

ОТЗЫВ

официального оппонента Гамова Георгия Александровича на диссертацию Никифоровой Алены Алексеевны на тему «Влияние белок-лигандных взаимодействий на процесс фибриллообразования ряда белков», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по научной специальности 1.4.4. Физическая химия.

Актуальность темы и цель диссертационной работы. Амилоидные фибриллы представляют собой упорядоченные, богатые β -слоями структуры, образующиеся в результате агрегации белков. Этот процесс, называемый фибриллообразованием, изначально изучался преимущественно с медицинской точки зрения, поскольку он лежит в основе ряда тяжелых и неизлечимых заболеваний – амилоидозов (например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, диабета 2-го типа и др.). Однако в последние годы интерес к амилоидным фибриллам значительно расширился: они играют важную роль в нормальных физиологических процессах (образование биоплёнок у бактерий, накопление гормонов), а также рассматриваются как перспективные функциональные материалы для нано- и биотехнологий.

Несмотря на значительный прогресс в изучении структуры амилоидных фибрилл, остаётся множество нерешённых вопросов, связанных с механизмом их образования, строением промежуточных олигомеров, а также влиянием различных лигандов на скорость и равновесие процесса. Особенно остро стоит проблема отсутствия надёжных количественных данных о связывании органических лигандов с фибриллами и хорошо воспроизводимых методик получения таких данных.

Понимание механизмов влияния лигандов на процесс фибриллообразования критически важно для разработки эффективных терапевтических антиамилоидных препаратов, создания диагностических агентов для визуализации амилоидных отложений в организме, разработки новых материалов на основе белковых фибрилл с заданными свойствами.

Таким образом, работа Никифоровой А.А. находится на стыке фундаментальной физической химии, биохимии, медицинской химии и материаловедения, что определяет её высокую актуальность.

Целью работы являлся поиск закономерностей влияния белок-лигандных взаимодействий на скорость и равновесие процесса фибриллообразования. Сформулированные задачи исследования полностью соответствуют поставленной цели. Для выполнения работы привлечены надежные прецизионные современные физико-химические методы исследования, включая дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресцентную спектроскопию и спектроскопию кругового дихроизма, атомно-силовую микроскопию. Теоретическая часть работы включает компьютерное моделирование взаимодействия белков с лигандами методом молекулярного докинга, а также корректный вывод и применение уравнений химической кинетики применительно к процессам фибриллообразования.

Обсуждаемая научно-квалификационная работа выполнена во ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (Химический институт им. А.М. Бутлерова) при поддержке программы Министерства образования Российской Федерации «Содействие занятости выпускников 2020 года на научно-исследовательские позиции в образовательные организации высшего образования и научные организации», программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», а также грантов РФФИ по проектам № 19-315-51012 и 20-315-90053; РНФ по проекту № 23-23-10084, что дополнительно свидетельствует в пользу ее актуальности.

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа Никифоровой Алены Алексеевны написана в традиционном для научно-квалификационных работ ключе и содержит такие основные разделы как введение, литературный обзор, экспериментальную часть, посвященную описанию теоретических и экспериментальных методик, а также происхождение и подготовку к работе реактивов, обсуждение полученных данных, которое, в свою очередь, подразделяется на 6 разделов, и заключение

с выводами по работе. Диссертационная работа изложена на 169 страницах, содержит 10 таблиц, 54 рисунка и список литературы, насчитывающий ссылки на 272 источника.

В разделе *Введение* описаны традиционно принятые для квалификационных работ позиции, а именно, актуальность и степень разработанности темы исследования, сформулирована цель и поставлены задачи работы, заявлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также приводятся основные положения, выносимые на защиту, оценены достоверность полученных результатов, личный вклад автора и апробация данных.

В *первой главе* (с. 12-58) дается детальное описание главного объекта исследования – белковых фибрилл, их строения, термодинамических и кинетических параметров их формирования, а также механизма образования. Существенное внимание уделено вопросу влияния различных низкомолекулярных соединений на скорость формирования фибрилл и их выход, а также причин этих эффектов. Обосновывается выбор конкретных белков для экспериментального изучения и на основании обнаруженных в литературе лакун четко формулируется цель и задачи исследования.

Во *второй главе* (с. 59-69) Никифорова А.А. описывает происхождение, контроль чистоты и подготовку реактивов к использованию, приводит конкретные методики приготовления растворов, ДСК-экспериментов, исследования кинетики фибриллообразования с использованием спектрофлуориметрии, изучения морфологии фибрилл с помощью АСМ, определения вторичной структуры белков с помощью КД-спектроскопии, протокол проведения молекулярного докинга и описание процедуры определения констант связывания лигандов с белковыми фибриллами. Приведенной в этом разделе информации вполне достаточно для воспроизведения экспериментов автора.

В *третьей главе* (с. 70-139) обсуждаются полученные автором результаты. Сперва представлена кинетическая модель фибриллообразования

сывороточных альбуминов быка и человека как в отсутствие, так и в присутствии различных низкомолекулярных органических соединений и охарактеризовано влияние лигандов на термостабильность и вторичную структуру этих белков. Далее подробно описано, как двухзарядные ионы металлов влияют на денатурацию, кинетику фибриллообразования и морфологию образующихся фибрилл α -лактальбумина. Третий и четвертый подразделы обсуждения касаются взаимодействия модельного олигосахарида (альгината натрия) с лизоцимом и БСА, и его влияния в присутствии хлорида гуанидиния на кинетику фибриллообразования. Пятый и шестой подразделы, по моему мнению, являются самыми важными, так как предлагают разработанную автором надежную методику определения констант связывания лигандов с фибриллами белков (на примере лизоцима), что позволяет получать в контролируемых условиях данные, которые могут быть сопоставлены друг с другом. Помимо этого, на основании количественного анализа соотношений «структура-свойство» автор показывает, что одной только липофильности недостаточно для корректного прогнозирования связывающей способности лиганда по отношению к фибриллам, но указывают, что введение бензолсульфамидного фрагмента способствует высокой устойчивости ассоциата низкомолекулярного соединения с белковым агрегатом.

В разделе *Заключение* (с. 140, 141) приведены основные результаты и выводы диссертации, а также даются рекомендации по дальнейшей разработке темы.

Личный вклад автора заключался в анализе литературы, постановке цели и задач исследования, получении и обработке экспериментальных данных, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации. Автором лично выполнены эксперименты методами дифференциальной сканирующей калориметрии, спектрофлуориметрии, УФ-спектрофотометрии, спектрометрии кругового дихроизма, подготовлены образцы для большинства экспериментов.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые предложена и экспериментально обоснована модель, согласно которой лимитирующей стадией процесса является переход развёрнутой формы белка в конформацию, способную к быстрой агрегации. Показано, что фибриллообразование альбуминов можно рассматривать как обратимую реакцию первого порядка, и определены константы скорости прямой и обратной реакций. Впервые установлены линейные корреляции между начальной скоростью, равновесным выходом фибриллообразования и периодом полупревращения альбуминов в фибриллы с равновесной долей денатурированной формы белка в присутствии широкого набора лигандов (более 30 соединений). Впервые показана зависимость периода индукции от термостабильности белка в присутствии катионов двухвалентных металлов, а также обнаружено влияние природы катионов на выход и морфологию фибрилл. Для Zn^{2+} и Cu^{2+} выявлено образование шарообразных утолщений на фибриллах, что может свидетельствовать о вторичной нуклеации. Впервые показано, что альгинат натрия замедляет агрегацию лизоцима без снижения выхода фибрилл за счёт связывания с растущими фибриллами (а не с мономером), тогда как для БСА эффект альгината аналогичен влиянию низкомолекулярных лигандов (стабилизация нативной структуры). Наконец, разработана и апробирована воспроизводимая методика определения констант связывания лигандов с амилоидными фибриллами методом спектрофлуориметрии с тиюфлавином Т. Для 50 лекарственных соединений впервые определены константы связывания с фибриллами лизоцима.

Достоверность полученных результатов и выводов обеспечивается применением надежных методологических подходов, использованием комплекса химических, физических и математических методов, критическим анализом результатов эксперимента и расчетов, соответствием результатов, полученных Никифоровой А.А., надежно установленным закономерностям и данным, опубликованными другими исследователями.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в развитии фундаментальных представлений о механизмах амилоидной агрегации белков. В частности, предложенная кинетическая схема фибриллообразования альбуминов (медленный конформационный переход и быстрая агрегация) позволяет объяснить наблюдаемое отсутствие периода индукции и экспоненциальный характер кинетических кривых. Это дополняет существующие модели (Финке-Вацки, Ноулза и др.), которые описывают агрегацию чистых белков, и включает в рассмотрение конформационные равновесия белка. Также показано, что влияние лигандов на фибриллообразование глобулярных белков определяется их способностью связываться с нативной формой белка и смещать равновесие между свёрнутым и развёрнутым состояниями. Это позволяет предсказывать эффект новых лигандов на основе данных об их аффинности к белку. Экспериментально подтверждено, что доля развёрнутой формы белка (α), определяемая методом ДСК, является ключевым параметром, контролирующим как кинетику, так и равновесие фибриллообразования. Полученные константы связывания 50 лигандов с фибриллами лизоцима создают основу для будущих QSAR-моделей и понимания молекулярных основ связывания органических соединений с амилоидными агрегатами.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования установленных закономерностей влияния лигандов на процесс фибриллообразования для скрининга потенциальных ингибиторов фибриллообразования среди лекарственных соединений, прогнозирования антиамилоидной активности новых соединений на основе их аффинности к белку и данных ДСК, оптимизации структуры лигандов для повышения их ингибирующей способности.

Автор предлагает использовать метод ДСК в качестве экспресс-скрининга для поиска эффективных ингибиторов фибриллообразования глобулярных белков: достаточно измерить сдвиг температуры денатурации

белка в присутствии потенциального ингибитора, чтобы оценить его способность подавлять агрегацию.

Применение полученных результатов. Полученные в работе результаты представляют интерес для организаций и учреждений, занимающихся теоретическими и прикладными аспектами неорганической химии координационных соединений, физической химии растворов, биохимии, фармакологии и медицинской химии. Они могут быть востребованы в ФГБОУ ВО: «Восточно-Сибирский государственный университет», «Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева», «Ивановский государственный химико-технологический университет», «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», ФГБУН: Институте физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина, Институте общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Институте химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Институте химии растворов им. Г. А. Крестова РАН, а также в Федеральном исследовательском центре химической физики РАН им. Н.Н. Семенова.

Публикации. Основное содержание диссертации изложено в 5 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Полнота опубликования результатов диссертации достаточная. Работа прошла апробацию на конференциях различного уровня, включая всероссийские и международные.

В целом, рецензируемая научно-квалификационная работа производит самое благоприятное впечатление и выполнена на высоком уровне.

К диссертации могут быть высказаны следующие уточняющие вопросы и замечания:

1. Стр. 30, уравнение 1.4.1. После реакции фибрилла очевидно стала больше на один мономер, но в записи уравнения это не отражено. Правильно ли я понимаю, что модель применима только для случаев, когда фибрилла много больше единственной молекулы белка, когда

этим приростом можно пренебречь? Откуда в этом уравнении берется коэффициент 2?

2. Вопрос к разделу 2.7. Проводился ли редокинг лигандов с известными позами для верификации используемых протоколов? Также желательно было бы привести параметры сетки.
3. Ряд экспериментально определенных значений в диссертации приводится без погрешностей. В частности, интерес представляют стандартные отклонения для доли денатурированной формы сывороточных белков в табл. 3.2, 3.3.
4. Почему не были количественно оценены вклады структурных элементов во вторичную структуру белка по спектрам кругового дихроизма?
5. Почему все пики на ДСК-термограммах денатурации α -лактальбумина (рис. 3.20) являются бимодальными? Какой из двух наблюдаемых максимумов использовался для оценки изменения термостабильности белка в присутствии лиганда?
6. Можно ли на основе вашей модели рассчитать, при каком значении α фибриллообразование становится термодинамически невыгодным?
7. Вы использовали десятикратный мольный избыток катионов металлов по отношению к белку. Проводили ли вы эксперименты с варьированием концентрации катионов? Наблюдается ли пороговая концентрация, выше которой эффекты становятся заметными, и как это соотносится с физиологическими концентрациями ионов металлов?
8. В ваших экспериментах α -лактальбумин находился в кислой среде ($\text{pH} = 2$) в присутствии 100 мМ NaCl. Как вы считаете, можно ли экстраполировать полученные закономерности на физиологические условия ($\text{pH} 7.4$, другие концентрации солей)?
9. В таблице 3.10 приведены константы связывания для 50 соединений. Каковы критерии отбора лигандов для этого исследования? Были ли

они выбраны случайным образом, или вы ориентировались на какие-либо структурные признаки (например, наличие ароматических колец, заряда, липофильности)?

Высказанные вопросы и замечания *не носят критического характера* и не умаляют достоинств работы, заключающихся, прежде всего, в исследовании механизмов амилоидной агрегации и открытии новых возможностей для разработки терапевтических и диагностических агентов, а также функциональных материалов на основе амилоидных фибрилл.

Заключение:

В рецензируемой научно-квалификационной работе на основании выполненных автором исследований кинетики фибриллообразования ряда белков в присутствии большого количества низкомолекулярных лигандов, а также двухзарядных ионов металлов и полисахаридов *решена научная задача, имеющая важное значение для развития физической химии*. А именно, с помощью совокупности взаимодополняющих экспериментальных и теоретических методов разработана новая методика определения констант связывания белковых фибрилл с лигандами с использованием спектрофлуориметрического титрования с тιοфлавином Т. Определены величины констант связывания амилоидных фибрилл лизоцима с рядом низкомолекулярных органических лигандов. Установлены значения констант скорости прямой и обратной реакции фибриллообразования для бычьего и человеческого альбуминов, продемонстрировано соответствие равновесной конверсии белка в фибриллы в присутствии различных лигандов. Можно констатировать соответствие паспорту научной специальности 1.4.4. Физическая химия, а именно, п. 2 в части «Экспериментальное определение термодинамических свойств веществ...», п. 4 в части «Теория растворов, межмолекулярные и межчастичные взаимодействия...» и п. 9 «Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями протекания химической реакции».

Диссертация Никифоровой Алены Алексеевны на тему «Влияние белок-лигандных взаимодействий на процесс фибриллообразования ряда белков» соответствует критериям, определенным пп. 9-11, 13, 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), а ее автор, Никифорова Алена Алексеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по научной специальности 1.4.4. Физическая химия.

Официальный оппонент

Доктор химических наук
(1.4.4. Физическая химия
1.4.1. Неорганическая химия),
Ведущий научный сотрудник
кафедры общей химической технологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Ивановский государственный
химико-технологический университет»

Гамов Георгий Александрович

Адрес:

Россия, 153000, г. Иваново,
пр. Шереметевский, д. 7
Тел.: +7(915)8218562
e-mail: ggamov@isuct.ru

24.08.2026

Дата

Ученый секретарь ИХТУ Гамов Г.А.