпителия протоков поджелудочной железы. При этом установлено, что большая часть таких клеток локализована в ацинусах железы. С помощью иммуногистохимических методов исследования впервые установлено влияние макрофагов на содержание панкреатического дуоденального гомеобоксного белка 1 (Pdx1) при воздействии аминофталгидразидом натрия и в его отсутствии. Выявлено, что снижение макрофагальной инфильтрации при введении аминофталгидрида натрия способствует увеличению количества Pdx1-позитивных клеток в паренхиме неэдокринной части поджелудочной железы и росту содержания трансформирующего фактора роста бета 1 в ткани железы, что приводит к увеличению количества внеостровковых инсулин-позитивных клеток и возрастанию их функциональной активности. В свою очередь, изменения морфо-функциональной активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток могут являться, с одной стороны, причиной роста продукции инсулина, а с другой – приводить к снижению уровня гликемии и инсулинорезистентности, наблюдаемых при воздействии на функциональное состояние макрофагов при экспериментальном сахарном диабете 2 типа.

Таким образом, автором исследования доказано, что макрофагальная регуляция образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы осуществляется посредством изменения содержания в железе провоспалительных цитокинов, ростовых факторов, количества Pdx1-позитивных клеток.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.** Полученные результаты экспериментальных исследований создают теоретическую основу для разработки методов стимулирования образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток путем изменения функциональной активности макрофагов. Новые сведения о механизмах макрофагальной регуляции образования указанных клеток поджелудочной железы могут быть внедрены в образовательные программы подготовки обучающихся по медицинским и биологическим специальностям, а также использоваться в деятельности специализированных научно-исследовательских лабораторий. Кроме

того, результаты, полученные автором, могут быть использованы при разработке новых способов коррекции инсулиндефицитных состояний.

**Оценка содержания диссертации, ее завершенности.** Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, содержат 18 таблиц, 8 рисунков. Структура диссертации традиционная и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы, используемые в работе», 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 304 источника, из которых 48 – русскоязычных, 256 – англоязычных.

Во введении автор обосновывает выбор темы, ее актуальность и степень разработанности, формулирует цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, раскрывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, пишет о внедрении результатов исследования в практику и апробации их на конференциях разного уровня.

Первая глава «Обзор литературы» посвящена оценке влияния макрофагов на внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы. На 35 страницах машинописного текста представлен подробный анализ научных работ, посвящённых морфо-функциональной характеристике поджелудочной железы и ее внеостровковым инсулин-позитивным клеткам, влиянию транскрипционных факторов и стволовых клеток на образование инсулин-продуцирующих клеток, а также на патогенез и течение сахарного диабета 2 типа. Обзор литературы написан в соответствии с требованиями, тщательно выверен. Последние литературные источники датированы 2019 годом.

Во второй главе «Материалы и методы, используемые в работе», автором дана подробная характеристика биохимическим, гематологическим, иммуногистохимическим, иммуноферментным методам исследования биологического материала, существующим моделям экспериментального диабета, представлен дизайн исследования.

К.В. Соколова убедительно обосновывает выбор совместного использования стрептозотоцина и никотинамида для моделирования экспериментального сахарного диабета 2 типа, а также использование аминофталгидразида натрия в качестве агента воздействия на функциональное состояние макрофагов. Статистические методы исследования включают как параметрические, так и непараметрические методы. В целом, комплекс примененных лабораторных и инструментальных методов исследований современен и информативен.

Результаты собственных исследований представлены четырьмя главами. В главе 3 «Внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы при

экспериментальном сахарном диабете 2 типа» автором показано установленное с помощью метода иммуногистохимического исследования срезов поджелудочной железы с применением антител к инсулину и проинсулину наличие внеостровковых инсулин-позитивных клеток как у интактных животных, так и у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа. Глава 4 посвящена анализу содержания и функциональной активности макрофагов в поджелудочной железе интактных крыс, крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа, а также при воздействии аминофталгидразида натрия. Показано, что распределение макрофагов в паренхиме поджелудочной железы отличается у интактных животных и крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа, а аминофталгидразид натрия снижает активность воспалительного процесса и уменьшает значение индекса инсулинорезистентности в экспериментальной группе.

В главе 5 «Внеостровковые инсулин-позитивные клетки поджелудочной железы при изменении активности макрофагов аминофталгидразидом натрия», убедительно доказано, что введение аминофталгидразида натрия увеличивает общее количество и функциональную активность инсулин-продуцирующих клеток; приводит к стойкому снижению гликемии, содержания гликированного гемоглобина, индекса HOMA-IR и росту концентрации инсулина в крови.

В главе 6 «Механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы» автор, выясняя возможную связь образования и функционирования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы с экспрессией в неэндокринных клетках железы панкреатического дуоденального гомеобоксного белка 1, рецептора к фактору стволовой клетки c-kit и концентрации его лиганда (фактора стволовой клетки) в ткани железы, приходит к заключению, что ведущим механизмом в регуляция образования и активности внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы может быть интенсивность экспрессии транскрипционного фактора панкреатического дуоденального гомеобоксного белка 1 неэндокринными клетками железы.

В Заключении (10 страниц машинописного текста) Соколовой К.В. подробно обсуждены полученные результаты, проведен глубокий анализ данных, полученных в ходе проведенных экспериментальных исследований, раскрыты возможные патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы при диабете 2 типа. Автором убедительно, по нашему мнению, доказано, что макрофаги, являющиеся одними из основных

«координаторов» метаболического и тканевого гомеостаза, способны создать в паренхиме поджелудочной железы условия для образования внеостровковых инсулин-позитивных клеток как в составе ацинусов, так и в эпителии протоков. В то же время, диссертантом сделано предположение о том, что воздействие на макрофаги аминофталгидразидом натрия способствует снижению выраженности воспалительных реакций в поджелудочной железе и, возможно, создает благоприятный фон для трансдифференцировки неэндокринных клеток железы в инсулин-позитивные клетки под влиянием панкреатического дуоденального гомеобоксного белка 1.

Выводы отражают основные результаты диссертационного исследования. Все они корректны, объективны, соответствуют поставленным задачам, отражают суть и результаты работы, подтверждаются представленным материалом. практические рекомендации вытекают из собственных исследований автора, могут быть использованы в работе специализированных лабораторий.

Содержание автореферата отражает основные положения работы.

**Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом.** Структура и содержание работы свидетельствуют о самостоятельно выполненном научном исследовании, получены новые данные о механизмах макрофагальной регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете 2 типа, а также способах коррекции активности макрофагов. Результаты диссертационного исследования отражены в 15 публикациях, из них 3 работы опубликованы в изданиях, рецензируемых ВАК, 11 - в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах (Scopus, Web of Science, Pubmed). Работа поддержана двумя грантами РНФ. Материалы работы широко представлены и обсуждены на научных форумах различного уровня.

Диссертационная работа хорошо оформлена, написана литературным языком, практически отсутствуют ошибки, неудачные выражения.

Принципиальных возражений ни основная концепция работы, ни положения, выносимые на защиту, ни полученные фактические данные не вызывают.

В качестве замечаний можно отметить следующее:

1. Использование бытового глюкометра Contour TS для определения глюкозы при проведении перорального теста к толерантности к глюкозе не оправдано, поскольку имеются публикации о значительной ошибке данного глюкометра при высоких значениях глюкозы в крови (журнал «Клиническая лабораторная диагностика», 2015, № 1).

2. В работе встречаются отдельные опечатки (стр.13, 14).

Указанные замечания не умаляют значимости работы.

В плане продолжения научной дискуссии хотелось бы задать диссертанту ряд вопросов:

1. Вы определяли уровень кортикостерона в крови, однако в работе этот показатель никак не обсуждается. С какой целью определяли концентрацию кортикостерона в крови?

2. Какие тест-системы Вы использовали для изучения содержания инсулина и кортикостерона в крови методом ИФА: специфические тест-системы для определения инсулина и кортикостерона у крыс или тест-системы для определения изучаемых показателей у человека?

3. Известно, что в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы инсулин вырабатывается по схеме: препроинсулин-проинсулин-инсулин. Как Вы считаете, в инсулин-позитивных клетках вне островков Лангерганса вырабатывается инсулин, идентичный инсулину  $\beta$ -клеток?

4. Могут ли изменения размеров инсулин-позитивных клеток при экспериментальном сахарном диабете 2 типа привести к усилению, или, наоборот, к снижению количества вырабатываемого ими инсулина или этот показатель не зависит от их размеров?

5. Каков, по-Вашему мнению, механизм влияния аминофталгидразида натрия на снижение или даже нормализацию уровня гликемии и количество гликированного гемоглобина в крови?

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.** Таким образом, диссертационная работа Соколовой Ксении Викторовны на тему «Патофизиологические механизмы макрофагальной регуляции образования внеостровковых инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете второго типа», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, является самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором экспериментальных исследований выявлено участие макрофагов в регуляции образования и функционирования внеостровковых инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете 2 типа, изучены и проанализированы молекулярные механизмы корригирующего действия аминофталгидразида натрия на морфо-функциональную активность макрофагов в условиях экспериментального диабета. Разработаны теоретические и практические



рекомендации, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения, имеющие важное значение для медицины и биологии, а именно патофизиологии, изучающей механизмы нарушений метаболических процессов при сахарном диабете.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертация Соколовой Ксении Викторовны полностью соответствует критериям, установленным пунктом 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, с изм., утв. 21.04.2016 № 335), а ее автор Соколова Ксения Викторовна заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:  
заведующий кафедрой клинической биохимии  
и лабораторной диагностики  
факультета повышения квалификации  
и профессиональной переподготовки  
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная  
медицинская академия» Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор



Е.Г. Бутолин

Подпись Бутолина Е.Г. заверяю  
Начальник отдела кадров

С.П. Овечкина

Дата 24 мая 2021 г.

МП

Полное название учреждения, адрес с индексом: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России. 426033, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281, тел. 8 (3412)52-62-01

Адрес электронной почты: [rector@igma.udm.ru](mailto:rector@igma.udm.ru). Официальный сайт: <http://www.igma.ru/>

Отзыв официального оппонента поступил «31» мая 2021 г.  
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02

И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлена «31» мая 2021 г.  
Соискатель

К.В. Соколова