

На правах рукописи

Шариков Роман Викторович

**СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ СПИДРОИНОВ В
УСЛОВИЯХ СДВИГОВЫХ ДЕФОРМАЦИЙ В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ ПРИ
ПОЛУЧЕНИИ НАНОВОЛОКНИСТЫХ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель: **Чвалун Сергей Николаевич**
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Отдела нанобиоматериалов и структур Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва

Официальные оппоненты: **Цветков Николай Викторович**
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», г. Санкт-Петербург.

Молчанов Вячеслав Сергеевич
кандидат физико-математических наук, доцент кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва.

Защита диссертации состоится 15 октября 2024 г., начало в 11:00 часов, на заседании диссертационного совета 24.1.161.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 28, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН и на сайте <https://ineos.ac.ru/>.

Автореферат разослан «__»_____2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.161.02
кандидат химических наук

Беломоина Н.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Нетканые полимерные и композиционные материалы находят широкое применение в различных областях экономики: в машиностроении, атомной промышленности, энергетике и других отраслях. Их используют в качестве изоляционных и фильтрующих материалов. Последнее время нетканые биосовместимые материалы на основе синтетических полимеров получили распространение в медицине в качестве повязок для лечения ран и ожогов. Особый интерес в этом аспекте представляют природные полимеры: полисахариды (производные целлюлозы и хитина) и белки (коллаген, фиброин шелка, эластин и спидроины). Тем не менее, электроформование природных полимеров является сложным технологическим процессом, зависящим, прежде всего, от структуры и свойств их растворов. Оптимизация параметров этого процесса является важнейшей задачей, которая по-прежнему далека от своего окончательного решения.

Одними из перспективных биоматериалов являются белки паутины – спидроины. В зависимости от аминокислотного состава спидроина материалы на его основе обладают уникальными механическими характеристиками, например, сочетанием высокой прочности и эластичности. Самыми изученными белками паутины являются MaSp1 и MaSp2, которые формируют ее каркасную нить. Белки имеют гидрофильные терминальные N- и C- участки и более гидрофобную повторяющуюся структуру, которые позволяют им собираться в компактные мицеллы внутри прядильной железы. Мицеллярная структура позволяет достигать концентрации белка в железах паука до 50 вес. %. Выделение нативных белков из природного сырья – технологически сложный и дорогостоящий процесс, поэтому в настоящее время активно развиваются различные методы синтеза рекомбинантных спидроинов (РС). Использование генно-инженерных методов позволяет управлять составом белковой молекулы, и регулировать не только физико-механические свойства изделий на их основе, но и биосовместимость, а также их родство к различным клеткам. Поэтому такие материалы перспективны в качестве матриц в биомедицине, в том числе в регенеративной медицине.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на большое количество исследований различных спидроинов, остается открытым вопрос о получении на их основе материалов с контролируемыми параметрами, приближенными по своим физико-механическим свойствам к природной паутине. Любые рекомбинантные аналоги отличаются по своему аминокислотному составу, поэтому стоит ожидать различий в свойствах полученных на их основе волокон. Исследуемые РС не содержат гидрофильных N- и C- концов и представляют собой многократно повторяющуюся последовательность мономерных звеньев, являющихся ключевыми в структурообразовании природных белков. В настоящее время отсутствует систематический подход к получению РС и изучению влияния надмолекулярной организации в растворах на свойства получаемых

материалов на их основе. Поэтому исследование механизма этих превращений является ключевым фактором для получения нановолокнистых нетканых материалов с регулируемой структурой и свойствами.

Целью работы является исследование структурных превращений рекомбинантных белков спидроинов разного состава в различных средах в условиях внешних воздействий для разработки методов получения нетканых материалов биомедицинского назначения.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- Исследовать реологическое поведение растворов РС в различных растворителях;
- Исследовать структурные превращения РС на разных стадиях формирования материала – переход от мицеллоподобной к фибриллярной структуре методами инфракрасной спектроскопии, рентгеновского рассеяния в больших и малых углах, атомно-силовой, просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии;
- Получить нетканые материалы методом электроформования на основе РС;
- Исследовать физико-механические свойства полученных материалов.

Научная новизна

- Установлено, что на стадиях выделения и очистки РС rS1/9 и rS2/12 происходят структурные превращения белков, а именно, переход от мицеллоподобной в фибриллярную форму. Этап выделения и очистки РС, на котором реализуется этот переход, определяется аминокислотным составом белка.
- Впервые установлено, что в водных растворах муравьиной кислоты сдвиговые деформации приводят к реорганизации структуры РС rS1/9 и rS2/12. Внешнее воздействие на раствор РС rS2/12 способствует формированию фибриллярных структур и появлению предела текучести, тогда как внешнее воздействие на раствор РС rS1/9 приводит к росту его предела текучести в 2,5 раза.
- Впервые показано, что содержание вторичных структур типа β -листов в пленочных и нетканых материалах на основе РС зависит от типа растворителя и больше при использовании в качестве растворителя водного раствора муравьиной кислоты, по сравнению с гексафторизопропанолом. Установлено, что их последующая обработка этиловым спиртом позволяет увеличить долю β -листов более чем на 10%.
- Определены оптимальные условия электроформования нетканых волокнистых материалов с контролируемой структурой и свойствами из растворов РС rS1/9 и rS2/12 в различных растворителях.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование самоорганизации РС rS1/9 и rS2/12 в растворах, пленочных и волокнистых образцах позволило выявить их структурные превращения на разных стадиях получения: от процесса выделения до формирования материалов на их основе. Надмолекулярная структура РС в материалах на их основе существенно зависит от состава используемого растворителя, способа

получения материала и его последующей обработки. Установленные закономерности позволят контролировать характеристики получаемых нетканых материалов, что необходимо для разработки изделий биомедицинского назначения с заданными свойствами.

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных, исследовании растворов РС на стадиях выделения и очистки, приготовления растворов и материалов и изучении их свойств. Структура исследуемых РС rS1/9 и rS2/12 подтверждена комплексом физико-химических методов анализа: динамическое (ДСР) и статическое светорассеяние (ССР), реологические исследования растворов, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), атомно-силовая микроскопия (АСМ), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), криоэлектронная микроскопия (крио-ПЭМ), инфракрасная (ИК) и ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия, рентгеновское рассеяние в больших и малых углах. Подробно описаны особенности метода электроформования для получения нетканых волокнистых материалов для биомедицинского применения. Упругие свойства индивидуальных нановолокон проводили в геометрии трехточечного изгиба методом сканирующей зондовой микроскопии.

Личный вклад

Автором получены и исследованы растворы и материалы на основе РС; подобраны оптимальные условия для получения нетканых волокнистых материалов на основе РС методом электроформования.

Автор принимал непосредственное участие в постановке, проведении и обработке экспериментов с использованием ротационной вискозиметрии, динамического и статического светорассеяния, атомно-силовой, сканирующей, просвечивающей электронной и криоэлектронной микроскопии, инфракрасной и УФ-спектроскопии, рентгеновской дифракции, анализа удельной площади поверхности и размера пор для описания физико-химических свойств растворов и материалов на основе РС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сдвиговые деформации растворов РС rS1/9 и rS2/12 сопровождаются структурным переходом от мицеллоподобных к фибриллярным структурам;
2. Влияние природы растворителя на структурную перестройку РС rS1/9 и rS2/12 под воздействием сдвиговых напряжений: образование фибрилл более выражено в водных растворах;
3. Оптимальные условия получения нетканых волокнистых материалов методом электроформования на основе РС rS1/9 и rS2/12 с контролируемой структурой и свойствами;
4. Размерный эффект, проявляющийся в увеличении модуля изгиба индивидуальных волокон РС rS1/9 и rS2/12, полученных методом электроформования, при уменьшении их диаметра менее 600 нм.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов определяется надежностью применявшихся методов исследования, воспроизводимостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах с помощью независимых методов, а также применением устоявшихся в мировой научной практике методик и теоретических положений при анализе и интерпретации результатов.

Апробация работы

Результаты исследования были изложены в 13 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях. Содержание работы отражено в 4 публикациях в журналах, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в российских и международных базах данных (РИНЦ, Web of Science, Scopus) и рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 152 страницах текста, содержит 9 таблиц, 73 рисунка и 132 источника литературы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, включающих анализ современного состояния исследований в этой области, экспериментальную часть и обсуждение результатов, заключения и выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы, списка публикаций по материалам диссертации, списка докладов на международных и всероссийских конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** показана актуальность темы диссертационной работы, обозначены научная новизна и практическая значимость исследований, сформулированы цель и задачи работы, приведены положения, выносимые на защиту, степень достоверности, полнота опубликования в печати и апробация результатов.

В **литературном обзоре** представлена информация о различных материалах на основе природных полимеров, таких как коллаген, фиброин и спидроин, которые применяются в качестве противоожоговых и раневых покрытий в виде нетканых, губчатых изделий для биомедицинского применения. Проанализированы работы, посвященные разработке методов получения материалов на основе фиброина и спидроинов, а также исследованию их физико-химических свойств. Анализ литературных источников показал, что исследование надмолекулярной организации таких биополимеров при их формировании, в особенности новых рекомбинантных аналогов спидроинов остается актуальным и на сегодняшний день. Обоснована актуальность применения нетканых материалов на основе РС в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

В **экспериментальной части** описаны экспериментальные методики синтеза РС rS1/9 и rS2/12, приготовления растворов на их основе, характеристики используемых реактивов. Указаны технические характеристики приборов и приведены методы анализа, используемые для исследования структуры растворов и материалов на основе РС.

РС rS1/9 с молекулярной массой 94 кДа и rS2/12 с молекулярной массой 113 кДа (аналоги MaSp1 и MaSp2) были получены из биомасс дрожжей *S.cerevisiae* SCR-702T-rS1/9 и SCR-702T-rS2/12. Схема выделения и очистки РС представлена на рисунке 1.

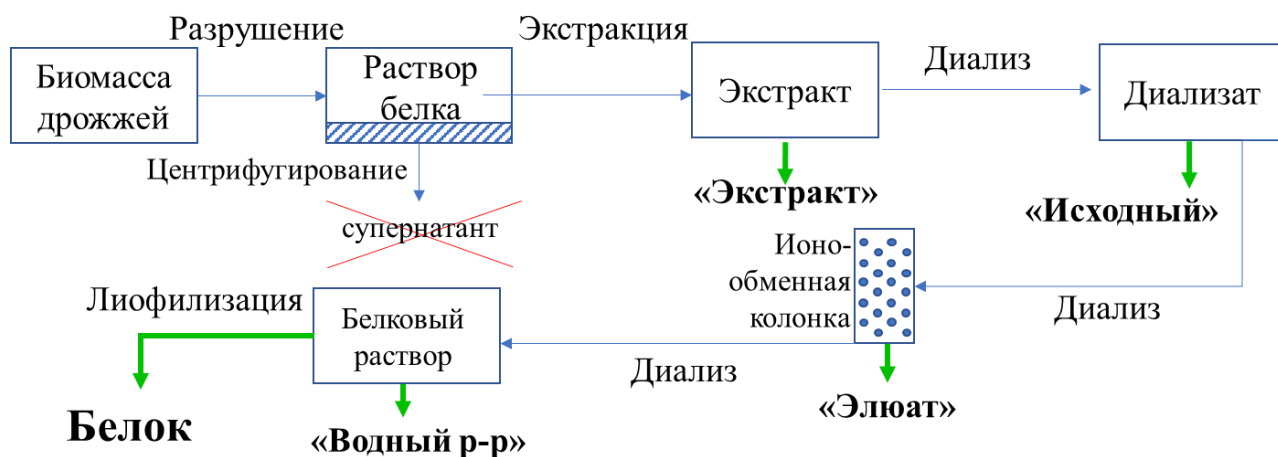


Рисунок 1 – Схема выделения и очистки РС rS1/9 и rS2/12.

Каждый мономер белка rS1/9 содержит 4 первичных повтора, мономер rS2/12 состоит из 5 первичных повторов и имеют следующие аминокислотные последовательности (рис. 2):

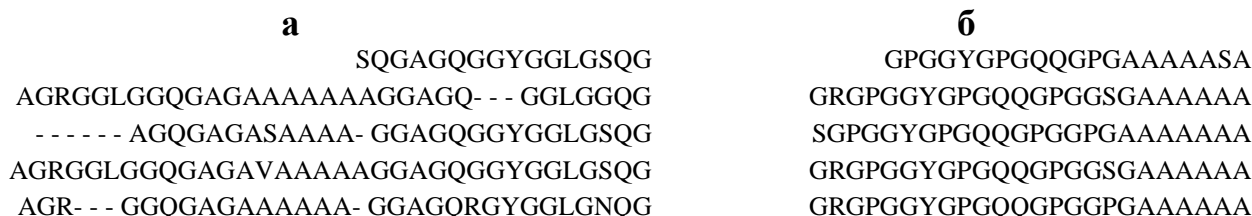


Рисунок 2 – Аминокислотные последовательности мономеров РС rS1/9 (а) rS2/12 (б)

Влажную биомассу суспендировали в буфере, содержащем 0,05 М фосфата натрия и 5% раствор глицерина с рН 7,4. Дрожжевые клетки разрушали с помощью стеклянных шариков в проточной мельнице в течение 1,5 часов. Полученную суспензию центрифугировали с последующим удалением супернатанта. На следующем этапе РС экстрагировали из осадка 10% раствором хлорида лития в 90% уксусной кислоте при перемешивании в течение суток. Далее образец центрифугировали, супернатант отбирали и диализовали против 10 мМ раствора ацетата натрия с рН 4,0. Окончательную очистку проводили методом ионообменной хроматографии. Белок элюировали раствором с градиентом концентрации NaCl, затем диализовали против воды, замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофильно высушивали.

Результаты представлены в трех разделах третьей главы. **Первый раздел** посвящен описанию структурных превращений РС rS1/9 и rS2/12 в процессе их выделения из биомассы дрожжей. Изучение реологических свойств растворов спидроинов на разных этапах получения

позволило сделать выводы о структурных перестройках РС под действием сдвиговых напряжений.

Исследованы низкоконцентрированные растворы РС rS1/9 и rS2/12 в 90% уксусной кислоте с добавлением 10 масс. % LiCl («экстракт»), в ацетатном буфере («исходный» и «элюат») и в «водном растворе» (рис. 1). Анализ частотных зависимостей модулей накопления и потерь показал, что «исходный», «элюат» и «водный раствор» спидроина rS1/9 являются структурированными жидкостями с $G' > G''$ (рис. 3а). Видно, что модули накопления «элюата» и «водного раствора» более чем на порядок превосходят аналогичное значение для «исходного» раствора. Поэтому, можно предположить, что РС rS1/9 имеют большее количество узлов в сетке зацеплений. В то же время растворы РС rS2/12, полученные на разных этапах выделения, являются вязкими жидкостями кроме высокоочищенного «водного раствора», обладающего упруго-вязкими свойствами. Золь-гель переход в растворах обоих РС происходит при частоте выше 10 с^{-1} , поэтому дальнейшие измерения производили при частоте 5 с^{-1} .

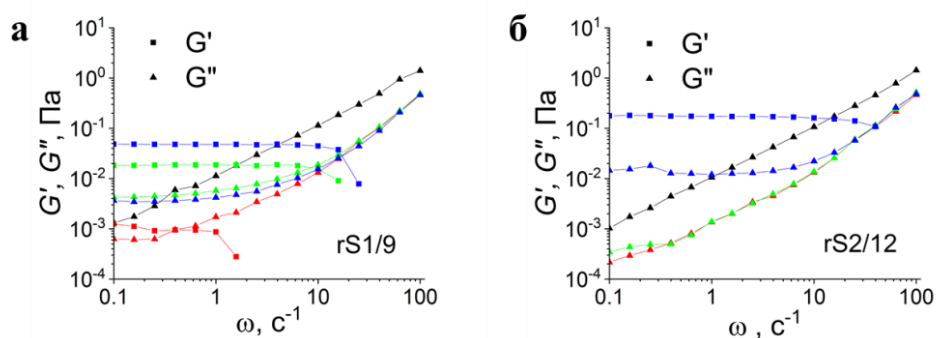


Рисунок 3 – Частотные зависимости модуля накопления G' (■) и модуля потерь G'' (▲) различных растворов: «экстракта» (—), «элюата» (—), «исходного» (—) и «водного раствора» (—) РС rS1/9 (а) и rS2/12 (б); концентрации всех растворов 1 мг/мл.

Аналогичные заключения можно сделать из зависимости напряжения сдвига и вязкости от скорости сдвига (рис. 4). На кривых течения «элюата» rS1/9 (рис. 4а), а также «водных растворов» обоих белков (рис. 4б) появляется предел текучести, в то время как «экстракт» обоих белков, «исходный» раствор и «элюат» rS2/12 являются классическими вязкими жидкостями, что согласуется с данными измерения вязкости от скорости сдвига (рис. 4в, г). У растворов, имеющих предел текучести, кривые вязкости с увеличением скорости сдвига носят ниспадающий характер с последующим выходом на плато. Такое поведение связано с перестройкой надмолекулярной структуры РС с увеличением скорости сдвига. Ньютоновское поведение «экстрактов», «исходных» растворов, а также «элюата» rS2/12 обусловлено, вероятно, мицеллоподобным строением белка в растворах независимо от приложенных сдвиговых напряжений.

Таким образом, проведенные реологические исследования показали, что «водные растворы» РС rS1/9 и rS2/12, а также «элюат» РС rS1/9 обладают пределом текучести, что говорит о наличии в них трехмерной сетки зацеплений, и может быть связано с образованием фибриллярных структур.

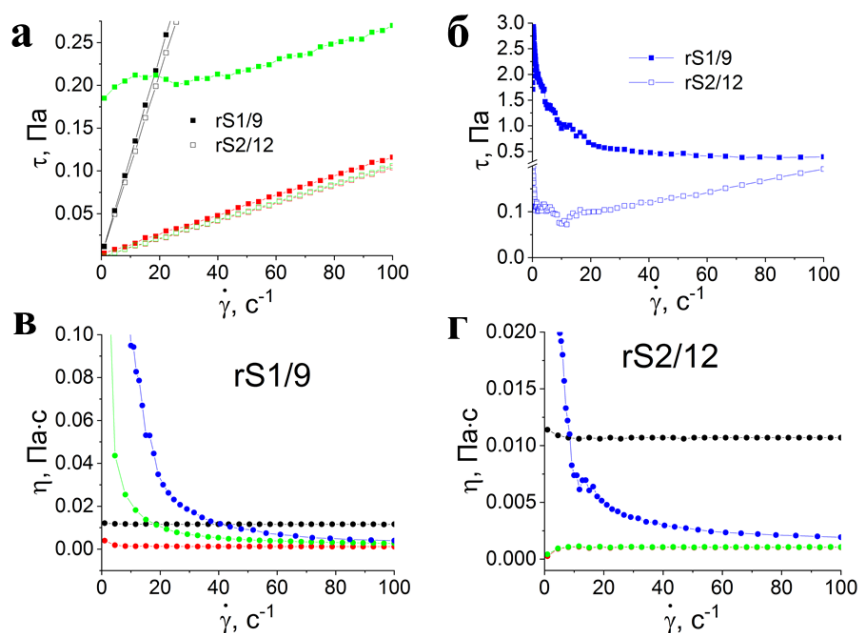


Рисунок 4 – Зависимость напряжения сдвига (а, б) и вязкости (в, г) от скорости сдвига различных растворов: «экстракт» (—), «элюат» (—), «исходный» (—) и «водный раствор» (—) РС rS1/9 и rS2/12; концентрации всех растворов 1 мг/мл.

Самоорганизацию РС rS1/9 и rS2/12 на разных этапах выделения исследовали методом ПЭМ. Анализ микрофотографий показал, что растворы РС, не обладающие пределом текучести (рис. 5а, г, д, е), формируют преимущественно сферические агрегаты. В упруго-вязких «водных растворах» обоих белков и в «элюате» РС rS1/9 спидроины организуются в нановибриллы диаметром около 10 нм. Причем нановибриллы rS1/9 (рис. 5б, в) имеют гораздо большее характеристическое отношение, их длина может достигать нескольких микрометров. Фибриллы РС rS2/12 (рис. 5ж) имеют длину в диапазоне от 50 до 200 нм. Наличие нановибрилл в растворах, по-видимому, объясняет появление пределов текучести на реологических кривых (рис. 4).

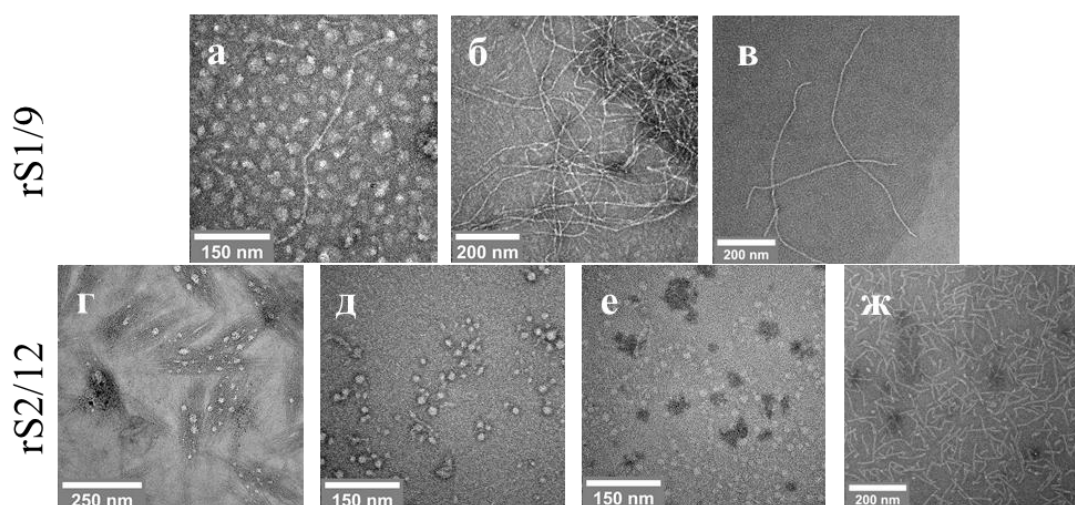


Рисунок 5 – ПЭМ-изображения с негативным контрастированием «экстракта» (г), «элюатов» (б, е), «исходных» (а, д) и «водных растворов» (в, ж) РС rS1/9 и rS2/12 с концентрациями 1 мг/мл.

Влияние сдвиговых деформаций на структурообразование «элюатов» PC rS1/9 и rS2/12 исследовано методом АСМ. На микрофотографиях свежевыделенных растворов PC видно наличие как фибриллярных структур, так и сферических частиц, причем PC rS1/9 формирует на поверхности слюдяной подложки преимущественно фибриллы (рис. 6а), а PC rS2/12 образует большее количество сферических частиц (рис. 6в). После сдвиговых деформаций в процессе реологических измерений оба белка формируют протяженные фибриллярные структуры на подложке (рис. 6б, г). Полученные результаты согласуются с данными реологических исследований, где увеличение скорости сдвига приводит к резкому возрастанию вязкости и напряжения сдвига.

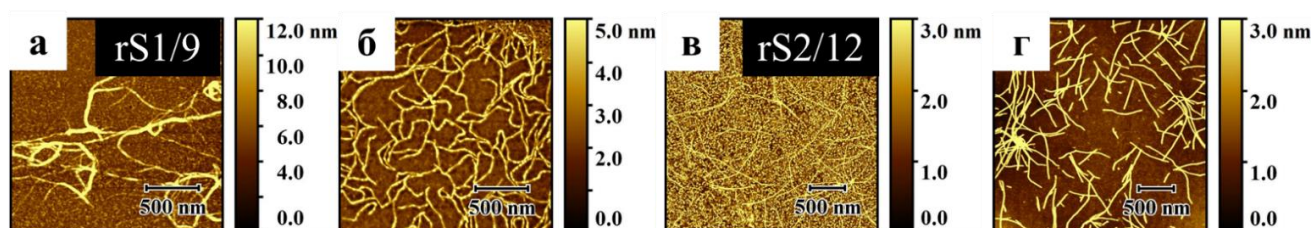


Рисунок 6 – АСМ изображения сферических агрегатов и нанофибрилл rS1/9 (а, б) и rS2/12 (в, г), полученных из растворов концентрацией 0,8 мг/мл в ацетатном буфере («элюат») до реологических испытаний (а, в); после реологических испытаний (б, г)

Таким образом, характер самоорганизации PC rS1/9 и rS2/12 на разных стадиях выделения меняется в зависимости от степени очищенности белков, химической природы растворителя и прилагаемых сдвиговых деформаций. Причем PC rS1/9 более склонен к формированию фибриллярных структур, которые образуются на более ранней стадии выделения. Проведенные исследования показывают, что для получения материалов методом электроформования из растворов PC rS1/9 и rS2/12 с воспроизводимыми и прогнозируемыми свойствами важно следовать единому протоколу выделения и очистки белков.

Второй раздел посвящен исследованию влияния химической природы растворителя на самоорганизацию очищенных PC rS1/9 и rS2/12 в растворах. Реологические исследования растворов спидроинов являются важными с точки зрения подбора оптимальных условий электроформования нетканых волокнистых материалов с заданными структурой и свойствами, а также отражают структурные превращения, происходящие в растворах белков под действием сдвиговых деформаций. ГФИП сильно полярный растворитель, способный растворять фибриллярные белки, в том числе спидроин. ГФИП сольватирует белок и способствует формированию преимущественно его спиральной конформации. Другим хорошим растворителем для белков является концентрированная муравьиная кислота (МК). Но со временем, она может вызывать деградацию белка, поэтому часто используют разбавленные водные растворы МК.

Для приготовления водных растворов PC rS1/9 и rS2/12 в качестве растворителя использовали 2% и 5% водные растворы МК. Как видно из рисунков 7а и 7б, в режиме

периодических колебаний растворы РС rS1/9 в этих растворителях с концентрацией 3 мг/мл ведут себя как слабо структурированные жидкости ($G' > G''$). В то же время аналогичные растворы РС rS2/12 во всей области частот являются вязкими жидкостями. Увеличение концентрации РС rS2/12 в растворе 5%-ой МК приводит к появлению модуля накоплений, свидетельствующего об образовании сетки зацеплений (рис. 7в). При этом практически во всем интервале частот величина G' для раствора РС rS1/9 больше, чем соответствующее значение для раствора РС rS2/12. Таким образом, процесс формирования сетки зацеплений более выражен для растворов РС rS1/9, чем для растворов РС rS2/12. Прочность образовавшихся гелей РС rS1/9 в 2% и 5%-ой МК была определена из предела текучести и составила менее 0,01 Па (рис. 7г, д). Это значение практически не зависит от содержания МК и белка в исследованном диапазоне концентраций.

В ГФИП растворы РС rS1/9 и rS2/12 демонстрируют свойства вязкой жидкости (рис. 7е). Исследования показали, что увеличение концентрации обоих белков с 3 до 80 мг/мл вязкость возрастает с 0,03 до 0,2 Па·с и не зависит от скорости сдвига в исследуемом диапазоне значений

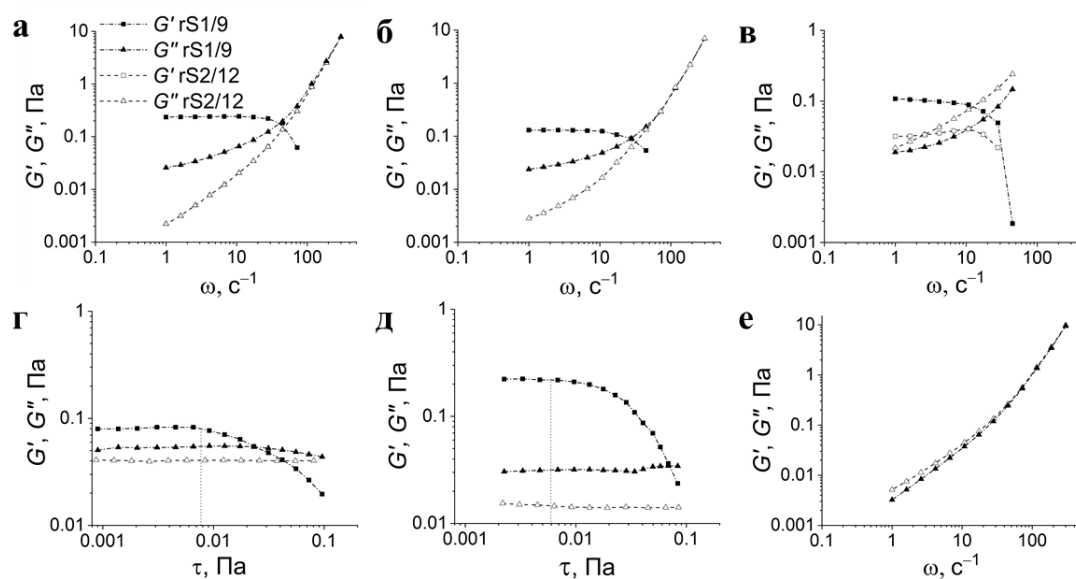


Рисунок 7 – Частотные зависимости модуля накопления (G') и модуля потерь (G'') для растворов rS1/9 и rS2/12 с концентрацией: 3 мг/мл в 2%-ной (а) и 5%-ной (б) МК, 11 мг/мл в 5%-ной МК (в) и ГФИП (е);. Зависимости модуля накоплений (G') и модуля потерь (G'') от напряжения сдвига rS1/9 с концентрацией 3 мг/мл в 2%-ной (г) и 5%-ной (д) МК при частоте 5 c^{-1} . Величина предела текучести обозначена пунктирной линией.

Необходимо отметить, что реологические свойства растворов РС в 2%-ной и 5%-ной МК зависят от количества циклов нагружения и скорости сдвига: во втором и третьем циклах нагружения проявляется тиксотропия - наличие предела текучести (рис. 8а, б). Тиксотропные свойства наиболее ярко выражены в растворе РС rS2/12 в 2%-ной МК (рис. 8а).

Для разрушения трехмерной структуры сетки зацеплений, образовавшейся после сдвиговых напряжений в растворах РС rS1/9 и rS2/12 необходимо приложить нагрузки 0,4 и

0,2 Па, соответственно. Это свидетельствует о том, rS1/9 образует более прочную сетку зацеплений. Несмотря на то, что величина предела текучести зависит от способа ее определения, эффект разрушения структуры РС rS1/9 ярко выражен на рисунке 8.

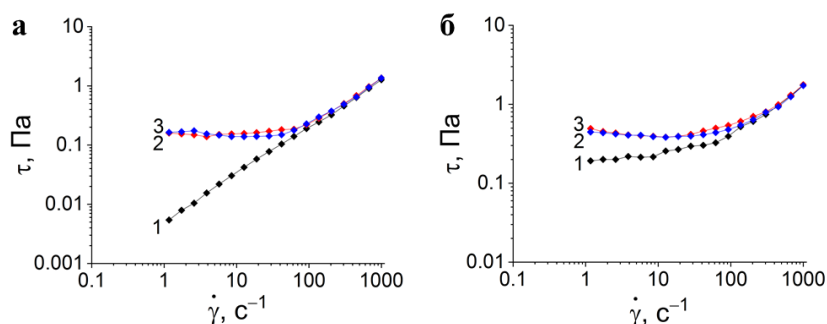


Рисунок 8 – Зависимость напряжения сдвига (τ) от скорости сдвига ($\dot{\gamma}$) rS2/12 (а) и rS1/9 (б) с концентрацией 3 мг/мл в 5%-ной МК при последовательных циклах деформирования (от одного до трех).

Таким образом, сравнительный анализ реологического поведения растворов РС при сдвиговых деформациях и в осцилляционном режиме позволили показать влияние типа растворителя на переход от упруговязкой жидкости к модели упругого тела ($G' \gg G''$) по мере увеличения концентрации белка, и обнаружить зависимость образования и разрушения непрерывной трехмерной структуры в растворе от значения напряжения сдвига. При исследовании реологических особенностей поведения растворов РС, было установлено, что рост концентрации rS1/9 и rS2/12 в водной среде приводит к существенному увеличению модуля накоплений растворов и переходу в гелеобразное состояние при концентрации 5 масс. %. Однако раствор с такой концентрацией все еще не обладает волокнообразующими свойствами, что не позволило получать волокна методом электроформования без волокнообразующих добавок. В ГФИП были получены растворы на основе РС с максимальной концентрацией до 12 масс. %, при этом растворы ведут себя как ньютоновская жидкость, поэтому электроформование из таких растворов можно проводить без использования дополнительных компонентов.

Наблюдаемое изменение реологического поведения растворов РС, по-видимому, связано с изменением надмолекулярной структуры белков в растворах МК и ГФИП. Из литературных источников известно, что РС в ГФИП формируют мицеллоподобные структуры, состоящие преимущественно из белка в спиральной конформации. В растворах МК для РС описано формирование ламеллярных структур, содержащих β -листы.

Методом крио-ПЭМ исследовали самоорганизацию РС rS1/9 и rS2/12 в растворах 5%-ной МК до и после реологических испытаний. Как видно из рисунка 9, РС rS1/9 в водных растворах имеет фибриллярную структуру как до, так и после воздействия сдвиговых напряжений. РС rS2/12 в исходном растворе МК организуется в сферические частицы диаметром от 3 до 12 нм. После реологических испытаний происходит структурная реорганизация белка в фибриллы. Диаметры фибрилл для РС rS1/9 и rS2/12 практически не отличаются и составляют 5 ± 1 нм.

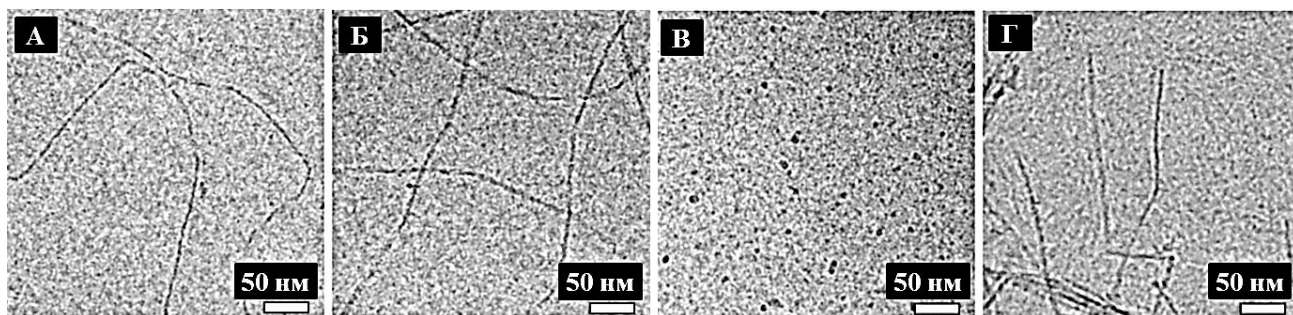


Рисунок 9 – Крио-ПЭМ изображения нановолокон и сферических агрегатов, полученных из растворов rS1/9 (а, б) и rS2/12 (в, г) концентрацией 3 мг/мл в 5%-ной муравьиной кислоте до реологических испытаний (а, в); после реологических испытаний (б, г).

Аналогичные результаты получены методом АСМ (рис. 10). На слюдяной подложке белок rS1/9 организуется в фибриллярные структуры длиной несколько сотен нм. При продавливании раствора со скоростью 50 мкл/сек через капилляр диаметром 150 мкм возникают значительные сдвиговые напряжения, и формируются более длинные до нескольких микрометров фибриллярные структуры. РС rS2/12 на слюдяной подложке образует сферические частицы высотой около 3 нм, после продавливания через капилляр белок формирует фибриллы длиной несколько сотен нм.

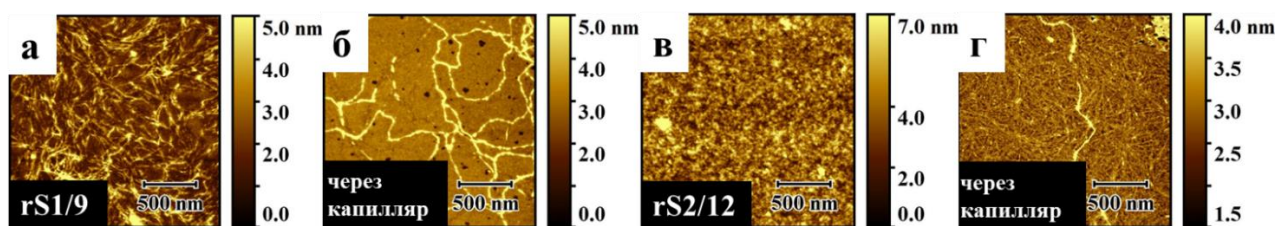


Рисунок 10 – АСМ-изображения осажденных на слюдяную подложку РС rS1/9 и rS2/12 в 5%-ной МК концентрацией 1 мг/мл стандартным нанесением (а, в) и через тонкий капилляр (б, г).

Фибриллярные структуры РС в водных растворах МК, обнаруженные методами АСМ и крио-ПЭМ, согласуются с результатами реологических измерений (рис. 7 и 8). Наличие предела текучести в растворах РС rS1/9 в 5%-ной МК можно объяснить формированием сетки зацеплений из протяженных фибриллярных структур. Рост предела текучести при повторных реологических испытаниях, по всей видимости, связан с совершенствованием фибриллярной структуры. Отсутствие фибрилл в растворе РС rS2/12 в 5%-ной МК (рис. 10в) при исследуемой концентрации объясняет отсутствие сетки зацеплений и, как следствие, ньютоновское поведение раствора, а приложение сдвиговых напряжений приводит к реорганизации молекул белка в фибриллы, образованию сетки зацеплений и, как следствие, появлению предела текучести.

Методом АСМ исследовали влияние природы растворителя на надмолекулярную организацию РС rS1/9 и rS2/12. На рисунке 11 представлены АСМ-изображения РС rS1/9 и rS2/12, полученные нанесением на слюдяную подложку их растворов в воде, ГФИП и смеси вода/ГФИП в соотношении 50:50 масс.%. В водных растворах РС образовывали

преимущественно фибриллярные структуры. Увеличение содержания ГФИП в составе растворителя до 50 масс. % приводит к появлению сферических частиц наряду с фибриллярными структурами (рис. 11б, д). На АСМ-изображениях, полученных из растворов в ГФИП, наблюдаются преимущественно сферические частицы. Увеличение содержания ГФИП в смесевом растворителе приводит, по-видимому, к сольватации белковых молекул и образованию внутривещных водородных связей, стабилизирующих спиральную конформацию белка. В водном растворе возрастает влияние взаимодействия между гидрофобными блоками, что, по-видимому, способствует формированию фибрилл.

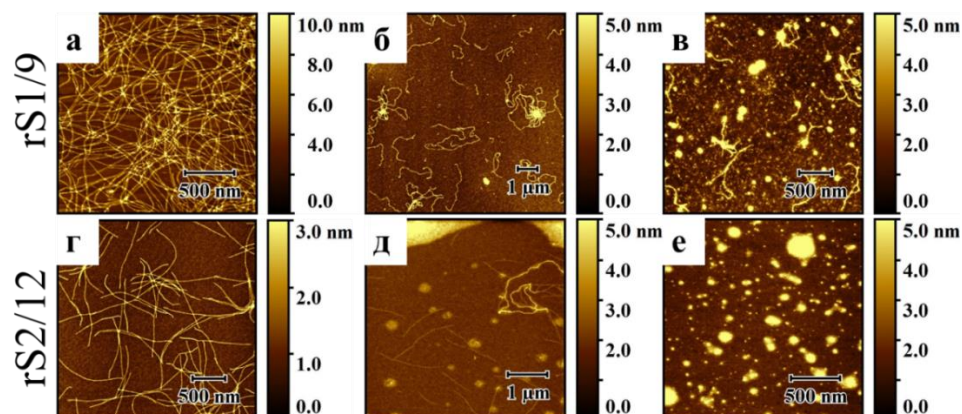


Рисунок 11 – АСМ изображения сферических агрегатов и нановибрилл rS1/9 (а, б, в) и rS2/12 (г, д, е), полученных из растворов концентрацией 0,8 мг/мл в смесях растворителей вода:ГФИП соотношением 100:0 (а, г); 50:50 (б, д); 0:100 (в, е) масс. %.

Можно отметить, что способность к организации в фибриллярные структуры больше у rS1/9, а размеры таких нановибрилл (ширина и высота) в 2 раза больше по сравнению с нановибриллами, состоящими из rS2/12.

Использованные микроскопические методы позволили проанализировать надмолекулярные структуры РС после высушивания растворов. Для того чтобы исследовать самоорганизацию РС rS1/9 и rS2/12 в растворах использовали методы динамического, статического светорассеяния и рентгеновского рассеяния.

Самоорганизация в растворе высокоочищенных РС была изучена методами статического и динамического светорассеяния. Исследование молекулярно-массовых и гидродинамических характеристик растворенных рекомбинантных белков rS1/9 и rS2/12 проводили в 2%-ном растворе МК и ГФИП. Было установлено, что для обоих белков кривые распределения размеров частиц (гидродинамического радиуса R_h), полученные методом ДСР, имеют схожий вид: в ГФИП наблюдается основной максимум в области R_h 3-4 нм и максимум в области R_h 70-80 нм, соответствующий, по-видимому, агрегатам. При переходе к раствору 2%-ной МК максимум основной фракции частиц смещается в область 10 нм, а максимум агрегатов – в область нескольких сотен нанометров. Для исследования процесса самоорганизации белков rS1/9 и rS2/12 в разбавленных растворах использовали метод статического светорассеяния. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Молекулярно-массовые и гидродинамические характеристики РС rS1/9 и rS2/12, где $(R_h)_0$ – гидродинамический радиус, экстраполированный к нулевой концентрации; M_w – средневесовая молекулярная масса; A_2 – второй вириальный коэффициент.

Белок	Растворитель	$(R_h)_0$, нм	M_w , кДа	$A_2, \frac{\text{моль} \cdot \text{дм}^3}{\text{г}^2}$	Степень агрегации
rS1/9	2 % HCOOH	8	-	-	-
	ГФИП	3	95	$1,67 \cdot 10^{-5}$	1
rS2/12	2 % HCOOH	11	1122	$1,50 \cdot 10^{-6}$	10
	ГФИП	4	90	$1,29 \cdot 10^{-5}$	1

Средневесовая молекулярная масса (M_w) рассеивающих частиц в растворе ГФИП составляет 95 кДа и 90 кДа для РС rS1/9 и rS2/12, соответственно. Полученные величины близки к значениям молекулярных масс индивидуальных белков, определенных методом электрофореза на стадии их выделения. Таким образом, можно предположить, что в ГФИП РС rS1/9 и rS2/12 хорошо диспергированы и находятся в виде индивидуальных макромолекул с $(R_h)_0$ равным 3 и 4 нм, соответственно. В растворе 2%-ной МК $(R_h)_0$ рассеивающих частиц становится больше: в случае РС rS1/9 гидродинамический радиус возрастает до 8 нм, а для раствора белка rS2/12 – до 11 нм. Средневесовая молекулярная масса рассеивающих частиц РС rS2/12 в растворе 2%-ной МК составила 1122 кДа, что с учетом молекулярной массы индивидуального белка, соответствует степени агрегации 10. Таким образом, в этом растворе РС rS2/12 диспергирован в виде частиц с гидродинамическим радиусом 11 нм, состоящих из 10 индивидуальных молекул белка. Более выраженное агрегационное поведение РС rS1/9 в водном растворе МК по сравнению с РС rS2/12 не позволило измерить молекулярную массу частиц и это можно объяснить исходя из гидрофильно-гидрофобного баланса первичной последовательности РС. Показатель гидропатичности исследуемых белков, характеризующийся величиной GRAVY (Grand Average of Hydropathy), составляет -0,006 и -0,414 для РС rS1/9 и rS2/12, соответственно. Чем ниже это значение, тем белок более гидрофильный.

Отметим, что термодинамическое качество растворителя по отношению к спидроинам можно определить из значений второго вириального коэффициента A_2 (таблица 1). Так для обоих спидроинов 2% водный раствор МК и ГФИП являются хорошими растворителями, т.к. $A_2 > 0$, но термодинамическое качество растворителя ГФИП выше, т.к. значение A_2 больше на порядок. Поэтому, возможно, он и диспергирует спидроины до индивидуальных молекул белка.

Методы ДСР и ССР применяются для разбавленных растворов, поэтому для исследования самоорганизации РС в более концентрированных растворах использовали метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). На рисунке 12 представлены малоугловые дифрактограммы для растворов РС rS1/9 и rS2/12 в ГФИП с концентрацией от 5 до 20 мг/мл. В 2 масс. % МК растворы с такой концентрацией получить не удалось.

Увеличение концентрации РС в растворе приводило к росту числа агрегатов, что подтверждается изменением наклона кривых в области самых малых волновых векторов (рис. 12а, в). Средние размеры агрегатов составляли 30 и 15 нм для РС rS1/9 и rS2/12,

соответственно (рис. 12б, г). Отметим, что при увеличении концентрации РС rS2/12 с 5 до 20 мг/мл наблюдается значительное увеличение вклада рассеяния агрегатов в общую интенсивность рассеяния (рис 12в). Для малоуголового рассеяния растворов rS1/9 наклон кривых практически не меняется в диапазоне исследуемых концентраций, что свидетельствует о наличии агрегатов.

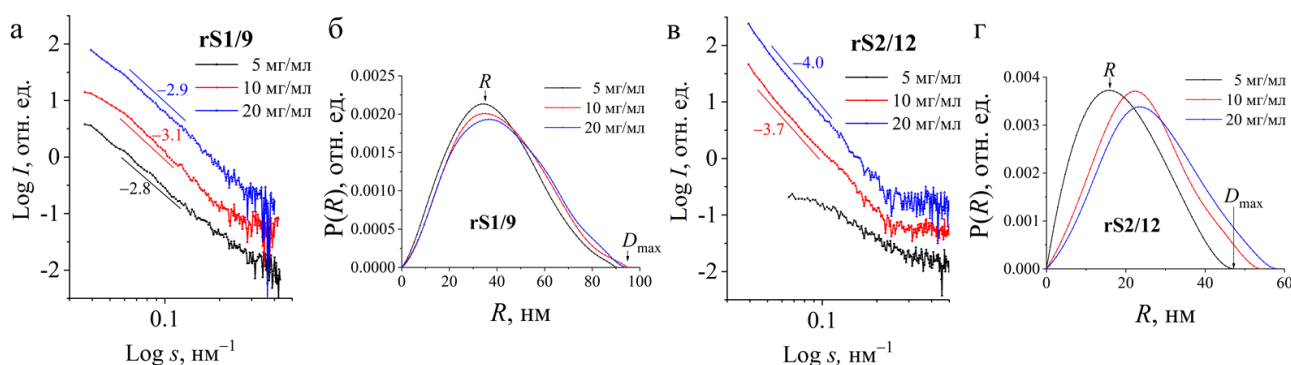


Рисунок 12 – Малоугловые дифрактограммы в двойных логарифмических координатах (а, в) и парные корреляционные функции (б, г) для растворов РС в ГФИП с концентрациями 5, 10 и 20 мг/мл.

Наклон кривых в области самых малых волновых векторов для РС rS2/12 равен -4, что соответствует гладкой компактной частице. Для РС rS1/9 этот наклон уменьшается до -3, что говорит о существовании поверхностного фрактала.

Таким образом, обнаружено, что в ГФИП оба РС при низких концентрациях находятся в виде индивидуальных макромолекул со спиральной конформацией (рис. 13а), что, по-видимому, объясняется хорошим качеством растворителя. Увеличение концентрации РС приводит к их агрегации и увеличению размеров частиц. В 2%-ой МК РС rS2/12 даже в разбавленном растворе формирует сферические агрегаты (рис. 13б). РС rS1/9 в таких же растворах наряду с агрегатами формирует фибриллярные структуры. Приложение сдвиговых напряжений к растворам РС в МК приводит к полной реорганизации структуры белков в фибриллы.

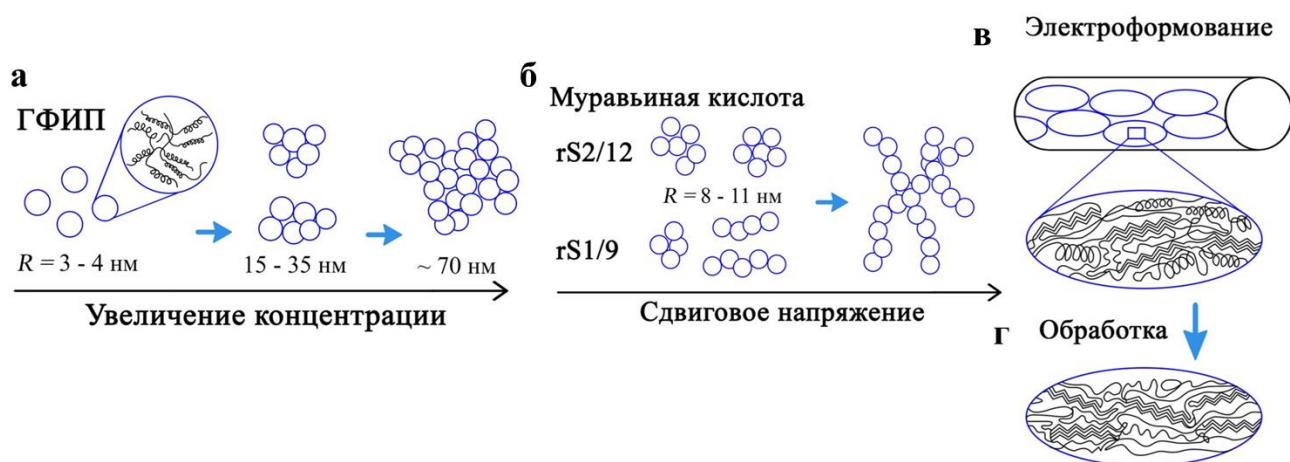


Рисунок 13 – Схема структурных перестроек РС rS1/9 и rS2/12 в растворах ГФИП (а) и МК (б); схематическая изображение строения волокна РС до (в) и после (г) обработки ЭС.

Третий раздел посвящен получению нетканых и пленочных материалов на основе РС и

исследованию их структуры и свойств. Получение волокнистых нетканых материалов проводили из 8% растворов РС rS1/9 и rS2/12 в ГФИП методом электроформования с использованием обдувки кончика капилляра парами ГФИП. Обработка таких образцов спиртами приводит к увеличению степени кристалличности, улучшению механических свойств, и стабильности в воде. Поэтому после получения нетканые материалы выдерживали в этиловом спирте (ЭС). Их структура представлена на рисунке 14в.

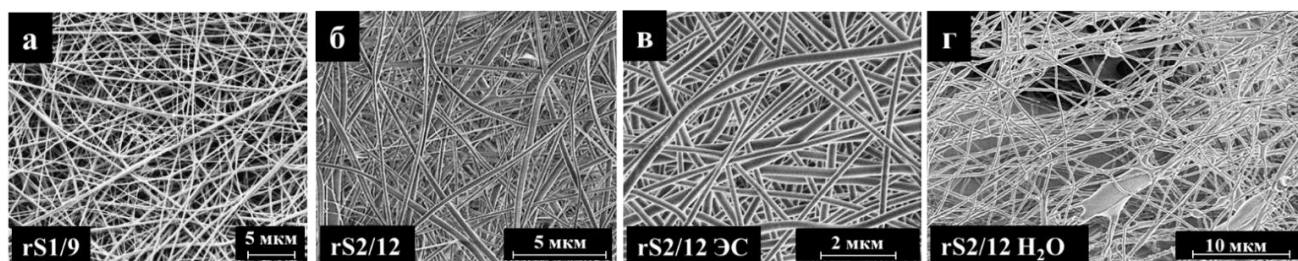


Рисунок 14 – Микрофотографии нетканых материалов на основе rS1/9 (а) и rS2/12 (б), полученных методом электроформования из 8% растворов в ГФИП; после обработки этиловым спиртом (ЭС) в течение 4 ч при 60 °С (в); из водного раствора МК на основе rS2/12 с концентрацией 1,1 масс. %.

Обращает на себя внимание широкое распределение волокон по диаметру (рис. 58 диссертации), что может быть связано с процессом расщепления матричной струи на дочерние струи. Средний диаметр волокон в полученных образцах составлял 190 ± 80 нм и не зависел от природы белка и последующей обработки. 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.

Для производства биомедицинских материалов отказ от использования токсичных органических растворителей является важным преимуществом. Проведенные ранее исследования показали, что РС ограниченно растворимы в водных растворах, что препятствует его использованию для электроформования, поэтому в качестве водного растворителя использовали 5 масс. % МК. Полиэтиленоксид (ПЭО) – универсальная водорастворимая волокнообразующая добавка, использованная для получения волокон из водных растворов РС rS2/12 (рис. 14г). Средний диаметр волокон составляет 310 ± 100 нм. Обнаруженные незначительные дефекты могут быть связаны с невысокой концентрацией высокомолекулярных соединений в растворе и, как следствие, низкой вязкостью.

Был проведен структурный анализ полученных материалов. Белки представляют собой сложные трехмерные структуры, состоящие из локальных участков с различной пространственной конфигурацией: β -повороты, β -листы, неориентированные структуры, α -спирали и др. Естественно, что выделение исходных белков, их очистка, формирование волокон сопровождаются значительными изменениями во вторичной структуре белковых молекул.

Информативным методом, позволяющим следить за такими структурными превращениями, является ИК-спектроскопия. Полоса Амид I ($1600-1690\text{ см}^{-1}$) спектра поглощения зависит от природы водородных связей между $\text{C}=\text{O}$ и NH группами и, как следствие, от вторичной структуры белка. В результате, полоса Амид I полипептидов состоит из перекрывающихся полос, соответствующих α -спиралям, β -листам, β -поворотам и неориентированным структурам. ИК спектры пленочных и волокнистых материалов на основе PC rS1/9 и rS2/12 представлены на рисунке 15.

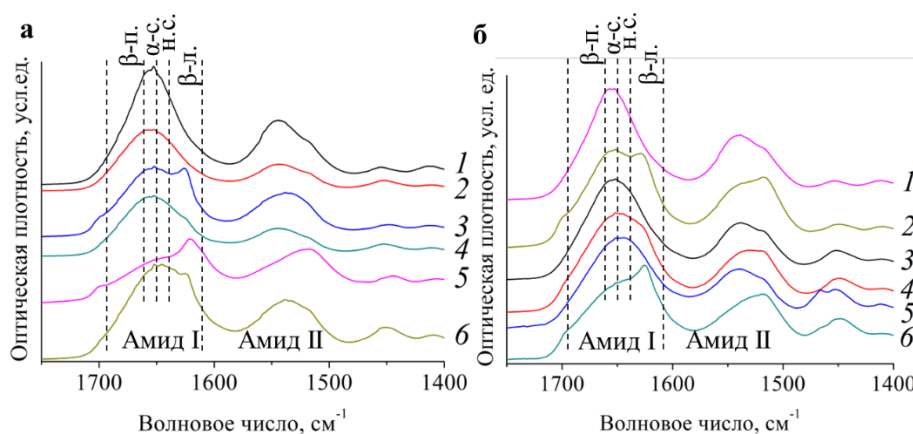


Рисунок 15 – ИК спектры пленок (а) PC rS1/9 (нечетные номера) и rS2/12 (четные номера), отлитых из растворов ГФИП (1,2), ацетатного буфера (3,4), воды (5,6); нетканых материалов (б) на основе PC rS1/9, полученных из ГФИП (1,2) и rS2/12, полученных из ГФИП (3,4) и воды (5,6). Нечетные номера – исходные материалы. Четные номера – после обработки ЭС.

На рисунках наблюдаются существенные отличия между спектрами пленок, полученных из водных растворов и ГФИП. Пленки, полученные из органического растворителя, характеризуются спектром поглощения с полосой поглощения Амид I в области 1656 см^{-1} . Для пленок, полученных из водных растворов, увеличивается вклад полосы поглощения β -листов (1628 см^{-1}), что свидетельствует об увеличении их доли в конформационном наборе PC (рис. 15а). Описанная закономерность сохраняется для нетканых материалов на основе PC rS1/9 и rS2/12 (рис. 15б). Обработка нетканых материалов ЭС также приводит к росту вклада полосы поглощения β -листов в области Амид I. Анализ показал, что PC rS1/9 имеет большую склонность к образованию β -листов, чем у PC rS2/12. Результаты математической обработки спектров поглощения в области Амид I представлены в таблице 2.

Видно, что при переходе от ГФИП к водным растворам, доля β -листов в конформационном наборе PC rS1/9 и rS2/12 увеличивается за счет уменьшения общего содержания неориентированной структуры, α -спиралей и β -поворотов. Обработка нетканых материалов PC rS1/9 и rS2/12 спиртом приводит к росту доли β -листов примерно на 8-10 %, одновременно доля α -спиралей уменьшается на 9-20 %. Такие изменения могут приводить к росту степени кристалличности и улучшению механических свойств материалов. Неожиданным оказалось отсутствие значительных конформационных изменений PC, вызванных растяжением

струи в процессе электроформования по сравнению с пленочными материалами.

Таблица 2 – Доля элементов вторичной структуры РС rS1/9 и rS2/12 по данным ИК-спектроскопии в пленках и нетканых материалах в зависимости от типа растворителя и обработки этиловым спиртом (НМ – нетканый материал; ЭС – обработка этиловым спиртом в течение 4 ч при 60 °С).

Конформация спидроина	ГФИП			АЦ буфер	H ₂ O		
	Пленка	НМ	НМ ЭС	Пленка	Пленка	НМ	НМ ЭС
rS1/9							
β-повороты, %	29	33	23	28	12	-	-
β-листы, %	31	31	39	43	69	-	-
Неориентированная структура, %	11	9	32	2	2	-	-
α-спирали, %	29	27	7	27	17	-	-
rS2/12							
β-повороты, %	30	29	23	30	24	30	24
β-листы, %	27	30	40	34	40	37	43
Неориентированная структура, %	14	19	24	9	10	12	23
α-спирали, %	29	22	13	27	26	21	10

Нативная паутина характеризуется значительной ориентацией кристаллических областей вдоль оси формования. Поэтому возникает вопрос об ориентации белковых кристаллитов в волокнах нетканого материала. Для ответа на этот вопрос были изготовлены ориентированные нетканые материалы на основе РС rS1/9 из раствора в ГФИП методом электроформования на осадительный электрод в виде металлической пластины с зазором 5 мм (рис. 16).

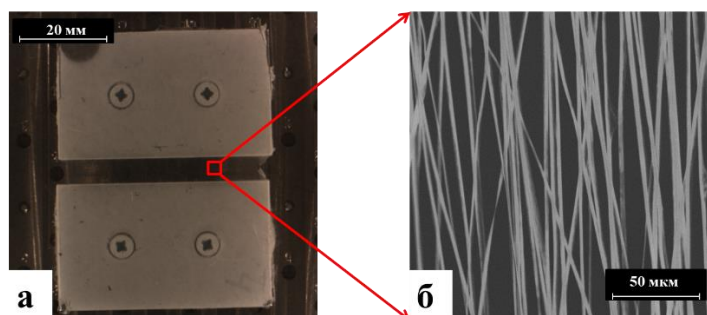


Рисунок 16 – Осадительный электрод с зазором (а); СЭМ изображение ориентированных волокон на основе РС rS1/9 в зазоре (б).

Как видно, волокна характеризуются заметной ориентацией, перпендикулярно зазору осадительного электрода (вдоль силовых линий напряженности поля). Фактор ориентации, рассчитанный из анализа микрофотографий, превышает 0,9.

Для достижения хороших механических характеристик важна не только ориентация волокон, но и ориентация на молекулярном уровне. ИК спектры в поляризованном излучении представлены на рисунке 17а. Видно, что спектры, полученные при поляризации параллельно и перпендикулярно направлению волокон, заметно отличаются, что свидетельствует об анизотропии свойств в материале. Фактор ориентации полосы поглощения 1628 см⁻¹,

соответствующей β -листам, равен $-0,36$, что говорит об их ориентации преимущественно вдоль волокна.

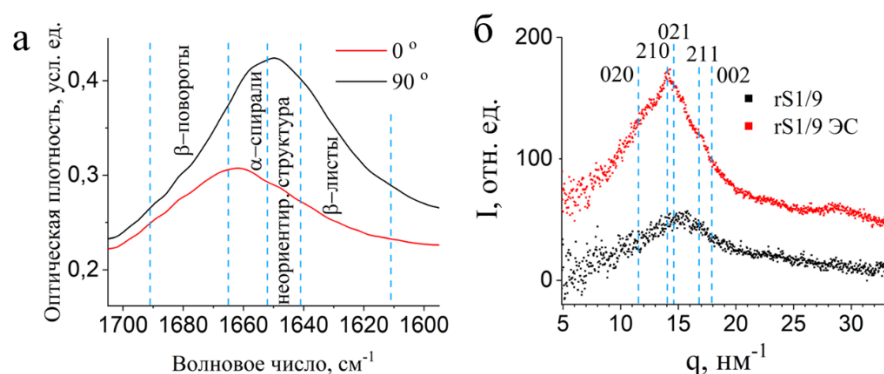


Рисунок 17 – Профиль полосы Амид-I при различной поляризации для РС rS1/9 (а) (0° - направление поляризатора вдоль ориентации волокон; 90° - перпендикулярно); большеугловые дифрактограммы для нетканых материалов на основе rS1/9 (исходный и после обработки ЭС) (б).

Методом рентгеновского рассеяния в больших углах исследовали влияние обработки ЭС на структуру ориентированного нетканого материала на основе rS1/9. Последующая обработка спиртами материалов, вероятно, приводит к образованию большого количества водородных связей, что влияет на конформационный состав белков. Установлено, что обработка материала в парах этанола позволяет существенно повысить его степень кристалличности, вероятно, за счет изменения вторичной структуры, а именно увеличения количества β -листов (рис. 17б и 13в, г).

Обнаруженная ориентация индивидуальных направленных волокон методами ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа, должна оказывать влияние на механические свойства, как индивидуальных волокон, так и материалов в целом. Методом АСМ были исследованы механические характеристики индивидуальных волокон, полученных методом электроформования из растворов в ГФИП. Методика измерения была отработана на волокнах фиброина шелка, поскольку механические свойства фиброина к настоящему моменту достаточно подробно исследованы и описаны в литературе.

На рисунке 18а показана зависимость модуля на изгиб от диаметра для волокон фиброина шелка. Было обнаружено, что для волокон диаметром выше критического (около 300 нм) их модуль на изгиб не зависит от диаметра и составляет $4,4 \pm 1,3$ ГПа, что близко к значениям модуля для макроскопических волокон фиброина шелка, приведенным в литературе. Однако для тонких волокон их модуль быстро увеличивался с уменьшением диаметра, достигая значений 30 ГПа (рис. 18а), то есть в 6-7 раз выше значения модуля макроскопических волокон. Подобный эффект многократного (до 30 раз) увеличения модуля накопления (а также прочности) с уменьшением диаметра в субмикронном диапазоне размеров, ранее был описан для волокон многих полимеров, как природных, так и синтетических, полученных методом электроформования и объяснялся либо увеличивающимся вкладом поверхностного слоя волокон

с более высокой степенью ориентации полимерных цепей в нем (структура типа «ядро-оболочка»), либо эффектом конфайнмента, приводящему к увеличению степени ориентации полимерных цепей и внутри волокна, либо совокупностью этих эффектов. Пунктирной линией на рисунке 18а показана аппроксимация размерного эффекта механических свойств волокон фиброина шелка с диаметром ниже критического моделью, описывающей увеличение степени ориентации полимерных цепей в тонких волокнах с ростом скорости деформации потока в процессе электроформования. Аналогичный размерный эффект наблюдали и для волокон на основе РС rS1/9 и rS2/12 (рис. 18б). Для волокон с диаметром выше критического (около 500 нм для волокон rS1/9), модуль на изгиб был примерно постоянен $4,8 \pm 1,3$ ГПа и сравним с модулем макроскопических волокон фиброина шелка. Ниже критического диаметра, модуль волокон на изгиб быстро увеличивался с уменьшением диаметра волокна для обоих спидроинов, достигая значения 60-80 ГПа, то есть в 12-16 раз выше значения модуля макроскопических волокон. Обработка волокон этиловым спиртом (рис. 18б, фиолетовые символы) не привела к существенному изменению значения модуля на изгиб, что возможно связано с уже достигнутой высокой степенью ориентации тонких волокон спидроина с диаметром менее критического.

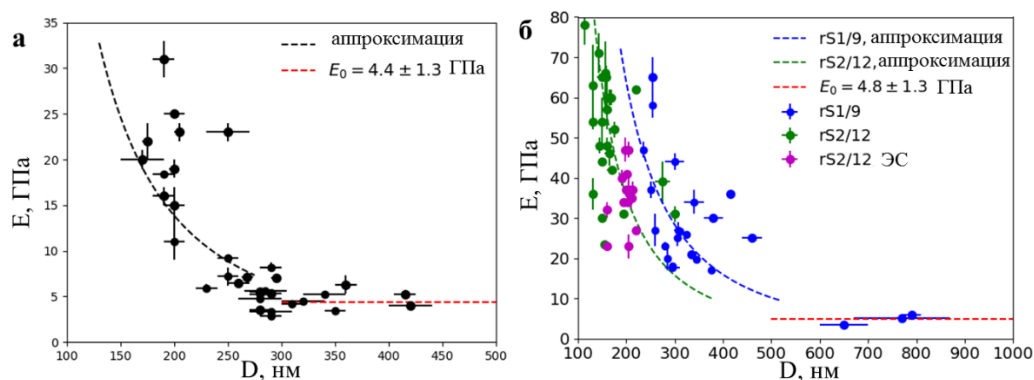


Рисунок 18 – Зависимость модуля на изгиб индивидуальных волокон а) фиброина шелка и б) РС rS1/9 и rS2/12 от их диаметра. Символы – экспериментальные точки для волокон фиброина шелка (черные), рекомбинантного спидроина rS1/9 (синие), rS2/12 (зеленые) и волокон rS2/12 после обработки этиловым спиртом (фиолетовые). Красная пунктирная кривая – значение модуля на изгиб для волокон с диаметром большим критического; черная, синяя и зеленая пунктирные кривые – аппроксимация размерного эффекта для модуля на изгиб для фиброина шелка (черная кривая) и рекомбинантных спидроинов rS1/9 (синяя кривая), rS2/12 (зеленая кривая).

ВЫВОДЫ

1) Аминокислотный состав белка, как и природа растворителя определяют реологическое поведение растворов рекомбинантных спидроинов (РС) rS1/9 и rS2/12. На начальных стадиях выделения белка rS1/9 при концентрации 1 мг/мл раствор представляет собой структурированную жидкость. За счет образования фибриллярных структур и трехмерной сетки зацеплений в ацетатном буфере и воде появляется предел текучести. Структурирование РС rS2/12 наблюдается у растворов после прохождения ионообменной колонки под действием

сдвиговых деформаций.

2) Установлено, что процесс выделения РС требует единый протокол очистки, что обусловлено надмолекулярной структурой белков РС, трансформирующейся от мицеллоподобной к фибриллярной структуре при смене среды и под действием сдвиговых напряжений.

3) Установлено, что водные растворы муравьиной кислоты (МК) с концентрацией РС rS1/9 3 мг/мл проявляют упруговязкое поведение. Упруговязкое поведение и появление предела текучести у растворов РС rS2/12 с теми же концентрациями наблюдается после приложения сдвиговых деформаций и при увеличении концентрации, что связано с изменением формы агрегатов РС от сферических к фибриллярным. В разбавленных водных растворах МК белки образуют агрегаты со степенью агрегации около 10, что приводит к образованию межмолекулярной сетки зацеплений и появлению пределов текучести.

4) Показано, что природа растворителя оказывает влияние на надмолекулярную организацию РС в растворах: в МК наблюдается преобладание фибриллярных структур, в гексафторизопропаноле (ГФИП) – мицеллоподобных, что предопределяет реологическое поведение. В растворах концентрацией 1 мг/мл РС в ГФИП гидродинамический радиус рассеивающих центров составляет 3–4 нм, что указывает на то, что белки находятся в виде индивидуальных макромолекул. Увеличение концентрации до 100 мг/мл приводит к образованию и росту размеров агрегатов. Однако такие растворы являются ньютоновскими жидкостями.

5) Определены оптимальные условия электроформования. Показано, что формование из растворов в ГФИП с обдувкой кончика капилляра парами растворителя позволяет получить бездефектные цилиндрические волокна без использования волокнообразующих добавок. Электроформование из водных растворов возможно только при использовании в составе волокнообразующих полимеров. Получены нетканые волокнистые материалы с диаметром волокон в интервале 100–200 нм.

6) Нетканые и пленочные материалы на основе РС, полученные из водных растворов, характеризуются более высоким содержанием вторичных структур в виде β -листов и более высокой степенью кристалличности чем у образцов, полученных из ГФИП. Обработка материалов на основе исследуемых белков этиловым спиртом позволяет изменить конформацию белков, тем самым дает возможность регулировать свойства полученных материалов.

7) Исследование нетканых материалов методами поляризационной ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа показало наличие ориентации на надмолекулярном уровне в волокне.

8) Методом силовой спектроскопии показано, что модуль изгиба индивидуальных волокон РС, полученных методом электроформования, зависит от типа белка. Обнаружен размерный эффект, проявляющийся в резком увеличении модуля изгиба (на порядок) индивидуальных

волокон PC rS1/9 и rS2/12 при уменьшении их диаметра менее 500–600 нм. При увеличении диаметра модуль изгиба остается постоянным и равен ~ 5 ГПа.

Перспективы дальнейшей работы по теме диссертационного исследования заключаются в получении нетканых волокнистых материалов методом электроформования на основе PC rS1/9 и rS2/12 с регулируемой структурой и свойствами для биомедицинского применения.

Основное содержание диссертации изложено в следующих **публикациях**:

Статьи в журналах

1. Tenchurin T.K. Effect of Recombinant Spidroins Self-Assembly on Rheological Behavior of Their Dispersions and Structure of Electrospun Nanofibrous Materials / T.K. Tenchurin, R.V. Sharikov, S.I. Belousov, D.R. Streltsov, S.N. Malakhov, E.V. Yastremsky, Y.M. Chesnokov, L.I. Davydova, V.G. Bogush, S.N. Chvalun // *Polymers*. – 2023. – V. 15. – №. 14. – P. 3001.
2. Sharikov R.V. Effect of shear on structural organization of various recombinant spidroins / R.V. Sharikov, T.Kh. Tenchurin, S.I. Belousov, D.R. Streltsov, L.I. Davydova, E.V. Yastremsky, V.G. Bogush, S.N. Chvalun // *Macromolecular Symposia*. – 2022. – V. 404. – №. 1. – P. 2100421.
3. Tenchurin T.Kh. Modification of non-woven materials based on sodium alginate for tissue-engineering / T.Kh. Tenchurin, M.M. Pavlovsky, A.D. Shepelev, V.G. Mamagulashvili, V.I. Gomzyak, N.G. Sedush, S.V. Krashenninikov, A.A. Puchkov, S.N. Malakhov, R.V. Sharikov, S.N. Chvalun // *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing. – 2019. – V. 1347. – №. 1. – P. 012072.
4. Тенчури́н Т.Х. Новые перспективные материалы на основе рекомбинантного и регенерированного шелка для медицины и конструкционных тканей / Т.Х. Тенчури́н, Р.В. Шариков, С.Н. Чвалун // *Российские нанотехнологии*. – 2019. – Т. 14. – № 7-8. – С. 3-22.

Тезисы докладов

1. Шариков Р.В., Тенчури́н Т.Х., Камышинский Р.А., Ястремский Е.В. Исследование структурных особенностей рекомбинантных белков спидроина // Тезисы 62-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Москва, 2019. С. 59-60.
2. Шариков Р.В., Тенчури́н Т.Х., Камышинский Р.А. Биополимеры для тканевой инженерии // Сборник тезисов XXI Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Санкт-петербург, 2020. С. X-4.
3. Тенчури́н Т.Х., Белоусов С.И., Шариков Р.В., Чвалун С.Н., Богуш В.Г. Исследование реологических свойств растворов спидроина в гексафторизопропанолe и ацетатном буфере и процесса их электроформования // Сборник тезисов Восьмая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ «Полимеры — 2020». Тверь, 2020. С. 167.

4. Шариков Р.В., Тенчурин Т.Х. Исследование структуры в растворах и нановолокнистых материалах на основе рекомбинантных спидроинов // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020». Москва, 2020. С. 182.
5. Шариков Р.В., Тенчурин Т.Х. Исследование влияния состава растворителя на конформационное состояние спидроина // Труды Всероссийской научной конференции МФТИ. Москва, 2020. С. 31-33.
6. Yastremsky E.V., Kamyshinsky R.A., Tenchurin T.H., Sidoruk K.V., Sharikov R.V., Grigoriev T.E., Chvalun S.N., Vasiliev A.L. Microstructure of Recombinant Spidroin and Spidroin Scaffolds for Tissue Engineering // Book of Abstracts 8th International Bakeev Conference “Macromolecular Nanoobjects And Polymer Nanocomposites“. Moscow, 2020. P. 89.
7. Шариков Р.В., Тенчурин Т.Х., Белоусов С.И., Ястремский Е.В., Чвалун С.Н. Структурные особенности рекомбинантных белков спидроинов // Сборник тезисов VIII Всероссийского молодежного научного форума «Open Science 2021». Гатчина, 2021. С. 155.
8. Тенчурин Т.Х., Шариков Р.В., Ястремский Е.В. Исследование пространственной организации и реологических свойств рекомбинантных спидроинов в различных средах // Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Москва, 2021. С. 52-53.
9. Шариков Р.В., Тенчурин Т.Х., Богуш В.Г. Рентгеноструктурный анализ рекомбинантных спидроинов // Труды 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Москва, 2021. С. 137-138.
10. Sharikov R.V., Tenchurin T.Kh., Belousov S.I., Streltsov D.R., Yastremsky E.V., Bogush V.G., Chvalun S.N. Investigation of recombinant spidroins structural organization // 5th International Conference Polcom 2021 «Progress on Polymers and Composites Products and Manufacturing Technologies». Bucharest, Romania EU, 2021.
11. Шариков Р.В., Стрельцов Д.Р., Малахов С.Н., Тенчурин Т.Х., Давыдова Л.И., Богуш В.Г., Чвалун С.Н. Структура и свойства волокнистых материалов на основе рекомбинантных спидроинов для биомедицины // Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине, Москва, Россия, 2022, С. 259-260.
12. Шариков Р.В., Бакиров А.В., Богуш В.Г., Чвалун С.Н. Исследование структуры биосовместимых материалов на основе рекомбинантных спидроинов // Труды 65-й Всероссийской научной конференции МФТИ в честь 115-летия Л.Д. Ландау, МФТИ, Москва, Россия, 2023, С. 68-69.
13. Шариков Р.В. Исследование структурных свойств нетканых материалов на основе биополимеров // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2023», Москва, Россия, 2023, С. 160.