

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Бобылёва Александра Геннадьевича «Амилоидная агрегация мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов», представленную к защите в диссертационный совет 24.1.232.01 (Д 002.285.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Актуальность темы.

Формирование амилоидных агрегатов представляет собой сложный многостадийный процесс, многие аспекты которого до настоящего времени остаются недостаточно изученными, а имеющиеся данные нередко трактуются неоднозначно. Такие агрегаты могут образовываться в различных тканях организма как при патологических состояниях, так и в составе функционально значимых белковых структур. Особый интерес в этом отношении представляют процессы белковой агрегации в мышечной ткани, где высокая плотность структурных белковых комплексов сочетается с постоянными механическими нагрузками.

Актуальность работы определяется, прежде всего, тем, что она сфокусирована на исследовании амилоидной агрегации двух мышечных белков: титина, являющегося самым крупным из известных белков и необходимого для структурно-механической организации сократительного аппарата поперечно-полосатых и гладких мышц, а также миозин-связывающего белка С (С-белка), представляющего собой важный структурный компонент саркомеров поперечно-полосатых мышц. Исследования амилоидных свойств этих белков, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов и играющих важную роль в поддержании структуры и функции сократительных нитей, имеют приоритетный характер. Несмотря на интенсивное изучение амилоидогенеза, механизмы формирования амилоидных структур у крупных мультидоменных мышечных белков остаются недостаточно изученными. Особенно важным является вопрос о том, всегда ли амилоидная агрегация имеет патологическое значение или может быть связана с формированием функциональных амилоидов? В связи с этим актуальность диссертации А.Г. Бобылёва, посвящённой изучению амилоидной агрегации гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка, исследованию типа формируемых ими агрегатов и возможной функциональной роли подобной агрегации в мышцах, не вызывает сомнений.

Общая характеристика работы.

По формальным признакам (количеству опубликованных по материалам диссертационной работы публикаций, роли диссертанта в планировании и реализации экспериментов, методическому уровню, анализе данных) диссертация полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям. Диссертационная работа изложена на 301 странице машинописного текста, построена по стандартному принципу и включает следующие разделы: оглавление, список используемых сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы. Диссертация содержит 52 рисунка, 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 717 источников.

Во **введении** автор обосновывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи, указывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, приводит положения, выносимые на защиту, сведения об апробации результатов и личном вкладе.

Обзор литературы весьма объёмный и всесторонне характеризует современное состояние проблемы. В нём рассмотрены общие механизмы белковой агрегации, признаки амилоидных структур, различия между патологическими и функциональными амилоидами, а также структурные особенности мышечных белков, выбранных в качестве объектов исследования. Важным достоинством обзора является то, что он не ограничивается перечислением известных данных, а подводит к нерешённому вопросу: могут ли мультидоменные мышечные белки, состоящие из иммуноглобулин-подобных и фибронектин III-подобных доменов, формировать амилоидные структуры особого типа, отличные от классических фибриллярных амилоидов.

В разделе «**Материалы и методы**» описан широкий набор используемых в работе методов и подходов, относящихся к области биофизики, биохимии и клеточной биологии: динамическое рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, флуоресцентная спектроскопия с тиофлавином Т, круговой дихроизм, ИК-Фурье спектроскопия, рентгеновская дифракция, синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние, дифференциальная сканирующая калориметрия, конфокальная микроскопия, ДСН-гель-электрофорез, вестерн-блот анализ, а также биоинформатические методы. Такой набор методов позволил автору рассмотреть процесс амилоидной агрегации мышечных белков на разных уровнях: от динамики агрегации и морфологии частиц до признаков кросс- β -структуры, а также исследовать влияние агрегатов на клетки.

В разделе «Результаты» последовательно раскрываются результаты работы в соответствии с поставленными задачами. Сначала автор характеризует динамику агрегации титина и С-белка и показывает, что исследуемые белки агрегируют достаточно быстро, без выраженного лаг-периода. Далее с использованием электронной и атомно-силовой микроскопии автор демонстрирует, что образующиеся агрегаты имеют аморфную, а не фибриллярную морфологию. Это наблюдение принципиально важно, поскольку оно сразу выводит работу за рамки стандартного описания амилоидогенеза как процесса образования фибриллярных структур. Следующая часть работы посвящена доказательству амилоидной природы аморфных агрегатов исследуемых белков. Автор показывает, что агрегаты титина и С-белка связывают тиофлавин Т и имеют характерные для кросс- β -структуры рефлексy, выявленные методом рентгеновской дифракции. Далее автор, используя методы кругового дихроизма и ИК-Фурье спектроскопии, убедительно показывает, что амилоидная агрегация титина и С-белка происходит без значительных изменений во вторичной структуре исследуемых белков. Значимым фрагментом диссертации является исследование обратимости агрегации. Автор показывает способность отдельных агрегатов гладкомышечного титина к дезагрегации при повышении ионной силы раствора. Обратимость амилоидной агрегации рассматривается как один из признаков функциональных, а не патологических амилоидов и высказывается предположение о потенциальной функциональной роли амилоидной агрегации мышечных белков *in vivo*.

Далее автор переходит к представлению результатов экспериментов по влиянию агрегатов на клетки. Автор демонстрирует, что агрегаты титина нарушают адгезию гладкомышечных клеток и фибробластов, однако не проявляют прямого цитотоксического действия. Для выяснения причин нарушения клеточной адгезии автором методом атомно-силовой микроскопии было проведено исследование рельефа поверхности, формируемой агрегатами титина. Значения среднеквадратичной шероховатости поверхности, формируемой амилоидными агрегатами титина гладких мышц, оказались сопоставимы с описанными в литературе значениями антиадгезивных поверхностей, которые формируют некоторые специально для этого созданные полимеры. Результаты исследования позволили автору сделать обоснованное заключение, что нарушение адгезии клеток связано с топологическими особенностями поверхности, которую формировали амилоидные агрегаты белка и на которой находились клетки.

К ключевым результатам, определяющим новизну и значимость диссертационной работы, можно отнести следующие:

- впервые выявлен и показан амилоидный тип агрегации крупных мультидоменных мышечных белков, таких как гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок, формирующих не фибриллы, а аморфные агрегаты с характерной кросс-β-структурой;

- установлено, что формирование амилоидных агрегатов мышечных белков происходит на уровне локальных межмолекулярных взаимодействий, начиная с олигомеров, с сохранением целостности вторичной структуры самого белка; отличием амилоидной агрегации мышечных белков от амилоидогенеза других белков является высокая скорость и обратимость этого процесса в условиях, приближенных к физиологическим, что является важным для понимания возможной функциональной роли этого процесса *in vivo* и для понимания отсутствия токсического действия агрегатов на гладкомышечные клетки в условиях *in vitro*;

- результаты, показывающие, что формирование амилоидной кросс-β структуры в агрегатах титина и С-белка происходит на этапе их олигомеризации при отсутствии выраженного лаг-периода вносят вклад в формирование представлений о молекулярных механизмах патологического и функционального амилоидогенеза;

- выявленное свойство агрегатов гладкомышечного титина препятствовать адгезии клеток, не оказывая на них прямого цитотоксического действия, может иметь практическое значение в области науки и техники.

При **обсуждении** полученных результатов автор плавно подводит читателя к более широкому пониманию амилоидной агрегации белков. В рамках изложенной им концепции исследуемые мышечные белки суперсемейства иммуноглобулинов рассматриваются в виде структурных элементов сократительного аппарата, доменная организация которых потенциально допускает быстрые и обратимые межмолекулярные взаимодействия с формированием участков кросс-β-структуры.

Научно-практическая значимость. Предложенный подход к комплексной оценке амилоидной природы белковых агрегатов может использоваться как методологическая основа для дальнейших исследований агрегации белков в норме и при патологии. Открытие амилоидных свойств мультидоменных мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов расширяет знания о функциональной роли этих белков, отвечающих за поддержание структурно-функциональной целостности сократительного аппарата, и вносит вклад в биофизическое понимание белковой агрегации как механизма, регулирующего вязко-упругие свойства мышцы.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования полученных результатов о сохранении вторичной структуры при агрегации мышечных белков в разработке подходов для оценки агрегации при изготовлении белковых препаратов

и других биотехнологических продуктов. Результаты по влиянию агрегатов титина на клеточную адгезию имеют значение для биомедицины, поскольку указывают на возможность создания антиадгезивных белковых или белок-содержащих покрытий для имплантируемых электродов, электростимуляторов и других медицинских устройств.

Материалы диссертационной работы следует рекомендовать для использования в курсах лекций и практических занятий по биофизике, клеточной биологии и патофизиологии для студентов биологических и медицинских факультетов в университетах Российской Федерации.

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

Содержание диссертации, степень ее завершенности, а также степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций можно оценить только положительно. Диссертантом изучены и проанализированы опубликованные результаты и теоретические положения других авторов по теме исследования. Для подтверждения теоретических выводов автором использован большой набор современных методов научных исследований. Обоснованность результатов, полученных диссертантом, основывается на согласованности поставленной цели работы, определяемых ею задач, полученных данных и сделанных выводов. Личный вклад автора несомненен.

Достоверность результатов и выводов.

Высокая степень достоверности результатов исследования определяется большим объемом полученных результатов и применением большого числа современных методов, апробированных мировым биофизическим сообществом. Двадцать девять публикаций автора (из которых 20 статей из списка ВАК РФ, в том числе в высокорейтинговых отечественных и зарубежных журналах) отражают основные положения работы, которые были апробированы на научных мероприятиях и опубликованы в их сборниках.

Автореферат отражает основное содержание диссертации. Судя по результатам, представленным в работе, содержанию публикаций, объему исследований, выполненным соискателем, личный вклад А.Г. Бобылёва в диссертацию заслуживает самой высокой оценки.

В качестве замечаний отмечу следующее:

1. В начальном разделе «результатов» – «Исследование динамики агрегации титина и С-белка методом ДСР» в графическом представлении результатов (рисунок 10 текста диссертации, соответствует рисункам 1А и 1Б автореферата) логарифмическая шкала абсцисс, на которой откладывается гидродинамический радиус обрывается на значимых для исследования значениях свыше 4,5 мкм. Почему?

2. В главе «Исследование изменений вторичной структуры титина и С-белка при агрегации» приведены полученные методом КД данные об агрегированных 5% α -спиральных участках, 30% β -складчатых структур. Далее автор пишет: «оставшиеся проценты скорее всего относятся к участкам неупорядоченности; по полученным нами данным... таковых участков ~ 50%». Где оставшиеся 15%? Не в них ли прячется причина отличий от данных, полученных методом ИК-Фурье?

3. Несогласованность в терминологии. По тексту в противовес изучаемым в диссертации белкам говорится то об «истинных амилоидных белках», то о «классических амилоидогенных белках».

4. При исследовании структуры С-белка методом СМУРР (стр. 141) говорится о «построенной зависимости $\log(IQ)-Q^2$ ». Почему не указано основание этого логарифма?

5. Наличествует глава «Сравнительное изучение обратимости агрегации ГМТми», в ней приводятся данные об обратимости агрегации гладкомышечного титина. Что по поводу дезагрегации другого объекта изучения диссертации – С-белка?

6. Для такой обстоятельной, обширной докторской диссертации явно мало выводов – 5. Можно было бы пару из пяти вынесенных на защиту положений обозначить «выводами». Что касается соответствия количества «выводов» пяти «задачам», то и они вызывают впечатление их сознательного укрупнения.

Приведенные замечания носят рекомендательный характер и никак не снижают высокую значимость обсуждаемой диссертации.

Заключение.

Диссертационная работа Бобылёва Александра Геннадьевича «Амилоидная агрегация мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований амилоидных свойств двух мышечных белков, разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как значимое научное достижение для биофизики, в частности биофизики мышечного сокращения, структурной организации сократительного аппарата и биофизики сложных систем.

Достоверность и объективность полученных результатов, их научная и практическая значимость позволяют считать, что диссертационная работа А.Г. Бобылёва полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, согласно пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор, Бобылёв Александр

Геннадьевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

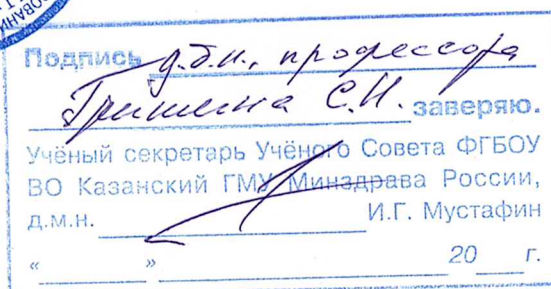
Профессор кафедры медицинской и биологической физики
имени академика Е.Е. Никольского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор биологических наук (шифр
специальности 03.01.02 – Биофизика),

профессор _____ Гришин Сергей Николаевич,

420012, г. Казань, ул. Булгарова, д. 49. Тел: +7 (843) 2360652

Электронная почта: sgrishin@inbox.ru

13.05.2026 г.



Сведения об официальном оппоненте
по диссертации Бобылёва Александра Геннадьевича «Амилоидная агрегация мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика

Фамилия, имя, отчество	Гришин Сергей Николаевич
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым защищена диссертация	Доктор биологических наук (шифр специальности 03.01.02 – Биофизика)
Ученое звание	Профессор
Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России
Ведомственная принадлежность организации	Министерство здравоохранения Российской Федерации
Полное наименование кафедры, лаборатории	кафедра медицинской и биологической физики имени академика Е.Е. Никольского
Должность	профессор
Почтовый индекс, адрес организации	420012, Приволжский федеральный округ, Республика Татарстан, г.Казань, ул. Бутлерова, д.49
Веб-сайт организации	https://kazangmu.ru/
Телефон	+7 (843) 236-06-52
Адрес электронной почты	sgrishin@inbox.ru
Являетесь ли Вы работником (в том числе по совместительству) организации, где работает соискатель ученой степени, его научный руководитель?	Не являюсь
Являетесь ли Вы работником (в том числе по совместительству) организации, где ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени	Не являюсь

является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем)?	
Являетесь ли Вы членом Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования науки Российской Федерации?	Не являюсь
Являетесь ли Вы членом экспертных советов Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования науки Российской Федерации?	Не являюсь
Являетесь ли Вы членом диссертационного совета, принявшего диссертацию к защите?	Не являюсь
Являетесь ли Вы соавтором соискателя степени по опубликованным работам по теме диссертационного исследования?	Не являюсь
Список основных публикаций в рецензируемых изданиях, монографии, учебники за последние пять лет по теме диссертации (не более 15 публикаций)	
1. Grishin S.N., Gorshunova A.N., Teplov A.Yu., Grishin A.S., Nasybullin A.R., Khairullin A.E. Purinergic modulation of ocular muscle contraction / Biophysics. 2025. T. 70. № 2. С. 320-323. 2. Khairullin A.E., Khabibrakhmanov A.N., Efimova D.V., Samigullin D.V., Grishin S.N., Mukhamedyarov M.A., Ziganshin A.U. Subtypes of P2 receptors in rat neuromuscular junction / Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2025. T. 178. № 5. С. 591-596. 3. Khairullin A.E., Efimova D.V., Teplov A.Y., Khabibrakhmanov A.N., Nagiev K.K., Grishin S.N., Ziganshin A.U., Mukhamedyarov M.A. Impairment of P2 receptor-mediated modulation of skeletal muscle contractions in transgenic mice with model amyotrophic lateral sclerosis / Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2025. T. 179. № 1. С. 20-23. 4. Горшунова А.Н., Зиганшин А.У., Гришин С.Н., Габдрахманов А.Ш., Хайруллин А.Е. Неизменные и переменные механизмы в синаптической модуляции различных типов скелетных мышц / Биофизика. 2025. Т. 70. № 5. С. 933-943. 5. Khairullin A.E., Mukhamedyarov M.A., Mukhamedzyanov R.D., Kashtanova N.M., Zhivotova E.N., Suchkova G.G., Shaizutdinova A.R., Ereemeev A.A., Grishin S.N. Patterns of purinergic modulation of myoneural transmission in presence of capsaicin / Biophysics. 2024. T. 69. № 1. С. 124-128. 6. Gorshunova A.N., Teplov A.Yu., Grishin S.N., Mukhamedzyanov R.D., Khairullin A.E. The effects of ethidium bromide on purinergic modulation of myoneural transmission and skeletal muscle contraction / Biophysics. 2024. T. 69. № 6. С. 1121-1125.	

7. Khairullin A.E., Efimova D.V., Ivanova D.V., Baltina T.V., Baltin M.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. Disorders of motor activity in a model of autism spectrum disorders / Neuroscience and Behavioral Physiology. 2024. T. 54. № 3. С. 465-473.
8. Хайруллин А.Е., Ефимова Д.В., Мухамедьяров М.А., Балтин М.Э., Балтина Т.В., Гришин С.Н., Зиганшин А.У. Динамика сокращений скелетных мышц крысы при активации P2-рецепторов после перерезки спинного мозга / Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2024. Т. 18. № 2. С. 45-51.
9. Khairullin A.E., Mukhamedyarov M.A., Grishin S.N., Teplov A.Yu., Nagiev K.K., Ziganshin A.U. Synaptic aspects of the pathogenesis of autism, amyotrophic lateral sclerosis, and Alzheimer's disease / Biophysics. 2023. T. 68. № 1. С. 137-145.
10. Khairullin A.E., Efimova D.V., Ivanova D.V., Grishin S.N., Ziganshin A.U. On the role of ectonucleotidases in synaptic transmission. thermolability of ATP metabolism / Biophysics. 2023. T. 68. № 4. С. 576-580.
11. Khairullin A.E., Efimova D.V., Ereemeev A.A., Sabirova D.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. Effect of spinal cord injury on P2 signaling in the cholinergic synapse / Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2023. T. 59. № 3. С. 822-830.
12. Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. Presynaptic purinergic modulation of the rat neuro-muscular transmission / Current Issues in Molecular Biology. 2023. T. 45. № 10. С. 8492-8501.
13. Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. P2 receptor signaling in motor units with muscular dystrophy / International Journal of Molecular Sciences. 2023. T. 24. № 2. С. 1587.
14. Khairullin A.E., Teplov A.Y., Grishin S.N., Ziganshin A.U. ATP causes contraction of denervated skeletal muscles / Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2023. T. 17. № S1. С. S73-S77.
15. Khairullin A.E., Grishin S.N., Gabdrahmanov A.I., Ziganshin A.U. Effects of ATP on time parameters of contractility of rats' slow and fast skeletal muscles in normal and hypothermic conditions / Muscles. 2023. T. 2. № 1. С. 23-35.

16 марта 2026 г.



/ Гришин Сергей Николаевич

Подпись д.б.н. профессора
Гришина С.Н. заверяю.
 Ученый секретарь Ученого Совета ФГБОУ
 ВО Казанский ГМУ Минздрава России,
 д.м.н. И.Г. Мустафин
 « 16 » 03 2026 г.