

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук, профессора Капилевича Леонида Владимировича на диссертацию Секунова Алексея Васильевича «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 А.В. Секунова посвящена изучению влияния процессов, ассоциированных с метаболизмом сфинголипидов, на реорганизацию компонентов примембранного цитоскелета и изменения миозинового фенотипа волокон постуральных мышц в условиях гравитационной разгрузки.

Актуальность темы исследования не вызывает сомнений и определяется высокой частотой развития атрофии и дисфункции мышц в результате мышечной разгрузки при таких состояниях, как вынужденный длительный постельный режим, иммобилизация конечностей у пациентов в клинике, а также у здоровых людей, в частности, у космонавтов в условиях длительной гипогравитации. Интерес к проблеме липид-зависимой регуляции функций клеток неуклонно растет в последние два десятилетия. Известно, что многие процессы, протекающие в клеточных мембранах, могут зависеть от состояния белковых структур, тесно связанных с липидным микроокружением. Показано участие сфинголипидов в регуляции ряда функций скелетных мышц, однако данные об их влиянии на компоненты костямерного цитоскелета и экспрессию различных изоформ тяжелых цепей миозина при мышечной атрофии, вызванной бездействием, в литературе практически отсутствуют. Поэтому исследование, направленное на выяснение этих вопросов, представляет несомненный интерес для патофизиологии.



## Научная новизна исследования

В диссертационной работе А.В. Секунова исследовано влияние мышечной разгрузки, вызванной антиортостатическим вывешиванием (АОВ) разной длительности на уровень сарколеммального церамида (основного компонента сфингомиелиназного сигнального пути), бета-дистрогликана, гамма-актина, дистрофина и кавеолина-3. Автором установлено, что как при кратковременном (12 час), так и при длительном (14 дней) АОВ наблюдается прирост сарколеммального церамида и гамма-актина с параллельным уменьшением дистрофина. Показано также, что изменения кавеолина-3 (компонента кавеолярных рафтов) и бета-дистрогликана зависят от длительности воздействия. Ингибирование кислой сфингомиелиназы частично предотвращает наблюдаемые изменения. Во второй части работы автор оценивал экспрессию различных изоформ тяжелых цепей миозина и возможность коррекции изменений миозинового фенотипа при разгрузке мышц с помощью ингибитора кислой сфингомиелиназы. Обнаружено, что при 14-дневной разгрузке *m. soleus* ингибитор предотвращает повышение экспрессии генов «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина, но не оказывает влияние на экспрессию генов «медленных» изоформ. Атрофические изменения мышц также частично нивелируются при использовании ингибитора.

Следует отметить, что полученные результаты отличаются высокой степенью новизны, при этом бóльшая часть данных получена впервые.

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

Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений. Исследование проведено на известной и широко используемой в исследованиях на грызунах экспериментальной модели гравитационной разгрузки. В работе использованы современные методы (ПЦР в реальном времени, иммунофлуоресцентное исследование срезов мышц), результаты



корректно проанализированы с использованием современных статистических программ.

Научные положения работы обоснованы корректным анализом и интерпретацией полученных экспериментальных данных. На основе оценки результатов опытов и сопоставления их с данными литературы автор делает обоснованные выводы об участии сфинголипидов в регуляции состояния постуральных мышц при их неиспользовании, вызванном гравитационной разгрузкой. Эти выводы закономерно базируются на эффектах, полученных в результате применения ингибиторов сфингомиелиназного гидролиза, направленных на предотвращение повышения уровня церамида в мышечных волокнах, что отражается как на состоянии субсарколеммального цитоскелета, так и на экспрессии «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

#### **Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования**

Полученные автором результаты могут быть использованы в учебном процессе в медицинских вузах, как расширяющие представление о механизмах структурно-функциональной реорганизации мышц, в том числе их атрофии и смены миозинового фенотипа в условиях неиспользования. Их можно также использовать как теоретическую базу для поиска подходов к медикаментозной коррекции подобных состояний.

#### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация написана в традиционной манере, включает все рекомендованные ВАК разделы и по своей структуре соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Работа изложена на 110 страницах компьютерного текста и 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.

В актуальности обоснован выбор темы исследования, показано, что многие аспекты изменений в разгруженных при бездействии скелетных мышцах до конца не изучены, сделан акцент на важности изучения липидных механизмов в патогенезе нарушений костамерного цитоскелета и перестройке миозинового фенотипа постуральных мышц.

В главе 1 представлен анализ данных современной литературы по теме работы. Обзор написан хорошим литературным языком, легко читается и состоит из 5 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 кавеоларных мембранных рафтов и роли сфинголипидов в функциях скелетных мышц.

В главе 2 представлены использованные материалы и методы исследования, общий дизайн работы. В главе описано моделирование гравитационной разгрузки постуральных мышц, выделены экспериментальные группы, показаны схемы применения ингибиторов кислот сфингомиелиназы кломипрамина и amitриптилина, приведено подробное описание использованных методов оценки изучаемых параметров с использованием современной лабораторно-экспериментальной базы (ПЦР, иммунофлуоресцентное исследование).

В 3 главе дано описание результатов собственных исследований, представлен иллюстративный материал в виде таблиц, микрофотографий, графиков, наглядно демонстрирующий полученные данные.

В 4 главе представлен анализ полученных результатов, в котором автор дает свою трактовку изменений изучаемых параметров, широко используя



литературные источники по теме диссертации. Обсуждение результатов написано грамотно и логично.

В разделе «Заключение» автор подводит итоги проведенной работы и далее делает закономерные выводы, отражающие решение поставленных научных задач. Список литературы состоит из 168 ссылок на источники, из которых 9 отечественных и 159 зарубежных работ.

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.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основное содержание диссертации. Принципиальных замечаний по автореферату нет.

### **Вопросы и замечания**

1. Не совсем корректно описаны применяемые методы статистической обработки результатов. Автор пишет: *«Для оценки достоверности результатов в зависимости от характера распределения использовались непараметрические методы (критерии Краскелла-Уоллиса, Манна-Уитни, Пирсона)»*. Остается непонятным, как именно осуществлялся выбор конкретного критерия для каждого показателя, какие группы результатов оценивались по каждому из названных критериев и каким образом выбор одного из трех непараметрических критериев зависел от характера распределения?
2. Не совсем понятно представление и описание результатов на некоторых рисунках. В частности, на рисунках 2 и 3 не указаны единицы измерения представляемых величин по оси ординат. В подписи к рисункам указано, что результаты приведены в условных единицах, но что это за единицы – остается непонятным. Описание методики во второй главе (плотность флуоресценции ... рассчитывалась как средняя плотность пикселей измеряемого цветового



канала, преобразованная в условные единицы программным обеспечением Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, США) ясности в этот вопрос не вносит. Данный вопрос требует разъяснения. Аналогичные вопросы и по многим другим рисункам в диссертации.

3. Четвертая задача – «Оценить характер перестройки мышечного фенотипа ... при разгрузке разной длительности» не раскрыта в отдельном выводе, 4-й вывод с этой задачей не согласован.
4. При обсуждении возможных механизмов воздействия функциональной разгрузки мышц на процессы, протекающие в мембране, автор пишет: *«Данный процесс вносит непосредственный вклад в структурную целостность, разделенных на основании физико-химических взаимодействий, различных липидных фаз, в норме циркулирующих в сарколеммальном слое»*. Из данного утверждения остается непонятым, какой же механизм автор рассматривает как ведущий – изменение химического состава мембран или изменение характера физико-химических взаимодействия между белковыми и липидными компонентами?

Однако все высказанные замечания не являются принципиальными и не влияют на общую положительную оценку работы.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация Секунова Алексея Васильевича на тему «Роль сфинголипидов в нарушении мембрано-цитоскелетных взаимодействий и мышечной пластичности при гравитационной разгрузке постуральных мышц» соответствует пунктам паспорта научной специальности 3.3.3 Патологическая физиология: п. 1 (Исследование особенностей этиологических факторов, вызывающих развитие повреждения, и характера их воздействия на уровне клеток, органов и систем организма), п. 4 (Анализ механизмов саногенеза, направленных на предотвращение повреждающего действия патогенного агента на организм, его



органы и системы, изучение причин и особенностей взаимной трансформации саногенетических и патогенетических процессов.), п. 8 (Изучение защитных, компенсаторных и приспособительных реакций организма, развивающихся в ответ на действие повреждающих факторов различной природы и при развитии патологических процессов).

Диссертация Секунова Алексея Васильевича на тему: «Роль сфинголипидов в нарушении мембрано-цитоскелетных взаимодействий и мышечной пластичности при гравитационной разгрузке постуральных мышц» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой представлено решение актуальной научной задачи установления патогенеза структурно-функциональных нарушений скелетных мышц в условиях их неиспользования, что имеет важное теоретическое значение для патофизиологии.

По своей актуальности, методическому уровню, объему исследований, научной новизне и практической значимости работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., с изменениями от 01.10.2018 г., Постановления Правительства Российской Федерации № 1168, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук: решает актуальные задачи экспериментальной патофизиологии (описаны результаты влияния изменений сфинголипидов сарколеммы, развивающихся при функциональной разгрузке разной длительности, на уровни компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса, связанного с ним гамма-актинового компонента костамеров мышечных волокон, а также на изменение генной экспрессии изоформ ТЦМ, характеризующих мышечную пластичность); содержит решение задачи мышечной патофизиологии гравитационно-зависимых нарушений



(функциональный ингибитор кислой сфингомиелиназы, снижающий активность процессов сфингомиелиназного гидролиза в сарколемме мышечных волокон постуральных мышц, оказывает предотвращающий эффект на развитие изменений в экспрессии сарколеммальных белков и мышечной пластичности, снижение мышечной массы и диаметра мышечных волокон, обусловленные функциональной разгрузкой). Диссертант – Секунов Алексей Васильевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

### Официальный оппонент

Заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Национального исследовательского Томского государственного университета доктор медицинских наук (03.03.01 – Физиология), профессор

Леонид Владимирович Капилевич

«17» мая 2023 г.



Подпись удостоверяю  
Ведущий документовед  
Андреев И. В.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск.  
Адрес: Российская Федерация, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.  
Тел. 8 (3822) 529 852, e-mail: [rector@tsu.ru](mailto:rector@tsu.ru)  
Адрес сайта в сети Интернет: <http://www.tsu.ru/university/>