

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
(Минобрнауки России)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)**

«УТВЕРЖДАЮ»

И. о. директора ИНЦ РАН
член-корреспондент РАН

 А.Н. Томилин
» августа 2026 г.

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, эл.адрес: cellbio@incras.ru;
<http://www.incras.ru/>
ИНН 7802030531, КПП 780201001

20.08.2026 № 12316-662-249

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Никифоровой Алёны Алексеевны
«Влияние белок-лигандных взаимодействий на процесс
фибриллообразования ряда белков»,
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.4. Физическая химия

Актуальность работы. Амилоидные фибриллы и приводящие к их образованию процессы патологической агрегации белков являются одной из ключевых проблем современной физической химии и молекулярной биофизики. Формирование и накопление амилоидных структур в организме лежит в основе патогенеза широкого спектра нейродегенеративных и системных заболеваний. Понимание механизмов фибриллогенеза и факторов, модифицирующих этот процесс, является необходимым условием для разработки эффективных подходов к профилактике и терапии патологических состояний.

Особый интерес в настоящее время представляет изучение влияния на процессы фибриллообразования лигандов различной природы (низкомолекулярных органических соединений, ионов металлов, полисахаридов и др.). Связывание таких лигандов может

существенно изменять термостабильность и конформационное состояние мономерных белков, а также кинетику роста и морфологию белковых агрегатов. Установление закономерностей этих эффектов создаёт физико-химическую основу для целенаправленного управления амилоидогенезом и разработки эффективных модификаторов белковой агрегации.

В диссертационной работе Никифоровой Алёны Алексеевны рассматриваются фундаментальные вопросы влияния лигандов разных классов на термостабильность, кинетику образования и морфологию фибрилл сывороточных альбуминов, α -лактальбумина и лизоцима, а также исследуется аффинность низкомолекулярных органических соединений к амилоидным фибриллам лизоцима. Таким образом, работа направлена на решение актуальных задач современной физической химии белков и амилоидных систем и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение в контексте поиска регуляторов амилоидогенеза.

Научная новизна. Научная новизна работы заключается в систематическом исследовании влияния низкомолекулярных органических лигандов, ионов двухвалентных металлов и полисахаридов на процессы фибриллообразования модельных амилоидогенных белков с использованием комплекса физико-химических методов. В результате проведенных исследований получены новые данные о различном влиянии Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} на термостабильность и лаг-фазу фибриллогенеза α -лактальбумина и морфологию фибрилл на основе этого белка. Кроме того, установлено влияние альгината натрия на термостабильность и кинетику фибриллообразования лизоцима и сывороточного альбумина, а также выполнено компьютерное моделирование взаимодействий полисахарида с мономерными и фибриллярными формами этих белков. В работе предложена и апробирована модификация методики определения констант связывания лигандов с амилоидными фибриллами на основании данных спектрофлуориметрии в присутствии амилоид-специфического зонда тиюфлавина Т (ThT), что позволило количественно охарактеризовать взаимодействие ряда органических соединений с амилоидами лизоцима. Существенным элементом новизны также является анализ соотношений между структурными характеристиками низкомолекулярных лигандов и их аффинностью к амилоидным фибриллам лизоцима на основе QSAR-подходов, что обеспечивает переход от чисто описательного подхода к количественному прогнозированию.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты работы развивают представления о том, как связывание лиганда с нативным белком, его денатурированной формой или поверхностью белкового агрегата изменяет отдельные стадии фибриллогенеза. Практическую ценность имеют предложенный способ предварительной оценки ингибиторов по термостабилизации глобулярного белка, данные о влиянии на фибриллогенез полисахарида альгината натрия и катионов металлов, а также сравнительный набор параметров взаимодействия органических лигандов с фибриллами лизоцима. Полученные закономерности влияния

лигандов на термическую стабильность, кинетику образования и морфологию фибрилл могут иметь значение как для понимания фундаментальных основ механизмов амилоидогенеза, так и для оптимизации условий хранения и переработки белковых препаратов, создания белково-полисахаридных материалов и разработки антиамилоидных и диагностических соединений.

В диссертационной работе также была предложена модификация конкурентного титрования ThT с амилоидами и получен массив параметров связывания структурно разнородных лекарственных соединений с фибриллами лизоцима. На его основе обсуждены возможные структурные фрагменты, повышающие сродство лигандов к фибриллам лизоцима, показана связь аффинности с липофильностью лигандов, а также проведено сравнение с литературными данными для других амилоидогенных белков. При условии строгого определения области применимости такой подход в дальнейшем может быть полезен как доступный сравнительный скрининг взаимодействий такого рода. В частности, предложенная методика может быть использована для скрининга потенциальных антиамилоидных агентов и количественной характеристики их взаимодействий с белковыми агрегатами.

Степень обоснованности и достоверности результатов. В работе применён комплекс взаимодополняющих методов: дифференциальная сканирующая калориметрия, УФ-спектрофотометрия, спектрофлуориметрия с ThT, спектроскопия кругового дихроизма, атомно-силовая микроскопия и молекулярный докинг. Для большинства флуоресцентных экспериментов указано не менее трёх повторов, использованы независимо подготовленные образцы фибрилл, а для отдельных систем выводы сделаны на основании сопоставления результатов нескольких комплементарных методов. Объём фактического материала, представленного в диссертационной работе, значителен. Несмотря на то, что ряд интерпретаций мог бы быть усилен более явным описанием контрольных экспериментов и статистической обработкой (что отражено ниже в вопросах и замечаниях), в целом обоснованность и достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Апробация результатов и публикации. Результаты работы отражены в 5 статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и в тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях. Основные разделы диссертации (фибриллообразование альбуминов в присутствии лигандов, влияние катионов двухвалентных металлов на α -лактальбумин, эффект альгината натрия на фибриллогенез лизоцима и альбумина) отражены как в статьях в рецензируемых журналах, так и в тезисах докладов. Вместе с тем следует отметить, что результаты разделов 3.5–3.6, включающие разработку конкурентного флуоресцентного подхода и определение констант связывания низкомолекулярных соединений с фибриллами лизоцима, судя по приведённому списку работ, отражены в тезисах доклада, но не представлены в отдельной статье в рецензируемом издании. Поскольку данный блок результатов является важной

частью диссертационной работы, полнота его публикационного отражения требует уточнения.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа построена по традиционному плану и включает в себя основные разделы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Список условных обозначений и сокращений» и «Список литературы». Работа изложена на 169 страницах, содержит 54 рисунка и 10 таблиц, список литературы включает 272 источника.

Во *Введении* обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, описаны методы исследования и обоснован личный вклад автора в работу. Цель работы сформулирована ясно, а задачи охватывают все основные экспериментальные блоки.

Литературный обзор посвящён современным представлениям об амилоидных фибриллах, механизмах фибриллообразования, кинетическим и термодинамическим моделям агрегации, а также влиянию лигандов различной природы на амилоидогенез. Обзор построен логично, отражает широкий круг отечественных и зарубежных публикаций, что позволяет читателю получить целостное представление о современном состоянии проблемы.

Материалы и методы. Глава 2 подробно описывает объекты исследования (сывороточные альбумины, α -лактальбумин, лизоцим), методики приготовления растворов, условия проведения экспериментов, а также применённые физико-химические методы: дифференциальная сканирующая калориметрия, спектрофлуориметрия с ThT, атомно-силовая микроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, молекулярный докинг. Основные процедуры описаны достаточно подробно, однако отдельные элементы требуют уточнения (см. замечания ниже).

Результаты и обсуждение. В разделе 3.1 проанализировано влияние низкомолекулярных органических лигандов на фибриллообразование сывороточных альбуминов. На основе совокупного анализа кинетических кривых ThT и профилей ДСК показано, что при выбранных условиях рост сигнала ThT для альбуминов начинается без заметного периода индукции и хорошо описывается экспоненциальной зависимостью, а начальная скорость процесса и уровень плато линейно зависят от концентрации белка. Полученные результаты позволили автору предложить схему с медленным конформационным переходом и быстрым последующим включением белка в фибриллы. С использованием данных КД для ряда лигандов дополнительно установлено, что изменения сигнала ThT во времени сопровождаются преобразованием вторичной структуры сывороточного альбумина.

В разделе 3.2 исследовано действие катионов двухвалентных металлов на α -лактальбумин. Показано, что Ca^{2+} , Cu^{2+} и Mn^{2+} увеличивают период индукции, Zn^{2+} и Cu^{2+} повышают максимальную скорость и уровень плато сигнала ThT, а Ca^{2+} заметно снижает последний. Получена высокая корреляция лаг-фазы фибриллогенеза α -лактальбумина с

параметром $\alpha^{-3/2}$, рассчитанным на основе данных ДСК. С применением АСМ в исследуемых образцах выявлены стержневидные фибриллы в контроле и в присутствии Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} и локальные утолщения агрегатов в присутствии Cu^{2+} и Zn^{2+} . Наблюдаемые эффекты позволили выдвинуть гипотезу о возможном участии механизма вторичной нуклеации в изменении кинетики фибриллогенеза.

Разделы 3.3 и 3.4 посвящены фибриллогенезу лизоцима и бычьего сывороточного альбумина в присутствии альгината натрия. Для системы лизоцим-альгинат показано образование коацервата в воде и его растворение в присутствии 2 М хлорида гуанидиния. Установлено, что в денатурирующей среде альгинат практически не влияет на ДСК-профиль мономерного лизоцима, но заметно увеличивает период индукции и полупериод агрегации белка. Замедление образования фибрилл объяснено связыванием альгината с поверхностью растущих фибрилл, что может ингибировать скорость роста агрегатов и/или вторичную нуклеацию. Результаты проведения молекулярного докинга позволили предложить возможное положение фрагмента альгината в сахарид-связывающей щели лизоцима. В случае альбумина показано смещение максимума пика и появление правого плеча на ДСК-термограмме денатурации. При этом влияние полисахарида на кинетические параметры оказалось сходным с влиянием низкомолекулярных органических лигандов. На основании полученных результатов сделано предположение о преимущественном связывании альгината с нативной формой белка и его стабилизации.

В разделах 3.5 и 3.6 автором предложена модификация подхода к проведению количественного анализа взаимодействия лигандов с амилоидными фибриллами, основанного на вытеснении связанного с фибриллами ThT исследуемым лигандом. Автором выведено линейное соотношение между F_0/F и концентрацией конкурирующего лиганда в рамках одноцентровой модели Ленгмюра, с использованием которого для 42 низкомолекулярных соединений были рассчитаны константы связывания с фибриллами лизоцима. Обсуждено соотношение между выявленной аффинностью, структурой, зарядом и липофильностью молекул. Широта набора исследованных соединений является несомненным достоинством работы.

Заключение последовательно суммирует шесть основных результатов проведенного исследования.

При общем достаточно высоком уровне диссертационной работы она не лишена некоторых редакционных неточностей (например, два подраздела последовательно имеют номер 3.1.3), формулировок, требующих стилистического уточнения, а также отдельных опечаток. Но эти замечания носят технический характер и не влияют на положительную оценку работы.

Автореферат в целом отражает содержание диссертации, её структуру, методы и основные выводы. В автореферате приведён список публикаций по теме диссертации, включающий 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и ряд тезисов докладов. Вместе с тем, в разделе тезисов имеет место техническая неточность: публикации под номерами 3 и 4 фактически совпадают по названию и выходным данным,

что создаёт впечатление удвоения одной и той же работы. Данная ошибка носит редакционный характер, но требует уточнения фактического числа уникальных тезисов.

Рекомендации по использованию результатов. Полученные данные могут быть использованы исследовательскими группами, изучающими физическую химию белковой агрегации. В частности, модифицированная методика конкурентного флуоресцентного титрования после валидации с учетом сделанных замечаний может применяться для предварительного скрининга и сравнительного ранжирования лигандов по сродству к амилоидным фибриллам. Совместное применение ДСК и кинетических измерений представляет интерес для оценки влияния лигандов на фибриллообразование сывороточных альбуминов и других глобулярных белков, агрегация которых связана с частичной термической денатурацией. Данные о влиянии альгината натрия и катионов металлов на формирование фибрилл могут быть востребованы при выборе условий получения белковых агрегатов и при проектировании белково-полисахаридных материалов.

Вопросы и замечания. Диссертация производит положительное впечатление самостоятельного и объемного исследования. Работа содержит новые экспериментальные данные и обобщения, имеющие значение для физической химии белков. Вместе с тем при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы и замечания:

1. В *литературном обзоре* утверждается, что «разрушение амилоидных фибрилл происходит в биологических условиях лишь под действием некоторых микробных протеаз». Такая формулировка выглядит слишком категоричной, поскольку в клеточных системах участвует широкий спектр протеаз и шаперонных/аутофагических механизмов, способных ремоделировать и деградировать амилоидные агрегаты. Возможно, имелось в виду полное протеолитическое разрушение фибрилл в конкретных системах, описанных в работах, или просто приведены отдельные примеры. Было бы полезно либо уточнить, что речь идёт о специфических микробных протеазах в указанных моделях, либо расширить обсуждение до других известных механизмов деградации амилоидных структур.

2. Учитывая значимость раздела 3.5, посвящённого методике определения констант связывания лигандов с амилоидными фибриллами, *литературный обзор* мог бы выиграть от отдельного подраздела, систематизирующего существующие экспериментальные подходы к измерению аффинности. Краткая справка по данному вопросу дана непосредственно в начале раздела 3.5, однако более подробное и полное описание применяемых методик с соответствующими ссылками на источники и описанием достоинств и недостатков каждой из них позволило бы более ясно обозначить место предлагаемой автором модификации флуоресцентного титрования в контексте существующих методов. В частности, из диссертации не до конца понятно, в чём состоит принципиальная новизна разработанного подхода относительно исходной схемы FLINT3: в новой математической модели обработки данных, в специфической настройке протокола для системы ThT–фибриллы лизоцима, в расширении диапазона применяемых

лигандов или в иных отличиях. Было бы полезно более чётко сформулировать, какие именно элементы методики являются принципиально новыми.

3. В Главе «*Материалы и методы*» следовало бы указать, как контролировалась стабильность и отсутствие агрегации/осаждения используемых лигандов в условиях эксперимента, поскольку для ряда гидрофобных низкомолекулярных соединений переход из DMSO в водную среду может сопровождаться изменением растворимости и эффективной концентрации, что критично для интерпретации кинетических кривых и оценок аффинности.

4. В разделе 2.4 указано, что «50 мкМ раствор тιοфлавина Т (ThT) готовили в 25 мМ трисовом буфере (pH 7,4), а конечная концентрация ThT в кювете при измерении составляла ... 65,7 мкМ для α лактальбумина». При исходной концентрации раствора 50 мкМ конечная концентрация ThT не может превышать 50 мкМ, поэтому приведённое значение 65,7 мкМ выглядит внутренне противоречивым. Вероятно, имеет место опечатка в приведенных концентрациях или в описании протокола упущены дополнительные шаги разбавления.

5. В разделе 3.1 в подписи к Рисунку 3.16 приведена исходная концентрация белка при инкубировании, вместо концентрации проб, для которых проводились измерения представленных спектров КД. Исчезновение минимума в этих спектрах при 222 нм, действительно, свидетельствует о происходящих структурных изменениях, но без деконволюции спектров (например, с использованием программных пакетов BeStSel, CDPro и др.) не даёт возможности количественно оценить прирост β -структуры. В связи с этим соответствующие механистические выводы целесообразно формулировать как вероятные.

6. В Таблицах 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.8 и 3.9 (разделы 3.1 и 3.4) представлены численные значения параметров термостабильности и кинетики фибриллообразования исследуемых белков для различных условий и лигандов, однако не во всех случаях указаны погрешности и приведены результаты статистического сравнения. Хотя в целом представленная система параметров позволяет проследить основные тенденции, отсутствие хотя бы стандартных отклонений и минимального статистического анализа выявленных различий несколько затрудняет оценку их значимости. Последнее замечание также касается Таблицы 3.10 (раздел 3.5).

7. При проведении кинетических исследований в разделах 3.1 и 3.2 в инкубируемых образцах наряду с амилоидогенными белками и ThT присутствуют также различные низкомолекулярные вещества, которые могут поглощать свет при длинах волн возбуждения и эмиссии ThT, тушить его флуоресценцию и конкурировать с красителем за участки связывания. В методической главе соответствующие контроли и коррекция на эффект внутреннего фильтра не описаны. Проводились ли такие исследования?

8. Как известно, флуоресценция ThT чувствительна к вязкости среды: квантовый выход красителя существенно возрастает при ограничении внутримолекулярной подвижности. В разделах 3.3 и 3.4 фибриллообразование исследуется в присутствии

полисахарида альгината натрия в концентрациях до 10–20 мг/мл. Вместе с тем из описания методики не вполне ясно, какова была конечная концентрация альгината непосредственно в измерительной кювете. Проводились ли контрольные измерения флуоресценции ThT в растворах альгината соответствующей концентрации без фибрилл и оценивалось ли возможное влияние вязкости на уровень плато F_{∞} и определяемые кинетические параметры?

9. Предложенная в *разделе 3.5* методика оценки аффинности связывания лигандов с фибриллами основана на одноцентровой конкурентной модели и применима только в случае, когда лиганд конкурирует с ThT за те же или перекрывающиеся сайты, не меняет структуру фибрилл или микроокружение красителя и не вызывает статического или динамического тушения флуоресценции ThT. В связи с этим возникает ряд вопросов:

- как экспериментально подтверждено отсутствие неконкурентного связывания лигандов с фибриллами или тушения флуоресценции ThT?

- использовались ли лиганды, поглощающие при длине волны возбуждения флуоресценции ThT, и, если да, то проводилась ли в их случае коррекция регистрируемой интенсивности флуоресценции на эффект первичного внутреннего фильтра?

- использовались ли лиганды, поглощающие при длине волны регистрации флуоресценции ThT, и, если да, то как это учитывалось?

- приводило ли связывание лигандов к изменению структуры фибрилл и, если да, не могло ли это повлиять на флуоресценцию ThT?

10. В *разделе 3.5* для пересчёта углового коэффициента K в абсолютную K^L используется литературное значение $K^T = 7,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. В цитируемой работе [271] для ThT и фибрилл лизоцима описаны две моды связывания с существенно различными константами. На каком основании выбрана именно высокоаффинная мода? Кроме того, протокол получения фибрилл в работе [271] отличается от протокола, используемого в диссертации. В частности, в диссертации использована соляная, а в работе [271] – уксусная кислота. При этом известно, что условия фибриллогенеза, в том числе компоненты буфера, влияют на структуру фибрилл и связывание с ними ThT. Насколько в связи с этим правомерен перенос K^T между полиморфными типами фибрилл? Желательно было бы определить K^T непосредственно для образцов, полученных диссертантом. Кроме того, работу усилило бы включение заведомо неконкурирующего или несвязывающегося отрицательного контроля. Это особенно важно, поскольку ненулевые K получены для всех 42 соединений.

Перечисленные вопросы и замечания не снижают общей ценности выполненного исследования и не влияют на положительную оценку диссертации. Они главным образом очерчивают границы количественной интерпретации полученных данных и направления дальнейшей валидации предложенных подходов.

Заключение. Диссертационная работа Никифоровой Алёны Алексеевны «Влияние белок-лигандных взаимодействий на процесс фибриллообразования ряда белков» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании

выполненных автором исследований решена научная задача, имеющая значение для развития физической химии белков. По актуальности, объёму выполненных исследований, научной новизне и практической значимости работа соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а её автор, Никифорова Алёна Алексеевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Диссертация и проект отзыва обсуждены и одобрены на научном семинаре Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук 17 августа 2026 года (протокол № 7).

Отзыв подготовил: доктор биологических наук (1.5.3 – Молекулярная биология), ведущий научный сотрудник Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук Сулацкая А.И.

В.н.с. Лаборатории структурной динамики,
стабильности и фолдинга белков
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института цитологии
Российской академии наук,
д.б.н.

Анна Игоревна Сулацкая

Подпись д.б.н. А.И. Сулацкой заверяю:
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института цитологии
Российской академии наук,
к.б.н.

Мария Анатольевна Бердиева

Адрес и контактная информация:

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

Телефон: +7 (812) 297-18-29

Эл. почта: cellbio@incras.ru

Официальный сайт: <https://incras.ru/>