

ОТЗЫВ

об автореферате диссертации Шарикова Романа Викторовича «Структурные превращения рекомбинантных белков спидроинов в условиях сдвиговых деформаций в различных растворителях при получении нановолокнистых нетканых материалов», представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Диссертационная работа Р.В. Шарикова является актуальной и важной, поскольку она направлена на разработку усовершенствованного метода получения более эффективных нановолокнистых нетканых материалов на основе биосовместимых гидрофильных белков – спидроинов, входящих в состав паутины, для создания перспективных матриц в биомедицине, в том числе в регенеративной медицине для лечения ран и ожогов.

Известно, что паутина является одним из наиболее интересных природных биоматериалов, способных образовывать ориентированные волокна с уникальным сочетанием физико-механических характеристик – очень высокую механическую прочность в предельно растянутом состоянии и высокую эластичность в исходном состоянии.

Каркас нити паутины формируют в основном белки MaSp1 и MaSp2, которые склонны к формированию надмолекулярных образований путем самосборки в виде мицелл. В сдвиговых полях из мицелл формируются более совершенные и однородные образования – нанофибриллы с уникальными физико-механическими характеристиками. Имеются зарубежные публикации, описывающие способы получения высококачественных волокон на основе белков природной паутины, которые, естественно, трудоемкие, малопроизводительные, а продукция – дорогостоящая.

Поэтому большое внимание уделяется поиску различных методов получения рекомбинантных спидроинов (РС). Генно-инженерные методы позволяют управлять составом белковой молекулы, что открывает возможности регулировать физико-механические свойства изделий на их основе, а также биосовместимость и сродство к различным клеткам. В настоящее время – это ключевой фактор в получении нановолокнистых нетканых материалов с регулируемой структурой и свойствами.

В диссертационной работе Р.В. Шарикова предложен метод выделения и очистки из биомассы дрожжей *S.cerevisiae* белков rS1/9 (I) и rS2/12 (II) с молекулярными массами

94 и 113 kDa, причем каждый мономер белков содержал 4 или 5 первичных повторов, соответственно.

Для выявления взаимосвязей структура – свойства на всех этапах исследований применялся комплекс современных методов, включая светорассеяние, сканирующую и просвечивающую электронную микроскопию, атомно-силовую микроскопию, ИК- и УФ спектроскопию, рентгеновскую дифракцию в больших и малых углах, реологические исследования растворов и др.

Реологические исследования показали, что «водные растворы» РС rS1/9 (РС I) и rS2/12 (РС II) обладают пределом текучести, что позволяет говорить о трехмерной физической сетки зацеплений, образование которой Р.В. Шариков связывает с возникновением надмолекулярных фибриллярных структур.

Интересными представляются результаты ПЭМ исследования самоорганизации белков различного аминокислотного состава на разных этапах их выделения - в упруго-вязких «водных растворах» обоих белков формируются нанофибриллы диаметром около 10 нм, причем нанофибриллы в I имеют гораздо большее характеристическое отношение - их длина может достигать нескольких мкм, тогда как во II длина лежит в пределах от 50 до 200 нм.

Методом АСМ обнаружено, на характер самоорганизации существенно влияет степень очистки белков, химическая природа растворителя и прилагаемые сдвиговые деформации, что, естественно, необходимо учитывать при осуществлении практического метода производства нановолокнистых нетканых материалов.

Р.В. Шариков провел очень детальные исследования характера самоорганизации выделенных белков I и II в зависимости от химической природы двух «хороших» растворителей: 1) гексафторизопропанол (ГФИП) – сильный полярный растворитель, способный растворять фибриллярные белки, при этом формируется спиральная конформация молекул белков в растворе и 2) муравьиная кислота (МК), которую для предотвращения деградации белков применяют в виде разбавленных водных растворов.

На Рис.13 автореферата приведены детальные обобщенные схемы перестроек надмолекулярных образований выделенных белков в этих двух растворителях в зависимости от концентрации растворов и под влиянием сдвиговых напряжений. Показано, что в ГФИП оба РС при низких концентрациях находятся в виде индивидуальных макромолекул со спиральной конформацией. Увеличение концентрации

РС приводит к их агрегации и увеличению размеров частиц. В 2% водном растворе МК РС II даже в разбавленном растворе формирует сферические агрегаты. При этом РС I в таких же условиях наряду со сферическими агрегатами формирует фибриллярные структуры. Очень важно, что приложение сдвиговых напряжений к растворам РС в МК приводит к полной реорганизации структуры белков в нанофибриллы.

Большое внимание Р.В. Шариков уделил применению специфического метода электроформования из раствора для получения ориентированных волокон для нетканых материалов из РС I и РС II из растворов в ГФИП и водных растворах МК.

Представленные в автореферате СЭМ снимки показывают, что этим методом можно получить нановолокна с широким распределением диаметров около 190 ± 80 нм и большим содержанием пор (до 84%) со средними их размерами от 0,4 до 0,7 мкм. Подобные волокно хорошо подходят для производства био-активных перевязочных материалов, не содержащих токсичных органических растворителей.

Определены оптимальные условия электроформования. Найдено, что использование в качестве растворителя ГФИП позволяет получать цилиндрические волокна без использования в растворах дополнительных полимерных волокнообразующих добавок, тогда как в случае электроформования из водных растворов МК такие добавки необходимы.

Методом ИКС в полученных нановолокнах и пленках на основе РС I и РС II выявлено наличие различных локальных вторичных структур из белковых молекул (β -повороты, β -листы, неориентированные структуры и т.п.), количество которых зависит от степени очистки РС и определяет физико-механические свойства материалов. Методом ИКС и рентгеновской дифракции выявлено анизотропное расположение молекул РС вдоль оси нанофибрилл.

Следует отметить интересный результат, полученный при использовании АСМ микроскопии для нестандартного определения модуля изгиба очень тонких ориентированных нановолокон РС I и РС II с диаметрами от 100 до 800 нм. Выявлен размерный эффект, а именно, резко многократное (вплоть до 10 раз и более) увеличение модуля изгиба нановолокон с диаметрами ниже некоторого порогового значения около 300 нм по сравнению с образцами с диаметрами выше 400-500 нм, вплоть до макроскопических.

Серьезных недостатков диссертационная работа Р.В. Шарикова не содержит, она выполнена на высоком методическом, экспериментальном и аналитическом уровне. Работу следует считать завершенной в рамках поставленных задач. Основные результаты работы отражены в 4-х публикациях в высоко рейтинговых отечественных и зарубежных научных журналах и были представлены на 13 отечественных и зарубежных научных конференциях.

По объему выполненных исследований, своей актуальности, научной новизне и практической значимости диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции) и паспорту специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, автор диссертации, Шариков Роман Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Ведущий научный сотрудник
доктор физико-математических наук
по специальности 01.04.07 – Физика твердого тела.

В.А. Марихин



ФГБУН Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН
194021, г. С.-Петербург, Политехническая ул., д. 26
Тел: +7 981 749 4151
e-mail: v.marikhin@mail.ioffe.ru

09.10.2024 г.



Подпись Марихина В.А. удостоверяю
зав. отделом кадров ФТИ им. А.Ф. Иоффе

В.А. Н.С. Буценок

09.10.2024г.