

Отзыв

официального оппонента Молчанова Вячеслава Сергеевича на диссертацию Шарикова Романа Викторовича «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.

В работе Р.В. Шарикова проведено систематическое исследование структуры и свойств двух рекомбинантных белков спидроинов (РС) и их агрегации в разных растворителях и при сдвиговых деформациях, получены и исследованы волокна и нетканые материалы, перспективные для применения в биомедицинских приложениях.

Нетканые полимерные материалы имеют широкое практическое применение в качестве изоляционных и фильтрующих материалов в различных областях: в медицине, атомной промышленности, энергетике. Активно развивающимся современным направлением применения нетканых биосовместимых материалов на основе синтетических полимеров, является медицина. Такие материалы используются в качестве повязок для лечения ран и ожогов. В связи с проблемой загрязнения планеты полимерным мусором, фокус научных исследований смещается в сторону экологичных материалов: биоразлагаемых и биосовместимых. Поэтому особый интерес представляют природные полимеры полисахариды и белки, например, коллаген, фиброин шелка, эластин и спидроины – белки паутины. Но создание волокон из таких полимеров, например, электроформованием, является сложным технологическим процессом, сильно зависящим от структуры и свойств растворов полимеров. Данная тема остается плохо изученной для целого ряда перспективных полимеров и белков. Одним из таких экологичных перспективных биоматериалов, но малоизученным, являются белки паутины пауков – спидроины. Поэтому работа Р.В. Шарикова **соответствует современным вызовам** науки о полимерах.

Волокна на основе природных белков спидроинов хорошо известны своими уникальными механическими свойствами, сочетающими высокую эластичность и прочность. При этом в настоящее время выделение нативных белков из природного сырья является сложным и дорогостоящим процессом, что сильно затрудняет исследование их фундаментальных свойств и развитие областей применения.

Одновременно развивается альтернативный путь решения задачи – методики синтеза рекомбинантных спидроинов с помощью технологии клонирования рекомбинантной ДНК в клетках дрожжей, бактерий, растений и животных, за которой следует множество этапов экстракции и очистки белка. Поэтому работа Р.В. Шарикова, посвященная исследованию рекомбинантных белков спидроинов, полученных из биомассы дрожжей, получению волокон и нетканых материалов на их основе, имеет **высокую научную и практическую значимость.**

Выбор основных объектов исследований **стоит отнести к несомненным достоинствам данной работы.** Рекомбинантные белки спидроинов rS1/9 и rS2/12 (где «г» - рекомбинантный, «S» - спидроин, 1 и 2 – тип белка, 9 и 12 – количество повторов мономера в белке) являются аналогами нативных MaSp1 и MaSp2 спидроинов, основных белков паутины, которые формируют ее каркасную нить, обладающую рекордными механическими свойствами и, поэтому являющиеся объектом исследований в литературе. MaSp1 содержит длинные полиаланиновые блоки, которые складываются в β -листы с образованием системы обширных водородных связей, и при формировании нитей способны собираться в кристаллические области, обеспечивающие их прочностные свойства. Глициновые участки MaSp2 формируют аморфную матрицу, представленную α -спиралями, неориентированной структурой и β -поворотами, придающую эластичность волокнам паутины. Смесь данных белков в нативной паутине обеспечивают комбинацию этих практически важных свойств. Поэтому исследование аналогов нативных белков паутины MaSp1 и MaSp2 рекомбинантных спидроинов (PC) rS1/9 и rS2/12 и получение нановолокнистых нетканых материалов из них является **актуальной перспективной задачей.**

Работа имеет классическую структуру. Во введении описана актуальность работы, кратко степень разработанности темы, сформулирована цель и задачи, новизна, научная и практическая значимость, кратко методология и методы исследования, личный вклад автора, основные положения и результаты, выносимые на защиту, обоснование достоверности полученных результатов, апробация работы, указана структура и объем диссертации. Литературный обзор написан достаточно подробно и охватывает работы последних лет российских и зарубежных авторов в данной области. Обзор включает описание основных современных материалов для биомедицины, включая ряд природных полимеров и фиброина шелка. Современным исследованиям спидроинов посвящена значительная часть обзора, включающая нативные и рекомбинантные спидроины, описание их структуры и особенностям образования фибрилл и описание технологии создания материалов из них. В

экспериментальной части автор подробно описывает процессы выделения и очистки белков спидроинов и выделение фиброина шелка, волокна которого используются для сравнительного анализа свойств, так как они являются основным научным конкурентом для волокон спидроинов. Автор описывает методы анализа свойств и структуры объектов, изучаемых в работе, и основные принципы проведения измерений и анализа экспериментальных данных. Далее представлена глава, посвященная описанию полученных результатов, их анализу и сравнению с литературой. В конце работы заключение, выводы, список литературы и список публикации по теме диссертационного исследования.

На первом этапе исследования автор исследовал особенности реологического поведения и структуры РС rS1/9 и rS2/12 на разных этапах выделения, перерастворения и очистки. Автор обнаружил образование жидкостей с пределом текучести и упругими свойствами при малых гармонических деформациях за счет образования пространственной сетки фибрилл на конечных этапах выделения и очистки белков. Показано, что РС rS1/9 образует фибриллы микронной длины в ацетатном буфере после стадии финальной очистки на ионообменной хроматографической колонке, а РС rS2/12 образует фибриллы, причем более короткие на следующей стадии после лиофилизации и приготовления водных растворов, что указывает на более высокую склонность к образованию фибрилл именно первого РС rS1/9, что согласуется с литературными данными для нативных аналогов белков.

Далее было проведено исследование РС обоих типов в хороших растворителях – гексафторизопропанол (ГФИП) и 2 и 5% водных растворах муравьиной кислоты (МК). Показано, что в растворах обоих РС в ГФИП не образуются сетки фибрилл. РС rS1/9 в растворах МК образует сетку фибрилл с пределом текучести и упругими свойствами при малых воздействиях уже при концентрации 3 мг/мл. Обнаружено, что раствор РС rS2/12 3 мг/мл в 5%-ной МК после сдвиговых воздействий до 1000 с^{-1} при повторном исследовании обладает пределом текучести, т.е. происходит образование фибрилл под действием деформации сдвига. При этом в аналогичном эксперименте с РС rS1/9 предел текучести увеличивается, т.е. исходные фибриллы становятся длиннее. Таким образом обнаружено, что РС rS1/9 образует фибриллы в растворах муравьиной кислоты даже без воздействия деформации, а РС rS2/12 только в условиях высоких сдвиговых деформаций. Данные реологических исследований были подтверждены изображениями криогенной электронной микроскопии до и после воздействия деформации сдвига. Данные микроскопии методами АСМ и ПЭМ растворов белков rS1/9 и rS2/12 в чистом ГФИП подтвердили предположение о том,

что в данном растворителе белки находятся преимущественно в мицеллоподобном состоянии сферических агрегатов. Таким образом, автор предположил, что в более гидрофобном растворителе происходит образованию внутривептидных водородных связей, стабилизирующих спиральную конформацию белка, и способствующих образованию сферических агрегатов. В более гидрофильном растворителе возрастает влияние взаимодействия между гидрофобными блоками, что, способствует формированию фибрилл. **Таким образом впервые получены закономерности влияния растворителя и сдвиговых воздействий на процесс образование фибрилл двух типов рекомбинантных белков спидроина rS1/9, rS2/12.**

Отдельно хотелось бы выделить то, что автор удачно использовал комбинацию реологических исследований и микроскопии для однозначного подтверждения структурных превращений РС в зависимости от состава растворителя и сдвиговых деформаций для выявления влияния структуры белков спидроинов на образование ими фибрилл. Более того, методами ДРС и СРС и МУРР были исследованы РС в растворах и получена важная информация о структуре белков и их агрегатов.

Эти результаты стали основой для приготовления прядильных растворов для создания волокон РС методом электроформования и нетканых материалов из них. **Одним из наиболее важных результатов работы Шарикова Р.В.** стало создание волокон на основе растворов белков rS1/9 и rS2/12 и нетканых материалов из них. Сначала были получены волокна и нетканые материалы из растворов ГФИП. Были проанализированы размеры, удельная площадь поверхности волокон и пористость полученного материала. Пористость полученных материалов составляла $84,0 \pm 1,5 \%$, а средний размер пор находился в диапазоне от 0,4 до 0,7 мкм. Высокая пористость нетканых материалов благоприятна для адгезии клеточных культур и лучшему их распределению по всему объему материала. **Важно отметить**, что были получены нетканые материалы из волокон с низкой дефектностью из более экологичных водных растворов белков rS1/9 и rS2/12 с волокнообразующей добавкой полиэтиленоксида, что важно для производства биомедицинских материалов. **Таким образом работа отличается новизной и имеет высокую практической значимость.**

Методом ИК было показано, что при получении волокон из водных растворов и обработке этанолом волокнистых материалов, полученных из растворов ГФИП, доля содержания вторичных структур в виде β -листов увеличивается вплоть до 40 %, в то время как доля содержания α -спиралей значительно снижается. Повышение кристалличности при увеличении содержания β -листов было показано методом широкоугольного рентгеновского рассеяния. Обнаружено, что кристаллические

структуры β -листов располагаются преимущественно вдоль волокна. Согласно литературе, это обычно способствует росту механических свойств материалов.

Были исследованы закономерности изменения модуля на изгиб для волокон разного диаметра на основе PC rS1/9 и rS2/12 и проведено сравнение с результатами для волокон фибрина шелка. По мере уменьшения диаметра ниже критического размера происходило резкое увеличение значения модуля на изгиб, что согласуется с литературными данными и наблюдалось для обоих типов волокон (из фибрина, и PC). Выше критического диаметра 500 нм для волокон из PC rS1/9 модуль на изгиб был постоянен $4,8 \pm 1,3$ ГПа и сравним с модулем волокон фибрина шелка. При меньших диаметрах модуль на изгиб быстро увеличивался для обоих спидроинов, достигая значения 60-80 ГПа. Для второго белка rS2/12 получились более тонкие волокна, но значения модуля на изгиб сопоставимы с волокнами PC rS1/9.

В главе результаты и обсуждение **Р.В. Шариков** проводит сравнение полученных результатов с литературными данными. Экспериментальные данные получены с использованием современного высокоточного оборудования. Это позволяет достоверно описать получаемые закономерности и сделать обоснованные выводы.

В работе можно выделить ряд недостатков и замечаний.

1. На стр. 76 автор описывает амплитудные зависимости модуля потерь на рис.34 и делает вывод, что «в этом интервале деформаций растворы ведут себя как ньютоновские жидкости». Но данные зависимости на это не указывают. На это указывают зависимости вязкости от скорости сдвига на рис. 36.

2. Стр.77. На основе частотных зависимости модулей накопления и потерь на рис.35 для «исходного раствора» автор делает вывод, что это структурированная жидкость, но данные на рис.36 и 37 это опровергают. В итоге в конце главы автор все-таки не относит данный раствор к ряду растворов с пространственной сеткой зацеплений.

3. Стр. 88. Автор пишет «Увеличение концентрации PC rS2/12 в растворе 5%-ой МК приводит к появлению модуля накоплений, свидетельствующего об образовании сетки зацеплений (рис. 42д).» Концентрация 11 мг/мл. При этом на том же графике показано, что при концентрации 3 мг/мл белок в растворе 5%-ой МК не образует сетки зацеплений, а на рис.47в) показано образование только сферических агрегатов до сдвигового воздействия. Возникает вопрос образуются ли фибриллы при увеличении концентрации rS2/12 в растворе 5%-ой МК без воздействия сдвиговых деформаций?

4. Из текста диссертации складывается впечатление, что образование фибрилл в растворах при воздействии сдвиговой деформации необратимо. Если это так, то почему? В тексте не очень четко сформулировано какие межмолекулярные взаимодействия обеспечивают агрегацию РС в форме фибрилл в водных растворах.

5. В тексте есть ряд опечаток и неточностей. Стр. 111 Рис.58б не отличается от рис.58а. Стр. 124 на рис.70 нет обозначения оси ординат.

Отмеченные замечания и недостатки не снижают научную значимость выполненной работы, так как не влияют на основные результаты и выводы. Диссертационная работа Р.В. Шарикова несомненно заслуживает общей высокой оценки, а разработанные методики создания нетканых материалов из волокон РС имеют большие перспективы практического использования.

Таким образом, можно заключить, что диссертация Романа Викторовича Шарикова «Структурные превращения рекомбинантных белков спидроинов в условиях сдвиговых деформаций в различных растворителях при получении нановолокнистых нетканых материалов», удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, обозначенным в н.п. 9-14 положения ВАК «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. в действующей редакции, и является научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления закономерностей самоорганизации рекомбинантных белков спидроинов в растворах и получения из них волокон и нетканых материалов, а ее автор Роман Викторович Шариков, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Официальный оппонент – Молчанов Вячеслав Сергеевич,
кандидат физико-математических наук (специальность 02.00.06 –
высокомолекулярные соединения), доцент кафедры физики полимеров и кристаллов
физического факультета федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы д.1, кор.2

Телефон: +74959391464

e-mail: molchan@polly.phys.msu.ru


_____/Вячеслав Сергеевич Молчанов/

Дата: 26.09.2024

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Физический факультет

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы д.1 кор.2

Тел. +7(495)939-31-60

подпись В.С. Молчанова удостоверяю,

И.о. декана физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

профессор

/В.В. Белокуров/

Дата: 24.09.2024

М.П.

