

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.232.01 (Д 002.285.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25 июня 2026 г. № 7

О присуждении Бобылёву Александру Геннадьевичу, гражданину Российской Федерации, учёной степени доктора биологических наук.

Диссертация «Амилоидная агрегация мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов» по специальности 1.5.2. – Биофизика принята к защите 18 марта 2026 г. (протокол заседания № 5) диссертационным советом 24.1.232.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пушкино, проспект Науки, д. 3, приказ Минобрнауки России от 07 ноября 2019 года № 1069/нк, с изменениями, внесенными приказами Минобрнауки России № 118 от 24 февраля 2021 г., № 561/нк от 3 июня 2021 г., № 24/нк от 28 января 2021 г., № 1162/нк от 12 октября 2022 г., 54/нк от 26 января 2023 г. и № 475/нк от 21 мая 2024 г.

Соискатель Бобылёв Александр Геннадьевич, 23 сентября 1982 года рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Сравнительное изучение амилоидных свойств мышечных белков и Аβ(1-42)-пептида мозга» по специальности 03.01.02 – «Биофизика» защитил в 2011 г. в диссертационном совете Д 002.093.01 на базе ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) (приказ Министерства образования и науки Российской Федерации от 22 марта 2012 г. № 61/нк-1). В настоящее время Бобылёв А.Г. работает в должности ведущего научного сотрудника Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус» (РФ,

федеральная территория Сириус) и по совместительству работает в должности ведущего научного сотрудника в лаборатории биофармакологии ИТЭБ РАН.

Диссертация выполнена в Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности (с 2025 г. переименована в лабораторию биофармакологии) ИТЭБ РАН.

Научный консультант – доктор биологических наук Вихлянцев Иван Милентьевич, главный научный сотрудник лаборатории биофармакологии ИТЭБ РАН.

Официальные оппоненты:

1. Гришин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры медицинской и биологической физики имени академика Е.Е. Никольского;
2. Огнева Ирина Владимировна, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук;
3. Кравцова Виолетта Васильевна, доктор биологических наук, доцент кафедры общей физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва) – в своём **положительном** отзыве, подписанным доктором биологических наук, профессором Левицким Дмитрием Ивановичем, заведующим лабораторией структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха (ФИЦ Биотехнологии РАН) и утвержденным доктором биологических наук Федоровым Алексеем Николаевичем,

директором ФИЦ Биотехнологии РАН, указала, что диссертационная работа Бобылёва А.Г. является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании комплекса современных биофизических и биохимических методов разработаны и экспериментально обоснованы положения о способности гладкомышечного титина и скелетномышечного миозин-связывающего белка С формировать аморфные агрегаты с признаками амилоидной кросс- β -структуры. Совокупность полученных результатов можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное значение для биофизики мышечного сокращения и структурной организации сократительного аппарата, а также физики белка. Диссертационная работа Бобылёва Александра Геннадьевича соответствует всем критериям, предъявляемым к докторским работам, в том числе пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с последующими изменениями), Бобылёв А.Г. заслуживает присвоения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Соискатель имеет 108 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации 29 работ общим объемом 15,7 печатных листа, из них 20 статей опубликовано в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и Минобрнауки России для опубликования результатов докторских диссертаций и индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ и RSCI и 9 тезисов в материалах российских и международных конференций.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах, текст диссертации не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые соискатель внес основной или существенный вклад, определяя концепт и планирование исследования, проведение экспериментов, включая все этапы пробоподготовки, а также анализ данных и написание статьи):

1) **Bobylev A.G. et al.**, Smooth muscle titin forms *in vitro* amyloid aggregates, *Bioscience Reports*. 2016, V. 36(3), Art. No. e00334. DOI: 10.1042/BSR20160066 (Впервые показана способность гладкомышечного титина к агрегации *in vitro* и определен ее тип. Каноническими методами выявлена кросс- β -структура и спектральные признаки амилоидной агрегации титина, определена морфология агрегатов).

- 2) Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V., **Bobylev A.G.** Amyloid properties of titin, *Biochemistry* (Moscow), 2017, V. 82 (13), 1675–1685. DOI: 10.1134/S0006297917130077 (Представлен обзор о структуре и амилоидных свойствах титина. Сформулировано собственное представление об атипичной амилоидной агрегации мышечного белка титина).
- 3) Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., Penkov N.V., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Enin G.A., Khutzian S.S., Selivanova O.M., **Bobylev A.G.** Different amyloid aggregation of smooth muscles titin *in vitro*, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018, V. 36 (9), 2237–2248. (Исследованы свойства амилоидных агрегатов гладкомышечного титина в зависимости от условий среды *in vitro* и показано ее влияние на тонкую структуру и морфологию амилоидных агрегатов, что имеет значение для понимания как патологических, так и потенциально функционально-значимых аспектов агрегации титина).
- 4) **Bobylev A.G., et al.** Changes in titin structure during its aggregation, *Molecular Biology*, 2020, V. 54(4), 643–652. (Получены структурные данные, свидетельствующие об амилоидной агрегации титина, формирующем не классические фибриллярные амилоиды, а аморфные амилоидные агрегаты с локальными участками кросс- β -структуры. На основе анализа собственных и литературных данных была предложена модель структурной организации амилоидных агрегатов титина, согласно которой, β -тяжи в агрегатах титина ориентированы параллельно предполагаемой оси агрегата, а не перпендикулярно, как в классических амилоидных фибриллах. При этом расстояние между β -слоями варьирует в пределах 8–12 Å).
- 5) Bobyleva L.G., Shumeyko S.A., Yakupova E.I., Surin A.K., Galzitskaya O.V., Kihara H., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Penkov N.V., Nikulin A.D., Suvorina M.Y., Molochkov N.V., Lobanov M.Y., Fadeev R.S., Vikhlyantsev I.M., **Bobylev A.G.** Myosin Binding Protein-C Forms Amyloid-Like Aggregates *In Vitro*. // *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, V. 22. Art. No. 731. DOI: 10.3390/ijms22020731 (Исследована способность скелетномышечного миозин-связывающего белка C (С-белка) к амилоидной агрегации с использованием канонических методов (рентгеноструктурный анализ и спектрофлуориметрия). Было показано, что С-белок, так же, как и гигантский белок титин формирует аморфные амилоидоподобные агрегаты *in vitro*. Полученные данные показали, что способность титина формировать амилоидные агрегаты не является его уникальным свойством, а может проявляться у других саркомерных белков суперсемейства иммуноглобулинов).

6) **Bobylev A.G. et al.** Amyloid Aggregates of Smooth-Muscle Titin Impair Cell Adhesion. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22, iss. 9. Art. No. 4579. DOI: 10.3390/ijms22094579 (Исследовано цитотоксичное действие амилоидных агрегатов мышечных белков на клетки *in vitro* с целью понимания возможных биологических последствий амилоидной агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов. Продемонстрирована способность агрегатов гладкомышечного титина нарушать адгезию клеток к поверхности подложки, а также влиять на организацию актинового цитоскелета клеток в культуре).

7) **Bobylev A.G., et. al.** Nonspecific Amyloid Aggregation of Chicken Smooth-Muscle Titin: *In Vitro* Investigations, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, V. 24 (2), Art. No. 1056. DOI: 10.3390/ijms24021056 (С использованием набора классических биофизических методов изучения амилоидной агрегации белков, исследован процесс амилоидной агрегации высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина, выделенной из желудка курицы. Показано, что белок способен быстро формировать не амилоидные фибриллы, а аморфные амилоидные агрегаты с локальными участками четвертичной кросс- β -структуры. Впервые методом атомно-силовой микроскопии выявлены олигомеры титина в условиях высокой ионной силы (0,6 М KCl), которые способствуют быстрой агрегации титина).

8) Бобылёва Л.Г., Тимченко М.А., Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** Особенности олигомеризации гладкомышечного титина и скелетного миозин-связывающего белка С, *Биофизика*, 2023, Т. 68(3), 365–368. (Изучена динамика процесса олигомеризации двух мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов (гладкомышечного титина и скелетномышечного миозин-связывающего белка С (С-белка)) в условиях *in vitro*. Показаны различные пути агрегации титина и С-белка: С-белок в условиях низкой ионной силы формирует относительно стабильные олигомеры, которые существенно не вовлекаются в дальнейшую агрегацию, тогда как гладкомышечный титин образует олигомерные формы уже при высокой ионной силе, а при снижении ионной силы эти олигомеры становятся предшественниками крупных аморфных амилоидных агрегатов). Описана морфология олигомерных форм белков.

9) Бобылёва Л.Г., Урюпина Т.А., Тимченко М.А., Удальцов С.Н., Вихлянцев И.М., **Бобылёв А.Г.** К вопросу о пути амилоидной агрегации титина, *Биофизика*, 2023, Т. 68(6), 1085–1091. (Обобщены собственные и литературные данные по амилоидной агрегации белка титина и сформулирована гипотеза об особом пути его агрегации, приводящем к образованию не фибриллярных, а аморфных форм агрегатов. В формировании последних участвует не вся гигантская молекула титина, а только

отдельные ее участки или домены, способные к локальным межмолекулярным взаимодействиям. В работе описан энергетический ландшафт агрегации титина, в котором учитываются его мультидоменная организация, ранняя олигомеризация, отсутствие выраженной перестройки вторичной структуры и возможность одновременного сохранения внутримолекулярных связей при формировании межмолекулярных контактов амилоидной природы).

10) Тимченко М.А., Тимченко А.А., Казаков А.С., Вихлянцев И.М., Бобылёва Л.Г., Бобылёв А.Г. Исследование методами СМУРР и ИК-Фурье спектроскопии структурных особенностей агрегатов гладкомышечного титина, сформированных в разных условиях *in vitro*, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2024, Т. 177 (4), 459–465 (Методами молекулярной спектроскопии выявлено два типа агрегатов гладкомышечного титина, различающихся по морфологии, способности связывать тиофлавин Т и дезагрегировать при изменении внешних условий. Согласно структурным данным (СМУРР), оба типа агрегатов имеют близкую к плоской структуру. ИК-Фурье спектроскопия также не выявила существенных различий во вторичной структуре между двумя типами агрегатов. Показано, что агрегация титина включает два этапа: первоначально формируются устойчивые надмолекулярные комплексы с кросс- β -структурой, а затем в зависимости от условий среды из них образуются агрегаты разной морфологии и с разными свойствами, что важно для понимания неклассического пути амилоидной агрегации титина).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы **оппонентов**:

д.б.н., профессора **Гришина С.Н.** – отзыв **положительный**. Критических замечаний по существу работы нет, имеются замечания и вопросы: 1). В разделе «Исследование динамики агрегации титина и С-белка методом ДРС» на рис. 10 логарифмическая шкала оси 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 КД данные об агрегированных 5% α -спиральных участках и 30% β -складчатых структур, отмечая, что «оставшиеся проценты скорее всего относятся к участкам неупорядоченности; по полученным нами данным таких участков ~50%», а где оставшиеся 15%? Не в них ли прячется причина отличий от данных, полученных ИК-Фурье методом? 3). Несогласованность в терминологии в определении амилоидных белков, о которых говорится то, как об «истинных амилоидных белках», то о «классических амилоидогенных

белках». 4). На стр. 141 в «построенной зависимости $\log(IQ)-Q^2$ » не указано основание этого логарифма. 5). В гл. «Сравнительное изучение обратимости агрегации ГМТнми» приводятся данные об обратимости агрегации гладкомышечного титина, но нет данных по дезагрегации С-белка – другого объекта изучения диссертации. 6). Для такой обстоятельной, обширной докторской диссертации явно мало пяти выводов. 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.

д.ф.-м.н., профессора Огневой И.В. – отзыв положительный.

Критических замечаний по существу работы нет, имеются замечания и вопросы: 1). Замечание рекомендательного характера: в автореферате автору стоило бы объединить результаты и обсуждение. Такое предложение связано с тем, что ограниченный объем автореферата и большой пул экспериментальных данных несколько нивелируют впечатление от удивительно стройного изложения, которое имеет место в диссертации. 2). Большое число сокращений, особенно с подстрочными символами, затрудняет восприятие результатов в начале знакомства с материалом диссертации. 3). 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? 3). 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? 4). По данным автора, в формировании агрегата как титином, так и С-белком участвует не вся молекула. Для высокомолекулярного титина представлен рис. 16, на котором это отчётливо видно, однако для низкомолекулярного титина и С-белка столь же убедительных изображений не представлено. Это связано с разрешающей способностью АСМ? 5). Какие отличия титина (от С-белка) позволяют ему формировать шероховатость поверхности? 6). В обсуждении автор убедительно показывает, что амилоидные структуры в скелетной мышце могут формировать адаптационные возможности 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?

д.б.н. **Кравцовой В.В.** — отзыв **положительный**. Критических замечаний по существу работы нет, имеются замечания и вопросы: 1). Чем можно объяснить способность низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина (ГМТнми) 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? 4). В тексте имеются единичные опечатки и стилистические погрешности.

В положительном отзыве ведущей организации указано, что: 1). Концепция частичной амилоидной агрегации титина и С-белка является интересной и перспективной. Для усиления восприятия работы желательно было бы представить в заключительной части обобщающую схему, объединяющую этапы олигомеризации, формирования локальных кросс- β -участков, укрупнения агрегатов и возможные функциональные следствия для мышечной клетки. 2) Экстраполяция результатов *in vitro* на возможные процессы *in vivo* является обоснованной, однако требует дальнейшего экспериментального подтверждения. В тексте можно было бы более явно обозначить ограничения такой экстраполяции и возможные подходы к ее проверке на клеточных или тканевых моделях; 3). Автором подробно исследованы варианты дезагрегации агрегатов гладкомышечного титина. Было бы интересно дополнительно обсудить, почему аналогичный блок экспериментов не был столь же подробно представлен для С-белка и какие физико-химические условия могли бы быть использованы для проверки обратимости его агрегации? 4). Выводы диссертации в целом соответствуют поставленным задачам, однако для докторской работы такого объема и концептуального уровня их можно было бы несколько расширить, отдельно

сделав вывод о предлагаемом механизме частичной амилоидной агрегации и вывод о потенциальном функциональном значении обратимой амилоидной агрегации мышечных белков; 5). Почему интенсивность флуоресценции тиюфлавина Т в присутствии амилоидных агрегатов титина и С-белка увеличивалась не настолько сильно в сравнении с таковой в присутствии классических амилоидных фибрилл? 6). Если не меняется вторичная структура титина и С-белка при их агрегации, то что меняется? 7). Известны ли амилоидозы, патогенез которых является следствием амилоидной агрегации титина и С-белка?

Положительные, не содержащие замечаний отзывы, на автореферат предоставили: д.б.н. Мирзоев Т.М., ведущий научный сотрудник, зам. заведующего лабораторией миологии ФГБУН Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем РАН; д.м.н., профессор Афанасьев С.А., зав. лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии Томского НИМЦ; д.б.н. Бершицкий С.Ю., главный научный сотрудник, зав. лабораторией биологической подвижности ФГБУН Института иммунологии и физиологии Уро РАН; д.ф.-м.н. Гриневич А. А., зам. директора Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН; д.м.н. Костарева А.А., директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ имени В.А. Алмазова» МЗ.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их профессиональной компетентностью в области биофизики и физиологии мышечной клетки, структурной биологии и физики белка, которые подтверждены сериями публикаций в ведущих российских и международных научных журналах.

Оппонент д.б.н., проф. Гришин С.Н. является специалистом в области медицинской и молекулярной биофизики, пространственной организации и динамических свойств белков; оппонент д.ф.-м.н., профессор Огнева И.В. является специалистом в области биофизики клетки, сборке цитоскелетных белков, механизмов клеточной адаптации; оппонент д.б.н. Кравцова В.В. является специалистом в области физиологии и биофизики сократительных систем, включая мышечные клетки.

Выбор ФИЦ Биотехнологии РАН в качестве ведущей организации обоснован широкой известностью и достижениями сотрудников лабораторий структурной биохимии белка, белок-белковых взаимодействий и молекулярной генетики в области биофизики мультидоменных мышечных белков и молекулярных механизмов белок-белковых взаимодействий, а также наличием ряда публикаций, близких по теме диссертационной работы Бобылёва А.Г., что позволяет им оценить научную новизну, теоретическую и практическую значимость его диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований агрегации мышечных белков:

Предложена концепция, выделяющая агрегацию мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов в особый тип амилоидной агрегации без образования классических фибрилл и характеризующейся формированием участков с кросс- β -структурой за счет локальных взаимодействий, не затрагивающих вторичную структуру всей молекулы.

Впервые с помощью рентгеновской дифракции и спектрофлуориметрии с использованием тиофлавина Т была продемонстрирована способность гладкомышечного титина и скелетно-мышечного миозин-связывающего белка С (С-белка) формировать *in vitro* аморфные агрегаты с признаками амилоидной, четвертичной кросс- β -структуры.

Показано, что агрегация мышечных белков происходит при отсутствии выраженной фазы нуклеации, что отличает ее от амилоидогенеза фибриллярного типа.

Установлено, что в отличие от патологических форм амилоидов, формирование амилоидных агрегатов исследованных мышечных белков происходит за относительно короткие временные интервалы: в течение 5-10 минут для С-белка, 20 минут для высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина и 60 минут для низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина.

Показано, что формирование амилоидной кросс- β -структуры в агрегатах титина и С-белка происходит на этапе олигомеризации, т.е. на начальной, а не завершающей стадии процесса амилоидной агрегации.

Впервые показано, что амилоидная агрегация как титина, так и С-белка происходит за счет формирования локальных участков с кросс- β -структурой без выраженных изменений вторичной структуры самих белков, что указывает на особый путь агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов.

Показана обратимость процесса агрегации гладкомышечного титина, что может иметь функциональное значение в условиях *in vivo*.

Продemonстрировано, что амилоидные агрегаты обоих исследованных белков, не оказывая прямого цитотоксичного действия, нарушают клеточную адгезию фибробластов и гладкомышечных клеток в культуре в условиях *in vitro*.

Показано, что способность амилоидных агрегатов гладкомышечного титина нарушать клеточную адгезию фибробластов и гладкомышечных клеток происходит за счет изменения агрегатами морфологии (топологии) поверхности подложки.

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что полученные результаты об участии в формировании амилоидной кросс- β -структуры не всей молекулы белка, а ее отдельных доменных участков или локально-раскрытых фрагментов, способных к межмолекулярному взаимодействию внутри олигомерных или надмолекулярных структур позволяет рассматривать исследуемые агрегаты не только в контексте патологической белковой агрегации, но и как возможный элемент функциональной регуляции вязко-упругих свойств мышц, что расширяет традиционные представления об амилоидогенезе.

Значимость работы для биофизики мышечного сокращения определяется тем, что исследуемые белки являются важнейшими компонентами сократительного аппарата поперечно-полосатых и гладких мышц и предположение о возможной роли обратимых амилоидных взаимодействий в поддержании структурно-функциональной целостности сократительного аппарата и регуляции вязко-упругих свойств мышечной ткани представляет собой новое направление дальнейших исследований.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные биофизические и биохимические методы исследования, включая динамическое рассеяние света (ДРС),

просвечивающую электронную микроскопию, атомно-силовую микроскопию (АСМ), флуоресцентную спектроскопию с тиофлавином Т, круговой дихроизм (КД), ИК-Фурье спектроскопию, рентгеновскую дифракцию, малоугловое рентгеновское рассеяние с использованием синхротронного излучения, дифференциальную сканирующую калориметрию, конфокальную микроскопию, методы выделения и очистки мышечных белков, ДСН-гель-электрофорез, вестерн-блот анализ, жидкостную хроматографию с tandemной масс-спектрометрией, а также методы биоинформатического анализа. Использование совокупности независимых методов позволило провести комплексную верификацию полученных результатов на разных уровнях структурной организации белков. Использованные в работе методы соответствуют поставленным цели и задачам.

Значение для практики полученных соискателем результатов исследования об особенностях и условиях агрегации исследуемых мышечных белков подтверждается тем, они могут быть использованы при разработке подходов к контролю белковой агрегации в биотехнологии и биомедицине. Результаты также важны для интерпретации возможной роли негативной белковой агрегации при развитии патологических процессов и при состояниях, связанных с нарушением протеостаза. Выявленный эффект нарушения клеточной адгезии на поверхностях, покрытых агрегатами титина является перспективным в использовании при разработке антиадгезивных материалов и покрытий для имплантируемых устройств.

Достоверность результатов подтверждается высоким уровнем экспериментальной работы с применением широкого спектра современных биофизических, биохимических методов и методов статистического анализа данных, а также согласованностью результатов, полученных независимыми методами.

Воспроизводимость результатов обеспечивалась использованием сертифицированного оборудования и точностью калибровки приборов, высоким качеством используемых материалов, обоснованными контролями, строгим соблюдением методических протоколов.

Использованы современные методы статистической обработки. Полученные результаты прошли экспертизу в рецензируемых научных

журналах и докладывались на профильных российских и международных научных конференциях.

Идея диссертационного исследования базируется на анализе собственных экспериментальных данных и находится в согласии с современными представлениями о белковой агрегации, включая амилоидогенез функциональных амилоидов и структурную организацию мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов.

Все основные результаты автора получены впервые.

Личный вклад соискателя в постановку задач, анализ результатов и формирование общей научной концепции диссертационного исследования и выполнение экспериментов является определяющим. Междисциплинарный характер работы включал часть исследований, проведенных совместно с профильными лабораториями и научными центрами: 1) Национальной лабораторией физики высоких энергий Фотонной фабрики, Цукуба, Япония (исследование конформации агрегатов мышечных белков с использованием синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния); 2) лабораторией биофизики и радиационной биологии Семмельвейского университета, Будапешт, Венгрия (определение морфологии одиночных молекул и олигомеров гладкомышечного титина методом АСМ); 3) лабораторией фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН (определение цитотоксичности агрегатов исследуемых мышечных белков в культуре клеток); 4) лабораторией новых методов в биологии, ФИЦ ПНЦБИ РАН (структурные исследования мышечных белков ИК-Фурье спектроскопией); 5) группой структурных исследований макромолекулярных комплексов, Институт белка (ИБ) РАН (определение структуры белковых агрегатов методом рентгеновской дифракции); 6) лабораторией биоинформатики, ИБ РАН (изучение идентичности аминокислотной последовательности, а также расчет неупорядоченных участков в молекулах исследуемых белков), 7) группой термодинамики белка, ИБ РАН (определение термостабильности агрегатов титина с применением дифференциальной сканирующей калориметрии); 8) лабораториями ЯМР-исследований биосистем, ИТЭБ РАН и физики белка, ИБ РАН (исследование морфологии и структуры белковых агрегатов методом АСМ); 9) лабораторией наноструктур и нанотехнологий, ИТЭБ РАН (методом АСМ

исследована структура поверхности, сформированной агрегатами титина на подложке); 10) сектором оптической микроскопии и спектроскопии ФИЦ ПНЦБИ РАН (динамика агрегации титина и С-белка методом ДСР).

Работа написана автором самостоятельно, актуальные научные результаты по своему содержанию соответствует специальности 1.5.2. – Биофизика в части пп. 2. Молекулярная биофизика; 3. Супрамолекулярные сборки. Метастабильные состояния и механизмы самоорганизации биомолекул *in vivo* и *in vitro*; 6. Биофизика сократительных систем Паспорта научной специальности 1.5.2. Биофизика.

В ходе защиты диссертации Бобылёва А.Г. не было высказано критических замечаний.

Соискатель Бобылёв А.Г. ответил на все задаваемые в ходе заседания вопросы:

- 1) могут ли формироваться амилоидные агрегаты в мышцах *in vivo* (например, при высоких физических нагрузках спортсменов, когда происходит снижение pH, лактата или при повреждениях мышечной ткани, ассоциированных с увеличением креатинфосфокиназы (КФК) в крови?
- 2) Раствор с каким pH использовался в экспериментах с клетками, 7.0 или более физиологический 7.4?
- 3) Эта диссертация представляет большой интерес, так как поднимает вопросы в целом о белковой агрегации не только в мышцах, но и в других тканях и органах и не только животных, но и растений, одноклеточных и других живых организмов. Насколько явление амилоидной агрегации распространено среди других представителей живых организмов? Встречается ли она в растениях? Если, да, то исследовали ли Вы белковую агрегацию, в том числе, амилоидного типа, в клетках растений? Известны ли работы о белковой агрегации у одноклеточных организмов?
- 4) Какую функцию может выполнять обратимость амилоидной агрегации? Какие внутриклеточные процессы могут запускаться агрегацией в нормальных условиях в клетке? Какие сигнальные пути в клетке могут влиять на обратимую агрегацию тайтина и С-белка? Каковы перспективы?
- 5) Каким образом выявленные механизмы агрегации тайтина и С-белка можно будет использовать в терапии амилоидогенеза?

- 6) С учетом того, что тайтин и С-белок являются внутриклеточными белками, насколько правомерно было проведение экспериментов по исследованию адгезии клеток на поверхности с агрегатами (амилоидами) этих белками? Ведь в норме они не встречаются в экстраклеточном пространстве.
 - 7) полученные Вами данные указывают на частичную агрегацию белков. Пробовали Вы как-то идентифицировать участки, непосредственно вовлеченные в агрегацию?
 - 8) Оценивали Вы цитотоксичность и какова выживаемость клеток в экспериментах с гладкомышечными клетками? Каков механизм нарушения адгезии? Были ли попытки посмотреть культуру на поверхности агрегатов титина в 3-Д матриксе чтобы увидеть точный механизм взаимодействия клеток с агрегатами титина?
 - 9) Согласно данным методов КД и ИК-Фурье спектроскопии вторичная структура практически не меняется, но в докладе показано, что кросс-бета структура определяется рентгеновской дифракцией и спектрофлуориметрией. Как формируется кросс-бета структура в агрегатах исследуемых белков?
 - 10) На слайде 22 представлен ИК-спектр белка с белковыми полосами Амид I и Амид II, по каким параметрам оценивали вторичную структуру нормальных и агрегированных белков?
 - 11) Окрашивание тиофлавина Т приводит к увеличению флуоресценции и это используется в качестве критерия для характеристики физической объемной формы белка. Есть ли понимание того, почему это происходит?
 - 12) В диссертации, как мне показалось, необычно сформулированы задачи, т.к. они ориентируют исследование на использование широкого набора методов, а не на ожидаемый результат. Поясните, пожалуйста, почему Вы выбрали именно такой формат?
 - 13) В диссертации акцентируется внимание на агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов. Уточните, пожалуйста, какова доля иммуноглобулиновых доменов в исследуемых модельных белках?
- и привел собственную аргументацию:
- 1) касательно возможности агрегации в мышцах *in vivo* в литературе данных нет, однако формирование агрегатов неправильно свернутых белков при этом

исключить нельзя. Известен факт рабдомиолиза при высокоинтенсивных нагрузках, что может приводить к увеличению уровня КФК в крови.

- 2) Использовали раствор с физиологическим рН – 7.4.
- 3) Да, белковая агрегация амилоидного типа — это повсеместно распространенный процесс в живой природе. В растениях, в частности, при моём участии были открыты амилоидные фибриллы вицилина в горохе. Что касается белковой агрегации в одноклеточных организмах, то да, она известна, например, у бактерий. И весь функционал методов, используемых в диссертации, можно применять и для исследования амилоидной агрегации в клетках разных живых организмов.
- 4) Агрегаты могут влиять на вязкоупругие свойства мышечных клеток, в частности, может увеличиваться локальная жесткость в I-зоне саркомера, там, где молекулы титина могут агрегировать с формированием локальных кросс-бета участков (амилоидных участков) между соседними нитями титина. Локальная жесткость поможет избежать разрывов при перерастяжении саркомера. Что касается внутриклеточных процессов и их влияния на обратимость процесса белковой агрегации, то ионы кальция могут влиять на этот процесс. В мышцах *in vivo* не показано. В них наблюдали полусвернутые белки, а не амилоиды, поскольку неправильно свернутые белки клеткой убираются путем митофагии.
- 5) Полученные данные могут помочь в разработке препаратов для удаления только патологических амилоидных агрегатов, а не функциональных амилоидов.
- 6) Да, маловероятно, что титин и С-белок смогут откладываться в виде агрегатов вне клеток. Однако задача по исследованию роста клеток на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами, ставилась для того, чтобы выяснить механизм гибели клеток. Основная задача была доказать отсутствие прямой токсичности амилоидных агрегатов титина на клетки.
- 7) Да, были попытки идентифицировать агрегированные участки. Ставилась задача выяснить это методом ограниченного протеолиза с последующим детектированием стабильных структур методом масс-спектрометрии. Однако титин оказался очень сложным объектом и даже на этапе исследования его в молекулярной (не агрегированной) форме было очень сложно проводить его первичный протеолиз перед масс-спектрометрией, и мы наблюдали низкий

пептидный выход. Следовательно, обнаружение агрегированных участков, или по-другому амилоидных ядер, остается не решенной задачей.

8) Да, мы проводили прямую оценку цитотоксичности, и в докладе я это указал. Непосредственно исследования на 3-Д матриксе не проводились, так как задачей работы было показать отсутствие прямого цитотоксического действия на клетки. Тем не менее, работы по данному направлению продолжаются и исследуются эффекты на других культурах клеток. Наиболее важные результаты, подтверждающие основные выводы диссертации, получены недавно на культуре SIM-A9 – иммортализованной культуре глиальных клеток мышей. В частности, показан антиадгезивный эффект подложки из агрегатов титина. Выявлены морфологические изменения цитоскелета относительно контроля, отсутствие иммунного ответа и лизис, как возможный путь гибели небольшого числа неоткрепившихся клеток. Было подано 2 заявки на изобретение: «Применение белка титина и его фрагментов для снижения адгезии клеток нейроглии и способ снижения адгезии клеток нейроглии *in vitro*» (дата подачи заявки 08.05.2026) и «Антиадгезивное биоинертное не деградирующее покрытие для импланта и способ его изготовления» (дата подачи заявки 09.09.2025).

9) Мы предполагаем, что кросс-бета структура возникает между определенным количеством частично развернутым доменов белков. Как показано в литературе при исследовании отдельных доменов титина, частичное раскрытие происходит с сохранением большинства элементов вторичной структуры белка. Это соответствует нашим данным, полученным методами КД и ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье.

10) В обоих случаях для анализа использовали разложение спектров на компоненты и анализировали их относительный вклад в спектр и по этим параметрам проводили сравнение.

11) Флуоресценция тиофлавина Т усиливается при связывании с белком, а связывание происходит только на тех участках, где формируются кросс-бета структура, что и позволяло определить её.

12) Учитывая сложность и особенности выбранных объектов, для выявления агрегатов и подтверждения их аморфной формы и амилоидного типа агрегации

необходимо было использовать широкий спектр экспериментальных методов, включая биоинформативный анализ.

- 13) Доля иммуноглобулиновых доменов составляет 50% и более. Также фибронектиновые домены, входящие в состав молекулы исследуемых белков, являются разновидностью иммуноглобулиновых доменов.

Оппоненты и члены диссертационного совета были полностью удовлетворены ответами диссертанта.

На заседании 25 июня 2026 г. диссертационный совет принял решение: за исследование механизма белковой агрегации и открытие особого типа функциональной амилоидной агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов присудить **Бобылёву Александру Геннадьевичу** ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.2. – Биофизика, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав диссертационного совета, проголосовали: за – «18», против – «1», недействительных бюллетеней – «0».

Председатель

диссертационного совета

д.б.н., проф. Озолин О.Н.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.б.н. Дегтярева О.В.

25 июня 2026 г.

