МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

ЖУЙКОВ Всеволод Александрович

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И ЕГО СОПОЛИМЕРОВ В ПРОЦЕССЕ БИОДЕГРАДАЦИИ *IN VITRO*

03.01.08 - Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН и на кафедре биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. U

научные руковооители	– Бонарцев Антон Павлович				
	кандидат биологических наук				
	Бонарцева Гарина Александровна				
	кандидат биологических наук				
Официальные	– Яминский Игорь Владимирович - доктор физико-				
оппоненты	математических наук, профессор, ведущий научный				
	сотрудник кафедры физики полимеров и кристаллов				
	физического факультета и ведущий научный				
	сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений				
	химического факультета Федерального				
	государственного бюджетного образовательного				
	учреждения высшего образования «Московский				
	государственный университет имени				
	М.В.Ломоносова»; ведущий научный сотрудник				
	лаборатории физической химии полимеров				
	Федерального государственного бюджетного				
	учреждения науки «Институт				
	элементоорганических соединений им.				
	А. Н. Несмеянова Российской академии наук»				
	Максимов Георгий Владимирович - доктор				
	биологических наук, профессор кафедры биофизики				
	биологического факультета, Федерального				
	государственного образовательного учреждения				
	высшего профессионального образования				
	"Московский государственный университет имени				
	М.В. Ломоносова»				
	Ольхов Анатолии Александрович - кандидат				
	технических наук, доцент, ведущии научныи				
	сотрудник лаборатории перспективных				
	композиционных материалов и технологий кафедры				
	химии и физики Федерального государственного				
	оюожетного образовательного учрежоения высшего				
	ооразования «Россиискии экономическии				
	университет имени І.В. Плеханова»				
защита состоится «/» Ноя	оря 2016 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного				
COBETA IVIT 9.03.04 IVIOCK	овского государственного университета имени М.В.				

Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 406. E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/126549643/

Автореферат разослан « » сентября 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук

и.В. Шапоралова 2

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной ИЗ наиболее актуальных проблем В биоинженерии является разработка биоразлагаемых полимерных материалов. Несмотря на активное исследование в течение последних нескольких десятилетий, проблема биодеградации полимерных материалов медицинского назначения не теряет своей актуальности. Непрогнозируемая деградация биополимеров часто ограничивает возможность использования этих материалов для изготовления медицинских изделий. Целый ряд изделий должны обладать способностью к биодеградации. Для различных изделий требования к способности их деградации или, напротив, поддержания их стабильности могут сильно различаться. Например, полимеры, используемые для изготовления постоянных имплантируемых биомедицинских изделий, должны быть стабильными в биологических средах и способными выполнять свои функции в течение всего необходимого срока лечения. С другой стороны, полимеры, применяемые для для биоинженерии, должны разлагаться в течение изготовления имплантатов определенного периода времени, сопоставимого с процессами заживления тканей (от нескольких недель до нескольких лет). Время деградации полимеров, используемых для доставки лекарств, составляет от нескольких дней до нескольких лет. Много усилий сосредоточено на создании полимеров, получаемых из природных источников. Для таких материалов способность к деградации влияет не только на то, каким образом они могут использоваться, но также на то, как их можно производить и обрабатывать.

Период времени, в течение которого биополимер может поддерживать свои функции в период эксплуатации, является наиболее важной мерой его свойств, он называется «функциональным временем». Если полимер входит в состав биоразлагаемого изделия, важно также время, за которое биополимер полностью разрушится и потеряет массу. Это время называется «временем исчезновения». Для успешного использования полимера следует в полной мере контролировать такие характеристики, как функциональное время, время исчезновения, а также анализировать продукты разложения и скорость их высвобождения. При этом, понимание механизмов деградации данного полимера является наиболее важной задачей.

Большое внимание в биоинженерии биодеградируемых материалов уделяется полимерным материалам микробиологического происхождения, в частности поли-3оксиалканоатам (ПОА). Это класс природных полиэфиров, обладающих способностью к биоразложению и биосовместимостью с тканями животных наряду со значительной стабильностью физико-механических свойств в процессе биодеградации. Отличительной особенностью ПОА является возможность существенно варьировать их физикохимические свойства в зависимости от состава. Совокупность уникальных свойств ПОА имеют большую перспективу применения в различных областях биоинженерии и медицины. Настоящая работа посвящена изучению влияния особенностей микробного биосинтеза на физико-химические свойства ПОА и комплексному изучению изменения этих свойств для различных ПОА в процессе их гидролитической и ферментативной деградации, а также выяснению механизмов биодеградации.

3

Цель и задачи работы. Целью данной работы является комплексное изучение изменений физико-химических свойств поли-3-оксибутирата (ПОБ) и его сополимеров в процессе биодеградации *in vitro*. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

• Синтезировать ряд поли-3-оксиалканоатов разного химического строения: поли-3оксибутират различных молекулярных масс (ММ), сополимеры поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата (ПОБВ) разных молекулярных масс и молярного содержания 3оксивалерата (3-ОВ) в цепи сополимера, сополимеры ПОБ с 4-метилвалератом и ПОБВ с полиэтиленгликолем (ПЭГ).

• Изучить физико-химические свойства синтезированных полимеров.

• Провести комплексное исследование изменений физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров в процессе гидролитической и ферментативной деградации in vitro.

• Изготовить прототип полимерного медицинского изделия – пористый скаффолд из ПОБ и исследовать изменение его механических свойств и гидрофильности в процессе ферментативной деградации in vitro.

Научная новизна работы. Впервые проведено комплексное изучение изменения свойств широкого спектра биополимеров, перспективных для применения в тканевой инженерии, относящихся к классу ПОА, имеющих различную молекулярную массу и мономерный состав сополимеров, при их инкубации в натрий-фосфатном буфере и под действием свиной панкреатической липазы. Исследован механизм гидролитической и ферментативной деградации пленок ПОА. С помощью метода наноиндентирования показано изменение механических свойств пленок ПОА в поверхностном слое в процессе их деградации. Показаны изменения таких физико-химических характеристик ПОА, как степень кристалличности, молекулярная масса, степень гидрофильности и их различия в зависимости от условий деградации (гидролитический и ферментативный гидролиз). Приведено математическое описание процесса биодеградации ПОА, позволяющее прогнозировать механизм и кинетику биодеградации ПОА в зависимости от их молекулярной структуры.

Практическая значимость исследования. Полученные результаты об изменении физико-химических свойств различных ПОА являются практически значимыми для развития биоинженерии биодеградируемых материалов и создания на их основе биомедицинских изделий. Разработанные методы важны для определения состава полимеров из данного ряда для использования в биомедицинских изделиях различного назначения, а также для прогноза изменения свойств этих изделий в процессе их эксплуатации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Масса пленок из ПОБ и его сополимеров в процессе деградации в течение 6 месяцев в буферном растворе без и в присутствие липазы снижается незначительно. Молекулярная масса полимеров значительно снижается после инкубации как в фосфатном буфере, так и в фосфатном буфере с добавлением липазы. Наибольшее снижение ММ наблюдается у высокомолекулярных полимеров.

2. В процессе деградации на поверхности пленок ПОБ могут быть выявлены три типа изменений структуры поверхности: проявление новых ламелей, исчезновение части ламелей и фрагментация ламелей на более короткие участки.

3. При гидролитической деструкции волнообразное изменение степени кристалличности полимеров наблюдается в течение 6 месяцев. В отличие от ферментативной деградации, где волнообразного изменения кристалличности после 1 месяца инкубации не наблюдается.

4. Модуль Юнга пленок полиоксиалканоатов, увеличивается в процессе деградации у всех полимеров. Вследствие поверхностной эрозии пленок в процессе ферментативной и гидролитической деградации увеличивается гидрофильность полимеров.

5. Наблюдается разница механизмов деградации при ферментативной И гидролитической деструкции. При гидролитической деградации явление автокатализа Для наблюдается только v 3 разных ΠOA. ферментативной деградации автокаталитический механизм деградации свойственен большинству ПОА, кроме ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768 (явление автокатализа не наблюдается).

6. Содержание более 5,7% 3-оксивалерата в цепи сополимера является критической точкой, которая определяет область изменения структурно-механических свойств сополимера, в частности, степени кристалличности.

7. Пористые скаффолды из ПОБ через 6 месяцев ферментативной деградации сохранили свою целостность и улучшении свои функциональные свойства.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2013 (Москва, 2013), Шестой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры — 2014» (Москва, 2014), VII Международной конференции EuroNanoForum 2015 (Рига, Латвия, 2015), XXVI Российской конференции по электронной микроскопии (РКЭМ-2016) (Зеленоград, 2016), Международной конференции «Materials structure & micromechanics of fracture» (Брно, Чехия, 2016), 11-ом симпозиуме «Поликонденсация 2016» (Москва, 7-й международном 2016), международной конференции «Деформация и разрушения материалов и наноматериалов» (Москва, 2017), Третьем междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы» (Москва, 2017).

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 17 печатных работы (9 статей в рецензируемых журналах, и 8 тезисов докладов).

Личный вклад автора в проведение исследования. Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад заключается в анализе данных литературы, планировании и проведении экспериментов, а также в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарности, списка сокращений и списка цитируемой литературы (170 источника). Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 60 рисунков и 9 таблиц.

5

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовались образцы ПОА, полученные нами в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального Исследовательского Центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Для синтеза полимеров использовали штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б, способный к синтезу до 80 % ПОБ от сухого веса клеток. Коллекционный штамм *A. chroococcum* 7Б поддерживали на среде Эшби. Для достижения максимального синтеза ПОБ в клетках культуру азотобактера выращивали при 30°C в течение 48 часов на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (г/л): MgSO47H₂O – 0,4; FeSO47H₂O – 0,01; Na₂MoO4·2H₂O – 0,006; цитрат Na – 0,5; CaCl₂ –0,1; K₂HPO4·3H₂O – 1,05; KH₂PO4 – 0,2; сахароза – 40. Для синтеза ПОБВ сополимера с разным процентом вхождения валерата в питательную среду было добавлено 20 мМ валериановой кислоты (в виде натриевой соли). Для синтеза сополимера ПОБВ-ПЭГ к среде был добавлен полиэтиленгоиколь в концентрации 150 мМ.

Исследование деградации пленок ПОА *in vitro*. Для измерения гидролитической деградации пленок ПОА пленки инкубировали в 15 мл 10 мМ фосфатного буферного раствора (pH = 7,4) при 37°C в течение 183 дней. Перед взвешиванием пленки промывали дистиллированной водой и высушивали до установления равновесия на весах. Для изучения ферментативной деградации *in vitro* пленки ПОА инкубировали в растворе свиной панкреатическогой липазы (Type II, Sigma Aldrich A=30-90 U/mg белка, используя триацетин) в концентрации 0,25 мг/мл в 10 мМ фосфатном буферном растворе (pH = 7,4) при 37°C в течение 183 дней. В буферный раствор добавляли 2 г/л азида натрия (NaN₃) для ингибирования роста микроорганизмов и предотвращения их влияния на биодеструкцию. Замену буфера в пробирках производили дважды в неделю. Для измерения веса полимера, пленки вынимали из раствора и сушили до установления равновесия на весах. Перед измерениями пленки обрабатывали 0,1% SDS в дистиллированной воде в течение 2 часов, отмывали детергент водой и затем высушивали.

Определение молекулярной массы ПОА. Молекулярную массу полимеров определяли методом вискозиметрии. Измерения вязкости растворов ПОА в хлороформе проводили при 30°С. Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка-Хаувинка-Куна.

Исследование состава полимера методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры ¹Н-ЯМР 1-2% растворов ПОБ и его сополимеров в дейтерированном хлороформе были исследованы на спектрометре MSL-300 "Bruker" (Германия).

Изготовление пленок ПОА. В качестве объектов в работе выступали пленки двух типов: макроскопические и ультратонкие. Для изготовления макроскопических пленок ПОА раствор хлороформа с полимером (1,2%) выливали на дно стеклянной чашки Петри и оставляли на воздухе до полного испарения растворителя. Толщину пленок измеряли с

помощью микрометра (Etari E110, Германия). Средняя толщина пленок составляла 50±10 мкм.

Ультратонкие пленки готовили методом нанесения полимера на вращающуюся подложку (spin-coating). ПОБ наносили на слюду из раствора в хлороформе с концентрацией 0,5 мг/мл и объемом 50 мкл. Частота вращения подложки составляла ω =3000-5000 об/мин.

Изготовление пористых скаффолдов из ПОА. Скаффолды изготавливали модифицированным выщелачивания. Эта модификация методом основана на температурном разложении твердой соли, в то время как стандартный метод подразумевает вымывание соли растворителем. Раствор полимера смешивали с порошком бикарбоната аммония (Химмед, Россия) в соотношении 10:1 по массе и тщательно перемешивали шпателем. Размеры частиц соли варьировали в диапазоне 100-300 мкм. Смесь помещали в стеклянную чашку Петри и оставляли при комнатной температуре до полного испарения органического растворителя (2-3 часа). После этого форму помещали в горячую дистиллированную воду (70°С) до полного прекращения газообразования, промывали дистиллированной водой 5 раз и высушивали при 37°С в течение суток.

Исследование морфологии поверхности пленок ПОА методом атомно-силовой микроскопии. Исследование морфологии и процесса кристаллизации пленок осуществлялось на микроскопах Solver PRO и Smena фирмы ЗАО «Нанотехнология МДТ» (Россия, Зеленоград). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе. Для проведения измерений методом ACM при заданной температуре использовали термостолик атомно-силового микроскопа SU045NTF. ACM-изображения обрабатывали с помощью программ Nova (ЗАО «Нанотехнология МДТ») и FemtoScan Online (ЗАО «Центр Перспективных Технологий»).

Исследование физико-термических свойств пленок ПОА. Физико-термические свойства пленочных образцов ПОА, в частности, степень их кристалличности были исследованы методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (DSC 204 F1 Phoenix, Netzsch, Германия). Образцы нагревали с 25 до 220°С при скорости нагрева 10 К/мин в атмосфере аргона. Кристалличность структуры ПОБ (X_c) была рассчитана по формуле:

 $X_c = (\Delta H_m) / \Delta H^0_m (\Pi O \overline{B}) \times 100\%$, где $\Delta H_m - изменения энтальпии, вызванное плавлением исследуемого образца, соответственно, <math>\Delta H^0_m (\Pi O \overline{B})$ - теоретическое значение энтальпии плавления, которое было бы получено для 100%-кристаллических образцов ПОБ (146,6 Дж/г). Все расчеты проводились для второго цикла нагрева.

Определение модуля Юнга. Изучение механических свойств пленок проводили, используя метод наноиндентирования в соответствии с рекомендациями ISO 14577 на приборе сканирующий нанотвердомер NanoScan-4D (ФГБНУ ТИСНУМ, Троицк, Москва, Россия). Загрузка осуществлялась в линейном режиме, пиковая нагрузка на образец составляла 5 мН. Время нагрузки было равно времени разгрузки и составляло 30 секунд. Пиковая нагрузка поддерживалась в течение 5 секунд. Средняя глубина проникновения в образец составляла 1 мкм. Механические свойства усреднялись по 6 измерениям.

Механические свойства скаффолдов измеряли с помощью реометра Anton Paar MCR-302 (Австрия). Образцы сжимали, используя геометрию плита-плита. Получившиеся графики зависимости нормальной силы от зазора между плитами обрабатывали и строили зависимости давления от относительной деформации. Модуль Юнга находили по тангенсу угла наклона линейного участка кривой.

Измерение контактного угла смачивания водой пленок ПОА. Измерения производили на цифровом угломере - системе анализа формы капли Contact Angle Meter 110 VAC (Cole-Parmer, CША). Контактный угол измеряли для 8 капель при температуре 25° С, и высчитывали среднее значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез ПОА и его сополимеров. Разработана методика биосинтеза как гомополимера ПОБ, так и различных сополимеров ПОБ с использованием подхода добавления в культуральную среду дополнительных источников углерода – предшественников новых мономеров для синтеза сополимеров ПОБ.

Проведен подбор параметров, анализ и оптимизация условий биосинтеза ПОБ и его сополимеров с целью получения полимеров с различными характеристиками: содержанием мономеров в цепи сополимера и молекулярной массой. Если использовать сахарозу в качестве единственного источника углерода для синтеза биополимера, то *A.chroococcum* 7Б образует высокомолекулярный ПОБ. Продемонстрировали, что добавление ацетата натрия в различных концентрациях (от 10 до 100 мМ) при использовании сахарозы в качестве основного источника углерода и при оптимальных параметрах биосинтеза приводило не только к уменьшению выхода биомассы и содержания полимера в клетках, но и к уменьшению молекулярной массы синтезированного *A.chroococcum* 7Б ПОБ.

Для улучшения физико-химических и биомедицинских свойств ПОБ в культуральную среду были добавлены соли валерата и пропионата, что привело к биосинтезу сополимера ПОБВ с отличающимися физико-механическими свойствами, а также синтетические полимеры, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), в качестве предшественника мономеров для биосинтеза сополимеров ПОБ. В таблице 1 суммированы данные о параметрах биосинтеза биополимеров штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7B, растущего в культуральной среде с сахарозой в качестве основного источника углерода и различных дополнительных источников углерода: ацетата натрия (АН); натриевых солей валериановой (пентановой) и 4-метилвалериановой кислот и ПЭГ 300.

Таким образом, варьирование концентрации основного источника углерода и добавлении дополнительных источников приводит к возможности синтеза разнообразных полиоксиалканоатов, обладающих различными физико-химическими свойствами.

8

Таблица 1. Параметры биосинтеза и основные характеристики синтезируемых ПОБ и ПОБВ штаммом-продуцентом А. chroococcum 7Б в культуральной среде с сахарозой в качестве основного источника и добавлением ВК и АН.

Субстрат	Время до- бавления ВК или АН в культураль- ную среду, часы	Урожай биомас- сы, г/л сре- ды	Содержа- ние ПОА в био- массе, % от су- хого веса клеток	Молекуляр- ная масса ПОА, ×10 ⁶ Да	Содержание 3ОВ/3ОБ в сополимере, мол. %	Обозначение полученного полимера
Сахароза, 50 мМ (С)	-	5,8±0,6	83,4±3,1	1,09	0	ПОБ 1095
С+35 мМ АН	0	4,3±0,5*	71,7±3,2*	0,364	0	ПОБ 364
С + 100 мМ АН	0	1,9±0,6*	58,8±3,6 *	0,1	0	ПОБ 105
С + 5 мМ ВК	12	4,4±0,9*	76,2±3,0*	1,22	2,5	ПОБВ 2,5% 1224
С + 10 мМ ВК + 20 мМ АН	12/0	3,6±0,9*	71,4±3,5*	0,82	5,9	ПОБВ 5,9% 1253
С + 10 мМ ВК	12	4,2±0,5*	73,8±3,7*	1,39	9,0	ПОБВ 9% 1385
С+20 мМ ВК	0	3,2±0,4*	67,7±3,0*	0,82	9,0	ПОБВ 9% 850
С + 20 mM BK + 60 мM АН	12/0	2,6±0,3*	49,5±3,2*	0,21	9,6	ПОБВ 9,6% 210
С+35 мМ ВК + 50 мМ АН	12/0	2,6±1,4*	65,8±4,5*	0,22	17,6	ПОБВ 17,6% 220
С+20 мМ ВК + 20 мМ АН	12/0	3,4±1,1*	68,7±4,3*	0,635	17,6	ПОБВ 17,6% 635
C + 20 mM BK	9	3,5±0,6*	69,8±4,1*	1190	17,6	ПОБВ 17,6% 1190
С+20 мМ 4МВК	12	3,4±0,9*	76,7±3,3*	1,30	0,60	ПОБ-4МВ 1360
С+20 мМ ВК+ 150 мМ ПЭГ 300	12/0	2,6	49,5	0,219	4,69 - 3-ОВ 0,15 - ПЭГ	ПОБВ-ПЭГ 290

* p<0,05 при сравнении с группой "Сахароза", n = 8.

Исследование физико-химических свойств пленок из ПОА. В работе провели сравнительный анализ физико-химических свойств синтезированных полимеров. В таблице 2 приведены результаты исследования пленок ПОБ и его сополимеров методами дифференциальной сканирующей калориметрии, наноиндентирования, вискозиметрии и измерения контактного угла смачивания водой.

Образец	ММ, кДа	Tc,°C	T _m ,°C	Е, ГПа	Xc, %	Контактный угол, °
ПОБ 105	105	74	152/168	2,2±0,05	66	59±2,5
ПОБ 364	364	87	159/176	2±0,02	65	60±2,8
ПОБ 1095	1095	80	154/170	2,2±0,06	63	59±3
ПОБВ 2,5% 768	768	88	157/170	1,3±0,03	60	66±3,4
ПОБВ 5,9% 819	819,5	81	155/167	0,3±0,05	51	65±2
ПОБВ 9% 850	850	77	151/165	1,3±0,04	47	70±4,4
ПОБВ 9% 1010	1010	70	155/166	1±0,03	44	64±3,6
ПОБВ 9,6% 320	320	60	134/149	$1,4\pm0,05$	41	68±4,3
ПОБВ 17,6% 220	220	75	149/162	1,2±0,02	42	67±4,5
ПОБВ 17,6% 635	635	74	151/166	0,7±0,01	41	63±3
ПОБВ 17,6% 1190	1190	69	154/169	0,4±0,04	34	62±2
ПОБВ-ПЭГ 290	290	75	153/175	2±0,3	60	63±3,9
ПОБ-4МВ 1340	1340	73	145/157	1,3±0,05	49	63±1,5

Таблица 2. Физико-химические свойства пленок ПОА (погрешности представлены в виде ± стандартное отклонение).

Как видно из таблицы, включение в цепь гомополимера других полимеров оказывает влияние на гидрофильные свойства полимера. Наиболее гидрофильные из всех 13 полимеров – гомополимеры ПОБ 105, ПОБ 364 и ПОБ 1095, чьи контактные углы равны 59±2,5°, 60±2,8° и 59±3° соответственно. У сополимеров контактный угол смачивания увеличиваются, например, контактный угол ПОБВ 9% 850 равен 70±4,4°, что говорит о том, что увеличивается гидрофобность пленок таких полимеров (различия статистически значимы (уровень значимости р <0,05) при сравнении гомополимеров и сополимеров).

Включение 3-ОВ в цепь полимера также влияет и на модуль Юнга исследуемых образцов. Видно, что включение в цепь мономеров 3-ОВ снижает жесткость гомополимера. Так, модуль Юнга у ПОБ 1095 составлял 2,2 ГПа, а при включении 17,6% 3-ОВ он упал до 0,4 ГПа (Рисунок 1 А). Также обнаружено, что модуль Юнга падает при увеличении ММ у сополимера ПОБВ 17,6% (Рисунок 1 Б). Однако не удалось обнаружить такую же зависимость модуля Юнга от ММ при изменении ММ у гомополимера ПОБ.



Рисунок 1. Изменение модуля Юнга пленок ПОА в зависимости от молярного содержания 3-ОВ в цепи полимера (А) и при варьировании ММ (Б).

Степень кристалличности сополимеров ПОБВ ниже, чем у гомополимеров и сополимера ПОБВ-ПЭГ. Также важно отметить, что степень кристалличности уменьшается при увеличении содержания 3-ОВ, этот параметр убывает в ряду: ПОБ 1095 > ПОБВ 2,5% 768 > ПОБВ 5,9% 819 > ПОБВ 9% 850 > ПОБВ 9% 1010 > ПОБВ 17,6% 1190, причем кристалличность падает почти в два раза с 63% до 34% (Рисунок 2 А).



Рисунок 2. Изменение степени кристалличности ПОА в зависимости от молярного содержания 3-OB в цепи полимера (А) и при варьировании ММ (Б).

Эти данные согласуются с результатами, описанными в литературе (Sudesh K. et al., 2010). Также были обнаружены зависимости, показывающие, что MM влияет на степень кристалличности ПОА – кристалличность падает при увеличении MM как у ПОБ, так и ПОБВ 17,6%.

Изменение физико-химических свойств ПОА в процессе деградации in vitro

Изменение степени кристалличности пленок ПОА. По своей структуре полиоксиалканоаты относятся к частично-кристаллическим полимерам. Частично-кристаллические полимеры – полимеры, в которых помимо аморфной компоненты присутствует кристаллическая компонента. Для ПОА характерна высокая степень кристалличности – 55-80%. Степень кристалличности сильно влияет на скорость деградации полимера (K. Sudesh et al., 2000).

Результаты по изменению кристалличности и других физико-химических параметров проще анализировать, если исследуемые полимеры будут иметь общий параметр. Поэтому результаты биодеградации ПОА представлены двумя группами: 1) высокомолекулярные ПОА с разным молярным содержанием 3-оксивалерата и 2) ПОА с разными молекулярными массами, но одинаковым составом.

На рисунке 3 представлены графики изменения степени кристалличности ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в сополимере ПОБВ в буферном растворе без и в присутствии липазы в течение 6 месяцев. При сравнении данных графиков можно констатировать, что в начальный период времени изменение кристалличности в разных растворах схоже. В обоих случаях в период до 1 месяца наблюдаются достаточно сильные изменения степени кристалличности образцов. Наблюдается, как рост (ПОБВ 17,6% 1090 в буферном растворе без и в присутствии липазы), так и падение степени кристалличности (ПОБВ 2,5% 768 в буферном растворе) (Рисунок 3).



Рисунок 3. Изменение степени кристалличности высокомолекулярных ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ в процессе деградации в буферном растворе без (А) и в присутствии липазы (Б) в течение 6 месяцев. 1 – ПОБ 1095, 2 – ПОБВ 2,5% 768, 3 – ПОБВ 5,9% 819, 4 – ПОБВ 9% 1010, 5 – ПОБВ 17,6% 1190.

Предполагается, что начальное увеличение степени кристалличности связано с процессом рекристаллизации аморфных участков в полимерах, а снижение степени кристалличности – с разрывами цепи, происходящих в кристаллических участках полимеров (J. Han et al., 2017). Далее при инкубации в буферном растворе без и в присутствии липазы в течение 6 месяцев на графиках наблюдаются существенные различия. Так при инкубации ПОА в буферном растворе в промежутке от 1 до 6 месяцев наблюдается волнообразное колебание степени кристалличности.

При ферментативной деградации волнообразного изменения кристалличности не отмечено, однако видна четкая тенденция уменьшения степени кристалличности в зависимости от молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ, кроме того, изменяется наклон кривых (значения tgα на рисунке 3 Б), то есть при деградации кристалличность ПОБ 1095 растет к 6 месяцу, однако, кристалличность ПОБВ 17,6% 1090 к 6 месяцу падает.



Рисунок 4. Влияние молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ на изменение степени кристалличности сополимеров в течение деградации в растворе липазы в течение 6 месяцев в координатах зависимости тангенса угла наклона от времени инкубации.

Благодаря этой тенденции было вычислено значение молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ, которое начинает оказывать влияние на структурно-механические свойства всего полимера, приводящие к разложению полимера преимущественно уже по иному механизму (Рисунок 4). Из рисунка видно, что после инкубации в растворе липазы, к 6 месяцу деградации степень кристалличности будет снижаться, если молярное содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ будет больше 5,7%. Данный параметр важен для конструирования материалов с заданной скоростью деградации.

Изменение модуля Юнга пленок ПОА. Изменение степени кристалличности тесно связано с изменением модуля Юнга образцов. Модуль Юнга или жесткость образца – один из важнейших параметров, который необходимо учитывать при изготовлении изделий из биосовместимых и биоразлагаемых полимеров. Изделия из таких полимеров должны иметь не только определенные механические свойства, но и сохранять их в процессе эксплуатации.

Ранее была найдена закономерность, показывающая, что модуль Юнга уменьшается с увеличением молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ. Используя в качестве примера данные полимеры, рассмотрим, как изменятся их жесткость в процессе деградации (Рисунок 5).



Рисунок 5. Изменение модуля Юнга высокомолекулярных ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ (А) и разной ММ (Б) в процессе деградации в растворе панкреатической липазы в течение 6 месяцев.

На графике виден резкий рост модуля Юнга в первую неделю инкубации для всех образцов. После сильного роста в начале эксперимента модуль Юнга достигает относительного плато и в течение 6 месяцев инкубации изменяется незначительно. Также можно отметить важную тенденцию – при увеличении молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ модуль Юнга снижается. При варьировании ММ при одинаковом составе полимера зависимостей не наблюдалось (Рисунок 5 Б). При деградации в растворе натрий-фосфатного буфера наблюдаются похожие изменения. Таким образом, при биодеградации в условиях, симулирующих внутреннюю среду организма, модуль Юнга ПОБ, его сополимеров с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ и разных ММ сохраняют свои механические свойства в течение 6 месяцев.

Изменение массы пленок ПОА. Одним из показателей деградации полимеров является изменение массы изделия. Внешне за 6 месяцев инкубации пленки из ПОБ и его сополимеров не изменились. Изменения затронули только низкомолекулярный ПОБ 105 – к 6 месяцу пленки из данного полимера распались на несколько частей. Масса пленок ПОА, инкубируемых в буферном растворе не показала значительных изменений в течение 6 месяцев (Рисунок 6).



Рисунок 6. Изменение массы пленок высокомолекулярных ПОА с разным процентом вхождения 3-ОВ в цепь полиоксибутирата (А) и разной ММ (Б) в процессе деградации в растворе натрий-фосфатного буфера в течение 6 месяцев.

Следует, однако, заметить, что основное падение массы наблюдается за первую неделю. Предполагается, что за это время происходит растворение и вымывание олигомеров в полимере, что и приводит к снижению массы.

Результаты изменения массы образцов в растворе панкреатической липазы выглядят аналогичным образом (Рисунок 7).



Рисунок 7. Изменение массы пленок высокомолекулярных ПОА с разным процентом вхождения 3-ОВ в цепь полиоксибутирата (А) и разной ММ (Б) в процессе деградации в растворе фосфатного буфера с добавление липазы в течение 6 месяцев.

В буферном растворе, а также в буферном растворе с добавлением липазы, масса пленок ПОА изменилась незначительно. Основное снижение массы происходило на первой неделе разложения, например, масса пленок ПОБВ 2,5% 768 снизилась на 7%. Дальнейшая инкубация пленок в растворе липазы не привела к значительным изменениям массы. В результате инкубации в растворе липазы пленки только низкомолекулярного ПОБ 105 потеряли до 10% массы и так же, как и при гидролитической деградации распались на небольшие кусочки. Однако небольшое различие между гидролитической и ферментативной деструкцией все же есть, а именно: потеря массы всех пленок ПОА в растворе буфера с липазой в среднем на 2% больше по сравнению с изменением массы в растворе буфера.

Изменение молекулярной массы пленок ПОА. Молекулярная масса является одним из важнейших параметров полимеров. При изучении деградации биополимеров молекулярной массе уделяется большое внимание ввиду того, что данный параметр оказывает влияние на другие свойства биополимеров. Кроме того, именно по снижению молекулярной массы принято судить о процессе деградации полимера.

Сравнивали изменения ММ полимеров ПОБ и ПОБВ 9% с различными начальными ММ (Рисунок 8 А). Наиболее значительная потеря ММ наблюдалась у ПОБ 1095 – на 79%, причем наибольшая потеря ММ наблюдается за первую неделю – 43%. Возможно, это связано с большей долей аморфной компоненты в полимере, которая деградирует в 20 раз быстрее, чем кристаллическая. Можно заметить, что теряют высокомолекулярные полимеры молекулярную массу быстрее, чем низкомолекулярные. Видно, что у ПОБ 1095 и ПОБВ 9% 1010 молекулярная масса снижается быстрее, чем у ПОБВ 9% 850 и ПОБ 364, а у них, в свою очередь, быстрее, чем у ПОБ 105 и ПОБВ 9,6% 320 (Рисунок 8 А). Вероятно, это объясняется тем, что длинные

15

цепи полимеров менее склонны к образованию ламелей, таким образом, такие цепи более уязвимы для молекул воды, а, соответственно, и для гидролитического расщепления сложноэфирных связей, что соответствует данным других исследований деградации ПОА (Kanmani P. Et all., 2016).



Рисунок 8. Изменение молекулярной массы ПОБ и сополимеров ПОБВ 9% с различными ММ (А) и высокомолекулярных ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ (Б) в процессе гидролитической деградации в течение 6 месяцев.

Далее рассмотрели изменения ММ высокомолекулярных ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ. Закономерностей в зависимости молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ не отмечено (Рисунок 8 Б). Лишь два полимера в данной группе за первую неделю увеличили свою ММ – ПОБВ 17,6% 1190 и ПОБВ 5,9% 819. Это, вероятно, связано с тем же эффектом, что наблюдался и раньше – вымывание низкомолекулярных цепей из полимерной матрицы. При этом средняя ММ может немного повышаться. В итоге, состав полимера, вероятно, не влияет на изменение молекулярной массы в процессе гидролитической деструкции.

При анализе кривых, соответствующих изменению MM В процессе ферментативного гидролиза, наблюдается схожая картина с той, что была получена по результатам анализа пленок ПОА, инкубированных в растворе буфера в течение 6 месяцев (Рисунок 9). Полученные данные указывают на то, что падение молекулярной массы быстрее высокомолекулярных ΠΟΑ, также происходит y нежели чем y низкомолекулярных полимеров.

16



Рисунок 9. Изменение молекулярной массы ПОБ и сополимеров ПОБВ 9% с различными ММ (А) и высокомолекулярных ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ (Б) в процессе ферментативной деградации в течение 6 месяцев.

Анализ данных по изменению ММ ПОА позволяет предположить механизм деградации полимеров. Оценить, какая модель характерна для деградации исследуемых полимеров, можно по коэффициентам корреляции, посчитанным для графиков зависимости 1/ММ и ln(MM) от времени деградации. Если эти соотношение верны, то должна существовать линейная зависимость между 1/ММ или ln(MM) и временем, вплоть до полной потери массы. Ниже приведены графики, полученные в результате математической обработки данных по снижению ММ в буферном растворе (Рисунок 10 А и Б).



Рисунок 10. А – Модель не автокаталитической деградации и Б – автокаталитической деградации. 1 – ПОБ 1095, 2 – ПОБВ 2,5% 768, 3 – ПОБВ 5,9% 819, 4 – ПОБВ 9% 1010, 5 – ПОБВ 17,6% 1190.

На рисунке 10 А видно, что анализируемые кривые располагаются в соответствии с увеличением молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ. Проанализировав данную тенденцию и построив график в зависимости от угла наклона данных кривых, получаем точку перегиба (Рисунок 11).



Рисунок 11. График зависимости изменения угла наклона кривых некаталитической модели от % вхождения 3-оксивалерата в цепь гомополимера.

Данная точка соответствует 5,9% вхождения 3-OB, что близко к значению, полученному ранее при анализе изменения степени кристалличности – 5,7%. Это подтверждает, что включение 3-OB в количестве от 5,7% оказывает влияние на весь полимер, изменяя его структурно-механические свойства.

Подсчитав коэффициенты корреляции, полученные при построении моделей, получаем следующие результаты: более высокие коэффициенты корреляции для модели некаталитического механизма деградации, полученные из зависимости изменения 1/ММ от времени, показывают, что деградация идет по некаталитическому механизму деградации в случае гидролитической деградации (Таблица 3).

Однако коэффициенты, соответствующие автокаталитической модели в случае гидролитической деградации сопоставимы с коэффициентами для некаталитической модели только для трех полимеров - ПОБ 105, ПОБ 364, ПОБВ 9% 850. Отсюда следует, что автокатализ при гидролитической деструкции происходит только у 3 полимеров из 13. В случае ферментативной деградации применение моделей может дать ответ на вопрос о наличии или отсутствии вклада автокатализа реакции деградации. Коэффициенты корреляции для автокаталитической модели высокие уже для 11 полимеров (кроме ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768). Сопоставимые друг с другом коэффициенты указывают на то, что нельзя четко различить эти два механизма для данных полимеров (Таблица 3). Таким образом, воздействие липазы приводит к тому, что автокаталитический механизм деградации начинает принимать большее участие в процессе разложения полимеров по сравнению с гидролитической деструкцией.

05	Деградация в р фосфатного буб мес	растворе 0,01 М рера в течение 6 яцев	Деградация в растворе панкреатической липазы в течение 6 месяцев		
Образец	R^2 (He R^2		R ² (не	\mathbb{R}^2	
	автокаталитиче	(автокаталитич	автокаталитическая	(автокаталитическая	
	ская модель)	еская модель)	модель)	модель)	
ПОБ 105	0,94	0,93	0,92	0,91	
ПОБ 364	0,99	0,98	0,99	0,99	
ПОБ 1095	0,88	0,68	0,95	0,83	
ПОБВ 2,5% 768	0,99	0,93	0,93	0,88	
ПОБВ 5,9% 819	0,96	0,89	0,92	0,90	
ПОБВ 9% 850	0,92	0,90	0,99	0,98	
ПОБВ 9% 1010	0,96	0,90	0,99	0,97	
ПОБВ 9,6% 320	0,80	0,77	0,96	0,95	
ПОБВ 17,6% 220	0,98	0,95	0,96	0,95	
ПОБВ 17,6% 635	0,98	0,94	0,94	0,92	
ПОБВ 17,6% 1190	0,97	0,93	0,97	0,95	
ПОБВ - ПЭГ 290	0,92	0,83	0,96	0,95	
ПОБ-4МВ 1340	0,97	0,91	0,99	0,98	

Таблица 3. Коэффициенты корреляции автокаталитической и не автокаталитической моделей деградации ПОА.

Изменение морфологии поверхности пленок ПОА. Изменение морфологии поверхности пленок ПОА было исследовано методом атомно-силовой микроскопии (ACM). Отличительная особенность данного эксперимента в том, что изменение надмолекулярных структур полимера наблюдали на одном и том же участке в течение всего эксперимента (1 месяц).

В процессе ферментативного расщепления ПОБ обнаружено три морфологических изменения: появление новых ламеллярных структур, фрагментация ламеллярных структур, исчезновение ламеллярных структур. Для лучшей детализации выбраны и выделены определенные участки поверхности одной и той же пленки.

Первый наблюдаемый эффект разложения – исчезновение ламеллярных структур. На рисунке 12 представлено изображение одного и того же участка пленки ПОБ до (А) и после обработки липазой (Б) в течение месяца. На пленке ПОБ до обработки липазой был найден участок, имеющий в своем составе надмолекулярную структуру, интерпретированную нами, как стопка ламелей. Как видно на рисунке 12 (*), после

гидролиза липазой эта структура сильно изменилась: большая часть ламелей исчезли, оставшиеся сильно фрагментировалась. Причина исчезновения ламелей, вероятно, заключается в наличии большого количества дефектов в их структуре.

Второе наблюдаемое изменение в морфологии – фрагментация ламеллярных структур. На рисунке 12 (**) выделенная область содержит систему параллельных полос – ламелей. После обработки липазой видно, что ламели фрагментируются. Объяснение данного явления также заключается в фрагментации кристаллической компоненты из-за присутствующих в ней дефектов.

Третье морфологическое изменение – появление новых ламеллярных структур. На рисунке 12 (***) стрелкой показана протяженная структура, которая может быть интерпретирована как одиночная ламель. После обработки липазой она становится более заметной, кроме того, справа проявляется еще одна ламель. Данные изменения в морфологии пленки объясняется разложением аморфной компоненты на поверхности пленки, обнажая кристаллические структуры, находящиеся под ним.



Рисунок 12. Топографическое и фазовое изображение пленки ПОБ до гидролиза липазой (А) и после (Б). На изображении выделена и отконтрастированы области, соответствующие исчезновению части ламелей (*), фрагментации ламелей (**) и появлению новый ламелей (*).

Изменение гидрофобности пленок ПОА. В свою очередь, баланс между гидрофобностью и гидрофильностью поверхности является одним из главных параметров, указывающих на биосовместимость поверхности, определяющей биомедицинское использование полимеров.

В процессе деградации, как в случае ферментативной, так и при гидролитической, уменьшается контактный угол между каплей дистиллированной воды и поверхностью пленки полимера, что свидетельствует о снижении степени гидрофобности исследуемых полимеров (Рисунок 13). Увеличение гидрофильности поверхности пленок полимеров, вероятно, связано с тем, что деградация пленок ПОА приводит к расщеплению полимеров на её поверхности с высвобождением полярных концевых групп. При анализе графиков изменения контактного угла от процента вхождения 3-оксивалерата и от молекулярной массы полимера не удалось обнаружить зависимостей. Контактный угол снижается для всех групп полимеров.



Рисунок 13. Изменение контактного угла на границе вода/пленка ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ (А, В) и ПОБ и сополимеров ПОБВ 9% с различными ММ (Б, Г) в процессе ферментативной деградации (А, Б) и гидролитической деградации (В, Г) в течение 6 месяцев.

При биодеградации под действием липазы пленки из ПОБ 105 и ПОБ 365 показали наибольшее снижение контактного угла – на 31% и 29% против 13% и 14% при гидролитической деструкции, соответственно. В целом, при биодеградации контактный угол всех сополимеров снизился в среднем на 22% против 17% при гидролитической деструкции. Факт большего снижения контактного угла, а как следствие повышение гидрофильности пленок, можно объяснить действием липазы. Молекулы липазы дополнительно к молекулам воды атакуют полимерные цепочки, расположенные на поверхности полимеров, высвобождая полярные концевые группы. Таким образом, липаза ускоряет поверхностную эрозию, делая поверхность более гидрофильной. В литературе присутствуют данные, где посредством такой реакции авторы делали поверхность ПОА более привлекательной для роста клеток, что немаловажно для последующей имплантации в живой организм (X. Yang et al., 2002).



Дефекты в структуре

Рисунок 14. Модель разложения ПОА в растворе липазы.

На основании полученных результатов можно предложить следующую модель деградации ПОА в буферном растворе в присутствии липазы (Рисунок 14). Получаемые нами полимеры всегда содержат кристаллическую и аморфную компоненту. При инкубировании пленок ПОА в растворе буфера с липазой происходит растворение олигомеров, что приводит к снижению массы полимеров. Затем, молекулы воды и липазы атакуют сложноэфирные связи, образуя разрывы в цепи. При этом происходит снижение молекулярной массы полимеров. Затем образовавшиеся высоколабильные концевые участки полимерных цепей кристаллизуются, что является причиной роста степени кристалличности ПОА. Одновременно с этим молекулы воды и липазы атакуют дефекты кристаллической компоненты, также разрушая её.

Изменение свойств матриксов в процессе деградации. Изучение изменений свойств материала на примере модельного объекта позволяет сделать вывод о допустимости применения данных материалов в конструировании скаффолдов для тканевой инженерии. Поэтому следующим шагом комплексного изучения ПОА является изучение изменения таких свойств скаффолдов из ПОА, как модуль Юнга на сжатие и водопоглощение в процессе деградации. Данные свойства являются одними из важнейших свойств будущего изделия, так как под механическими свойствами понимается способность изделия сохранять свою структуру и эксплуатационные свойства, а водопоглощение – показатель способности тканям и физиологическим жидкостям проникать в структуру изделия.

Для решения данной задачи были сконструированы скаффолды из ПОБ 315, который по свойствам не отличается от рассматриваемого ранее ПОБ 364, и полилактида (ПЛА). Все они имели диаметр 24±1 мм и высоту в диапазоне 2–3,3 мм. Для изучения изменения свойств образцы помещали в раствор 0,01 М фосфатного буфера с добавлением липазы при условиях аналогичным тем, при которых исследовалась деградация пленок из ПОА.

В результате деградации в растворе фосфатного буфера с добавлением липазы за первую неделю скаффолды из полилактида разложились на отдельные составляющие, тогда как скаффолды из ПОБ 315 через 6 месяцев полностью сохранили свою целостность, а их модуль Юнга вырос примерно в 3,5 раза. Водопоглощение к 6 месяцу деградации выросло почти в 4 раза, что говорит о многократном увеличении гидрофильности скаффолда. Это способствует созданию более благоприятных условий для роста ткани (Таблица 4).

Таблица 4. Изменение свойств скаффолдов их ПОА в процессе деградации в течение 6 месяцев.

	До инкубировани	я в фосфатном	После инкубирования в фосфатном		
Образцы	буфере с добавле	ением липазы	буфере с добавлением липазы		
скаффолдов	Водопоглощение,	Модуль Юнга,	Водопоглощение,	Модуль Юнга,	
	%	кПа	%	кПа	
ПОБ 315	193±15	67±0,8	767±30	220±80	
T	~				

Таким образом, на основе полученных структурно-механических данных по биодеградации ПОБ и его сополимеров можно сделать вывод, что изучаемые полимеры могут быть использованы для создания биоразлагаемых медицинских изделий, способных длительно выполнять свои функции.

выводы:

1. Показано, что масса пленок из ПОБ и его сополимеров в процессе деградации в течение 6 месяцев под действием липазы снижается незначительно, не более 10% (для ПОБ с наименьшей молекулярной массой (ММ) 105 кДа). Молекулярная масса полимеров значительно снижается после инкубации в фосфатном буфере и в буферном растворе с добавлением липазы. Наибольшее уменьшение ММ наблюдается у высокомолекулярных полимеров.

2. Методом АСМ выявлены три типа изменений структуры поверхности пленок ПОБ, которые происходят при разложении панкреатической липазой: проявление новых ламелей (вследствие исчезновения аморфной компоненты), исчезновение части ламелей и фрагментация ламелей на более короткие участки (за счет дефектов в надмолекулярной кристаллической структуре).

3. Показано, что при гидролитической деструкции степень кристалличности полимеров изменяется волнообразно. При ферментативной деградации волнообразного изменения кристалличности после 1 месяца инкубации не наблюдается. Показано, что модуль Юнга, увеличивается в процессе деградации у всех полимеров: в первую неделю характерен резкий рост модуля Юнга, как в растворе липазы, так и буфера, затем он сменяется относительным плато. К 6 месяцу пленки из низкомолекулярного ПОБ (105 кДа) распадаются. Вследствие поверхностной эрозии пленок в процессе ферментативной и гидролитической деградации увеличивается гидрофильность полимеров.

4. Продемонстрирована разница механизмов деградации при ферментативной и гидролитической деструкции. При гидролитической деградации некаталитический механизм свойственен для 10 разных ПОА. Ферментативная деградация идет по двум

механизмам – не автокаталитическому и автокаталитическому для большинства ПОА, кроме ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768 (только не автокаталитический механизм).

5. Показано, что содержание более 5,7% 3-оксивалерата в цепи сополимера является критической точкой, которая определяет область изменения структурно-механических свойств сополимера, в частности, степени кристалличности.

6. Пористые скаффолды из ПОБ через 6 месяцев ферментативной деградации сохранили свою целостность, их модуль Юнга вырос примерно в 3,5 раза, а водопоглощение - в 4 раза, что говорит об улучшении их функциональных свойств.

7. На основе полученных структурно-механических данных о биодеградации синтезированных в нашей работе ПОБ и его сополимеров, а также прототипов медицинских изделий на их основе - полимерных пористых скаффолдов, можно констатировать, что данные полимеры могут быть использованы для создания биоразлагаемых медицинских изделий, способных длительно сохранять свои эксплуатационные свойства.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI:

1. **Жуйков В.А.,** Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Гидролитическая деградация поли-3-оксибутирата и его сополимера с 3-оксивалератом различной молекулярной массы in vitro// Биофизика 2018, Т. 63 № 2, стр. 249–257.

2. **Zhuikov V. A.**, Bonartsev A. P., Bagrov D. V., Yakovlev S. G., Myshkina V. L., Makhina T. K., Bessonov I. V., Kopitsyna M. N., Morozov A. S., Rusakov A. A., Useinov A. S., Shaitan K. V., Bonartseva G. A. Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution// Molecular Crystals and Liquid Crystals 2017, V. 648 N 1, P. 236–243. (IF = 0.571)

3. **Zhuikov V. A.**, Bonartsev A. P., Zharkova I. I., Bykova G. S., Taraskin N. Y., Kireynov A. V., Kopitsyna M. N., Bonartseva G. A., Shaitan K. V.. Effect of poly(ethylene glycol) on the ultrastructure and physicochemical properties of the poly(3-hydroxybutyrate)// Macromolecular Symposia 2017, V.375 № 1, P. 1600189.

4. **Zhuikov V.**, Bonartsev A., Bagrov D., Rusakov A., Useinov A., Myshkina V., Mahina T., Shaitan K., Bonartseva G.. The changes in surface morphology and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer films during in vitro degradation// Solid State Phenomena 2016, V. 258, P. 354–357.

5. Bonartsev A. P., Zharkova I. I., Yakovlev S. G., Myshkina V. L., Mahina T. K, Voinova V. V., Zernov A. L., **Zhuikov V. A.**, Akoulina E. A., Ivanova E. V., Kuznetsova E. S., Shaitan K. V., Bonartseva G. A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by azotobacter chroococcum 7b: a precursor feeding strategy// Preparative Biochemistry and Biotechnology 2017, V. 47 No 2, P. 173–184. (IF = 1.185)

6. Бонарцев А. П., Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Воинова В. В., Махина Т. К., Жаркова И. И., Яковлев С. Г., Зернов А. Л., Иванова Э. В., Акулина Е. А., Кузнецова Е. С., **Жуйков В. А.**, Алексеева С. Г., Подгорский В. В., Бессонов И. В., Копицына М. Н., Морозов А. С., Милановский Е. Ю., Тюгай З. Н., Быкова Г. С., Кирпичников М. П., Шайтан К. В. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом azotobacter chroococcum 7Б// Acta Naturae (русскоязычная версия) 2016, V. 8 № 3, P. 85–96. (IF = 1.77)

Мураев А. А., Бонарцев А. П., Гажва Ю. В., Рябова В. М., Волков А. В., Жаркова И.
И., Стамболиев И. А., Кузнецова Е. С., Жуйков В. А., Мышкина В. Л., Махина Т. К.,.
Бонарцева Г. А, Яковлев С. Г., Кудряшова К. С., Воинова В. В., Шайтан К. В., Иванов С.
Ю. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия// Современные технологии в медицине 2016, Т. 8 № 4, стр. 42-50.

8. Bonartsev A. P., Zharkova I. I., Yakovlev S. G., Myshkina V. L., Makhina T. K., Zernov A. L., Kudryashova K. S., Feofanov A. V., Akulina E. A, Ivanova E. V., **Zhuikov V. A.**, Andreeva N. V, Voinova V. V., Bessonov I. V., Kopitsyna M. V., Morozov A. S., Bonartseva G. A., Shaitan K. V., Kirpichnikov M. P. 3d-scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate)poly(ethylene glycol) copolymer for tissue engineering// Journal of Biomaterials and Tissue Engineering 2016, V. 6 No 1, P. 42–52. (IF = 3.11)

9. Bonartsev A. P., Yakovlev S. G., Boskhomdzhiev A. P., Zharkova I. I., Bagrov D. V., Myshkina V. L., Mahina T. K., Charitonova E. P., Samsonova O. V., Zernov A. L., **Zhuikov V. A.**, Efremov Yu M., Voinova V. V., Bonartseva G. A., Shaitan K. V.. The terpolymer produced by azotobacter chroococcum 7b: effect of surface properties on cell attachment// PLoS ONE 2013, V. 8 No 2, P. e57200. (IF = 2.06)

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Жуйков В.А.,** Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Ферментативная деградация поли(3оксибутирата) и его сополимеров в панкреатической липазе// Третий междисциплинарный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы», - М: ООО «Буки Веди», 2017. – С. 760-763.

2. Жуйков В.А., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Biodegradation of poly(3hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) films by porcine pancreatic lipase// VII международная Конференция «Деформация и разрушение материалов и наноматериалов». – М: ИМЕТ РАН, 2017. – С. 622-624,.

3. **Zhuikov V.A.,** Zharkova I.I., Bykova G.S., Taraskin N.Y., Kireynov A.V., Kopitsyna M.N., Bessonov I.V., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A. Poly(3-hydroxybutyrate) and its blends with polyethylene glycol – high potential materials for tissue engineering// Polycondensation 2016. – C. 119

4. **Zhuikov V.,** Bonartsev A., Bagrov D., Useinov A., Myshkina V., Mahina T., Shaitan K., Bonartseva G., Rusakov A. The changes in surface morphology and mechanical properties of poly(3-hydroxybutirate) and its copolymer films during in vitro degradation// VIII International Conference «Materials structure & micromechanics of fracture». 2016.

5. **Жуйков В.А.**, Бонарцев А.П., Багров Д.В., Бонарцева Г.А. «Использование атомносиловой микроскопии в изучении морфологии и процесса разложения пленок поли-3оксибутирата»// XXVI Российская конференция по электронной микроскопии (РКЭМ-2016), 2016. – С. 262,

6. **Zhuikov V.A.**,Bonartsev A.P., Bagrov D.V., Iordansky A.L., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Morphology and biodegradation of poly (3-hydroxybutirate) films studied by atomic force microscopy// EuroNanoForum 2015.

7. Жуйков В.А., Багров Д.В., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. «Исследование морфологии и процесса разложения поли(3-оксибутирата) в ультратонких пленках методом атомно-силовой микроскопии» // Шестая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры — 2014», – Т. 2 № 1. – С. 494.

8. **Жуйков В.А**. «Изучение процесса кристаллизации полиоксибутирата в ультратонких пленках методом атомно-силовой микроскопии» // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2013» – М.: МАКС Пресс, 2013.

ССЫЛКИ НА ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ СОИСКАТЕЛЯ ПРИВЕДЕНЫ В БАЗАХ ДАННЫХ:

Web of Science http://www.researcherid.com/rid/L-7180-2018 Scopus https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=8928564200 RSCI https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=725631 ИСТИНА https://istina.msu.ru/profile/Vsevolod// (IstinaResearcherID : 39671395)