

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 избранной темы

На сегодняшний день средняя продолжительность жизни в России составляет около 75 лет, а через 10 лет прогнозируют ее увеличение до 81 года, что приведет к увеличению доли гериатрических болезней в структуре общей заболеваемости. При этом, после 81 года частота встречаемости амилоидозов достигает 95%. Однако, на сегодняшний день, механизмы, лежащие в основе формирования амилоидов, увеличение их интенсивности с возрастом, и даже их триггеры остаются крайне малоизученными. Существование, наряду с патологическими формами, функциональных амилоидов приводит к необходимости разделения этиологии этих форм. Например, прионный белок PrP в норме участвует в целом ряде процессов в нервной системе, однако, что служит пусковым механизмом начала формирования им амилоидов и развития прионного заболевания остается неизвестным. Более того, единого мнения о том, каким именно образом патологическая форма белка приводит к изменению нормальных белков, на сегодняшний день нет, что представляет собой актуальную проблему современной молекулярной биофизики.

В ряду различных, способных к формированию амилоидов, белков особое место занимают те, которые имеют иммуноглобулин-подобные домены. Современные данные, представленные в литературе, свидетельствуют о возможной роли формирования амилоидов белками иммунного ответа, приводя к развитию аутоиммунных заболеваний, доля которых в мире с каждым годом увеличивается вне зависимости от продолжительности жизни.

В связи с вышеизложенным, актуальность выбранной Бобылёвым А.Г. темы не оставляет никаких сомнений. Исследование является своевременным, направленным как на изучение фундаментальных механизмов формирования третичной структуры белков, так и на образование патологических структур – амилоидов – белками, которые имеют иммуноглобулин-подобные домены.

Степень обоснованности, достоверности и новизны научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Автор диссертации Бобылёв А.Г. в качестве объектов исследования выбрал два белка, широко представленные в гладкомышечной (титин) и скелетномышечной (миозин-связывающий белок С, С-белок) тканях, которые изучал с помощью широчайшего арсенала современных биофизических (в том числе, малоугловое

рентгеновское рассеяние с использованием синхротронного излучения, рентгеновская дифракция, ИК-Фурье спектроскопия, атомная силовая микроскопия, динамическое рассеяние света и т.д.) и биохимических (выделение и очистка мышечных белков гель-фильтрационной и ионообменной хроматографией, ДСН-гель-электрофорез, вестерн-блот анализ) методов. Особенно следует отметить использование независимых методов при анализе вторичной структуры белков, что доказывает правильность интерпретации полученных результатов и обоснованность сделанных выводов. Таким образом, применение корректного биоинформационного анализа и адекватных методов статистической обработки результатов, вкупе с использованными экспериментальными методами, обеспечило достоверность полученных результатов.

Все заявленные автором научные положения полностью подтверждены представленными в диссертации экспериментальными данными и обладают несомненной научной новизной. Так, Бобылёв А.Г. впервые показал, что при формировании амилоидных агрегатов титина и С-белка не происходит изменений в их вторичной структуре, что отличает мышечные белки с иммуноглобулин-подобными доменами от других амилоидогенных белков. Амилоидная агрегация титина может быть функциональной, согласно результатам, свидетельствующим о ее обратимости. Более того, амилоидные агрегаты гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка не показывают цитотоксического действия, но амилоиды титина нарушают адгезию гладкомышечных клеток. Предложенный механизм влияния белковых амилоидных агрегатов на адгезию и выживаемость клеток является принципиально новым, что вносит вклад в фундаментальные представления о роли этих структур в живой ткани.

Выводы полностью следуют из экспериментальных результатов, представленных автором в работе и соответствуют положениям, выносимым на защиту. Все положения диссертационного исследования в полном объеме отражены в 20 статьях, опубликованных в индексируемых Web of Science и Scopus научных изданиях (включая журналы первого квартиля). Материалы диссертации были представлены широкой научной общественности на всероссийских и международных конференциях и симпозиумах.

Структура и объем диссертации

Диссертация написана по стандартному плану и состоит из следующих разделов: Список использованных сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Список литературы. Общий объем диссертации составляет 301 страница. Диссертация содержит 52 рисунка и 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 717 наименований.

Анализ диссертационной работы

Впечатляет представленный Бобылёвым А.Г. обзор литературы. Написан очень подробно, системно и, что, особенно ценно, практически после каждого раздела представлена таблица, которая позволяет систематизировать опубликованные ранее данные. В обзоре литературы сделан акцент на биофизических закономерностях и влиянии различных физических факторов на агрегацию белков, а также приведена очень информативная таблица с методами исследования различных свойств белков. Импонирует представление ссылок на литературные источники – каждый факт, упоминаемый в литературном обзоре (также, как и в обсуждении) подтвержден соответствующей ссылкой, что дает возможность глубже вникнуть в тот или иной вопрос. Кроме того, в обзоре представлены иллюстрации, которые помогают читателю разобраться в тонкостях того или иного процесса или механизма. Несмотря на то, что объектами исследования автора стали белки животных, в обзоре литературы представлены данные и о других царствах.

В целом, обзор литературы очень информативен и, несмотря на его впечатляющий объем, достаточно лаконичен – складывается впечатление, что автором была систематизирована практически вся доступная литература. Из обзора четко следуют поставленные автором задачи исследования, которые полностью обоснованы.

Материалы и методы исследования представлены максимально подробно, что дает возможность читателю использовать данную диссертацию как пошаговую инструкцию при реализации любого из методов. Автор использовал широкий диапазон высокотехнологичных экспериментальных методов, что, очевидно, требовало консультационной помощи конкретных специалистов. Следует отметить, что Бобылёв А.Г. скрупулезно и максимально корректно отмечает взаимодействие с другими лабораториями, что свидетельствует о его способности не только решать, но и формулировать научные задачи.

Наиболее значительную часть объема диссертации занимает глава, посвященная результатам исследования.

Автор провел выделение белков, охарактеризовал их агрегаты и доказал, причем как методом рентгеновской дифракции, так и путем окрашивания тиофлавином Т, их амилоидную природу. Далее, с использованием кругового дихроизма было показано, что доля альфа-спиральных и бета-складчатых участков после агрегации не меняется ни у титина, ни у С-белка. Неожиданный эффект был подтвержден методом ИК-Фурье спектроскопии, что позволило автору обоснованно заключить, что для формирования агрегатов этими мышечными белками не требуется изменение вторичной структуры.

Далее, Бобылёв А.Г. проанализировал формирование агрегатов в различных растворах (с солями калия и его основными производными) и показал, что в условиях, которые больше приближены к физиологическим, формируемые агрегаты имеют меньший размер. Согласно результатам, гладкомышечный титин способен формировать амилоидные агрегаты двух типов, причем тот, у которого выявлена

более низкая способность к связыванию тиофлавина Т, способен и к дезагрегации. Следует отметить, что формирование агрегатов белков является сильнозависимым от химического состава растворов, но автором исследования был учтен и этот момент: в таблице 7 представлены различные составы растворов, время агрегации и полученные методом рентгеновской дифракции рефлексы.

Затем, автор исследования провел биоинформационный анализ, в котором определил домены в исследуемых белках, которые обладают неупорядоченной структурой. Наконец, в финальной части экспериментальной работы Бобылёв А.Г. представил результаты исследования цитотоксичности, которые показали отсутствие цитотоксического действия, но дали возможность предположить, что агрегаты формируют на поверхности структуру, препятствующую адгезии клеток. Методом атомной силовой микроскопии это предположение было подтверждено – агрегаты создают сопоставимую с искусственным антиадгезивным покрытием шероховатость поверхности.

В целом, глава, посвященная результатам исследования, как и все предыдущие разделы написана очень детально и четко. Все результаты проиллюстрированы, каждый раздел имеет краткое введение, описывающее задачу конкретного эксперимента, и вывод из полученных в нем результатов.

Обсуждение результатов написано также логично и подробно, как и вышеописанные разделы. Каждая часть обсуждения сопровождается конкретным заключением, которое, далее, находит свое отражение в выводах. Автор предлагает механизм образования агрегатов при участии не всей молекулы, что объясняет высокую скорость образования агрегатов. Кроме того, высказано предположение о потенциальной возможности формирования амилоидных структур в мышце *in vivo*, а также приведено обоснование формирования аморфных, а не фибриллярных агрегатов. Сравнение белков A β и самой длинной изоформы Orb2В белка Orb2 *Drosophila melanogaster* дает основания полагать, что невовлечение большей части молекулы белка в формирование агрегата делает его функциональным, а не патологическим. Хотя далее Бобылёв А.Г. указывает, что скорость и легкость формирования агрегатов не дают возможности исключить формирование и патологических агрегатов мультидоменными мышечными белками *in vivo*.

Заключение и выводы полностью следуют из представленных результатов и их обсуждения.

Вопросы и замечания

Единственное замечание касается представления диссертационного исследования в автореферате. С одной стороны, содержание автореферата полностью отражает содержание диссертации, как и должно быть. С другой стороны – возможно, автору стоило бы объединить результаты и обсуждение с тем, чтобы при кратком знакомстве с диссертационным исследованием у читателя с первых строк могла бы сложиться полная картина. Такое предложение связано с тем, что ограниченный объем автореферата и большой пул экспериментальных данных

несколько нивелирует впечатление от удивительно стройного изложения, которое имеет место в диссертации.

Кроме того, большое число сокращений, особенно с подстрочными символами, несколько затрудняет восприятие результатов в начале знакомства с материалом диссертации.

Вопросы, которые хотелось бы вынести в качестве дискуссионных:

- в диссертации несколько раз упомянуто (например, на стр. 120 – 121), что, в отличие от титина, С-белок формирует наиболее крупные частицы, которые седиментируют и не участвуют в дальнейшем измерении. С чем, по мнению автора, это может быть связано?

- какие могут быть объяснения того, что С-белок имеет более высокую скорость агрегации? Может ли это быть связано с молекулярной массой? И не обладает ли низкомолекулярный титин промежуточным, между С-белком и высокомолекулярным титином, временем агрегации?

- по данным автора, в формировании агрегатов как титином, так и С-белком, участвует не вся молекула. Для высокомолекулярного титина представлен рисунок 16, на котором это отчетливо видно, однако, для низкомолекулярного титина и С-белка столь же убедительных изображений не представлено. Это связано с разрешающей способностью АСМ?

- какие отличия, по мнению автора, у титина (от С-белка) позволяют ему формировать шероховатость поверхности?

- в обсуждении автор убедительно показывает, что формирование амилоидных структур в скелетной мышце может формировать адаптационные возможности для ее адаптации к механическому напряжению. Кроме того, автор не исключает и возможности формирования патологических амилоидов в мышечной ткани. В связи с этим, не может ли быть это одним из механизмов потери мышечного тонуса и развития саркопении в пожилом возрасте?

Вышеуказанные замечания имеют исключительно не принципиальный характер, а вопросы заданы в порядке дискуссии и ни в коей мере не снижают исключительно высокую оценку представленной Бобылёвым А.Г. диссертационной работы.

Заключение

В соответствии с вышеизложенным, считаю, что диссертация Бобылёва Александра Геннадьевича на тему: «Амилоидная агрегация мышечных белков семейства иммуноглобулинов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика является самостоятельным целостным завершённым трудом. Автором соблюдены все требования, предъявляемые к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Работа по своей актуальности, научной новизне, практической и теоретической значимости, набору методов, объёму выполненных исследований и

достоверности полученных результатов полностью отвечает всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям в соответствии с пп.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г (в действующей редакции), а ее автор, Бобылёв Александр Геннадьевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Доктор физико-математических наук по специальности 03.01.02 Биофизика

Профессор по специальности «Биофизика»

Огнева Ирина Владимировна

28/05/2026

Адрес: 123007, Россия, Москва, Хорошевское шоссе, дом 76а

Телефон: +7-916-043-1393, +7-499-195-6398

E-mail: iogneva@yandex.ru, iogneva@imbp.ru

Подпись Огневой Ирины Владимировны заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Доктор биологических наук

Левинских Маргарита Александровна



Адрес: 123007, Россия, Москва, Хорошевское шоссе, дом 76а

Телефон: +7-499-195-2253

E-mail: doc@imbp.ru