

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук **Холявка Марины Геннадьевны** на диссертационную работу **Макаровой Анастасии Олеговны** «**Структура и физико-химические свойства белок-полисахаридных гидрогелей, армированных углеродными нанотрубками**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика

В последнее время постоянно увеличивается интерес к исследованию молекулярных аспектов взаимодействия и комплексообразования белков и полисахаридов. В живых системах белки и полисахариды участвуют в формировании супрамолекулярных структур, имеющих специфическую структурно-функциональную нагрузку, формируя уникальную пространственную среду, структурные и физико-химические свойства которой определяют условия функционирования организмов на уровне внеклеточных и межклеточных компартментов живых систем. Фундаментальные исследования межмолекулярных взаимодействий биологических макромолекул и их функциональных супрамолекулярных комплексов являются неотъемлемой частью современной физико-химической биологии и ее составной части – молекулярной биофизики, что позволяет охарактеризовать диссертационную работу А.О. Макаровой как **актуальную**.

Для современной биофизики интерес к системам на основе белков и полисахаридов обусловлен удобством их использования в качестве моделей для экспериментальных и теоретических исследований. Интересным методическим подходом является использование углеродных нанотрубок (УНТ) в качестве «возмущающей» силы, приводящей к модуляции структуры и свойств белок-полисахаридных супрамолекулярных комплексов. Изучение влияния УНТ на модельные биологические системы с использованием большого набора современных экспериментальных биофизических методов позволило получить новую информацию о структуре и свойствах изучаемых комплексов, что позволяет охарактеризовать диссертационную работу как имеющую признаки **новизны**.

Исследование закономерностей структурообразования в системах, содержащих белок и полисахарид, является актуальным для создания гидрогелей с контролируемой структурой, физико-химическими и солубилизационными свойствами, в том числе в присутствии модифицирующих добавок, таких как углеродные нанотрубки (УНТ), которые имеют высокую перспективу **прикладного использования** в различных областях биомедицины и биотехнологии, таких как регенеративная медицина и доставка диагностических и лекарственных средств.

Актуальность темы диссертационного исследования, его теоретическая и практическая ценность, новизна полученных результатов не вызывают сомнений.

Диссертационная работа изложена на 151 странице машинописного текста, включает 62 рисунка и 6 таблиц и оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями. Работа написана ясным и четким языком, построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 235 источников.

Основные положения диссертационной работы и результаты опубликованы в печатных изданиях и прошли апробацию как на всероссийских, так и международных конференциях. Результаты диссертационной работы опубликованы в 25 работах, из них 6 статей в базах *Web of Science* и *Scopus* и 1 статья в рецензируемом научном журнале, рекомендованном ВАК РФ; 18 тезисов докладов в аналитической системе РИНЦ.

Во введении в достаточно четкой форме отражена и обоснована актуальность представленной работы, цели и задачи, показана ее новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обозначен личный вклад автора в проведенном исследовании, указаны сведения об апробации работы.

В первой главе проведен литературный обзор по теме диссертационного исследования, выявлены проблемы в рассматриваемой предметной области, проанализированы основные результаты работ в области формирования полиэлектролитных комплексов на основе белков и полисахаридов, обобщены сведения о белок-полисахаридных гидрогелях, рассмотрена структура и описаны свойства белок-полисахаридных гидрогелей в зависимости от их состава. Обсуждены пути практического применения смесей желатина с ионными полисахаридами, армированными углеродными нанотрубками. В завершающем разделе обзора литературы автор подводит читателя к формулированию цели исследования. Обзор написан хорошо и легко читается, содержит большой массив информации и охватывает значительное количество источников, причем как новейших, так и фундаментальных, прошедших проверку временем.

Во второй главе приведена характеристика объектов исследования, а также дан краткий обзор применяемых автором методов исследования структуры, физико-химических и механических свойств образцов. Соискатель использовал широкий комплекс современных методов исследования и анализа данных, таких как рентгеноструктурный анализ, электронная и атомно-силовая микроскопия, кондуктометрия, реология и другие. Такой широкий набор использованных методов позволил диссертанту полностью выполнить поставленные перед ним задачи.

В третьей главе изложены результаты собственных исследований и их интерпретация. Экспериментальная часть работы начинается с описания объекта исследования и методов, использованных в диссертации. Для достижения поставленных задач автором применялся широкий круг традиционных и современных биофизических подходов. В целом характер изложения материала этой главы предполагает возможность воспроизведения методов при постановке аналогичных экспериментов. Результаты исследований и их обсуждение изложены последовательно и отражают

решаемые автором задачи, раскрывая суть выполненного диссертационного исследования.

Положительным и важным элементом работы является накопление большого массива экспериментальных данных, представленных как на рисунках, так и в весьма подробных таблицах.

Исследования, проведенные в диссертационной работе, позволили получить новую информацию о структуре и свойствах белок-полисахаридных гидрогелей, модифицированных углеродными нанотрубками.

Соискателем глубоко проанализирована качественная и количественная информация о супрамолекулярной структуре гидрогелей к-каррагинан-желатин, а также охарактеризована трансформация структуры гидрогеля, связанная с присутствием УНТ. Показано, что структура, образующаяся в гидрогеле в системе к-каррагинан-желатин в дисперсном состоянии, определяет супрамолекулярную структуру системы в состоянии геля.

Установлено, что включение углеродных нанотрубок в биополимерные композиты заметно усиливает их механические свойства.

Показано, что проводимость комплексов связана со структурой гидрогелей и структурными перестройками в исследованных системах, что подтверждает наличие корреляции между супрамолекулярной структурой гидрогелей и их физико-химическими свойствами.

Проведенные исследования по иммобилизации биологически активных веществ (БАВ) в гидрогелевой матрице показали, что регулировать скорость высвобождения БАВ можно путем выбора катионов металлов при формировании гидрогелей на основе альгината натрия. Установлено, что стабильность гидрогелевых микросфер на основе альгината натрия зависит от значений рН водной среды, а углеродные нанотрубки дают дополнительный модулирующий эффект на процесс иммобилизации и пролонгированный выход исследованных БАВ, включая ферменты, витамины и красители.

Автор также показывает, что взаимодействие фермента с гидрогелевой матрицей зависит от величины и знака электрического заряда его молекулы, определяя эффект пролонгации выхода иммобилизованных ферментов.

Диссертантом охарактеризована цитотоксичность сконструированных гидрогелевых конструкций. Обнаруженные им примеры высокой цитотоксичности поднимают вопрос о необходимости постоянного контроля токсичности для вновь сформированных систем.

Последний раздел диссертационной работы Макаровой А.О. содержит совокупность полученных результатов, представленных в виде основных *выводов* работы.

В целом, работа производит очень хорошее впечатление и содержит элементы научной новизны. Степень достоверности полученных диссертантом научных результатов подтверждена данными многих экспериментов, проведенных с помощью ряда современных физико-химических методов, их методически оправданной постановкой и воспроизводимостью.

Таким образом, в диссертации Макаровой А.О. выполнено решение научной задачи комплексного исследования влияния многостенных углеродных нанотрубок на структуру, физико-химические и солюбилизационные свойства белок-полисахаридных гидрогелей.

Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

К несомненным достоинствам работы можно отнести подробное описание методик исследований, что позволяет легко их воспроизвести, а также корректное сопоставление экспериментальных данных. Необходимо отметить, что диссертация написана системно и логично, полученные автором результаты наглядно проиллюстрированы.

Положительно оценивая работу в целом, следует отметить ряд вопросов и замечаний:

1. Из раздела 2.9 следует, что эксперименты по высвобождению биологически активных соединений (витаминов, БЗ, МО) из сферических структур гидрогеля осуществлялись в водном (не буферном и не солевом) растворе. При этом при проведении экспериментов с гидрогелем в фазовом состоянии (в отличие от сфер) и красителями, витаминами и ферментами в качестве зондов автор использовал 1 М раствор хлорида кальция. Хотелось бы уточнить, чем обусловлены эти методические различия. Вместо содержания зондов в растворе в мг более удачно, на мой взгляд, было бы указать их молярные концентрации.

2. На стр. 113 автору следовало бы указать не только цифровое значение, но и единицы измерения зарядов биназы и липазы при рН 7,4. Из текста диссертации не ясно, влияет ли добавление исследуемых гидрогелей с нанотрубками и без них на рН растворов и, если влияет, то каким образом. Без этой информации не понятно, зачем автор оценивал зарядовые свойства ферментов именно при рН 7,4. О наличии или отсутствии электростатических взаимодействий можно было бы утверждать с большей уверенностью, если провести дополнительный эксперимент по иммобилизации липазы в матрицу гидрогеля в присутствии Тритона X-100 (или другого детергента) и сульфата аммония в различных концентрациях.

3. Раздел «Результаты и обсуждение» украсили бы сведения (возможно из данных литературы) про изменение зарядовых свойств изучаемых автором диссертации гидрогелей и зондов при различном их соотношении, а также в присутствии и в отсутствие нанотрубок. До конца не ясно, почему в диссертации представлены данные, полученные при различных рН среды, только по кинетике высвобождения витаминов из альгинат-желатиновых сфер и не проведены эксперименты для других сочетаний гидрогель-зонд.

4. Раздел 3.9: до конца не понятно, почему не приведены результаты оценки жизнеспособности клеток HeLa и A549 в присутствии УНТ (без добавления белок-полисахаридных гидрогелей) в качестве дополнительного контроля. Может быть, разработанные автором гидрогели могли бы


применяться в перспективе для снижения токсичности наноматериалов медицинского назначения.

Вышеуказанные замечания не снижают научной значимости и достоверности полученных автором результатов. Диссертационная работа Макаровой Анастасии Олеговны является актуальной, имеет внутреннее единство, а также научную и практическую значимость представленных материалов.

Диссертационная работа «Структура и физико-химические свойства белок-полисахаридных гидрогелей, армированных углеродными нанотрубками», соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 года (в редакции Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 г. № 1539), является законченной научно-квалификационной работой. Автор работы, Макарова Анастасия Олеговна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Официальный оппонент:

д.б.н., доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии,
ФГБОУ ВО «Воронежского государственного университета»
(специальность 03.01.02 – Биофизика)

 / Холявка Марина Геннадьевна/

5.09.2022

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1
Тел.: +7(473)220-75-21
E-mail: marinaholyavka@yahoo.com



федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

подпись _____

заверяю _____

подпись, расшрифтовка подписи _____

05.09.22