

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Шарикова Романа Викторовича

на тему: «Структурные превращения рекомбинантных белков спидроинов в условиях сдвиговых деформаций в различных растворителях при получении нановолокнистых нетканых материалов», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения

Нетканые полимерные материалы находят самое широкое применение в различных сферах жизни человека. В последнее время особый интерес вызывает их применение в регенеративной медицине и тканевой инженерии в качестве противоожоговых покрытий, каркасов для роста клеток, а также систем доставки лекарств. Очевидно, что такие полимеры должны быть нетоксичными и биосовместимыми, а морфология материала и его физико-механические свойства, должны быть максимально приближены к характеристикам нативной ткани (внеклеточного матрикса).

Одними из перспективных полимеров для такого применения являются биополимеры, в частности белки паутины – спидроины. Материалы на их основе одновременно обладают высокой прочностью и эластичностью благодаря молекулярной структуре пептидной цепи. Выделение спидроина из природной паутины представляет собой очень сложную задачу, поэтому активно используются методы генной инженерии для получения рекомбинантных белков, что дает возможность тонко регулировать физико-химические свойства материалов.

Для создания нетканых материалов с большой удельной поверхностью широко используется метод электроформования. Благодаря возможности варьирования технологических параметров (напряжение, расход, расстояние между капилляром и осадительным электродом) можно получать материалы с различной толщиной волокна и пористостью. Очевидно, что кроме параметров формования важную роль играют реологические свойства полимерных растворов, а также природа растворителя. Вместе с тем, электроформование спидроинов является чрезвычайно сложным и малоизученным процессом,

поскольку белок претерпевает структурные изменения на всех стадиях процесса, включая приготовление растворов. Этим определяется актуальность и научная новизна исследований (как с теоретической, так и с практической точки зрения), выполненных в диссертационной работе Р.В. Шарикова.

В представленной кандидатской диссертация Шарикова Р.В. проведено систематическое исследование структурных превращений рекомбинантных белков спидроинов разного состава в различных средах в условиях внешних воздействий и, на основе полученных данных, приготовлены нетканые материалы биомедицинского назначения.

В процессе работы диссертант выполнил обширное исследование структурных свойств таких объектов, как рекомбинантные белки (спидроины rS1/9 и rS2/12) на различных стадиях выделения и очистки, том числе под действием сдвиговых деформаций, в различных растворителях, а также нетканые материалы на основе рекомбинантных спидроинов. Определены оптимальные условия электроформования для получения нетканых материалов.

Научная и практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнений. Необходимо отметить большой объем проведенной экспериментальной работы, при этом сложность поставленных перед диссертантом задач потребовала от автора профессионализма и применения междисциплинарных знаний. Особо отмечу чрезвычайно широкий спектр современного научного оборудования, который использован в работе. Это дополнительно обосновывает достоверность полученных результатов и научную обоснованность сделанных в работе выводов. В результате работы обнаружены и интерпретированы структурные превращения рекомбинантных белков rS1/9 и rS2/12, начиная от стадии выделения и до получения материалов на их основе. Полученные результаты вносят большой вклад в понимание структурных реорганизаций природных полимеров (на примере спидроинов) в процессе создания нетканых материалов биомедицинского назначения.

Диссертационная работа Шарикова Р.В. состоит из введения (где автор формулирует цель и задачи работы), трех глав (литературный обзор

исследуемой области, экспериментальную часть и обсуждение результатов), заключения и выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы (132 источника), списка публикаций по теме диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах, содержит 73 рисунок и 9 таблиц.

Во введении автор обозначает актуальность, новизну и научно-практическую значимость исследования, формулирует цели и задачи работы.

В литературном обзоре диссертант описывает применение полимерных материалов в тканевой инженерии, выделяет преимущества использования природных полимеров и приводит всесторонний анализ получения, структуры, свойств и влияния различных внешних параметров на такие полимеры как фиброин и спидроин. Особое внимание уделено структурному анализу и процессам реорганизации белков в растворенной форме под влиянием различных внешних условий. Отдельно описывается процесс электроформования, с указанием ключевых параметров, влияющих на получение нетканых материалов. Проведен анализ работ, посвященный получению волокнистых матриц на основе спидроина. В главе также существенное внимание уделено структурным характеристикам волокнистых материалов и способам их регулирования. Литературный обзор изложен хорошо и логично подводит к следующим главам диссертации.

В экспериментальной части подробно представлены методики синтеза рекомбинантных спидроинов rS1/9 и rS2/12. Подробно описаны этапы выделения и очистки белков, приведены список реагентов и растворителей, указаны волокнообразующие добавки, необходимые для электропрядения нетканых материалов. Описаны методики изготовления пленочных и нетканых материалов. К очевидным достоинствам экспериментальной части работы Шарикова Р.В. необходимо отнести квалифицированное применение чрезвычайно широкого набора различных современных физико-химических методов исследования. В частности, в работе использованы методы динамического и статического светорассеяния, электрокинетического потенциала, УФ-спектроскопии, атомно-силовая микроскопия,

просвечивающая, сканирующая электронная и криоэлектронная микроскопия, ИК-спектроскопия и рентгеновское рассеяние, а также механические испытания индивидуальных волокон.

Основное содержание диссертации приведено в главе «Результаты и обсуждения», которая включает в себя три раздела. Результаты, излагаемые в этой главе, рассматриваются в такой же последовательности, как и поставленные задачи исследования в работе. Первый раздел посвящен структурным превращениям рекомбинантных белков в процессе их выделения. Автором четко показано, что у белков rS1/9 и rS2/12 по-разному происходят структурные превращения: rS1/9 проявляет склонность к самоорганизации в фибриллярные структуры, что сказывается на более раннем появлении неньютоновского поведения растворов на его основе. Во втором разделе представлены результаты, которые характеризуют структурные перестройки изучаемых рекомбинантных спидроинов в различных средах и более высоких концентрациях. Установлено, что высокие сдвиговые деформации и скорости сдвига приводят к изменению надмолекулярной структуры и, как следствие, к фибриллообразованию в водных растворах муравьиной кислоты. Важно отметить, что в другом растворителе (гексафторизопропанол) во всем диапазоне исследуемых концентраций (до 100 мг/мл) хотя и наблюдался рост размеров агрегатов с увеличением концентрации, но он не приводил к образованию межмолекулярной сетки зацеплений и изменению общего поведения растворов. Заключительный раздел главы посвящен подробному изучению процесса формирования материалов на основе исследуемых белков и изучению их структуры. Особенно стоит выделить что в работе получены нетканые волокнистые материалы из водной среды, что на сегодняшний момент является нетривиальной задачей. Исследование надмолекулярной структуры в материалах из белковых систем является достаточно сложным. Однако в работе удалось, с использованием комплекса методов, продемонстрировать зависимость конформационного состава от метода получения материала и типа используемого растворителя. Это позволяет в

дальнейшем спрогнозировать свойства конечного материала. Особо отмечу эксперименты по изучению механических свойств индивидуальных волокон рекомбинантных спидроинов. Полученные результаты свидетельствуют о сложных структурных перестройках, как на молекулярном, так и надмолекулярном уровне. Результаты проведенных исследований в диссертационной работе Шарикова Р.В. несомненно вносят существенный вклад в вопросы получения материалов с регулируемыми свойствами.

Раздел «Заключение» логично завершает диссертационную работу. В нем кратко сформулированы основные результаты проделанной работы.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в российских и международных базах данных (РИНЦ, Web of Science, Scopus). Также результаты представлены на 13 международных и всероссийских конференциях.

При прочтении работы у меня возник ряд вопросов и замечаний:

1. Фраза на стр. 61 (4-5 строка снизу), по-видимому, содержит опечатку.
2. На стр. 63 (методика) и далее в диссертации динамическое рассеяние света измерено (или обсуждается) только на одном угле – 90 градусов. При изучении сложных многокомпонентных систем, содержащих агрегаты и иные крупные образования, важно убедиться, что все пики на распределениях интенсивности рассеянного света носят диффузионный характер. Это делают, снимая угловые зависимости. Однако, в диссертации я не нашел сведений о том, что такие измерения выполнены (обработаны). Это довольно странно, учитывая, что в диссертации приведены диаграммы Зимма (а значит, данные по рассеянию на разных углах у автора имелись).
3. На стр. 81-82 приведены результаты структурных изменений белков в процессе их выделения методом динамического светорассеяния. При этом, размеры частиц, приведенные на рисунках 38, очевидно, получены с использованием уравнения Стокса для шариков. На сколько это правомерно, принимая во внимание, что в растворе могут присутствовать

частицы абсолютно другой формы (например, фибриллы), существенно отличающиеся по форме от сферических?

4. На стр. 100-101 указывается, что переход от гексафторизопропанола к 2% раствору муравьиной кислоты приводит к увеличению гидродинамического радиуса от 3-4 нм до 10 нм. И проводится оценка числа молекул $rS2/12$ в агрегате по данным статического светорассеяния. Вместе с тем, распределения интенсивности света в обоих растворителях носят двухмодульный характер. Хорошо известно, что наличие высокомолекулярной фракции приводит к искажению данных статического рассеяния света. Учитывалось ли это обстоятельство при проведении оценок ММ полимеров и их агрегатов. Кстати, агрегационное число можно оценить и из гидродинамического радиуса. Тогда для $rS2/12$ оно составит порядка 20 (а не 10) в муравьиной кислоте. Любопытно, что и для $rS1/9$ оно получится точно таким же. Такая оценка представляется более обоснованной.

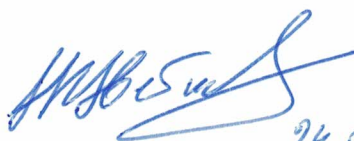
Указанные замечания не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой работы. Диссертация является законченным исследованием, обладает научной новизной и большим потенциалом, как для дальнейших фундаментальных исследований, так и для практического применения.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения. Диссертационная работа Шарикова Р.В. на тему: «Структурные превращения рекомбинантных белков спидроинов в условиях сдвиговых деформаций в различных растворителях при получении нановолокнистых нетканых материалов» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, изложенным в пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 в действующей редакции), а её автор, Шариков Роман Викторович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата

физико-математических наук по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук,
профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий кафедрой молекулярной
биофизики и физики полимеров
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет»



24.09.2024

Цветков Николай Викторович

Контактные данные:

Тел.: +79119101285

e-mail: n.tsvetkov@spbu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
01.04.14 – Теплофизика и молекулярная физика (физико-математические науки)

Адрес места работы:

Российская Федерация, 198504, г. Санкт-Петербург, г. Петродворец, ул.
Ульяновская, д. 1

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,
Физический факультет



Личную подпись
Н.В. Цветков
заверяю
И.О. начальника отдела кадров
И.И. Константинова

24.09.2024

Текст документа размещен
в открытом доступе
на сайте СПбГУ по адресу
<http://spbu.ru/science/expert.html>

Документ подготовлен
в порядке исполнения
трудовых обязанностей