

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор - проректор по научной деятельности  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», доктор физико-математических наук, профессор

Гагорский Д.А.

04.09.23

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань

« 4 » 09 2023 г.

Диссертация «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии» выполнена Фатхутдиновой Алисой Амировной на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель ученой степени кандидата

химических наук Фатхутдинова Алиса Амировна работала на  
(Ф.И.О.)

Кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова в должности инженера-проектировщика лаборатории физико-химических исследований отдела физической химии с 17.06.2020 по 06.06.2022, в должности инженера проектировщика НИЛ «Новые методы обработки и анализа материалов для медицины в условиях сверхбыстрого нагрева и охлаждения» с 07.06.2022 по 20.09.2022, в должности младшего научного сотрудника с 20.09.2022 по настоящее время НИЛ «Новые методы обработки и анализа материалов для медицины в условиях сверхбыстрого нагрева и охлаждения»

*(полное официальное наименование организации в соответствии с уставом, наименование учебного или научного структурного подразделения, должность, период работы)*

В 2018г. окончила Казанский (Приволжский) федеральный университет

по специальности/ направлению подготовки Фундаментальная и прикладная химия.

Фатхутдинова Алиса Амировна в 2022 г. окончила очную аспирантуру Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «КФУ» Минобрнауки РФ.

*(полное официальное наименование организации, в которой обучался соискатель ученой степени)*

Кандидатские экзамены сданы: справка о сдаче кандидатских экзаменов

№ 0.1.81.1.21 – 16/21223 от 25.09.2023.

*(номер и дата документа, подтверждающего сдачу кандидатских экзаменов).*

Научный руководитель (научный консультант): Мухаметзянов Тимур Анварович

*(Ф.И.О., основное место работы с указанием*

доцент Кафедры физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова, к.х.н., старший научный сотрудник НИЛ сверхбыстрой калориметрии и НИЛ Новые методы

обработки и анализа материалов для медицины в условиях сверхбыстрого нагрева и охлаждения Химического института им. А.М. Бутлерова  
*полного наименования организации в соответствии с уставом, структурного подразделения, должности, ученая степень, ученое звание)*

По итогам рассмотрения диссертации принято следующее **заключение**:

**Работа обладает актуальностью**, обусловленной большим теоретическим и практическим значением исследований фолдинга и анфолдинга белка. Выявление кинетических и термодинамических закономерностей процессов фолдинга и анфолдинга белков имеет большое значение для разработки процессов очистки белков с сохранением их биологических свойств, при изготовлении фармацевтических препаратов, пищевых добавок, в медицине при использовании белков в качестве биомаркеров. Применение метода сверхбыстрой калориметрии, особенностями которого являются высокие скорости нагрева и охлаждения, а также малые размеры образца, в области исследования фолдинга и анфолдинга белка представляет значительный интерес.

**Новизна полученных результатов** заключается в следующем:

- На основе анализа результатов дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния показано, что необратимая денатурация лизоцима при повышенных температурах вызвана протеканием процесса дезамидирования.
- На основе метода сверхбыстрой калориметрии впервые изучены кинетика и механизм процесса фолдинга лизоцима в глицерине. Определены кинетические параметры процесса (энергия активации, энтальпия и энтропия активации), влияние температуры на скорость фолдинга, предложена кинетическая схема процесса фолдинга, включающая интермедиат, изучены свойства интермедиата фолдинга.
- На основе результатов математического моделирования процесса ступенчатого нагрева белка показано влияние кинетики процесса обратимого анфолдинга на форму калориметрических кривых со ступенчатым нагревом.

**Теоретическая и практическая значимость работы:**

Выполненная работа расширяет набор калориметрических подходов для исследования быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белков. Подходы, предложенные в настоящей работе, могут быть использованы при исследовании термической стабильности белков и других биомакромолекул, как в рамках фундаментальных, так и прикладных исследований. Полученные в работе результаты демонстрируют, что современные калориметрические методы позволяют получать информацию не только о термодинамических параметрах быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белка, но могут быть использованы и для анализа кинетики этих процессов. Кинетические закономерности фолдинга лизоцима в глицерине могут быть использованы для оптимизации процессов выделения и очистки белков.

**Личное участие соискателя ученой степени в получении результатов, изложенных в диссертации:**

Автором получены все экспериментальные данные, представленные в работе; проведена математическая обработка экспериментальных данных; анализ литературы, выполнено обобщение полученных результатов. Также соискатель совместно с научным руководителем участвовал в поставке цели и формулировке задач исследования, обсуждении полученных результатов и их оформлении в виде научных публикаций.

**Результаты работы обоснованы и достоверны**, что подтверждается большим объемом экспериментальных данных, полученных с помощью современных физико-химических методов исследования. Материалы диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых журналах (Q1 и Q2).

**Основные результаты работы достаточно полно изложены в следующих публикациях:**

1. Mukhametzyanov T.A. Calorimetric observation of lysozyme degradation at elevated temperature in water and DMSO-water mixtures / T.A. Mukhametzyanov, A.A. Fatkhutdinova, I.A. Sedov, L.S. Yakimova, A.E. Klimovitskii // *Thermochim Acta*. Elsevier B. – 2021. – Vol. 695 (178826). – P. 1-9.

2. Fatkhutdinova A.A. Refolding of lysozyme in glycerol as studied by fast scanning calorimetry / A.A. Fatkhutdinova, T.A. Mukhametzyanov, C. Schick // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022 – Vol. 23, №2773 – pp. 1-13.

3. Mukhametzyanov T.A. Step-scan calorimetry of protein denaturation: modeling and experiment // T.A. Mukhametzyanov, A.A. Fatkhutdinova, C. Schick – 2022 – Vol. 710, 179181 – pp. 1-14.

Также опубликованы тезисы докладов в материалах 6 конференций.

**Ценность научных работ соискателя** заключается в создании подходов, позволяющих использовать метод сверхбыстрой калориметрии для изучения процессов анфолдинга и фолдинга белка. Полученные в работе результаты по кинетике фолдинга лизоцима в глицерине представляют значительный научный интерес для понимания роли растворителя в процессе фолдинга белка.

**Специальность, которой соответствует диссертация.**

Диссертационная работа Фатхутдиновой А.А. соответствует паспорту специальности 1.4.4. Физическая химия по ряду пунктов: 2. Экспериментальное определение термодинамических свойств веществ, расчет термодинамических функций простых и сложных систем, в том числе на основе методов статистической термодинамики, изучение термодинамических аспектов фазовых превращений и фазовых переходов; 7. Макрокинетика, механизмы сложных химических процессов, физико-химическая гидродинамика, растворение и кристаллизация; 9. Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями протекания химической реакции; 12. Физико-химические основы процессов химической технологии и синтеза новых материалов.

**С рецензией на работу выступил** д.х.н., профессор Горбачук В.В.:

Диссертационная работа Фатхутдиновой А.А. посвящена исследованию **актуальной** проблемы современной физической химии: созданию подходов для изучения быстрых процессов анфолдинга и фолдинга белков на основе сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии. Это исследование представляет интерес в связи необходимостью независимой оценки вкладов обратимых и необратимых процессов в суммарный тепловой эффект фолдинга и термической денатурации (анфолдинга) белка. Сверхбыстрая сканирующая калориметрия позволяет исследовать быстрые процессы установления равновесия анфолдинг/фолдинг, исключив относительно медленные процессы необратимой денатурации белков.

Результаты работы отличаются **новизной**: необратимая денатурация лизоцима при повышенных температурах, вызванная протеканием процесса дезамидирования, впервые изучена с помощью широкого набора физических методов: дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния; с помощью сверхбыстрой сканирующей калориметрии впервые изучен процесс фолдинга лизоцима в глицерине. Определены кинетические параметры процесса, влияние температуры на скорость фолдинга, предложена кинетическая схема процесса фолдинга, включающая интермедиат, изучены свойства интермедиата фолдинга; с помощью математического моделирования процесса ступенчатого нагрева белка показано влияние кинетики процесса обратимого анфолдинга на форму калориметрических кривых со ступенчатым нагревом.

Результаты диссертационной работы обладают **практической значимостью**.

Выполненная работа расширяет набор калориметрических подходов для исследования быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белков. Разработанные подходы с использованием сверхбыстрой сканирующей калориметрии могут быть использованы для характеристики термостабильности новых ферментов, приготовленных в микроколичествах с помощью методов современной биотехнологии.

Результаты диссертационной работы Фатхутдиновой А.А. имеют **теоретическую значимость**. Полученные в работе результаты демонстрируют, что современные калориметрические методы позволяют получать информацию не только о термодинамических параметрах быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белка, но могут быть использованы и для анализа кинетики этих процессов.

Выводы диссертации являются достоверными и обоснованными. Результаты воспроизводимы и согласуются с литературными данными, полученными разными экспериментальными методами.

По тексту диссертации нет принципиальных замечаний. Имеются замечания к используемым терминам и оформлению работы:

1. По необратимой термической денатурации лизоцима за счет дезамидирования в литобзоре желательно процитировать работы Томизавы (Hideyuki Tomizawa), например по ссылке <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7629034/>, и другие. Желательно также дать ссылку на работу Клибанова по фолдингу лизоцима <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13520>, где показано, что лизоцим в глицерине самопроизвольно восстанавливает свою ферментативную активность после денатурации восстановителем с последующим окислением.
2. Во введении нужно разделить формулировки теоретической и практической значимости работы.
3. В диссертации желательно дать иллюстрацию, например, в виде схемы, для связи между кинетикой процесса анфолдинга белка и характеристиками калориметрических кривых, регистрируемых в режиме ступенчатого нагрева.
4. Подзаголовки разделов диссертации должны коррелировать с выводами в разделе «Закключение».
5. В главе «Результаты и обсуждение» в подписи к каждому рисунку с калориметрическими кривыми нужно указывать скорость сканирования температуры, а также сегмент временного профиля температуры (температурной программы) термической обработки образца.

В целом автором проделана большая работа по определению условий и механизма фолдинга лизоцима с применением сверхбыстрой сканирующей калориметрии, в том числе при ступенчатом нагреве.

Диссертационная работа написана на 149 страницах, содержит введение, три главы, включая литературный обзор, экспериментальную часть и обсуждения результатов, заключение и приложение, содержит 2 таблицы, 56 рисунков, список цитируемой литературы с 217 ссылками на литературные источники и публикации автора по теме диссертации.

Фатхутдиновой А.А. опубликовано по теме диссертации 3 статьи в рецензируемых международных научных журналах с высоким рейтингом, индексируемых в WoS и Scopus. Работа апробирована на международных и российских научных конференциях.

Диссертация Фатхутдиновой Алисы Амировны по своей актуальности, новизне, объему и достигнутым результатам отвечает требованиям, установленным в пп.9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, и является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная задача современной физической химии, имеющая практическое и теоретическое значение: разработан новый подход по использованию сверхбыстрой калориметрии для исследования процессов анфолдинга и фолдинга биомакромолекул. Диссертация может быть представлена в диссертационный совет к защите на

соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. физическая химия.

**Выводы:**

Диссертация «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии» отвечает критериям, установленным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.

Диссертация «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии» является научно-квалификационной работой, в которой решена научная проблема создания подходов для экспериментального наблюдения за процессами анфолдинга и фолдинга белка с помощью метода сверхбыстрой чип-калориметрии, что соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней.

Диссертация «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии», представленная соискателем ученой степени кандидата химических наук Фатхутдиновой Алисой Амировной рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Заключение принято на расширенном заседании кафедры физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Присутствовало на заседании 22 чел., в том числе 4 доктора наук, 9 кандидатов наук.

Результаты голосования: за – 22 чел., против – 0 чел., воздержались – 0 чел., протокол от «4» сентября 2023 г. № 3

Председательствующий на заседании

Зиганшин М.А.  
Директор химического института,  
д.х.н., доцент

Секретарь заседания

Хабибуллина А.Р.  
Инженер кафедры физической химии

Заместитель руководителя основного  
структурного  
деятельности  
подразделения,  
в полномочия которого  
входят вопросы по научной деятельности

Челнокова И.А.  
Заместитель директора по научной  
деятельности, к.х.н., доцент