

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.225.01
при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии наук»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от «23» сентября 2026 г., протокол № 28

о присуждении Никифоровой Алёне Алексеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Влияние белок-лигандных взаимодействий на процесс фибриллообразования ряда белков» по специальности 1.4.4. Физическая химия принята к защите 24 июня 2026 года, протокол № 25, диссертационным советом 24.1.225.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 420111, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, приказ Минобрнауки РФ № 553/нк от 23.05.2018.

Соискатель, **Никифорова Алёна Алексеевна**, 22.01.1997 года рождения, в 2020 г. окончила специалитет Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО КФУ) по специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия. С 2021 г. по 2025 г. **Никифорова Алёна Алексеевна** обучалась в очной аспирантуре Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО КФУ по научной специальности 1.4.4. Физическая химия.

В период подготовки диссертации соискатель работала в должности инженера в научно-исследовательской лаборатории «Молекулярные основы амилоидообразования и антиамилоидной активности» Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО КФУ.

Диссертационная работа **выполнена** на кафедре физической химии

Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО КФУ.

Научный руководитель – доктор химических наук, доцент кафедры физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО КФУ Седов Игорь Алексеевич.

Официальные оппоненты:

Гамов Георгий Александрович, гражданин Российской Федерации, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры Общей химической технологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановский государственный химико-технологический университет», г. Иваново;

Улитин Николай Викторович, гражданин Российской Федерации, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой Общей химической технологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань

дали положительные отзывы на диссертацию.

В отзывах имеются следующие вопросы и замечания:

Гамов Г.А.: 1) Экспоненциальная модель применима только для случаев, когда фибрилла много больше единственной молекулы белка, когда этим приростом можно пренебречь? Откуда в уравнении 1.4.1. берется коэффициент 2? 2) Проводился ли редоксинг 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 таблицах 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 представленных ДСК-термограммах денатурации α -лактальбумина 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) Проводили ли вы эксперименты с варьированием концентрации катионов металлов для исследования фибриллообразования α -лактальбумина? Наблюдается ли пороговая концентрация, выше которой эффекты становятся заметными, и как это соотносится с физиологическими концентрациями ионов металлов? 8) Как вы считаете, можно ли экстраполировать полученные для фибриллообразования α -лактальбумина закономерности на физиологические условия (pH 7.4, другие концентрации солей)? 9) Каковы критерии отбора лигандов для определения констант связывания с амилоидными фибриллами лизоцима? Были ли они выбраны случайным образом, или вы ориентировались на какие-либо структурные признаки (например, наличие ароматических колец, заряда, липофильности)?

Улитин Н.В.: 1) Присутствуют два пункта 3.1.3 с разными названиями; 2) Насколько чувствительны полученные значения констант k_1 и k_{-1} к возможному включению в модель процессов вторичной нуклеации или фрагментации? Проводилось ли тестирование альтернативных кинетических схем, например, с учетом автокаталитического роста, и если нет, то каковы основания для выбора именно предложенной модели? 3) Является ли приведенная обработка кинетических кривых единственно возможной, и не следовало бы применить единый формализм (например, логистическую модель) для всех белков, чтобы унифицировать сравнение параметров? Кроме того, в диссертации не приводятся первичные данные по изменению конверсии со временем (например, в виде таблиц), что затрудняет проверку расчетов начальных скоростей и периодов полупревращения; 4) При наличии нескольких переходов (например, для альбуминов наблюдаются два пика) корректно ли использовать суммарную энтальпию? Также в работе не обсуждается изменение теплоемкости при денатурации (ΔC_p), которая может существенно влиять на температурную зависимость α , особенно при различии температур денатурации при использовании разных лигандов; 5) Может ли наблюдаться неконкурентное вытеснение или аллостерический эффект, искажающий

результаты при определении констант связывания с амилоидными фибриллами лизоцима? Проводилась ли проверка методики на лигандах с известными значениями константы диссоциации, определенными независимыми методами (например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс), чтобы подтвердить ее валидность? б) Не проведен систематический QSAR-анализ с использованием других дескрипторов помимо $\log P$. Было бы интересно узнать, планируется ли в дальнейшем создание прогностической модели на основе накопленного массива данных, и какие дескрипторы автор считает наиболее перспективными.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт цитологии Российской академии наук**, г. Санкт-Петербург – в своем положительном заключении, составленном и подписанном доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков ИНЦ РАН Сулацкой Анной Игоревной, указала следующие вопросы и замечания: 1) В литературном обзоре утверждается, то «разрушение амилоидных фибрилл происходит в биологических условиях лишь под действием некоторых микробных протеаз». Было бы полезно уточнить, что речь идёт о специфических микробных протеазах в указанных моделях, либо расширить обсуждение до других известных механизмов деградации амилоидных структур; 2) 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 ДМСО в водную среду может сопровождаться изменением растворимости и эффективной концентрации, что критично

для интерпретации кинетических кривых и оценок аффинности; 4) В разделе 2.4 имеет место опечатка в приведённых концентрациях тирофлавина Т или в описании протокола упущены дополнительные шаги разбавления; 5) Исчезновение минимума в приведенных спектрах КД при 222 нм, действительно, свидетельствует о происходящих структурных изменениях, но без деконволюции спектров не даёт возможности количественно оценить прирост β -структуры. В связи с этим механистические выводы целесообразно формулировать как вероятные; 6) В Таблицах 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.8 и 3.9 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; 7) В методической главе контроля и коррекция на эффект внутреннего фильтра не описаны. Проводились ли такие исследования? 8) Из описания методики не вполне ясно, какова была конечная концентрация альгината натрия 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) Как экспериментально подтверждено отсутствие неконкурентного связывания лигандов с фибриллами или тушения флуоресценции ThT? 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 цитируемой работе [271] для ThT и фибрилл лизоцима описаны две моды связывания с существенно различными константами. На каком основании для расчётов выбрана именно высокоаффинная мода? Кроме того, протокол получения фибрилл в работе [271] отличается от

протокола, используемого в диссертации. Насколько в связи с этим правомерен перенос K_T между полиморфными типами фибрилл? Желательно было бы определить K_T непосредственно для образцов, полученных диссертантом.

В отзыве отмечено, что «Перечисленные вопросы и замечания не снижают общей ценности выполненного исследования и не влияют на положительную оценку диссертации». «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».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается общностью тематики исследований по диссертационной работе и областью научных интересов, как ведущей организации, так и официальных оппонентов, являющихся ведущими специалистами в области физической химии, стабильности и кинетики агрегации белков.

На автореферат диссертации поступило 3 отзыва, все положительные. Отзывы получены от:

1. к.х.н. Кадцына Е.Д. (Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН), в отзыве *поднимаются следующие вопросы и замечания: 1) Накопления фибрилл БСА и ЧСА может быть эффективно описано кинетикой первого порядка. Однако для α -лактальбумина и лизоцима характерна сигмоидная кривая с периодом индукции. Известно ли, с чем связаны эти различия? 2) Приведенная автором на рис. 5 кинетическая схема с равновесием между нативной и развернутой формой белка является*

сильным упрощением. И нативная, и, в особенности, развернутая форма белка представляют собой широкий спектр состояний. Вероятно, лишь некоторая часть из их способна вступать в дальнейшую реакцию с растущей фибриллой; 3) Автор отмечает, что в наблюдаемое в растворах альгината изменение кинетики фибриллообразования не может объясняться изменением вязкости. Значимый вклад в растворах полимеров могут вносить, однако, краудинг-эффект, локальное изменение концентраций и коэффициентов активности белка. Может ли это быть альтернативным (но не отменяющим авторского) объяснением наблюдаемых эффектов?

2. д.х.н. Успенской И.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова), в отзыве отмечается, что одним из важных практических результатов диссертации является разработка новой методики определения констант связывания белковых фибрилл с лигандами с использованием спектрофлуориметрического титрования с тиюфлавином T; в автореферате перечислены требования к выбору условия титрования, но в явном виде отсутствуют ограничения данного метода, что важно знать для перспектив его использования. Кроме того, желательно привести погрешности кинетических параметров образования фибрилл (табл.1-3)

3. к.х.н. Миляевой О.Ю. (Санкт-Петербургский государственный университет), в отзыве отмечается, что предложенная модель фибриллообразования альбуминов как обратимой реакции первого порядка представляется убедительной в рамках исследованных условий. Вместе с тем было бы полезно более подробно обсудить границы применимости этой модели, в частности возможности её использования при изменении температуры, рН, ионной силы и концентрации белка за пределами исследованного диапазона. Среди низкомолекулярных органических лигандов наибольший ингибирующий эффект на фибриллообразование оказали малорастворимые гидрофобные соединения, требующие добавления ДМСО в качестве соразтворителя. Возникает вопрос о том, можно ли разделить действие этих соединений и влияние ДМСО? Как автор исследования оценивает возможность экстраполяции установленных закономерностей на

β-амилоид, α-синуклеин, тау-белок и другие патогенные белки?

Соискатель является соавтором 17 статей, в том числе по теме диссертации 5 статей, все опубликованы в отечественных и зарубежных рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Диссертационная работа не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Sedov, I. Binding Constant of Clinical Drugs and Other Organic Ligands with Human and Mammalian Serum Albumin / I. Sedov, **A. Nikiforova**, D. Khaibrakhmanova // Biophysica. – 2021. – Vol.1. – P. 344-358.

2. **Nikiforova, A.** Molecular design of magnetic Resonance Imaging Agents Binding to Amyloid Deposits / **A. Nikiforova**, I. Sedov // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, №13 – 32 P.

3. Khaibrakhmanova, D.R. Human Serum Albumin Fibril Formation in the Presence of Ligands with Different Affinity / D.R. Khaibrakhmanova, **A.A. Nikiforova**, Z. Li, I.A. Sedov // Russian Journal of General Chemistry. – 2024. – Vol. 94. – P. 395-405.

4. Bogdanova, L.R. Influence of divalent metal cations on α-lactalbumin fibril formation / L.R. Bogdanova, **A.A. Nikiforova**, S.A. Ziganshina, Y.F. Zuev, I.A. Sedov // Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2024. – Vol.29. – P. 601-609.

5. Khaibrakhmanova, D.R. The Contrasting Effect of Sodium Alginate on Lysozyme and Albumin Denaturation and Fibril Formation / D.R. Khaibrakhmanova, P.R. Kuzivanova, B.R. Gainutdinov, T.I. Magsumov, **A.A. Nikiforova**, I.A. Sedov // Biophysica. – 2024. – Vol.4, № 4. – P. 651-666

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

1. На основе экспериментальных данных **предложена** новая кинетическая модель фибриллообразования альбуминов. Согласно этой

модели, лимитирующей стадией процесса является переход развёрнутой формы белка в конформацию, способную к дальнейшей быстрой агрегации.

2. **Показано**, что фибриллообразование альбумина можно рассматривать как обратимую реакцию первого порядка. **Определены** значения констант скорости прямой и обратной реакции для бычьего и человеческого альбуминов, **продемонстрировано** соответствие равновесной конверсии белка в фибриллы в присутствии различных лигандов кинетической модели.

3. **Продемонстрировано** согласие кинетических параметров фибриллообразования альбумина по данным тιοфлавинового теста и спектроскопии кругового дихроизма, отражающей скорость изменения вторичной структуры белка.

4. **Установлено**, что для процесса фибриллообразования бычьего α -лактальбумина в присутствии катионов двухвалентных металлов продолжительность периода индукции коррелирует с изменениями термостабильности белка. Обнаружено влияние природы катионов на выход и морфологию фибрилл α -лактальбумина.

5. **Обнаружено** замедление агрегации без снижения выхода фибрилл лизоцима под действием альгината натрия в присутствии хлорида гуанидиния за счет связывания полисахарида с растущими фибриллами. Для альбумина в присутствии альгината натрия **продемонстрирован** слабо выраженный эффект стабилизации нативной структуры и связанного с ним ингибирования фибриллообразования, аналогичный влиянию низкомолекулярных лигандов.

6. **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.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

предложена кинетическая схема фибриллообразования альбуминов;

показано, что влияние лигандов на фибриллообразование глобулярных белков определяется их способностью связываться с нативной формой белка

и смещать равновесие между свёрнутыми и развёрнутыми состояниями;

впервые показано, что доля развёрнутой формы белка (α), определяемая методом ДСК, является ключевым параметром, контролирующим как кинетику, так и равновесие фибриллообразования;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Установленные закономерности влияния лигандов на термическую стабильность и кинетику фибриллообразования белков могут повысить эффективность скрининга потенциальных ингибиторов фибриллообразования, а также позволяют оптимизировать условия создания функциональных белковых материалов. Предложенная методика определения констант связывания лигандов с амилоидными фибриллами может способствовать разработке новых диагностических агентов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что: достоверность результатов обусловлена доказанной воспроизводимостью полученных данных, применением современных физико-химических методов исследования и использованием высококласного научного оборудования. Достоверность результатов дополнительно **подтверждается** публикациями в рецензируемых научных журналах высокого уровня.

Личный вклад соискателя заключается 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.

В ходе заседания критических замечаний высказано не было. Соискатель Никифорова А.А. аргументированно ответила на все заданные вопросы.

На заседании 23 сентября 2026 года диссертационный совет принял решение присудить Никифоровой Алёне Алексеевне ученую степень кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия за решение актуальной научной задачи, заключающейся в установлении

закономерностей влияния лигандов различной природы на кинетику и равновесие фибриллообразования ряда белков, имеющее важное значение для целенаправленного управления амилоидогенезом и разработки эффективных модификаторов белковой агрегации.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.4.4. Физическая химия, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали за – 16, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Заместитель председателя диссертационного совета 24.1.225.01

доктор химических наук, профессор

Игорь Анатольевич Литвинов

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.225.01

кандидат химических наук

Резеда Ринатовна Фазлеева

«23» сентября 2026 г.