

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента Герасимовой-Мейгал Людмилы Ивановны, доктора медицинских наук, доцента, профессора кафедры физиологии человека и животных, патофизиологии ФГБОУ ВО Петрозаводский государственный университет Минобрнауки России на диссертацию Секунова Алексея Васильевича на тему: «Роль сфинголипидов в нарушении мембрано-цитоскелетных взаимодействий и мышечной пластичности при гравитационной разгрузке постуральных мышц», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 Патологическая физиология

### **Актуальность темы диссертации**

Диссертация Секунова Алексея Васильевича посвящена исследованию сфинголипид-зависимых механизмов перестройки сарколеммального цитоскелета и мышечной пластичности в постуральных мышцах, подвергнутых функциональной разгрузке разной длительности. Актуальность исследования определяется более глубоким пониманием роли изменений метаболизма при продолжительном бездействии познотонических мышц в модификации цитоскелета мышечных волокон, а также изучением перспектив фармакологической коррекции данных патологических состояний.

Сфинголипиды – один из основных классов липидов, входящих в структуру клеточной мембраны, обуславливающих ее термодинамическую стабильность и реализующих ряд ключевых внутриклеточных путей регуляции пролиферации, дифференцировки, воспаления и апоптоза. В диссертационном исследовании Секунова А.В. рассматриваются фундаментальные аспекты патологических механизмов биохимических процессов постуральных мышц, возникающих как реакция на функциональную разгрузку и реализуемых структурной и функциональной динамикой сарколеммальных сфинголипидов.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Научная новизна диссертации определяется, прежде всего, тем, что автором впервые были выявлены механизмы изменений субсарколеммального цитоскелета, вызываемые функциональной разгрузкой, на уровне липид-белковых взаимодействий, включая исследования иммунофлуоресценции мембранного церамида, бета-дистрогликана, гамма-актина, дистрофина и кавеолина-3 (один из маркеров кавеолярных рафтов). Результаты исследований показали, что как при острой (12 часов), так и при длительной (14 дней) функциональной разгрузке наблюдается увеличение

иммунофлуоресценции церамида и гамма-актина и снижение дистрофина. Изменения иммунофлуоресценции кавеолина-3 и бета-дистрогликана зависят от длительности воздействия. Функциональное ингибирование кислой сфингомиелиназы препаратом из группы FIASMA частично предотвращает вызванные бездействием модификации субсарколеммального цитоскелета.

Во второй части исследования была проведена оценка экспрессии различных изоформ тяжелых цепей миозина и возможность коррекции изменений миозинового фенотипа при разгрузке мышц путем применения ингибитора кислой сфингомиелиназы. Обнаружено, что ингибитор оказывает влияние на экспрессию генов «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина, но не влияет на экспрессию генов «медленных» изоформ. Атрофические изменения мышц также частично нивелируются под действием функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы.

Эти результаты были получены впервые.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность результатов обоснована репрезентативностью выборки, применением адекватных методов статистического анализа. Результаты исследования получены на достаточном по объему экспериментальном материале. Исследования были проведены на крысах Вистар (n=85). Проведено несколько серий экспериментов с применением антиортостатического вывешивания разной продолжительности. Оценка иммунофлуоресценции компонентов цитоскелета, экспрессии изоформ сократительных белков, признаков атрофии выполнена в экспериментальных группах с разной продолжительностью антиортостатического вывешивания и контрольной группе. Оценка полученных результатов выполнена с помощью адекватных методов статистического анализа и критериев оценки достоверности результатов (вариационная статистика непараметрические критерии Краскел-Уоллеса, Манна-Уитни).

### **Содержание работы**

Диссертация имеет традиционную структуру, включает все рекомендованные ВАК разделы и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа изложена на 110 страницах компьютерного текста, содержит следующие разделы: «Введение», глава 1 – «Обзор литературы», глава 2 – «Материалы и методы исследований», глава 3 – «Результаты исследований», глава 4 – «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений и

условных обозначений», «Список литературы». Работа содержит 4 таблицы и 37 рисунков. Список литературы состоит из 168 ссылок на источники, из которых 9 отечественных и 159 зарубежных работ.

Во введении раскрыта актуальность исследования и обоснован выбор темы исследования, продемонстрированы аспекты патофизиологии гравитационно-зависимых модификаций мышечных волокон.

В главе «Обзор литературы» представлен анализ данных современной литературы по теме работы. Обзор написан литературным языком и состоит из пяти подглав, в которых описываются гипогравитационный двигательный синдром, способы его моделирования на грызунах, структура дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса в норме и при патологии, приводятся данные о миозиновом фенотипе мышечных волокон и его изменениях в условиях разгрузки. Также имеются данные о структуре и функциях планарных и кавеоллярных мембранных рафтов и роли сфинголипидов в функциях скелетных мышц.

В главе «Материалы и методы» изложена информация по объектам исследования и принципам формирования экспериментальных групп, используемому оборудованию, методикам применяемых воздействий (моделирование гравитационной разгрузки постуральных мышц, схемы применения ингибиторов кислой сфингомиелиназы кломипрамина и амитриптилина), отбора тканевых образцов для последующего анализа состава, методики проведения иммунофлуоресцентного исследования, ПЦР и оценки атрофии мышц. использованные материалы, лабораторные подходы и общий дизайн работы.

В главе «Результаты исследований» дано описание полученных результатов. Глава содержит разделы по результатам оценки иммунофлуоресценции и ПЦР компонентов цитоскелета, анализу фенотипа мышечных волокон и оценке атрофии. Представлены микрофотографии, диаграммы и графики, которые улучшают восприятие информации.

В главе «Обсуждение результатов» представлен результирующий анализ полученных результатов. Автор сделал концептуальную трактовку динамики изучаемых параметров, обосновывая ее известными данными литературы по теме диссертации. Обсуждение результатов написано грамотно и логично.

В разделе «Заключение» в аналитической форме, удобной для восприятия, изложены главные результаты проведенных исследований.

Выводы и практические рекомендации полностью подтверждены научными результатами.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

### **Научно-практическая значимость диссертации**

Полученные А.В. Секуновым результаты вносят вклад в понимание гравитационно-зависимых модификаций элементов цитоскелета и сократительных белков мышечных волокон, возникающих при функциональной разгрузке, раскрывают причинно-следственные связи структурно-метаболических изменений мышцах в условиях бездействия и атрофии. Результаты могут быть использованы в учебном процессе в медицинских вузах, в качестве детализирующих научную концепцию о процессах структурно-функциональной реорганизации мышц, в том числе их атрофии и смены миозинового фенотипа в условиях функциональной разгрузки. Выявленные молекулярно-клеточные модификации, происходящие в мышечных волокнах при продолжительной разгрузке, могут стать теоретической основой для разработки принципов фармакологической коррекции метаболических нарушений в мышцах, предупреждению и нивелированию мышечной атрофии.

### **Апробация диссертации и внедрение проведенных исследований**

По теме диссертации автором опубликовано 14 работ, из них в изданиях, рекомендованных ВАК - 2, в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science - 4 работы.

Исследования, проведенные в рамках данной диссертационной работы, были поддержаны грантом РФФИ №19-315-90099 Аспиранты.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебную деятельность кафедр нормальной физиологии, патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России.

### **Замечания и вопросы по работе**

Принципиальных замечаний к диссертации нет, однако есть ряд уточняющих вопросов детализации методики исследования для лучшего понимания полученных результатов.

1. Для лучшего понимания эффектов антиортостатического вывешивания в разделе «Материалы и методы» можно было уточнить был ли этот эффект симметричным в мышцах разных конечностей или нет. Каким образом проводился отбор проб для иммунофлуоресцентного анализа: из какой части мышцы (основная толщина или близость к сухожилию), какое количество образцов с животного / конечности исследовано и включено в последующую статистику?
2. При изложении результатов и в рисунках не указаны статистические критерии, которые использованы для оценки достоверности изменений. В

большинстве исследований проводится оценка динамики изучаемых параметров между контрольной группой и двумя группами, соответствующими разным срокам антиортостатического вывешивания с применением и без применения ингибитора кислой сфингомиелиназы. Необходимо уточнить, как проводилось сравнение.

3. Многие утверждения в выводах построены на роли «сфингомиелиназного гидролиза», однако в диссертации нет данных об оценке фармакологических эффектов примененных препаратов, активности фермента кислой сфингомиелиназы и сопоставления с результатами исследования мышечных волокон в разные сроки антиортостатического вывешивания.

4. Многие рисунки в тексте диссертации и в автореферате имеют нарушения в оформлении: на графиках не указана размерность вертикальной оси, нет обозначения иллюстрируемых статистических параметров (график box-plot), на микрофотографиях не указана шкала сравнения иммуофлуоресценции.

### **Заключение**

Диссертация Секунова Алексея Васильевича на тему «Роль сфинголипидов в нарушении мембрано-цитоскелетных взаимодействий и мышечной пластичности при гравитационной разгрузке постуральных мышц», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важных научных задач патологической физиологии (получены данные о влиянии динамики изменений сфинголипидного компонента сарколеммы, развивающейся при функциональной разгрузке разной длительности, на компоненты дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса, связанной с ним гамма-актиновой составляющей костамеров мышечных волокон, а также на изменение генной экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина, характеризующих мышечную пластичность); содержит решение важной научной задачи патофизиологии гравитационно-зависимых модификаций цитоскелета мышечных волокон (применение функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы способно частично нивелировать эффект функциональной разгрузки на экспрессию сарколеммальных белков и мышечную пластичность, а также проявления атрофии).

По новизне, научной и практической ценности полученных результатов, перспективам их практического применения диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением

