

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Гамова Георгия Александровича

на диссертационную работу

Хайбрахмановой Диляры Раисовны

**«ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ С АЛЬБУМИНОМ»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.4. Физическая химия

Актуальность темы и цель диссертационной работы. Альбумины составляют большую часть белков, растворенных в плазме крови млекопитающих, и играют важную физиологическую роль, транспортируя молекулы и ионы к тканям и выводя продукты метаболизма. Термодинамические и кинетические характеристики связывания малых молекул, обладающих биологической активностью, с этими белками в значительной мере определяют фармакокинетику лекарственных препаратов. По этим причинам, редкая статья, публикуемая в наши дни, обходится без раздела, посвященного исследованию связывания тех или иных впервые синтезируемых органических молекул или металлокомплексов с сывороточными альбуминами. Увы, зачастую эксперименты ставятся или их результаты обрабатываются неудовлетворительным образом.

В связи с этим тема диссертационной работы Хайбрахмановой Д.Р., посвященной разработке надежного метода определения констант связывания малых молекул с белками, а также поиску корреляций между прочностью образующихся ассоциатов и денатурационной/агрегационной устойчивостью белка, является в высшей степени актуальной.

Цель работы заключалась в совершенствовании методов исследования термодинамики взаимодействий низкомолекулярных органических лигандов с сывороточным альбумином в растворе и установлении связи между аффинностью лигандов к альбумину и их влиянием на денатурационную и агрегационную устойчивость белка. Поставленная цель соответствует задачам, которые решает автор при проведении диссертационного исследования. При выполнении

эксперимента привлечены современные методы физико-химического исследования (дифференциальная сканирующая калориметрия, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, спектроскопия кругового дихроизма). Используются также надежные теоретические методы (для расчета термодинамических характеристик исследуемых равновесий, построения QSAR моделей, в том числе, с привлечением машинного обучения, и оптимизации их параметров).

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-315-90053), РНФ (проекты 23-23-10084, 19-73-00209), а также в рамках программ повышения конкурентоспособности КФУ и Приоритет 2030.

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа Хайбрахмановой Д.Р. написана в стандартном для диссертаций стиле, а именно, содержит такие основные разделы как введение, обзор доступных литературных данных, методическую часть, описывающую экспериментальные процедуры, методики, а также подготовку реактивов к работе, обсуждение полученных данных, которое, в свою очередь подразделяется на шесть главок, и заключение с выводами по работе. Работа изложена на 151 странице и содержит 62 рисунка, 4 таблицы и список использованных литературных источников из 194 наименований.

Раздел *Введение* выполняет свое предназначение. Здесь описаны традиционно принятые для квалификационных работ позиции, а именно, актуальность и степень разработанности темы исследования, цель работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методы исследования, а также положения, выносимые на защиту, достоверность полученных результатов, личный вклад автора и апробация работы.

В *первой главе* (с. 10-47) дается характеристика основному объекту исследования, а именно, сывороточному альбумину (особое внимание уделено белкам человека и быка как наиболее часто исследуемым в литературе) и проводится краткий, но весьма информативный обзор экспериментальных и

теоретических методов, используемых для определения констант связывания малых молекул с сывороточными альбуминами. Автор совершенно справедливо подсвечивает недостатки, присущие различным экспериментальным техникам, и критически анализирует доступные литературные источники. Завершается глава кратким резюме, которое показывает проблемы и ограничения применяемых методов исследования реакций малых молекул с белками, и обосновывает выбор цели исследования.

Хочется отметить, что проблемы экспериментальных методов, точнее, способов обработки их результатов, которые поднимает автор, ясны уже долгое время. Однако, с упорством, достойным лучшего применения, многочисленные исследователи продолжают использовать одни и те же неверные протоколы. Как справедливо отмечает Хайбрахманова Д.Р., складывается впечатление, что одни и те же формулы бездумно копируются из статьи в статью.

Во *второй главе* (с. 48-52) диссертационного исследования Хайбрахманова Д.Р. описывает использованные ей физико-химические методы исследования реакций между малыми молекулами и сывороточными альбуминами, подготовку исходных реагентов, а также протоколы обработки первичных экспериментальных данных.

В *третьей главе* (с. 53-131) обсуждаются полученные автором результаты. Первый раздел главы посвящен описанию собранной базы литературных данных о константах равновесия реакций альбуминов с лекарственными веществами. Это большая, трудоемкая и очень ценная для других исследователей работа – вручную были проанализированы сотни записей, чтобы выбрать наиболее надежные результаты о константах связывания малых молекул с белками. Собранная база была также подвергнута краткому статистическому анализу с целью выявления закономерностей в условиях эксперимента, наиболее популярных методов определения констант равновесия и т.п.

Во втором разделе обсуждения результатов автор подробно описывает разработанный ею метод определения констант взаимодействия малых молекул с белками методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Суть метода заключается в том, что температура денатурации белка и равновесие между

нативной и денатурированной формой смещается вследствие связывания альбумина с органическим лигандом. Описывая ДСК-кривую с помощью предложенной автором математической модели, можно выбрать оптимальные параметры, которые наибольшей вероятностью соответствуют реальным стехиометрическим коэффициентам реакций и константам связывания. Методика апробирована на хорошо изученных системах, и в ее надежности сомнений не возникает. Далее, разработанный метод применили для определения термодинамических параметров реакций ряда лекарственных препаратов с бычьим сывороточным альбумином, сопоставляя с литературными данными, полученными иными методами. Считая ДСК более точным способом, можно дать рекомендации относительно выбора величин констант связывания из литературы.

Третий раздел обсуждения результатов – это попытка построить модель «структура-свойство», где в качестве свойства выступает константа связывания малой молекулы с белком. Для этого автором наработан большой массив экспериментальных данных по взаимодействию набора замещенных бензойных кислот с бычьим сывороточным альбумином. Для такой последовательности структурных аналогов удастся построить множественную линейную регрессию с использованием трех-четырёх составных молекулярных дескрипторов.

В четвертом разделе автор на основании проведенных компьютерных экспериментов решительно забраковывает возможность хоть сколько-нибудь точного прогноза констант связывания малых молекул с белками на основании результатов молекулярного докинга.

Пятый раздел – своего рода, расширенное продолжение третьей главы обсуждения результатов. В нем Хайбрахманова Д.Р. также с помощью множественной линейной регрессии ищет связь между строением органических лигандов и константами связывания с альбуминами, но уже для широкого круга разнородных соединений. Коэффициент детерминации при этом был предсказуемо ниже, чем в случае набора замещенных бензойных кислот. Использование методов машинного обучения, к сожалению, также не помогло дать надежные предсказания.

Последний, шестой, раздел обсуждения результатов описывает влияние лигандов с разной степенью сродства к белкам на их фибриллообразование. Закономерным образом, в полном соответствии с ранее полученными Хайбрахмановой Д.Р. результатами, лиганды, которые образуют прочные ассоциаты с альбуминами, сильнее препятствуют образованию фибрилл, что связано со смещением равновесия между нативной и денатурированной формами белка в пользу первой.

В разделе «*Заключение*» (стр. 132) лаконично сформулированы основные выводы диссертации и даны рекомендации по дальнейшей разработке темы.

Личный вклад автора в рецензируемую работу заключается выполнении большей части экспериментальной работы по разработке методик измерения констант связывания методами спектрофлуориметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии; изучении кинетики фибриллообразования альбумина; а также обработке полученных экспериментальных данных, анализе литературы и составлении базы данных констант связывания. Автор также принимал участие в обсуждении результатов и написании публикаций. В трех публикациях по теме диссертации из пяти Хайбрахманова Д.Р. является первым автором, что подчеркивает величину ее вклада.

Научная новизна представленной 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. Предложены рекомендации по идентификации продуктов взаимодействия дисульфидов с ионами d-металлов, основанные на совместном анализе экспериментальных данных УФ-, ЯМР- и КР-спектроскопии и квантовохимических расчетов.

Достоверность полученных результатов и выводов обеспечивается 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.

Теоретическая и 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.

Применение полученных результатов. Полученные в работе результаты представляют интерес для организаций и учреждений, занимающихся теоретическими и прикладными аспектами физической химии растворов макробиомолекул, 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», «Санкт-Петербургский государственный университет», «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», ФГБУН: Институте физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина, Институте белка РАН, Институте биологии гена РАН, Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Институте химии растворов им. Г. А. Крестова РАН.

Публикации, автореферат. Основное содержание диссертации изложено в 5 статьях, опубликованных в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, базы данных Scopus и Web of Science. Автореферат как по своей структуре,

так и по сути изложения материала полностью соответствует обсуждению основных результатов, описанных в диссертации.

В целом, рецензируемая диссертационная работа производит благоприятное впечатление. Автор продемонстрировал компетенции в области физической химии. Диссертация выстроена логично и последовательно, написана хорошим языком.

Тем не менее, к представленной работе имеется ряд вопросов:

1. Почему в некоторых случаях на кривой денатурации отмечается один пик, а в других – два пика (см. напр. рис. 3.10 и 3.11)? Почему при понижении модельной константы связывания эти два пика словно бы коалесцируют?
2. Чем определяется естественная ширина пиков на ДСК-кривой? При моделировании ЯМР-спектров, например, важно учитывать времена релаксации. Нет ли и здесь некоего параметра, учет которого позволит точнее подогнать ширину и высоту расчетных пиков к экспериментальным кривым?
3. Почему бы не учесть дробные стехиометрические коэффициенты при моделировании взаимодействия малых молекул с белками?
4. Насколько корректно искать корреляции между логарифмическими величинами и нелогарифмическими? Например, между логарифмами констант равновесия и собственными значениями констант Гаммета (рис. 3.27)? Или логарифмами констант равновесия и изменениями энергии Гиббса (рис. 3.40-43)?
5. В случае использования множественных линейных регрессий, проводилась ли оценка нормальности распределения значений констант равновесия вокруг линии $y = x$? Каковы стандартные отклонения экспериментальных величин от расчетных (если распределения нормальны)? Информация о нормальности распределения и величина стандартного отклонения были бы не менее полезны при оценке качества корреляции, чем использованный коэффициент детерминации.

6. Можно ли применить уравнение Михаэлиса-Ментен для описания зависимости скорости образования фибрилл от концентрации лекарственных препаратов, подавляющих фибриллообразование?
7. Как ведет себя в спектрах кругового дихроизма пик в положительной области при 190 нм, характерный для бычьего сывороточного альбумина, при повышении концентрации лиганда?
8. Работа, в целом, написана хорошим языком и тщательно вычитана, но, тем не менее, в ней встречаются немногочисленные опечатки и неудачные выражения. Например, стр. 15 «Спектр флуоресценции альбумина зависит по большей части от сигнала триптофана [17], так как тирозин в трехмерной структуре белка сильно экранирован, его вклад в общий сигнал невелик.», стр. 21 в двух предложениях подряд стоят слова «с использованием» и «используемый», стр. 46 «...обзора ...состояния изучения связывания ...соединений», стр. 54 «...соединений, прежде всего клинически одобренных лекарственных препаратов...», стр. 56 «...при этом каждый... при этом были...», стр. 125 «...корреляция ($r^2=0,915$) начальной скорости фибриллообразования v_0 при 65 °С доли денатурированной формы альбумина...».

Высказанные вопросы и замечания *не носят критического характера*, не умаляют общего благоприятного впечатления от рецензируемой диссертации и призваны, скорее, прояснить некоторые моменты в работе, которые, в силу ограничений по ее объему, не получили достаточного освещения.

Заключение:

В рецензируемой научно-квалификационной работе на основании выполненных автором исследований реакций между сывороточными альбуминами и низкомолекулярными биологически активными соединениями *решена научная задача, имеющая важное значение для развития физической химии*. А именно, разработан надежный метод определения константы связывания органических лигандов с белками, впервые получен ряд констант равновесия потенциально полезных веществ с сывороточным альбумином, исследовано фибриллообразование альбуминов в присутствии нескольких лекарственных

препаратов, протестирован ряд QSAR моделей для прогнозирования констант связывания малых молекул с белками. Можно констатировать *соответствие рассматриваемой рукописи паспорту специальности 1.4.4. Физическая химия*, пп. 2 в части «Экспериментальное определение термодинамических свойств веществ, расчет термодинамических функций простых и сложных систем...», 4 в части «Теория растворов, межмолекулярные и межчастичные взаимодействия...», 9 «Связь реакционной способности реагентов с их строением...».

Диссертационная работа Хайбрахмановой Д.Р. «Термодинамика взаимодействий низкомолекулярных органических лигандов с альбумином» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая *полностью соответствует требованиям* пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Автор работы Хайбрахманова Диляра Раисовна *заслуживает* присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Отзыв составил:

Старший научный сотрудник

Кафедры общей химической технологии

ФГБОУ ВО «ИГХТУ»

Доктор химических наук

Гамов Георгий Александрович

(1.4.4. Физическая химия

1.4.1. Неорганическая химия)

Адрес:

Россия, 153000, г. Иваново,

пр. Шереметевский, д. 7

Тел.: +7(915)8218562

e-mail: ggamov@isuct.ru