

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Хайбрахмановой Диляры Раисовны  
«Термодинамика взаимодействия низкомолекулярных органических лигандов с альбумином», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Актуальность работы определяется как выбором объектов исследования, так и необходимостью развития экспериментальных и расчетных методов химической термодинамики для описания биохимических объектов.

Исследование и количественная характеристика процессов комплексообразования белков с лигандами необходимы для оценки степени связывания фармпрепаратов с компонентами плазмы, характеристики денатурационной и агрегационной устойчивости белков. Основной целью работы Хайбрахмановой Д.Р. является развитие методов исследования термодинамических характеристик процессов взаимодействий низкомолекулярных органических лигандов с сывороточным альбумином в растворе и установление корреляций «структура-свойство», позволяющих прогнозировать константы связывания органических лигандов с альбумином.

### **Научная новизна работы**

Если обобщить результаты работы, проделанной диссертантом, то следует подчеркнуть удачное сочетание экспериментальных исследований и расчетных работ, в ходе которых:

- 1) получены новые данные о влиянии органических лигандов с различной аффинностью на вид термограмм денатурации альбумина, значения температуры и энтальпии денатурации,
- 2) предложена новая методика определения констант связывания белков с лигандами с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии, разработано оригинальная программа для моделирования термограмм,
- 3) получены новые данные и уточнены некоторые существующие значения констант связывания с альбумином ряда анионов замещенных бензойных кислот,
- 4) выявлены корреляции «структура-свойство» для констант связывания низкомолекулярных органических соединений с альбумином.

На основе анализа и обобщения результатов проведенных исследований:

- 1) создана база данных, содержащая 1755 значений констант связывания для 324 низкомолекулярных органических лигандов с сывороточными альбуминами млекопитающих в растворе с указанием условий их определения,
- 2) впервые показано, что ингибирование роста фибрилл альбумина происходит только за счет связывания нативной формы белка с лигандами, которое приводит к смещению равновесия между нативной и денатурированной формами,
- 3) показана невозможность использования данных, полученных с помощью молеку-



- лярного докинга, для предсказания констант связывания с альбумином,
- 4) выявлено влияние значений констант связывания лигандов с альбумином на начальные скорости и выход фибриллообразования.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость диссертации заключается в разработке нового способа определения констант связывания с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии, установлении ранее неизвестных корреляций между структурой лигандов и аффинностью к альбумину. Автором диссертационной работы впервые изучен механизм подавления фибриллообразования альбумина в присутствии связывающихся с ним веществ, установлена связь между аффинностью, изменением степени денатурации альбумина и ингибированием фибриллообразования. Несомненную ценность с точки зрения систематизации информации и возможности получения новых фундаментальных знаний представляет созданная в рамках диссертационной работы база данных констант связывания органических лигандов с альбуминами млекопитающих.

Практическая значимость диссертации определяется возможностью применения разработанных методик измерения и прогнозирования констант взаимодействия альбумина с лигандами произвольной структуры при изучении констант связывания с другими белками, которые являются непосредственными мишенями лекарственных препаратов. Эти данные могут быть использованы для оценки доли связанного соединения в плазме крови, что необходимо при разработке новых лекарственных соединений. Изучение влияния природы и аффинности лигандов на подавление роста фибрилл белков важно для поиска антиамилоидных агентов для терапии нейродегенеративных заболеваний, лечение которых в настоящее время невозможно.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современной приборной базы и проведением серий параллельных экспериментов с получением воспроизводимых результатов. Комплексный подход к проведению эксперимента и обработке результатов, сопоставление полученных данных с имеющимися в литературе, интерпретация экспериментальных наблюдений с использованием теоретических основ физической химии определяют достоверность полученных результатов и обоснованность выводов, сделанных на их основе.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом**

Диссертационная работа Хайбрахмановой Д.Р. построена по классической схеме: состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 152 страницах, включает 62 рисунка и 4 таблицы. В диссертации процитировано 194 работы российских и зарубежных авторов; из них более 75% – ссылки на работы, опубликованные после 2000



года, что также можно рассматривать как свидетельство актуальности и востребованности тематики исследования.

Во введении диссертационной работы обоснована ее актуальность, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, перечислены основные положения, выносимые на защиту, даны общие сведения о методах исследования, личном вкладе автора и апробации работы.

В 1-й главе приведена информация о строении сывороточных альбуминов, охарактеризованы их центры связывания. Подробно описаны экспериментальные методы определения констант связывания, рассмотрены расчетно-теоретические методы их прогнозирования. На примере основных работ, в которых определялись константы связывания низкомолекулярных органических лигандов с альбумином, дан подробный анализ преимуществ и недостатков различных методов определения этих величин. В завершении главы сформулированы основные задачи исследования.

Во 2-й главе перечислены объекты исследования, химические реактивы для проведения эксперимента, а также использованная инструментальная база. Подробно описаны методики определения констант связывания методами дифференциальной сканирующей калориметрии и спектрофлуориметрии, а также исследования кинетики фибриллообразования альбумина. Сочетание взаимодополняющих термодинамических и кинетических подходов для решения поставленной задачи свидетельствует о высоком общем уровне физико-химической подготовки диссертанта.

В 3-й главе представлены полученные результаты и приведен их критический анализ.

Одним из наиболее ценных результатов экспертно-аналитической части диссертационной работы можно считать создание базы данных для 324-х веществ, в которой собраны сведения о ключевых характеристиках изучаемых систем: организме-источнике альбумина, SMILES и InChIKey лиганда, значениях констант связывания в молярной шкале, температуре, концентрации альбумина и лиганда, рН буфера, его составе и концентрации, экспериментальных методах и модельных представлениях, использованных при определении численных значений констант. Для пользователей базы, которая находится в открытом доступе, очень полезной информацией является также наличие DOI или ссылок на исходные статьи. Это очень важная часть работы, так как при изучении биохимических объектов традиционно определяются не термодинамические (истинные) константы равновесия, а кажущиеся (эффективные), значения которых зависят от коэффициентов активности реагентов и продуктов, в подавляющем большинстве случаев неизвестных. Это одна из основных причин колоссального разброса значений констант равновесия одних и тех же реакций комплексообразования в биохимических системах. Наличие такой подборки может быть очень полезным в будущем при разработке методов оценки коэффициентов активности в биохимических системах, что существенно повысит роль термодинамики при моделировании реальных «живых» систем.



Одно из центральных мест в работе занимает разработанный автором метод определения констант связывания органических лигандов с альбумином с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии. Метод ДСК очень удобен для решения многих физико-химических задач в силу своей экспрессности и доступности. Однако при его применении к термодинамическим оценкам всегда возникает ряд вопросов, связанных с динамическим режимом измерений. Суммарный тепловой эффект зависит от температуры и равновесного состава системы, который, в свою очередь, тоже является функцией температуры. Это приводит к возрастанию ошибок при вынужденных допущениях в расчетах, поэтому одно из пожеланий к автору работы – уделить этому вопросу в дальнейшем больше внимания. Наличие погрешностей у измеренных и рассчитанных величин на графиках рис. 3.14 – 3.23 сделало бы заключения автора более аргументированными.

В развитие экспериментальных методов определения констант связывания альбумина с органическими лигандами автором диссертации были также предложены некоторые изменения методики спектрофлуориметрических измерений, благодаря чему удалось повысить точность определения численных значений констант связывания замещенных бензойных кислот с альбумином.

Часть 3-й главы посвящена результатам построения корреляций типа «структура – свойство» для разработки полуэмпирических методов оценки констант связывания. На основании проведенных расчетов сделан вывод о невозможности использования данных, полученных с помощью молекулярного докинга, для предсказания констант связывания с альбумином. Несмотря на отрицательный результат, данная часть работы имеет несомненную ценность, как с точки зрения последующего исключения «тупиковых» направлений исследований, так и в качестве показателя уровня квалификации автора работы. Свободное владение современными экспериментальными и расчетными методами, несомненно, свидетельствует о высоком уровне подготовки диссертанта.

Термодинамическая часть работы дополнена опытами по изучению кинетики фибриллообразования альбумина в присутствии лигандов с разной аффинностью. Предложена возможная схема образования фибрилл из развернутой формы альбумина, равновесной с нативной формой, согласующаяся с результатами эксперимента. На основании полученных результатов определены основные факторы, снижающие выход фибрилл.

В Заключении перечислены основные результаты диссертационной работы. Выводы по результатам диссертационного исследования сформулированы как перспективы дальнейшей разработки темы.

#### **Подтверждение соответствия публикаций и автореферата основным положениям диссертации**

Оформление и содержание автореферата в полной мере соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. В автореферате диссертации изложены все основные положения представленного научного исследования. Автором обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы ее цель и задачи, научные поло-



жения, выносимые на защиту, научная новизна результатов, их практическая и теоретическая значимость, описана методология исследования.

Работа прошла достаточную апробацию; по теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 5 статей, входящих в международные научные базы Scopus и Web of Science, а также 7 тезисов на международных и российских конференциях.

### **Рекомендации по использованию результатов диссертации**

Результаты диссертационной работы Хайбрахмановой Д.Р. представляют практический интерес для разработки новых лекарственных соединений. Так, предложенные методы измерения и прогнозирования констант взаимодействия основного транспортного белка сыворотки крови – альбумина – с лигандами произвольной структуры могут быть непосредственно использованы при определении 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.

### **Вопросы и замечания по диссертационной работе**

Диссертационная работа Хайбрахмановой Д.Р. написана хорошим языком, логично построена, необходимость и последовательность всех этапов выполнения исследований четко аргументированы. Тем не менее при прочтении текста возникло несколько вопросов и замечаний:

- 1) было бы желательно приводить погрешности констант химических реакций, полученных всеми использованными в работе методами (например, для спектрофлуориметрии они есть, а для ДСК отсутствуют);
- 2) в тексте рукописи встречаются как размерные, так и безразмерные константы химических реакций, при этом из текста рукописи непонятно, можно ли безразмерные константы относить к истинным (термодинамическим), не имеющим размерности;
- 3) в списке литературы представлена только одна работа на русском языке, в этой связи возникает вопрос, занимаются ли аналогичными проблемами российские научные школы или только зарубежные исследовательские группы;
- 4) есть ряд замечаний по оформлению работы (в уравнениях, связывающих константу равновесия с термодинамическими функциями, следует не забывать указывать знак стандартного состояния; не на всех осях на графиках указаны размерности величин; есть стилистические неточности).

### **Заключение**

Указанные замечания не умаляют значимости выполненного диссертационного исследования. Диссертация Хайбрахмановой Диляры Раисовны представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой предложены новые экспериментальные и расчетные методики определения термодинамических и кинетических характе-

ристик процессов связывания белков с широким спектром лигандов, востребованные при разработке новых лекарств с заданной аффинностью к альбумину.

По своему содержанию, основным положениям, выносимым на защиту, и полученным научным результатам диссертация отвечает паспорту специальности 1.4.4. Физическая химия по направлениям исследований:

- п.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;

Диссертационная работа Хайбрахмановой Диляры Раисовны «Термодинамика взаимодействия низкомолекулярных органических лигандов с альбумином» по актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности результатов соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (ред. от 26.09.2022), а ее автор – Хайбрахманова Диляра Раисовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

**Официальный оппонент:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,  
кафедра физической химии  
Профессор, зав. НИИ химической термодинамики,  
доктор химических наук (специальность 02.00.04  
Физическая химия)

Успенская Ирина Александровна

9 февраля 2024 г.

Почтовый адрес 119991 г. Москва, ГСП-1, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3. Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, химический факультет, кафедра физической химии.

Телефон: +7 (495) 939-12-05. Адрес электронной почты: ira@td.chem.msu.ru