

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 диссертационного исследования

Диссертационная работа А.Г. Бобылёва посвящена исследованию амилоидной агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов. Актуальность подобных исследований является несомненной, поскольку нарушение сворачивания белков является универсальной проблемой, затрагивающей как фундаментальные аспекты биофизики, так и прикладные области биотехнологии и биомедицины. В частности, белковая агрегация признана одной из ключевых проблем при разработке и промышленном производстве терапевтических белковых препаратов.

Следует учитывать, что с неправильным сворачиванием и агрегацией белков связаны патологические состояния, такие как системные амилоидозы, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет II типа и другие. Однако известны и функциональные амилоиды, они найдены у бактерий, беспозвоночных животных (белок CPFB у *Aplysia*) и млекопитающих (белок Pmel17 в меланосомах). По данным литературы известно, что и патологические, и функциональные амилоидные агрегаты имеют специфическую кросс- β структуру и обладают способностью связываться с тимофлавином Т и Конго красным. При этом патологические амилоиды имеют высокую стабильность – устойчивы к ферментативному расщеплению, тогда как функциональные амилоиды способны к дезагрегации. Однако причины этих различий не известны. В диссертации для выяснения подобных структурных изменений и для более детального фундаментального понимания механизмов белковой агрегации использован высокотехнологичный и комплексный *in vitro* подход с применением ряда современных биофизических методов.

Современные представления описывают амилоидогенез как спектр процессов, включающих не только формирование фибрилл, но и менее упорядоченных

агрегатов, имеющих амилоидные свойства. Однако молекулярные механизмы этой агрегации остаются неясными.

Несмотря на имеющиеся данные, указывающие, в частности, на высокую склонность титина и миозин-связывающего белка С (С-белка) к агрегации, до сих пор не установлено, образуются ли *in vivo* амилоидные агрегаты этих белков, а если образуются, то являются ли они функциональными или патологическими? Вопросы о типе белковых агрегатов (амилоидные/неамилоидные, патологические/функциональные) мультидоменных мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов, структурных изменениях в этих белках при агрегации, а также о роли подобной агрегации в мышечных клетках остаются открытыми.

Таким образом, диссертационное исследование А.Г. Бобылёва, посвященное комплексному подходу к решению перечисленных проблем, а также ряда других принципиально важных вопросов, безусловно, является весьма актуальным и серьезно продвигает наши знания в области биологии и биомедицины, изучающей проблемы формирования белковых агрегатов.

Общая характеристика диссертационного исследования

Диссертация построена по традиционному принципу. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, собственных результатов, обсуждения, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

Во «Введении» изложена суть проблемы, обоснованы и сформулированы цели и задачи исследования, а также 5 положений, выносимые на защиту. Данная часть диссертации соотносится с выводами, представленными на основании анализа полученных результатов.

Глава «Обзор литературы» содержит общий анализ современных представлений по рассматриваемой проблеме. Исследования процесса сворачивания белков и поддержания целостности их нативной структуры в различных условиях, под влиянием внешних и внутренних факторов, являются одними из наиболее актуальных проблем с биологической и медицинской точек зрения. Подробно описаны литературные данные, характеризующие мышечные белки суперсемейства

иммуноглобулинов как интересные объекты для изучения процесса белковой агрегации.

Выяснение особенностей структурных изменений при агрегации исследуемых белков представляет собой интерес в связи с возможной физиологической ролью или патологическими последствиями данной агрегации в мышечных клетках.

В этой главе дается анализ степени изученности проблемы. Обзор написан хорошим литературным языком, автор успешно отразил данные большого количества современных исследований по изучаемой проблеме. Качество, с которым выполнен обзор литературы, свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния проблемы, использованным в дальнейшем для описания и обсуждения результатов.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны экспериментальные процедуры, включающие приготовление сложных растворов. В опытах был использован широкий арсенал высокотехнологичных научных методов биофизики и биохимии, таких как: динамическое рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, флуоресцентная спектроскопия с красителем тиофлавин Т, круговой дихроизм, ИК-Фурье спектроскопия, рентгеновская дифракция, малоугловое рентгеновское рассеяние с использованием синхротронного излучения, дифференциальная сканирующая калориметрия, конфокальная микроскопия, выделение и очистка мышечных белков, ДСН-гель-электрофорез, вестерн-блот анализ, методы биоинформатического анализа, которые являются адекватными и соответствуют поставленным целям и задачам. Полученные данные проанализированы с использованием адекватных методов статистической обработки.

Условия проведения опытов описаны квалифицированно и достаточно подробно. Эта часть дает необходимую информацию о методических особенностях данной работы. Корректность выбора вектора исследования, а также современность и адекватность методических приемов не вызывают сомнений.

Глава «Результаты» состоит из 7 частей, содержащих результаты собственных исследований. Все полученные данные корректно статистически обработаны и

отображены графически. Следует отметить, что такие исследования проведены впервые.

Диссертация завершается «Обсуждением результатов» и «Заключением», посвященным осмыслению и интеграции полученных данных. Подводя итог, автор делает заключение, что для гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка характерен особый путь агрегации, заключающийся в способности формировать только аморфные амилоидные агрегаты. При этом наблюдаются следующие особенности агрегации этих белков: (1) высокая скорость образования амилоидных агрегатов при отсутствии фазы нуклеации (зародышеобразования); (2) отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации; (3) обратимость процесса агрегации. Полученные результаты расширяют представления о процессе амилоидной агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов и белков в целом.

На основании полученных результатов сделано пять выводов, которые логически вытекают из результатов и полностью соответствуют цели и задачам исследования.

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

Результаты экспериментов хорошо документированы, иллюстративный материал обширен и свидетельствует о высоком качестве полученных результатов. Все исходные данные тщательно обработаны и подвергнуты разностороннему анализу. Обсуждение и оценка собственных результатов проведены автором корректно и не вызывают возражений. При обсуждении результатов рассмотрены различные варианты трактовок с привлечением обширного списка публикаций по данной проблеме. Статистическая обработка данных произведена с помощью адекватных современных программ. Выводы, сформулированные автором, логически вытекают из результатов и полностью соответствуют цели и задачам исследования.

Результаты диссертационного исследования А.Г. Бобылёва опубликованы в 29 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и МИНОБРНАУКИ России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных WoS, Scopus, РИНЦ и RSCI).

Учитывая обширный экспериментальный материал, самый современный уровень исследований и анализа результатов, апробацию работы на достаточно большом числе отечественных и международных научных собраний, новизна исследования и достоверность выводов не вызывает никаких сомнений.

Новизна исследования и полученных результатов представленной работы во многом определяется комплексным подходом к изучению агрегационных свойств гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка с использованием широкого набора современных научных методов биофизики и биохимии.

Показано, что исследуемые белки формируют амилоидные агрегаты с аморфной морфологией, которые образуются за относительно короткие временные интервалы. Формирование амилоидной кросс- β структуры в агрегатах титина и С-белка происходит на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации. Открыт новый тип «частичной» агрегации, когда только часть молекулы формирует амилоидную структуру.

Теоретическая и практическая значимость работы не ограничивается получением фундаментальных знаний о формировании амилоидных агрегатов исследуемыми мышечными белками (гладкомышечным титином и скелетномышечным С-белком). Полученные данные углубляют представления о возможных различиях между функциональными и патологическими амилоидными агрегатами, показывая на примере мультидоменных мышечных белков механизм формирования нетоксичных амилоидных агрегатов, способных дезагрегироваться. Эти знания необходимы для построения молекулярных моделей разных типов амилоидной агрегации, что позволит в дальнейшем находить способы влияния на процесс амилоидообразования. Важна практическая ценность работы, поскольку полученные данные о структурных изменениях в исследуемых мышечных белках при агрегации *in vitro* могут быть использованы в производстве биотехнологических продуктов. Результаты исследования по влиянию амилоидных агрегатов на адгезию клеток могут быть использованы в биомедицине для создания специальных антиадгезивных материалов в качестве покрытия для вживляемых электродов или электростимуляторов.

Таким образом, новизна и научно-практическая ценность полученных автором экспериментальных данных не вызывают сомнений.

Структура и объем работы

Диссертация А.Г. Бобылёва изложена на 301 странице текста и представляет собой рукопись, построенную и оформленную по классической схеме. Она начинается полным «Списком используемых сокращений», включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Главы диссертационной работы логично построены, отличаются последовательностью и лаконичностью изложения. Восприятие работы облегчается представленными 52 рисунками и 8 таблицами. Список используемой литературы содержит 717 источников.

Вопросы и замечания к работе

Диссертация изложена хорошим научным и литературным языком, не вызывает принципиальных замечаний ни по форме, ни по содержанию. Можно отметить лишь единичные опечатки и некоторые стилистические погрешности.

В ходе знакомства с работой возникли следующие вопросы:

1. Чем можно объяснить способность низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина ($GM T_{\text{нми}}$) формировать два типа аморфных агрегатов, отличающихся по своим свойствам?

2. Можно ли полностью исключить прямое цитотоксическое влияние агрегатов титина и С-белка и, возможно, агрегатов других белков суперсемейства иммуноглобулинов в мышцах? Или их «негативное» влияние опосредуется только нарушением адгезии клеток?

3. Обнаружены ли амилоидные агрегаты исследуемых белков или других белков суперсемейства иммуноглобулинов в мышцах? И если нет, то почему?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают научную ценность и высокую оценку диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Бобылёва Александра Геннадьевича «Амилоидная агрегация мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов», является научно-

7

Сведения об оппоненте

Кравцова Виолетта Васильевна

Ученая степень, звание: доктор биологических наук (специальность 1.5.5 – Физиология человека и животных).

Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», биологический факультет, кафедра общей физиологии

Ведомственная принадлежность: Правительство Российской Федерации

Должность: доцент кафедры общей физиологии.

Адрес организации: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

Адрес эл. почты организации: spbu@spbu.ru

Телефон: +7 (812) 363-60-00; +7 (812) 325-87-36 (факс)

Сайт организации: <https://spbu.ru>

Адрес электронной почты оппонента: v.kravtsova@spbu.ru; violettakravtsova@gmail.com

Научные публикации оппонента

по тематике диссертационного исследования за последние пять лет (не более 15):

1. **Kravtsova V.V.**, Sharlo K.A., Kulishenko A.A., Saburova E.A., Shenkman B.S., Krivoi I.I. Short-Term Mild Hypoxia Maintains Endplate Integrity and Lipid Membrane Stability in Rat Skeletal Muscle under Simulated Gravitational Unloading. *J. Evol. Biochem. Phys.* 2025. 61: 1574–1585. doi: 10.1134/S0022093025050138.
2. **Kravtsova V.V.**, Fedorova A.A., Matytsin V.O., Vetrovoy, Ganke D. D., Krivoi I.I. Short-Term Simulated High-Altitude Hypoxia Enhances Na,K-ATPase Efficiency in Maintaining Rat Diaphragm Electrogenesis. *Bull Exp Biol Med.* 2025. 179(6): 756-761. doi: <https://doi.org/10.1007/s10517-026-06563-7>.
3. Fedorova A. A., Ganke D. D., Bikmurzina A. E., **Kravtsova V. V.**, Krivoi I. I., Markov A. G. Changes in Barrier Properties of the Rat Jejunum and Colon after Hypobaric Hypoxia. *J. Evol. Biochem. Phys.* 2025. 61(4): 1251-1261. doi: 10.1134/s0022093025040258.
4. **Kravtsova V.V.**, Ganke D.D., Tishkova M.V., Saburova E.A., Matytsin V.O., Krivoi I.I. Short-Term Hypobaric Hypoxia Isoform-Specifically Protects Rat Skeletal Muscle Na,K-ATPase from Disuse-Induced Dysfunction. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2024. 60(5), 1712–1724. doi: 10.1134/S0022093024050053
5. Markov A.G., Livanova A.A., Fedorova A.A., **Kravtsova V.V.**, Krivoi I.I. Chronic Ouabain Targets Pore-Forming Claudin-2 and Ameliorates Radiation-Induced Damage to the Rat Intestinal Tissue Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 278. doi: 10.3390/ijms25010278.
6. **Kravtsova, V.V.**; Fedorova, A.A.; Tishkova, M.V.; Livanova, A.A.; Vetrovoy, O.V.; Markov, A.G.; Matchkov, V.V.; Krivoi, I.I. Chronic Ouabain Prevents Radiation-Induced Reduction in the $\alpha 2$ Na,K-ATPase Function in the Rat Diaphragm Muscle. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23, 10921. doi: 10.3390/ijms231810921.
7. Rognant S., **Kravtsova V.V.**, Bouzinova E.V., Melnikova E.V., Krivoi I.I., Pierre S.V., Aalkjaer C., Jepps T.A., Matchkov V.V. The microtubule network enables Src kinase interaction with the Na,K-ATPase to generate Ca^{2+} flashes in smooth muscle cells. *Front. Physiol.* 2022.13:1007340. doi: 10.3389/fphys.2022.1007340.
8. **Kravtsova, V.V.**; Fedorova, A.A.; Tishkova, M.V.; Livanova, A.A.; Matytsin, V.O.; Ganapolsky, V.P.; Vetrovoy, O.V.; Krivoi, I.I. Short-Term Mild Hypoxia Modulates Na,K-

ATPase to Maintain Membrane Electrogenesis in Rat Skeletal Muscle. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 11869. doi: 10.3390/ijms231911869.

9. **Kravtsova, V.V.;** Paramonova, I.I.; Vilchinskaya, N.A.; Tishkova, M.V.; Matchkov, V.V.; Shenkman, B.S.; Krivoi, I.I. Chronic Ouabain Prevents Na,K-ATPase Dysfunction and Targets AMPK and IL-6 in Disused Rat Soleus Muscle. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 3920. doi: 10.3390/ijms22083920.
10. **Kravtsova V.V.,** Krivoi I.I. Molecular and Functional Heterogeneity of Na,K-ATPase in the Skeletal Muscle. J. Evol. Biochem. Physiol. 57 (4): 835-851. 2021.

доктор биологических наук,
доцент кафедры общей физиологии
биологического факультета СПбГУ



Кравцова Виолетта Васильевна

16.03.2026

