

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

На правах рукописи



Хайбрахманова Диляра Раисовна

**ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ С АЛЬБУМИНОМ**

1.4.4. Физическая химия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Седов Игорь Алексеевич

Казань 2023

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Седов Игорь Алексеевич.

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент
Успенская Ирина Александровна,
профессор кафедры физической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, г. Москва;

доктор химических наук
Гамов Георгий Александрович,
старший научный сотрудник кафедры общей химической технологии Ивановского государственного химико-технологического университета, г. Иваново.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук**, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится **«28» февраля 2024 года** в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.225.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, большой конференц-зал.

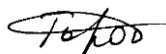
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН и на сайте www.iopc.ru.

Отзывы на автореферат (в 2-х экземплярах) просим направлять по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, ученому секретарю диссертационного совета (e-mail: toropchina@iopc.ru).

Автореферат разослан «1» декабря 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук



Торопчина А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Проблема количественной характеристики связывания различных соединений с альбумином выросла из задач фармакологии. Взаимодействия лекарственных молекул с белками плазмы крови напрямую влияют на их абсорбцию, распределение, метаболизм, выделение и токсичность (ADME-T свойства). Содержание белков в плазме довольно велико и составляет от 60 до 80 г/л. Среди них наибольшая доля приходится на сывороточный альбумин (60-65%). Лекарства, которые слабее связываются с плазмой, легче проникают в ткани, чем прочно связывающиеся, однако при этом, как правило, быстрее выводятся из организма. Альбумин выполняет функцию транспорта молекул и ионов и способен связывать соединения различной природы за счет наличия нескольких центров связывания. Глобулины и липопротеины, которые также содержатся в плазме, более селективны к природе связываемых лигандов и могут переносить, например, некоторые молекулы антибиотиков, холестерина, жирные кислоты и липиды. Количественно взаимодействие с плазмой крови в фармакологии обычно характеризуют в процентах связанного с плазмой препарата. Именно эта величина непосредственно влияет на фармакокинетические свойства препарата.

В физической химии для количественного описания прочности комплекса белка с лигандом используют константы устойчивости (связывания, ассоциации) K_a или нестойкости (диссоциации) K_d , которые для связывания в эквимольном отношении определяются формулами:

$$P + L = PL$$
$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]};$$
$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}.$$

Эти константы напрямую определяют содержание свободной и связанной форм соединения, поэтому их величины представляют интерес при разработке новых лекарственных соединений. Комплексообразование белка с лигандом также может влиять на взаимодействия белка с другими лигандами и белками, денатурационную и агрегационную устойчивость. Изучение связи между аффинностью лигандов к белку и их влиянием на процессы агрегации, играющие ключевую роль в развитии ряда неизлечимых заболеваний, также представляется важной задачей.

В настоящее время для определения или оценки величин констант связывания с альбумином и прочими белками используется множество экспериментальных и теоретических методов. Все существующие экспериментальные методы имеют высокие погрешности, которые определяются совокупностью сложности взаимодействий в исследуемых системах, проблем с условиями и объектами экспериментов, приборных ограничений и недостатков методик обработки данных. Методы молекулярного моделирования также не

могут обеспечить достаточной точности значений констант связывания с альбумином, а методы машинного обучения страдают от недостатка достоверных экспериментальных данных.

Поэтому, несмотря на значительное число работ в данной области, дальнейшее изучение связывания альбумина с органическими соединениями любыми экспериментальными и/или теоретическими методами является актуальной задачей.

Цель и задачи работы. Основными целями работы являются совершенствование методов исследования термодинамики взаимодействий низкомолекулярных органических лигандов с сывороточным альбумином в растворе и установление связи между аффинностью лигандов к альбумину и их влиянием на денатурационную и агрегационную устойчивость белка.

Для достижения целей были поставлены следующие задачи:

проанализировать возможности и недостатки существующих методов определения констант связывания низкомолекулярных органических лигандов с белками, в первую очередь с альбумином;

разработать базу данных констант связывания сывороточных альбуминов млекопитающих с различными лигандами, проанализировать сходимость результатов различных методов и исследовательских групп;

разработать и апробировать хорошо воспроизводимые методики определения констант связывания с белками по данным дифференциальной сканирующей калориметрии и спектрофлуориметрии;

проанализировать возможность предсказания аффинности к альбумину методом молекулярного докинга;

проанализировать возможность предсказания констант связывания с альбумином с помощью корреляционных соотношений типа структура-свойство на основе многопараметровых линейных регрессий и методов машинного обучения;

изучить влияние связывания различных лигандов на процесс фибриллообразования альбумина.

Научная новизна работы заключается в разработке нового подхода к определению констант связывания с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии, создании базы данных констант связывания с альбуминами млекопитающих, выводе новых соотношений между структурой лигандов и аффинностью к альбумину. Впервые изучен механизм подавления фибриллообразования альбумина в присутствии связывающихся с ним веществ, установлена связь между аффинностью, изменением степени денатурации альбумина и ингибированием фибриллообразования.

Практическая значимость работы состоит в разработке новых методик измерения и прогнозирования констант взаимодействия основного транспортного белка сыворотки крови – альбумина – с лигандами произвольной структуры. Получаемые данные могут быть использованы для оценки доли связанного соединения в плазме крови, что необходимо при разработке новых лекарственных соединений. Эти методы могут быть применены и к определению констант связывания с другими белками, которые являются непосредственными мишенями лекарственных препаратов. Изучение влияния природы и аффинности лигандов на подавление роста фибрилл белков важно для поиска антиамилоидных агентов для терапии неизлечимых в настоящее время нейродегенеративных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту.

Новые данные о влиянии различных органических лигандов с различной аффинностью на вид термограмм денатурации альбумина, значения температуры и энтальпии денатурации

Новая методика определения констант связывания белков с лигандами с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии

Новые данные о величинах констант связывания с альбумином для ряда анионов замещенных бензойных кислот и закономерностях их изменения в зависимости от природы заместителей в кольце

Новые соотношения типа структура-свойство для констант связывания низкомолекулярных органических соединений с альбумином на основе линейных корреляций с дескрипторами лигандов

Невозможность использования данных, полученных с помощью молекулярного докинга, для предсказания аффинности к альбумину

Зависимости начальной скорости и выхода фибриллообразования альбумина в присутствии лигандов с различными константами связывания и концентрацией от равновесной доли денатурированной формы белка

Ингибирование роста фибрилл альбумина только за счет связывания нативной формы с лигандами

Методы исследования. Для решения поставленных задач были использованы экспериментальные методы спектрофлуориметрии, УФ-спектрофотометрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, спектроскопии кругового дихроизма, а также вычислительные подходы: метод молекулярного докинга и различные методы анализа данных и машинного обучения.

Достоверность результатов подтверждается использованием современных экспериментальных физико-химических и вычислительных методов

исследования, воспроизводимостью полученных экспериментальных и расчетных данных, а также публикацией результатов работы в рецензируемых журналах высокого уровня.

Личный вклад автора. Автором выполнена большая часть экспериментальной работы по разработке методик измерения констант связывания методами спектрофлуориметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии; изучению кинетики фибриллообразования альбумина; а также проведена обработка полученных экспериментальных данных, анализ литературы и составление базы данных констант связывания. Автор также принимал участие в обсуждении результатов и написании публикаций.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на XXI, XXII Международных конференциях по химической термодинамике в России (Санкт-Петербург, 2019, Казань, 2022), XIV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (Москва, 2017), XIII Международной конференциях «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Суздаль, 2018), XII Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев-2021» (Санкт-Петербург, 2021), а также на научных конференциях Казанского федерального университета (2016 и 2018).

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования изложены в 5 статьях [1–5] в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и Scopus, а также в 7 тезисах докладов на международных и российских научных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, списка литературы из 194 источников. Работа изложена на 151 странице и содержит 62 рисунка и 4 таблицы.

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при поддержке грантов РФФИ по проекту № 20-315-90053, РФФИ 23-23-10084, РФФИ 19-73-00209, а также при поддержке программ повышения конкурентоспособности КФУ и Приоритет 2030.

Автор выражает огромную благодарность научному руководителю д.х.н., в.н.с. Седову Игорю Алексеевичу за руководство, помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен доценту Мухаметзянову Тимуру Анваровичу за помощь в освоении экспериментальных методов, м.н.с. Никифоровой Алене Алексеевне за помощь в проведении экспериментов, студенту Ибраеву Илье Юрьевичу за помощь в обработке данных. Также автор выражает признательность всем сотрудникам кафедры физической химии Химического института им. А. М. Бутлерова КФУ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** приводится описание строения сывороточных альбуминов, характеристика их центров связывания. Далее подробно описываются известные экспериментальные методы определения констант связывания, а также теоретические и вычислительные методы их прогнозирования. Проанализированы преимущества и недостатки различных методов, а также освещены основные работы, в которых они были применены для определения констант связывания низкомолекулярных органических лигандов с альбумином.

Во **второй главе** приводятся данные об объектах и методах исследования. Подробно описаны использованные экспериментальные методики определения констант связывания методами дифференциальной сканирующей калориметрии и спектрофлуориметрии, а также изучения кинетики фибриллообразования альбумина.

Третья глава посвящена описанию и анализу полученных результатов.

Создание базы данных по константам связывания органических лигандов с альбуминами млекопитающих

Проведен поиск в литературе экспериментальных констант связывания различных низкомолекулярных органических соединений, прежде всего клинически одобренных лекарственных препаратов, с альбуминами млекопитающих. Затем мы вручную проанализировали первоисточники всех данных о связывании с альбуминами, доступных в онлайн-базах данных ChEMBL и BindingDB. Были отброшены эксперименты, не соответствующие ряду критериев, таких как чистота белка или присутствие дополнительных веществ. В нашей базе данных каждое литературное значение константы связывания сопровождается следующими сведениями: организм-источник альбумина, название лиганда, его SMILES и InChIKey, значение константы связывания (K_a или K_d) в молярной шкале, температура, концентрация альбумина и лиганда, рН буфера и его состав и концентрация, использованный экспериментальный метод, использованная модель расчета константы, DOI или ссылка на исходную статью. Проанализировано распределение данных по методам, температурам и прочим условиям измерений. Всего в базе данных собрано 1755 значений констант связывания для 324 веществ. Она доступна в открытом доступе в репозитории <https://zenodo.org/record/5070430>.

Анализ собранных данных показал, что значения констант, полученные различными методами или различными авторами, могут отличаться более чем на три порядка. В качестве примера на рисунке 1 приведено распределение значений констант связывания ибупрофена с человеческим сывороточным альбумином при 310 К из различных литературных источников (33 значения). Поэтому имеющиеся литературные данные должны использоваться с осторожностью, совершенно

необходимо анализировать их достоверность, учитывать то, какой метод и условия проведения экспериментов использовались в каждом конкретном случае.

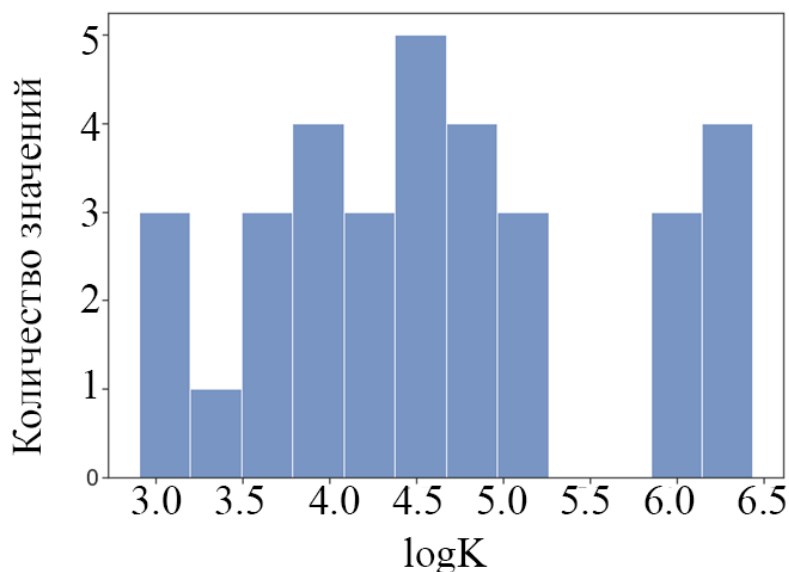


Рисунок 1 – Распределение значений десятичных логарифмов констант связывания ибупрофена с ЧСА при 310 К из различных литературных источников.

В результате нами убедительно продемонстрировано, что существует большая потребность в достоверных и воспроизводимых данных по связыванию с альбумином и методиках их определения. Предпочтительно проводить только анализ серий экспериментов, выполненных в единообразных условиях. При этом измерение значений констант связывания представляет большой интерес как для конкретных перспективных фармакологически активных соединений, так и для разработки общих соотношений структура-свойство, с помощью которых можно бы было предсказывать константы связывания широкого круга веществ.

Разработка и апробация методики определения констант связывания органических лигандов с альбумином с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии

Дифференциальная сканирующая калориметрия является перспективным методом для определения констант связывания. Она позволяет получать практически идеально воспроизводимые кривые денатурации белков, но в настоящий момент почти всегда используется только для качественной идентификации связывания лигандов с белком по наличию смещения пика денатурации. Для оценки величины константы связывания лигандов с белками нами предложен подход, основанный на моделировании ДСК-кривых с заданными параметрами с помощью разработанной для этой цели компьютерной программы. Она позволяет смоделировать ДСК-кривые с учетом произвольного количества равновесий между денатурированной формой и нативной формами белка, а также между белком и молекулами лиганда. Для описания процесса денатурации альбумина в наших расчетах, как и в некоторых предыдущих

работах, была использована простая одностадийная модель денатурации с двумя состояниями белка, в которой равновесие денатурация-ренатурация описывается константой равновесия K_u :

$$K_u = \frac{[U]}{[N]},$$

где $[U]$ и $[N]$ – концентрации денатурированной и нативной формы белка соответственно. Температура T_u , при которой $K_u = 1$, очень близка к (но, строго говоря, не равна) температуре максимума пика денатурации T_d . Энтальпия денатурации белка $\Delta_u H(T_u)$ при этой температуре приблизительно равна калориметрической энтальпии денатурации белка $\Delta_d H$, найденной путем интегрирования ДСК-пика денатурации с сигмоидальной базовой линией. Энергия Гиббса денатурации белка $\Delta_u G(T_u) = 0$, а энтропия денатурации равна:

$$\Delta_u S(T_u) = \frac{\Delta_u H(T_u)}{T_u}.$$

По данным наших экспериментов, значение энтальпии денатурации БСА в отсутствии лигандов $\Delta_d H = 620$ кДж/моль, а изменение теплоемкости при денатурации $\Delta_u C_p = 21$ кДж·К⁻¹·моль⁻¹. Примем, что изменение теплоемкости при денатурации не зависит от температуры. Тогда термодинамические функции денатурации при другой температуре могут быть рассчитаны по формулам:

$$\Delta_u H(T) = \Delta_u H(T_u) + \Delta_u C_p (T - T_u);$$

$$\Delta_u S(T) = \Delta_u S(T_u) + \Delta_u C_p \ln \frac{T}{T_u};$$

$$\Delta_u G(T) = \Delta_u H(T) - T \Delta_u S(T).$$

Из этих уравнений можно определить значение константы равновесия денатурации при любой температуре:

$$K_u(T) = e^{-\frac{\Delta_u G(T)}{RT}}.$$

В самом простом случае лиганд связывается только с нативной формой белка, при этом образуется комплекс состава 1:1. Константа связывания белок-лиганд записывается как $K = \frac{[NL]}{[N][L]}$, где $[NL]$ – концентрация комплекса нативной формы белка с одной молекулой лиганда. Температурная зависимость константы связывания определяется выражением:

$$K(T) = K(T_0) e^{\frac{\Delta_b H}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right)},$$

где $K(T_0)$ – константа связывания при температуре T_0 , $\Delta_b H$ – энтальпия связывания, которая в рамках простейшей модели предполагается не зависящей от температуры ($\Delta_b C_p = 0$ при всех температурах). Если же образуются комплексы с более чем одной молекулой лиганда, то необходимо учитывать последовательные константы связывания $K_n = \frac{[NL_n]}{[NL_{n-1}][L]}$ и их температурные зависимости. Условия материального баланса для случая связывания 1:1

записываются как $[N]+[NL]+[U]=[P]_0$ и $[L]+[NL]=[L]_0$, где $[P]_0$ и $[L]_0$ – начальные концентрации белка и лиганда в растворе, соответственно.

Одновременное численное решение всех вышеуказанных уравнений для каждой температуры (нами обычно брался диапазон от 320 до 370 К с шагом 0.1 К) позволяет получить температурные зависимости концентраций каждой формы белка и лиганда. Расчетная ДСК-кривая представляет собой температурную зависимость кажущейся теплоемкости исследуемого раствора на моль белка за вычетом базовой линии – теплоемкости раствора нативной формы белка в присутствии того же количества лиганда – и для случая связывания 1:1 вычисляется по формуле:

$$C_p(T) = \frac{d\left([U] \cdot (\Delta_u H(T_u) + \Delta_u C_p \cdot (T - T_u)) - [L] \cdot \Delta_b H\right)}{[P]_0 dT}.$$

Наша программа была апробирована на ряде кривых денатурации белков в присутствии разных количеств лигандов с известными термодинамическими характеристиками денатурации и связывания, взятых из литературы. Хорошая сходимость результатов позволила сделать вывод о работоспособности метода.

Экспериментально нами были получены кривые денатурации бычьего сывороточного альбумина в присутствии различных избытков ряда лигандов, представляющих собой молекулы лекарств с хорошо известной и значительно различающейся аффинностью: ибупрофен, варфарин, напроксен, изониазид, ампициллин, а также с неизвестными константами связывания: фенилбутазон, хлопропамид, мелоксикам, толбутамид. Для изониазида и ампициллина не наблюдалось значимых смещений пика денатурации альбумина, что подтверждало их низкую аффинность к альбумину. Для остальных лигандов было показано достаточно прочное связывание с нативной формой. Сравнение экспериментальных и смоделированных на основе известных констант связывания ДСК-кривых показало, что при небольших концентрациях лиганда хорошо согласуются две легко определяемые характеристики: температура максимума пика T_d и площадь пика, т.е. калориметрическая энтальпия денатурации. В экспериментах при более высоких концентрациях лиганда могут наблюдаться более высокие по сравнению с моделью температуры и энтальпии денатурации, что объясняется связыванием лиганда с менее аффинными центрами, не учитываемым в расчетах. Это дало нам возможность продемонстрировать и количественно охарактеризовать связывание напроксена и ибупрофена с дополнительными центрами помимо хорошо известного центра Судлоу II. Для лигандов с неизвестной аффинностью были определены значения первой и второй констант связывания (таблица 1). Сопоставление смоделированных и экспериментальных зависимостей температуры и энтальпии от мольного соотношения лиганд/белок приведено на рисунке 2.

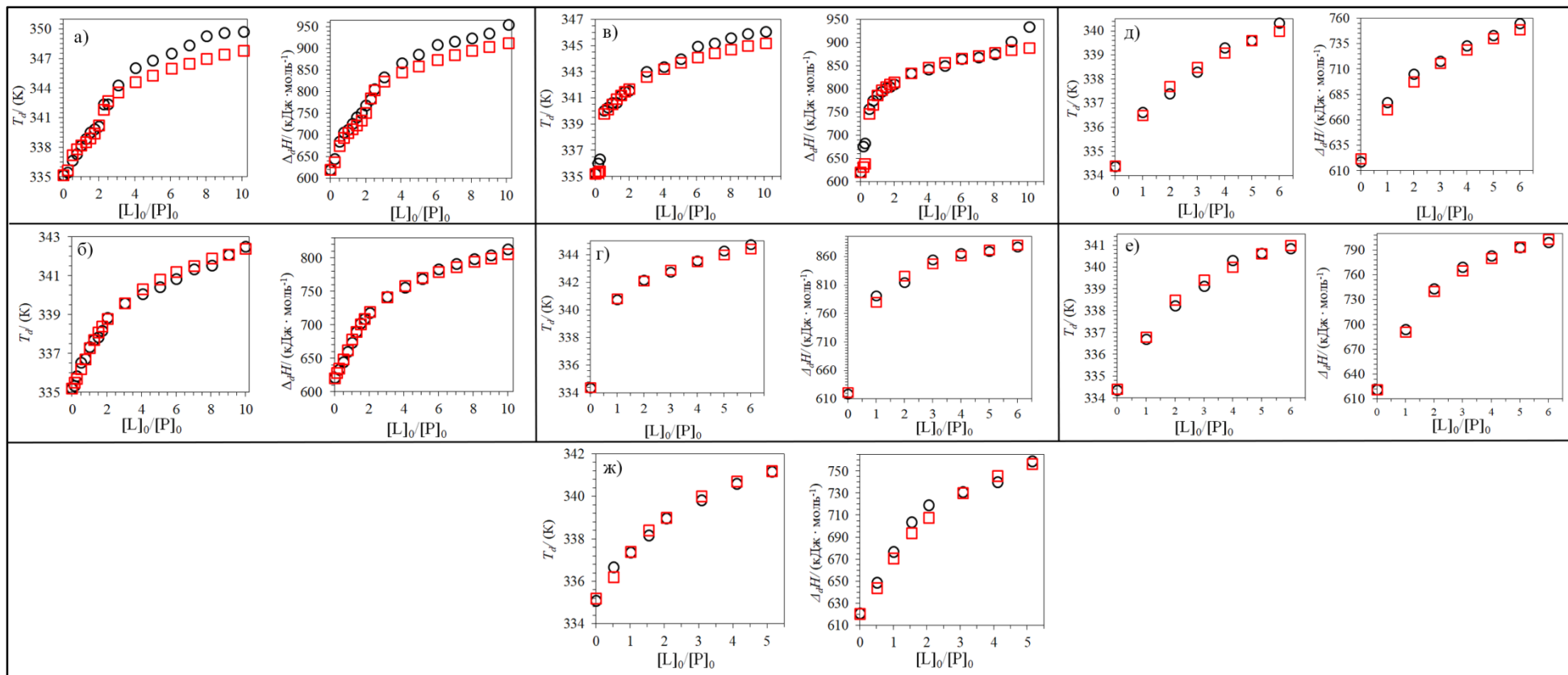


Рисунок 2 – Зависимость температуры максимума пика денатурации БСА T_d и calorиметрической энтальпии денатурации $\Delta_d H$ от мольного соотношения лиганд/белок для а) ибупрофена, б) варфарина, в) напроксена, г) фенилбутазона, д) хлопропамида, е) мелоксикама, ж) толбутамида при общей концентрации белка $5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Кружки соответствуют экспериментальным данным, квадраты – значениям, предсказанным моделью.

Таблица 1 – Константы связывания лекарств с бычьим сывороточным альбумином при 298 К, определенные или уточненные с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии.

Лиганд	K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}
Варфарин	$1.1 \cdot 10^5$	$2.3 \cdot 10^4$
Напроксен	$1.0 \cdot 10^7$	$1.0 \cdot 10^4$
Хлоропропамид	$7.2 \cdot 10^4$	$6.5 \cdot 10^3$
Фенилбутазон	$9.5 \cdot 10^5$	$2.4 \cdot 10^5$
Мелоксикам	$1.7 \cdot 10^5$	$4.3 \cdot 10^4$
Толбутаид	$6.9 \cdot 10^4$	$1.4 \cdot 10^4$

Разработанный подход для определения констант связывания по данным дифференциальной сканирующей калориметрии оптимально использовать совместно с методом изотермической титрационной калориметрии, который позволяет достаточно точно определять значение энтальпии связывания белков с лигандами, но может давать значительную погрешность по константе связывания и практически непригоден для определения второй константы связывания. Данные об энтальпии связывания при этом позволяют привести значение константы связывания вблизи температуры денатурации белка, которое определяется из результатов ДСК по зависимости температуры максимума пика от концентрации лиганда, к комнатной температуре. Это дает возможность получать более точные и хорошо воспроизводимые величины констант связывания при 298 К.

Спектрофлуориметрическое определение и анализ констант связывания замещенных бензойных кислот с альбумином

Широко используемый спектрофлуориметрический метод, основанный на явлении статического тушения флуоресценции, страдает от множества недостатков, описанных в разделе 1 диссертации. Нами была предпринята попытка выработать воспроизводимую методику на основании уравнения Штерна-Фольмера для определения констант связывания с альбумином в единообразных условиях с помощью спектрофлуориметрии для дальнейшего анализа и построения корреляционных соотношений. Важными особенностями методики являются:

1) добавление лиганда в раствор белка небольшими порциями вместо традиционного приготовления серии образцов с различными концентрациями лиганда. Это позволяет избежать колебания сигнала флуоресценции от образца к образцу, не связанного с комплексообразованием, которое наблюдается даже в случае приготовления в разных кюветах нескольких растворов белка с одинаковой концентрацией;

2) предварительное выдерживание раствора белка в кювете для его адсорбции на стенках;

3) использование низких концентраций белка для предотвращения димеризации;

4) определение константы связывания с учетом отличия равновесной концентрации свободного лиганда от общей, что достигается путем минимизации среднеквадратичного отклонения расчетных (при варьировании константы связывания) и измеренных значений.

Для апробации методики было изучено связывание серии замещенных бензойных кислот с БСА. Проводилось спектрофлуориметрическое титрование дегазированного раствора белка с микромолярной концентрацией. После каждого добавления лиганда снимался спектр флуоресценции и полученные экспериментальные данные были обработаны с помощью написанной нами программы, которая учитывает отличия равновесной концентрации свободного лиганда от общей. Константы связывания исследуемых соединений с БСА оказались не очень большими (таблица 2), и доля связанной формы лиганда в ходе титрования не превышает 10%. Поэтому разница между определяемыми по обычному уравнению Штерна-Фольмера и подобранными с помощью нашей программы значениями K_a невелика: для наибольшей кажущейся константы $7.6 \cdot 10^4$ (4-нитробензойная кислота) скорректированное значение равно $8.1 \cdot 10^4$, однако для более прочно связывающихся лигандов они могут отличаться на порядок.

Таблица 2 – Константы связывания замещенных бензойных кислот с бычьим сывороточным альбумином, определенные методом тушения флуоресценции.

Лиганд	$K \cdot 10^{-4}$	Лиганд	$K \cdot 10^{-4}$
Бензойная кислота	1.9 ± 0.1	3-хлорбензойная кислота	5.8 ± 0.3
2-гидроксибензойная кислота	4.0 ± 0.2	4-хлорбензойная кислота	5.1 ± 0.1
3-гидроксибензойная кислота	1.9 ± 0.1	2-бромбензойная кислота	2.3 ± 0.2
4- гидроксибензойная кислота	1.0 ± 0.1	3-бромбензойная кислота	3.5 ± 0.3
2,4-дигидроксибензойная	3.1 ± 0.2	4-бромбензойная кислота	5.4 ± 0.2
2-нитробензойная кислота	2.1 ± 0.2	2-иодбензойная кислота	3.3 ± 0.3
3- нитробензойная кислота	7.8 ± 0.3	3-иодбензойная кислота	5.1 ± 0.2
4- нитробензойная кислота	8.1 ± 0.2	4- иодбензойная кислота	4.1 ± 0.3
2,4-динитробензойная кислота	6.5 ± 0.2	2-цианбензойная кислота	2.6 ± 0.1
2-аминобензойная кислота	2.3 ± 0.2	3-цианбензойная кислота	3.9 ± 0.2
3- аминобензойная кислота	1.4 ± 0.2	4-цианбензойная кислота	6.4 ± 0.2
2-аминобензойная кислота	3.3 ± 0.2	4-метилбензойная кислота	1.4 ± 0.1

Полученные константы были использованы для поиска корреляционных соотношений типа структура – свойство. Была получена корреляция логарифмов константы связывания ($r^2=0.83$, $n = 15$) для серии м- и п-замещенных бензойных кислот с константой Гаммета заместителей, отражающей электронодонорную или

акцепторную способность заместителя по сравнению с атомом водорода. Также был проведен поиск множественных линейных корреляций с использованием больших наборов дескрипторов различных типов, генерируемых в программах PaDEL-Descriptor (1444 дескриптора) и E-Dragon (более 1600 дескрипторов). При отборе дескрипторов из набора PaDEL в лучшие модели входил параметр BCUTw-11, который учитывает заряд и поляризуемость атомов в молекуле, отражая информацию об электронной плотности в бензольном кольце. Лучшие корреляции с двумя, тремя и четырьмя дескрипторами имели значения r^2 0.74, 0.85 и 0.91 соответственно при числе изученных систем $n = 24$. Из набора дескрипторов E-Dragon наиболее высоко скоррелированными с экспериментальными значениями оказались топологические дескрипторы семейства HATS7, которые рассчитываются с учетом поляризуемости атомов. Для них лучшие корреляции с двумя и тремя дескрипторами имели значения r^2 0.77 и 0.83 соответственно. Из полученных результатов можно заключить, что различия в аффинности анионов бензойных кислот альбумина ключевую роль играют электростатические взаимодействия и распределение электронной плотности в молекуле.

Молекулярный докинг органических лигандов к альбумину

Метод молекулярного докинга показал свою эффективность для предсказания так называемых поз лигандов в белковых рецепторах, то есть их взаимного расположения и конформации лиганда. Он также широко используется для виртуального скрининга потенциально активных по отношению к заданному рецептору лигандов на основе сравнения величин так называемых оценочных функций, вычисляемых для каждого из лигандов. Хотя разработчики алгоритмов докинга предостерегают против интерпретации значений оценочных функций как энергий Гиббса белок-лигандных взаимодействий, существует большое число работ, в которых эти значения пытаются коррелировать с экспериментальными энергиями Гиббса связывания, в том числе с альбумином. Мы провели детальный критический анализ работоспособности такого подхода.

На первом этапе мы рассмотрели возможность прогнозирования поз лигандов в центрах связывания альбумина с помощью докинга. Для этого был применен один из наиболее простых подходов – жесткий докинг с использованием оценочной функции Autodock Vina. Для анализа из базы данных экспериментальных структур белков PDB было отобрано свыше 50 структур, содержащих низкомолекулярные органические лиганды, связанные с человеческим сывороточным альбумином хотя бы в одном из центров Судлоу. Для каждого анализируемого лиганда среди 10 поз с наивысшей оценкой, выдаваемых программой, осуществлялся поиск обладающей наименьшим среднеквадратичным отклонением (RMSD) положений тяжелых (всех, кроме водорода) атомов лиганда от экспериментальной структуры. Полученное среднее значение RMSD 2.7 Å для набора структурно разнородных лигандов сравнимо с пространственным разрешением рентгеноструктурного анализа белков в среднем

по базе PDB (2 Å) и позволяет говорить о возможности достаточно точного предсказания поз.

Затем мы рассмотрели возможность предсказания энергии Гиббса связывания с альбумином. Нами были сравнены первые по рангу позы одних и тех же лигандов из серии анионов замещенных бензойных кислот при докинге к двум различным экспериментальным структурам альбумина (4JK4 и 3V03). Существенные отличия в пространственном расположении боковых цепей аминокислотных остатков в этих двух структурах приводят к тому, что алгоритм докинга зачастую считает минимальными по энергии совершенно разные позы лиганда. Значения RMSD тяжелых атомов в среднем для 24 рассмотренных анионов кислот составило 3.15 и 3.93 Å соответственно для центров связывания Судлоу I и Судлоу II. Это приводит к контактам одних и тех же атомов с разными боковыми цепями в двух структурах и, естественно, значительным отличиям величины оценочной функции. Более того, даже сдвиг одного атома на 1 Å может в некоторых случаях существенно изменить значение, выдаваемое программой. Использование алгоритма гибкого докинга в Autodock Vina, учитывающего конформационную подвижность боковых аминокислотных цепей, также привело к расхождению в положениях атомов и отсутствию корреляции между значениями оценочной функции при использовании двух разных структур. Это связано в том числе с отличиями в расположении неподвижных в рамках использованного алгоритма атомов главной цепи белка в двух структурах. При таком результате уже нет смысла искать корреляцию расчетных значений с экспериментальными данными.

Учитывая то, что полученные результаты могут быть связаны с недостатками алгоритма Autodock Vina, мы провели докинг тех же лигандов в те же структуры альбумина с помощью программы Glide из пакета Schrodinger. При этом величины скоринговой функции также не коррелировали между собой для обоих центров. Полученные позы были использованы в качестве входных структур для расчета энергии Гиббса связывания методом MM/GBSA с использованием силового поля OPLS3e и модели сольватации VSGB. Алгоритм, используемый программой Schrodinger Prime, проводит минимизацию энергии комплекса, рецептора и лиганда, при этом аминокислотные остатки, содержащие атомы в радиусе 5 Å от лиганда, рассматривались как подвижные. Для лигандов в Судлоу I была получена статистически значимая ($r^2 = 0.75$) корреляция между предсказанной энергией Гиббса связывания для структур 4JK4 и 3V03, а для лигандов в Судлоу II такой корреляции не наблюдалось ($r^2 = 0.16$). Попытка сопоставить результаты расчета с экспериментальными данными показывает отсутствие корреляции ($r^2 = 0.09$ и 0.24 для центров Судлоу I и Судлоу II соответственно). Отсутствие корреляции с экспериментальными значениями также было показано нами при докинге в оба центра Судлоу с использованием алгоритмов гибкого докинга Autodock Vina и Glide с обработкой методом MM/GBSA 68 лекарственных соединений, изученных в работе Валько.

Добиться существенно более высокой точности расчетов энергии Гиббса связывания можно только с использованием значительно более ресурсоемких методов, учитывающими конформационную подвижность всего белка. Однако у альбумина есть особенность, которая делает использование любых подходов к прогнозированию аффинности лигандов, основанных на методах молекулярного моделирования, с нашей точки зрения, практически бесперспективным, по меньшей мере на современном этапе их развития. Это наличие множества неспецифичных центров связывания, для каждого из которых необходимо точно рассчитывать константы связывания для последующего суммирования. Данного недостатка лишены методы, основанные на корреляционных соотношениях известных энергий связывания с параметрами лигандов, или в общем случае методы машинного обучения на основе имеющихся экспериментальных данных. Для таких методов в целом неважно, каков механизм взаимодействий лигандов с альбумином, а важны лишь размер, достоверность и представительность обучающего набора.

Разработка соотношений между структурой и аффинностью к альбумину для широкого круга лигандов

На основе вышеизложенного ясно, что полученные с использованием разных методов и методик константы связывания содержат систематические погрешности, не позволяющие напрямую сравнивать их между собой. Тем не менее, результаты двух методов для одного и того же набора веществ с большой вероятностью имеют высокую степень корреляции. Поэтому целесообразно сначала разработать модель, описывающую наиболее крупный и содержащий структурно разнородные молекулы набор полученных единообразным путем данных, а затем пытаться применять и/или подстраивать эту модель к другим наборам данных.

К настоящему моменту самый большой и одновременно охватывающий множество возможных функциональных групп органических соединений набор данных по связыванию с альбумином (ЧСА) получен методом ВЭЖХ в работе Ульриха и др. При этом он не был описан с помощью QSAR-модели. Мы попробовали построить такие модели для данного набора, как на основе классических множественных линейных регрессий, так и некоторых методов машинного обучения.

Набор изначально содержал значения $\log K$ для 320 различных соединений. Прежде всего, мы попробовали построить корреляции с теми же дескрипторами, которые были использованы в предыдущих исследованиях связывания с альбумином. Достаточно хорошая корреляция наблюдается при попытке построить аналог классических для описания сольватационных процессов уравнений LSER с эмпирическими дескрипторами Абрахама ($r^2 = 0.73$). Однако эти дескрипторы определены лишь для ограниченного круга соединений, в основном с небольшим количеством функциональных групп, поэтому даже из анализируемого набора пришлось отбросить около трети соединений. Попытка же

перейти к полностью расчетным аналогам дескрипторов Абрахама приводит к ухудшению корреляции ($r^2=0.54$). Сходные по точности результаты дала лучшая из линейных корреляций с 4 дескрипторами QikProp из пакета Schrodinger:

$$\log K = 0.006FISA - 0.066QPlogPoct + 0.406QPlogPo / w - 0.260CIQPlogS - 0.704, \\ r^2 = 0.57, \text{CKO} = 0.444, n = 312.$$

Мы также проводили отбор дескрипторов, генерируемых в программах PaDEL-Descriptor и E-Dragon. При отборе 4–7 дескрипторов с помощью генетического алгоритма удавалось достичь значений r^2 на тестовом наборе, включающем 30% исходных данных, не выше 0.6. При этом в число отобранных всегда входили дескрипторы $AlogP$ или $CrippenlogP$, отражающие оценку коэффициента распределения 1-октанол-вода и являющиеся характеристиками гидрофобности молекулы. Добавление к этим наборам пула дескрипторов QikProp не привело к существенному изменению ситуации. Для дальнейшего использования была выбрана модель, описываемая уравнением:

$$\log K = 0.00779AATS2v + 0.115QGATS7m + 0.179CrippenLogP - 0.0484SaaCH + \\ + 0.283XLogP - 2.137, r^2 = 0.61, \text{CKO} = 0.428, n = 308.$$

Проведенный анализ позволяет заключить, что от линейных регрессий с расчетными дескрипторами сложно ожидать существенно большей точности описания данного набора. Попытка использования регрессий на основе алгоритмов случайного леса и опорных векторов не привела к значительно более точному описанию набора. При использовании метода случайного леса с числом деревьев 50–100 и числе дескрипторов 5–7 достигается значение r^2 в диапазоне 0.5–0.6 на тестовом наборе, а дальнейшее увеличение числа дескрипторов не приводит к увеличению точности. Регрессии на опорных векторах, а также использование различных типов молекулярных фингерпринтов Моргана в методах случайного леса и градиентного бустинга деревьев решений приводили к еще меньшей точности предсказания. Наконец, использование нейронных сетей с использованием в качестве входных признаков молекулярных фингерпринтов, векторов из масштабированных дескрипторов, тензорных представлений SMILES как предложений, полученных их посимвольным разбиением на токены и преобразованием в матрицу методом one-hot encoding, а также "трансформерной кодировки" молекул также привело к коэффициентам корреляции, не превышающим таковых для множественных линейных регрессий. Поэтому в качестве финальных моделей были выбраны вышеприведенные линейные корреляции с расчетными дескрипторами, обученные на полном наборе данных.

Эти модели затем были применены для предсказания значений констант связывания с альбумином различных соединений и сравнения результатов с другими наборами данных. (Так как во всех случаях при получении этих данных отличались экспериментальные условия и во многих случаях – тип приводимых физических величин, то проверялось наличие линейных корреляций, а не точное

совпадение расчетных и экспериментальных значений.) Показано наличие корреляций с набором данных Валько и др., результатами, полученными нами для серии бензойных кислот, а также данными о доле связанной формы различных соединений в плазме крови человека.

Фибриллообразование альбумина в присутствии лигандов с различной аффинностью

Амилоидные фибриллы – агрегаты белков, которые представляют собой сшитые антипараллельно между собой β -листы. Альбумин при нейтральных или кислых значениях рН и повышенной температуре может быстро образовывать фибриллы. Для изучения этого процесса нами были получены кинетические кривые фибриллообразования БСА в присутствии красителя тиофлавина Т (ThT), который селективно связывается с фибриллами, методом спектрофлуориметрии. Были построены графики зависимости интенсивности эмиссии флуоресценции на длине волны 485 нм от времени инкубации альбумина, которые отражают кинетику фибриллообразования.

На основе ряда кривых для различных концентраций альбумина можно заметить, что даже для самого разбавленного раствора не наблюдается заметного периода индукции. Это означает, что зародыши фибриллообразования изначально присутствуют в растворе. При этом начальная скорость роста фибрилл пропорциональна концентрации белка, а значит, эту стадию можно описать кинетикой первого порядка по альбумину (рисунок 3).

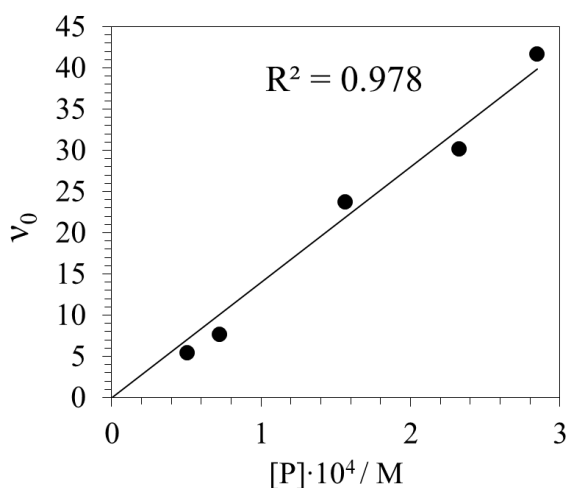


Рисунок 3 – График зависимости начальной скорости фибриллообразования от концентрации БСА.

Затем были получены кинетические кривые для образования фибрилл альбумина в присутствии изучаемых лигандов. Рост сигнала флуоресценции также всегда начинается без заметного периода индукции. При этом скорость и выход фибриллообразования значительно снижаются только в случае ибупрофена, напроксена и варфарина – веществ, для которых ранее нами было

показана высокая аффинность к альбумину. Степень подавления фибриллообразования зависит от концентрации высокоаффинных веществ. Ранитидин и изониазид, обладающие низкими константами связывания, мало влияют на исследуемый процесс.

Обсуждаемые системы также были изучены методами УФ-спектрофотометрии и спектроскопии кругового дихроизма. Спектры конго красного в смеси с инкубированным белком отличаются от спектров чистого красителя, что связано с образованием амилоидных фибрилл. В присутствии же напроксена, ибупрофена и варфарина спектры близки к чистому красителю из-за подавления роста фибрилл. На спектрах кругового дихроизма после инкубации наблюдается типичный для β -листов пик, при этом сигнал в области α -спиралей уменьшается, что подтверждает образование фибриллярных структур. В присутствии же напроксена, ибупрофена и варфарина количество β -слоев значительно снижается.

Как правило, белки с упорядоченной структурой, к которым относится и альбумин, образуют фибриллы в денатурирующих условиях, что указывает на то, что в этом процессе участвует развернутая форма белкового мономера. Эта форма (U) находится в термодинамическом равновесии с нативным мономерным белком (N) и его комплексом с лигандом (NL). Обозначим долю этой формы через α :

$$\alpha = \frac{[U]}{[U]+[N]+[NL]}$$
 Значение α может быть определено из ДСК-кривых денатурации для любой температуры T по отношению интегралов пика денатурации до заданной температуры и целиком:
$$\alpha = \frac{\Delta H_T}{\Delta H_{общая}}$$

Из кривых денатурации чистого БСА и в присутствии различных концентраций лекарственных соединений были рассчитаны доли развернутой формы при температуре 65°C. Наблюдалась корреляция ($r^2 = 0.92$) начальной скорости фибриллообразования v_0 при 65°C от доли развернутой формы альбумина α при той же температуре.

Этот результат можно интерпретировать, предложив следующий механизм фибриллообразования. Развернутая форма может участвовать в процессе роста фибриллы (с константой скорости k_+) и становиться частью фибриллы. Одновременно могут образовываться и другие типы агрегатов и ассоциатов. Начальная скорость фибриллообразования при $t = 0$ определяется выражением:

$$v_0 = 2k_+[Nuc][U]=k[U]=k\alpha[P],$$

где $[Nuc]$ — концентрация зародышей фибрилл, $k = 2k_+[Nuc]$ — эффективная константа скорости фибриллообразования, $[P]$ — начальная концентрация белка.

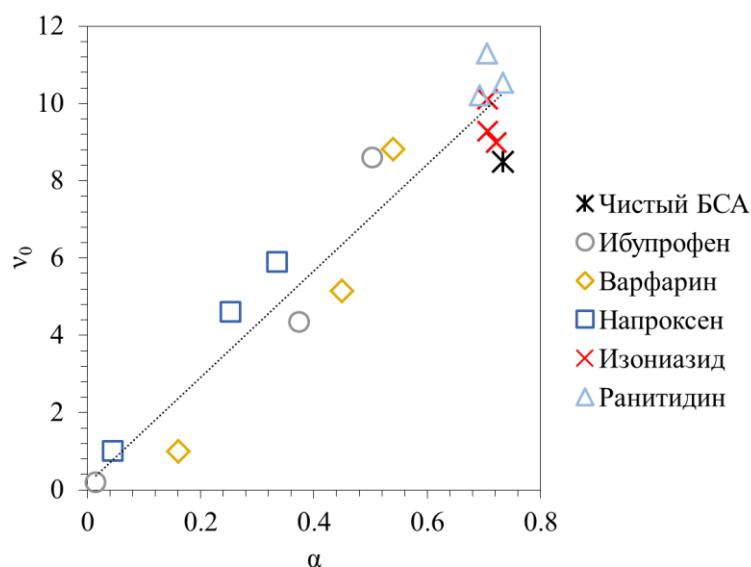


Рисунок 4 – Зависимость начальной скорости фибриллообразования БСА от доли его денатурированной формы при 65°C.

Через определенное время (около 120 минут) достигается равновесное превращение альбумина в фибриллы, которые можно рассматривать как отдельную фазу и записать условие равновесия $[U] = K_F$. При этом фибриллы, влияющие на сигнал флуоресценции тиофлавина, могут сосуществовать с другими типами медленно диссоциирующих агрегатов, в этом случае отношение концентраций этих агрегатов и фибрилл постоянно: $\frac{[X]}{[F]} = K_X$. Отсюда получаем:

$$[P] = [U] + [N] + [NL] + [F] + [X] = \frac{[U]}{\alpha} + [F] + [X] = \frac{K_F}{\alpha} + [F](1 + K_X),$$

$$[F] = \frac{[P] - \frac{K_F}{\alpha}}{1 + K_X} = \frac{\alpha[P] - K_F}{\alpha(1 + K_X)}.$$

Это означает, что равновесная концентрация фибрилл $[F]$ и пропорциональная ей интенсивность флуоресценции ThT должна гиперболически расти с увеличением α . Мы определили эту величину в присутствии различных концентраций лигандов при различных температурах инкубации от 65 до 85°C. Конечные значения интенсивности флуоресценции ThT F_∞ , представлены на рисунке 5а в зависимости от доли денатурированного БСА при соответствующих температурах, определенных по данным ДСК. Аналогичные эксперименты с ЧСА дали чрезвычайно схожие результаты, показанные на рисунке 5б, где одновременно помещены точки для ЧСА (с разделением вида маркеров по лигандам) и БСА (в виде квадратов для всех лигандов). Несмотря на то, что константы K_F и K_X могут зависеть от температуры, на графиках можно увидеть общую зависимость между концентрацией фибрилл и α .

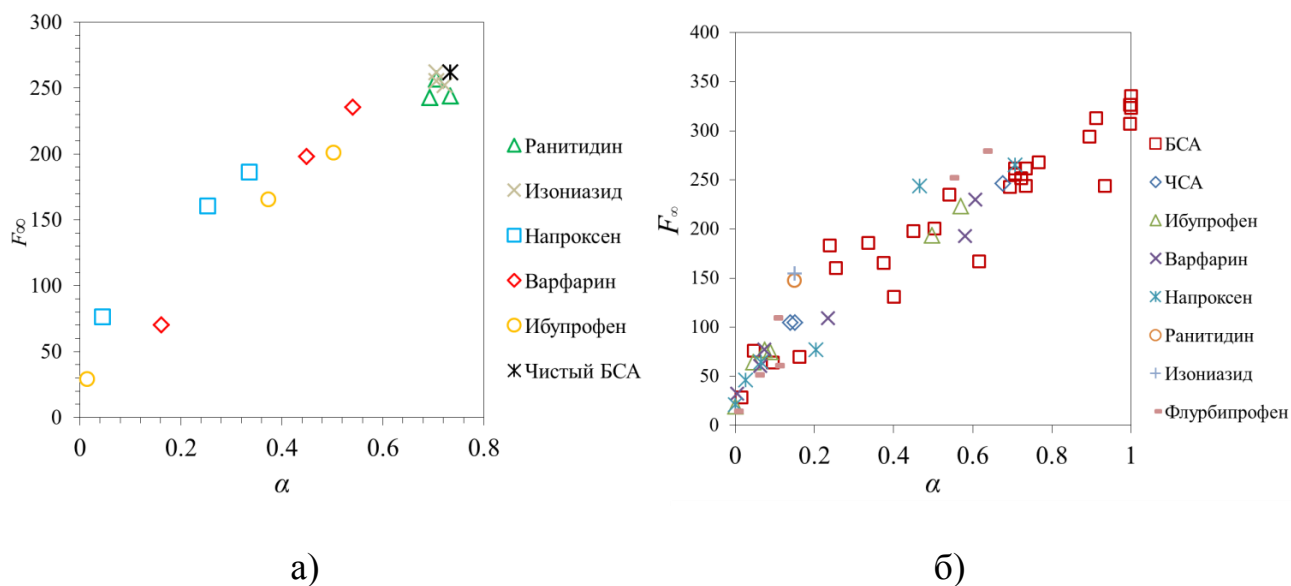


Рисунок 5 – Зависимость конечной интенсивности флуоресценции ThT F_{∞} в присутствии а) БСА, б) ЧСА, инкубированного в течение 120 минут при различных температурах от 65 до 85°C в присутствии или отсутствии лигандов, от доли развернутого белка α при соответствующей температуре и концентрации лигандов, определенной из ДСК-кривых.

Исследуемые лиганды, по-видимому, не оказывают заметного влияния на скорости роста или зародышеобразования фибрилл. Подавление фибриллообразования достигается за счет связывания лигандов с нативной формой альбумина и уменьшением количества всех остальных форм белка, находящихся с ней в равновесии, в том числе и фибрилл. При соотношении белок-лиганд 1:1 ингибирующая активность снижается в ряду $\text{напроксен} > \text{ибупрофен} > \text{варфарин}$, что соответствует порядку уменьшения первой константы связывания лиганд-БСА. Однако большой избыток ибупрофена приводит к большей термостабилизации нативного БСА, чем такое же количество варфарина и напроксена, вероятно, из-за связывания ибупрофена с несколькими сайтами связывания. Слабое связывание ранитидина и изониазида не позволяет им подавлять образование фибрилл.

Стабилизация нативной структуры белка за счет прочного связывания лиганда является общим способом снижения скорости образования и выхода фибрилл любого структурированного белка. Если лиганд не может связываться с самими фибриллами или другими белковыми агрегатами, то только доля связанной с лигандом нативной формы белка будет определять его влияние на фибриллообразование. Кроме того, наши результаты показывают, что термограммы белка, получаемые с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии, могут быть использованы для выбора оптимальных условий получения амилоидных фибрилл и изучения механизма фибриллообразования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены термограммы денатурации бычьего сывороточного альбумина в присутствии ряда органических лигандов с различной аффинностью, изучены зависимости температуры и энтальпии денатурации от концентрации лигандов. На основании этих данных и созданной нами программы для моделирования термограмм разработан новый метод определения констант связывания белков с лигандами с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии.

2. С помощью метода спектрофлуориметрии определены величины констант связывания бычьего сывороточного альбумина с анионами различных замещенных бензойных кислот. Получены корреляции этих величин с константами Гаммета заместителей и расчетными дескрипторами, на основании которых показано, что различия в аффинности этих анионов определяются преимущественно электростатическими взаимодействиями с аминокислотными остатками.

3. Показана невозможность использования данных, полученных с помощью молекулярного докинга, для предсказания констант связывания с альбумином.

4. Создана база данных, содержащая 1755 значений констант связывания для 324 низкомолекулярных органических лигандов с сывороточными альбуминами млекопитающих в растворе с указанием условий их определения. Продемонстрирована сильная зависимость этих величин от метода и условий эксперимента.

5. Разработаны новые соотношения типа структура-свойство для констант связывания разнообразных по структуре низкомолекулярных органических соединений с альбумином на основе линейных корреляций с дескрипторами лигандов из наборов PaDEL и DRAGON.

6. Получены кинетические кривые фибриллообразования альбумина в присутствии лигандов с различными константами связывания и концентрацией. Продемонстрированы зависимости начальной скорости и выхода фибриллообразования от равновесной доли денатурированной формы белка, определяющейся величинами констант связывания с альбумином.

7. Впервые показано, что ингибирование роста фибрилл альбумина происходит только за счет связывания нативной формы белка с лигандами, которое приводит к смещению равновесия между нативной и денатурированной формами.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты, а именно новые методики определения констант связывания, могут быть использованы для изучения различных белков с широким спектром лигандов. Новые корреляционные соотношения структура- свойство могут быть применены для разработки новых

лекарств с заданной аффинностью к альбумину, прогнозирования доли связанного лиганда в плазме крови. Результаты, полученные в ходе изучения фибриллообразования альбумина, могут быть использованы при исследовании механизмов агрегации других глобулярных белков, а также антиамилоидной активности различных молекул.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Khaibrakhmanova, D., Binding constants of substituted benzoic acids with bovine serum albumin / **D. Khaibrakhmanova**, A. Nikiforova, I. Sedov // *Pharmaceuticals*. – 2020. – Vol. 13. – №2. – P. 30

2. Sedov, I.A., Evaluation of the binding properties of drugs to albumin from DSC thermograms / I.A. Sedov, A.A. Nikiforova, **D.R. Khaibrakhmanova** // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 583. – 119362

3. Khaibrakhmanova, D. R., Binding constants of drug-albumin complexes from DSC measurements / **D. Khaibrakhmanova**, A. Nikiforova, I. Sedov // *Thermochemica Acta*. – 2021. – Vol. 699. – 178930

4. Khaibrakhmanova D., Effect of ligands with different affinity on albumin fibril formation / **D. Khaibrakhmanova**, A. Nikiforova, Z. Li, I. Sedov // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 204. – P. 709-717

5. Sedov, I., Molecular Mechanisms of Inhibition of Protein Amyloid Fibril Formation: Evidence and Perspectives Based on Kinetic Models / I. Sedov, **D. Khaibrakhmanova** // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – 13428

6. Седов И.А., Возможности дифференциальной сканирующей калориметрии для изучения белок-лигандных взаимодействий / И.А. Седов, **Д.Р. Хайбрахманова** // VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов. – 2023. – Т. 1. – С. 282

7. Khaibrakhmanova D.R., Evaluation Of The Binding Properties Of Drugs To Albumin From DSC Thermograms / **D.R. Khaibrakhmanova**, A.A. Nikiforova, I.A. Sedov // XXIII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia, RCCT-2022 (Kazan, Russia). – 2022. – P. 122

8. Khaibrakhmanova D.R. Lysozyme Fibril Disruption With Polysaccharides/ **D.R. Khaibrakhmanova**, O.N. Makshakova, I.A. Sedov // XII Международной конференции молодых учёных по химии «Менделеев-2021»: Сборник тезисов докладов (Санкт-Петербург). – 2021. – С. 399

9. Khaibrakhmanova D.R., Calorimetric Study of Binding of Substituted Benzoic Acids to Bovine Serum Albumin / **D.R. Khaibrakhmanova**, A.A. Nikiforova, I.A.

Sedov // XXII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia, RCCT-2019 (Saint Petersburg, Russia). – 2019. – P. 153

10. Хайбрахманова, Д.Р., Константы связывания органических молекул с бычьим сывороточным альбумином / **Д.Р. Хайбрахманова**, И.А. Седов // Кластер конференций 2018: XIII Международная научная конференция «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Тезисы докладов) (Суздаль). – 2018. – С. 155-156

11. Хайбрахманова Д.Р., Константы связывания замещенных бензойных кислот с бычьим сывороточным альбумином / **Д. Р. Хайбрахманова** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2017» (Москва, Россия), М.: МАКС Пресс. – 2016

12. Хайбрахманова Д.Р., Связывание альбумина с анионами ароматических карбоновых кислот / **Д.Р. Хайбрахманова** // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского федерального университета: сборник тезисов. – Казань: изд-во Казан.ун-та. – 2016. – Т.1. – С. 134-135