

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Якуповой Эльмиры Ильдаровны
на тему: «Исследование структурных изменений в гладкомышечном титине
при формировании агрегатов *in vitro*»
по специальности 03.01.02 – Биофизика
на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Актуальность темы.

Формирование амилоидо-подобных агрегатов представляет собой сложный процесс, многие детали которого по сей день неизвестны, а известное часто противоречиво. Эти агрегаты могут образовываться в различных тканях организма в ряде патологических ситуаций.

Амилоидо-подобные агрегаты образуются и из молекул одного из самых больших известных на текущий момент белков – титина, без которого невозможна адекватная работа сократительных элементов как поперечно-полосатых, так и гладких мышц. Причем, титин в поперечно-полосатых мышцах гораздо более изучен. Диссертация Э.И. Якуповой посвящена изучению структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании агрегатов.

Как известно, гигантский белок титин связывает между собой актиновые и миозиновые нити, является эластичной нитью, сигнальной платформой и обеспечивает пассивное напряжение и эластичность миоцитов. К титину в настоящее время усиливается интерес как самому вариabельному белку из образующих саркомер. Предполагается, что экспрессия различных изоформ титина может вносить вклад в особенности функционирования различных типов мышц. В связи со всем этим, тема обсуждаемой работы представляется вполне актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов.

В диссертации Э.И. Якуповой методами электронной, атомно-силовой микроскопии и методом динамического рассеяния света приведены доказательства того, что гладкомышечный титин формирует *in vitro* два типа аморфных агрегатов: «КСI-агрегаты» и «глицин-агрегаты», названных так по растворам, где наблюдалась агрегация. Дальнейшие исследования вышеназванных типов агрегатов титина с использованием метода рентгеновской дифракции позволили зарегистрировать так называемые «рефлексы», характерные для кросс- β структуры амилоидов. Была проведена верификация амилоидной природы «глицин-агрегатов» по критерию связывания их с тиофлавином Т. Методами кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием показано, что при агрегации титина не наблюдается изменений во вторичной структуре молекулы.

Кроме того, с помощью атомно-силовой микроскопии было проведено пионерское исследование морфологии молекул гладкомышечного титина в растворе с «высокой ионной силой» (0.6 М КСI). Впервые были визуализированы два типа олигомеров титина.

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

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 материалов и сделанных выводов.

Личный вклад автора несомненен. Э.И. Якупова самостоятельно осуществила лабораторные исследования (включая приготовление

препаратов), свела и проанализировала полученные результаты и написала диссертацию.

Достоверность результатов и выводов.

Высокая степень достоверности результатов исследования определяется достаточным объемом материала, применением адекватных методов, апробированных мировым биофизическим сообществом.

Теоретическая и практическая значимость.

Учитывая тот факт, что полученные диссертантом данные расширяют фундаментальные представления об особенностях процесса амилоидной агрегации белка титина куриных желудков, открываются перспективы изучения локализации титина в гладкомышечных клетках, а также выяснения роли возможной его агрегации *in vivo*. Проведена верификация различных методов подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов. Выявлена неспецифичность связывания красителя Конго красного с амилоидными агрегатами титина. В результате получена объективная оценка структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании агрегатов. Это может иметь существенную научную ценность и обеспечивает основание для новых исследований амилоидной природы белковых агрегатов.

Структура и объем работы.

Диссертация Э.И. Якуповой изложена на 89 страницах текста и представляет собой рукопись, построенную и оформленную по классической схеме. Она начинается «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 23 рисунками и 4 таблицами. Список используемой литературы содержит 227 источников.

Оценка содержания диссертационной работы.

Название диссертации отражает ее содержание. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Во «Введении» традиционно излагаются общие вопросы: актуальность научной проблемы, цель и задачи исследования, научная новизна, научно-практическая значимость работы; приводятся данные по осуществленным апробациям, а также структуре и объему диссертации.

Глава «Обзор литературы» включает обширный и всесторонний анализ компилятивной информации по изучаемой проблеме. Она начинается с описания истории открытия и свойств амилоидов. Следующая часть литературного обзора посвящена титину: структуре, функциям и агрегационным свойствам этого белка.

В главе «Материалы и методы» полно и емко описано, как выделялся титин из желудков курицы. Также приведены использованные в представленной работе протоколы определения концентрации белковых препаратов, ДСН-гель-электрофореза титина и расчета молекулярной массы белковых фракций, лиофилизации белка, вестерн-блот анализа, условий формирования титином агрегатов, динамического светорассеяния, электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии, кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием, рентгеновской дифракции, флуоресцентного анализа с красителем тиофлавином Т, спектрального анализа с красителем Конго красным, поляризационной микроскопии с красителем Конго красным.

В «Результатах исследования» содержатся основные разделы, обусловленные перечисленными выше методиками. Все данные приведены корректно, статистически достоверно. «Обсуждение результатов» проведено с надлежащей полнотой и использованием современных источников.

В качестве замечаний отмечу следующее:

1. *Замечание по «Списку используемых сокращений».*

Не дана расшифровка «ДСН» – натрия додецилсульфата.

2. *Замечания по главе «Материалы и методы».*

Методы, описанные в главках 2.2, 2.4, 2.8, 2.10 и 2.13 описаны крайне скупо. Часто описание сложных современных методов занимает три - пять строк.

Раздел 2.5 «Вестерн-блот анализ» начинается так: «Проводили электрофорез в 6.5% ПААГ образцов с гомогенатом мышц суслика, кролика, курицы и образцов с выделенным титином из желудков курицы». Однако, если про мышечный материал кролика по одному разу упомянуто в «Результатах» и «Обсуждении...», то про биоматериал суслика далее ничего не упоминается.

3. *Замечания по главе «Результаты».*

Таблица № 4 в тексте диссертации, она же таблица № 1 (единственная) в Автореферате называется так: «Оценка содержания вторичной структуры в образцах титина и его агрегатов». Там представлены средние величины содержания элементов вторичной структуры (α -спиралей, β -складок, «поворотов» и «неупорядоченной структуры») в препаратах и соответствующие величины стандартного отклонения. Для всех случаев (мономеры титина и оба вида агрегатов) общее представительство указанных структур стабильно меньше 100%, даже учитывая «величины стандартного отклонения». Почему так?

В разделе «Исследование связывания агрегатов гладкомышечного титина с красителем Конго красным» Автореферата нет ссылки на источник в предложении: «Однако известно, что различие в двулучепреломлении КК (Конго красного) может быть артефактом, вызванным связыванием КК с веществами буферного раствора».

На стр. 47 текста диссертации "Идентификация белковых фракций и определение их чистоты после выделения белка проводилась при помощи ... Вестерн-блот анализа (Рис. 7В,Г)", когда как нужно было сослаться на рис. 9.

4. Общее замечание.

Наличествует ряд опечаток, о которых сообщено диссертанту.

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

Заключение

Таким образом, диссертация Якуповой Эльмиры Ильдаровны представляет собой законченное исследование, основанное на привлечении достаточного фактического материала, собранного с высокой долей личного участия.

Считаю, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Якупова Эльмира Ильдаровна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика.

Официальный оппонент,
профессор кафедры медицинской и
биологической физики с информатикой и
медицинской аппаратурой Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Казанский государственный
медицинский университет», д.б.н.



Гришин Сергей Николаевич

Подпись	<u>Гришина С.Н.</u>
	заверяю.
Учёный секретарь Учёного Совета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, д.м.н.	И.Г. Мустафин
« 05 » <u>декабрь</u> 2020 г.	

Сведения об оппоненте

Гришин Сергей Николаевич

Ученая степень, звание: Доктор биологических наук (специальность 03.01.02 – биофизика), доцент

Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет Минздрава России» (ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ Минздрава России»), кафедра медицинской и биологической физики с информатикой и медицинской аппаратурой

Должность: профессор

Адрес организации: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

Адрес эл. почты организации: rector@kazangmu.ru

Телефон: +7 (843) 236-06-52

Факс: +7 (843) 236-03-93

Сайт организации: <https://kazangmu.ru>

Научные публикации ведущего оппонента по тематике диссертационного исследования Якуповой Э.И. за последние пять лет (2015-2020 гг.):

1. Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Hoyle C.H.V., Grishin S.N. Modulatory Roles of ATP and Adenosine in Cholinergic Neuromuscular Transmission // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. P. 6423.
2. Ziganshin A.U., Grishin S.N. Temperature-dependent effects of ATP on smooth and skeletal muscles / В книге: Adenosine Triphosphate in Health and Disease. Серия "Intech Open Book, Series Physiology" Edited by Gyula Mozsik. London, 2019. P. 11-23.
3. Хайруллин А.Е., Еремеев А.А., Гришин С.Н. Синаптические аспекты гипогравитационного двигательного синдрома // Биофизика. 2019. Т. 64. № 5. С. 1021-1029.
4. Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Teplov A.Y., Gabdrakhmanov A.I., Ziganshina L.E., Hoyle C.H.V., Ziganshin B.A., Grishin S.N. The effects of ATP on the contractions of rat and mouse fast skeletal muscle // Muscle and Nerve. 2019. V. 59. No. 4. P. 509-516.
5. Ziganshin A., Kamaliev R., Gabdrakhmanov A., Khairullin A., Grishin S. Foot-shock stimulation decreases the inhibitory action of ATP on contractility and end-plate current of frog sartorius muscle // International Journal of Pharmacology. 2018. V. 14. No. 8. P. 1198-1202.
6. Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Ziganshin B.A., Zobov V.V., Ziganshina L.E., Gabdrakhmanov A.I., Grishin S.N. Effects of ATP and adenosine on contraction amplitude of rat soleus muscle at different temperatures // Muscle and Nerve. 2017. V. 55. No. 3. P. 417-423.
7. Grishin S.N., Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Ziganshin A.U. The influence of glucocorticoids and catecholamines on the neuromuscular transmission // Biochemistry (Moscow). Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. 2017. V. 11. No. 4. P. 253-260.
8. Khairullin A.E., Ziganshin A.U., Grishin S.N. Motor units at various temperatures // Biochemistry (Moscow). Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. 2017. V. 11. No. 1.
9. Grishin S.N. Neuromuscular transmission in Ca²⁺-free extracellular solution. // Biochemistry (Moscow). Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. 2016. V. 10. No. 2. P. 99-108.
10. Эшпай Р.А., Хайруллин А.Е., Каримова Р.Г., Нуриева Л.Р., Ризванов А.А., Мухамедьяров М.А., Зиганшин А.У., Гришин С.Н. Параметры одиночных и суммированных сокращений скелетных мышц *in vivo* и *in vitro*. // Гены&Клетки. 2015. Т. X. № 4. С. 123-126.
11. Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. ATP-induced changes in rat skeletal muscle contractility.// International Journal of Risk and Safety in Medicine. 2015. V. 27. S82-S83.
12. Гришин С.Н., Зиганшин А.У. Котрансмиттерная модуляция мионевральной передачи в различных типах двигательных единиц. / Изд-во Казан. ун-та. Казань, 2015. 240с.
13. Grishin S.N., Ziganshin A.U. Synaptic organization of tonic motor units in vertebrates. // Biochemistry (Moscow). Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. 2015. V. 9. No. 1. P. 13-20.