

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Жуйков Всеволод Александрович

**Исследование изменений физико-химических свойств
поли-3-оксибутирата и его сополимеров в процессе
биodeградации *in vitro***

03.01.08 – Биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

к.б.н. Бонарцев Антон Павлович

к.б.н. Бонарцева Гарина Александровна

Москва – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1. Биопластики	12
1.1 Биодegradируемость	14
2. Полиоксиалканоаты	16
2.1 Биосинтез полиоксиалканоатов	16
3. Структура и свойства полиоксиалканоатов	18
3.1 Кристаллическая структура поли-3-оксибутирата	18
3.2 Физическо-химические свойства поли-3-оксибутирата	19
3.3 Структура сополимеров поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом и полиэтиленгликолем	21
3.4 Биодegradация полиоксиалканоатов	22
3.5 Факторы, влияющие на биоразлагаемость полиоксиалканоатов.....	22
3.6 Гидролитическая деградация полиоксиалканоатов.....	23
3.7 Ферментативная деградация полиоксиалканоатов.....	29
4. Применение полиоксиалканоатов.....	35
4.1 Предъявляемые к 3D матрицам (скаффолдам) ключевые факторы, необходимые при использовании в тканевой инженерии	36
4.2 Биодegradация биополимерных матриц.....	38
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
1. Объекты исследования и материалы	46
2. Выделение и очистка ПОА из биомассы	46
3. Изготовление макроскопических и ультратонких пленок.....	47

4. Исследование биодegradации пленок полиоксиалканоатов <i>in vitro</i>	48
5. Атомно-силовая микроскопия.....	49
6. Определение молекулярной массы.....	51
7. Механические свойства	52
8. Оценка гидрофильности пленок	53
9. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)	53
10. Изготовление пористых матриц (скаффолдов) из полиоксиалканоатов..	54
11. Статистический анализ	54
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	55
1. Синтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров	55
2. Исследование физико-химических свойств пленок из полиоксиалканоатов	60
3. Исследование морфологии поверхности макроскопических пленок	68
4. Исследование морфологии ультратонких пленок.....	70
5. Определение морфологии поли-3-оксибутирата на слюде.....	70
6. Визуализация процесса кристаллизации	74
7. Биодegradация полиоксиалканоатов	81
7.1 Изменение степени кристалличности пленок полиоксиалканоатов.....	82
7.2 Изменение модуля Юнга пленок полиоксиалканоатов.....	88
7.3 Изменение массы пленок полиоксиалканоатов	91
7.4 Изменение молекулярной массы пленок полиоксиалканоатов.....	93
7.5 Изменение степени гидрофобности полиоксиалканоатов	101
7.6 Изменение морфологии поверхности пленок полиоксиалканоатов.....	103

7.7 Визуализация процесса гидролиза поли-3-оксибутирата щелочью в реальном времени.....	106
7.8 Изменение морфологии поверхности пленок полиоксиалканоатов в процессе ферментативной деградации	112
7.9 Изменение свойств матриксов в процессе деградации.	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ:	122
БЛАГОДАРНОСТИ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3O4MB 3-окси-4-метилвалерат

4MBK 4 метилвалериановая кислота

АСМ атомно-силовая микроскопия

ВК валериановая кислота

КоА кофермент А

ММ молекулярная масса

НАДФФ никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ОВ, 3ОВ 3-оксивалерат

ПБС полибутиленсукцинат

ПЛА полилактид

ПОА поли-3-оксиалканоаты

ПОБ поли-3-оксибутират

ПОБ4MB поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат

ПОБВ поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат

ПОБВ-ПЭГ поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-полиэтиленгликоль

ППФ поли(п-фенилен)

ПТТ поли(триметилентерфталат

ПЭ полиэтилен

ПЭГ полиэтиленгликоль

ЯМР ядерно-магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее актуальных проблем в биоинженерии является разработка биоразлагаемых полимерных материалов. Несмотря на активное исследование в течение последних нескольких десятилетий, проблема биодegradации 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 биодegradации. 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 изготовления имплантатов для биоинженерии, должны разлагаться в течение 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 биodeградируемых материалов уделяется полимерным материалам микробиологического происхождения, в частности поли-3-оксиалканоатам. Это класс природных полиэфиров, обладающих способностью к биоразложению и биосовместимостью с тканями животных наряду со значительной стабильностью физико-механических свойств в процессе биodeградации. Отличительной особенностью ПОА является возможность существенно варьировать их физико-химические 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 биodeградации.

Цель и задачи работы.

Целью данной работы является комплексное изучение изменений физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров в процессе биodeградации *in vitro*.

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

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

2. Изучить физико-химические свойства синтезированных полимеров.

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

4. 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. 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 наноиנדентирования 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 биodeградации ПОА, позволяющее прогнозировать механизм и кинетику биodeградации ПОА в зависимости от их молекулярной структуры.

Практическая значимость работы. Полученные результаты об изменении физико-химических свойств различных ПОА являются практически значимыми для развития биоинженерии биodeградируемых 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 свойства 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 присутствии липазы снижается незначительно.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Модуль Юнга пленок полиоксиалканоатов, увеличивается в процессе деградации у всех полимеров
6. Вследствие поверхностной эрозии пленок в процессе ферментативной и гидролитической деградации увеличивается гидрофильность полимеров.
7. Наблюдается разница механизмов деградации при ферментативной и гидролитической деструкции. При гидролитической деградации явление автокатализа наблюдается только у 3 разных ПОА. Для ферментативной деградации автокаталитический механизм деградации свойственен большинству ПОА, кроме ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768 (явление автокатализа не наблюдается).
8. Содержание более 5,7% 3-оксивалерата в цепи сополимера является критической точкой, которая определяет область изменения структурно-механических свойств сополимера, в частности, степени кристалличности.

9. Пористые скаффолды из ПОБ через 6 месяцев ферментативной деградации сохранили свою целостность и улучшили 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 международном симпозиуме «Поликонденсация 2016» (Москва, 2016), 7-й международной конференции «Деформация и разрушения материалов и наноматериалов» (Москва, 2017), Третьем междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы» (Москва, 2017).

Личный вклад автора. 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.

Эксперименты по получению полимеров были проведены при участии Мышкиной В.Л.; выделение полимеров из биомассы проведены при участии Махиной Т.К.; термический анализ образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрией проведен Быковым М.А на химическом факультете МГУ.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

На протяжении последних нескольких десятилетий, в связи с ростом цен на нефтепродукты и загрязнением окружающей среды пластмассами, усилился интерес исследователей в области создания биопластиков, а также изучения их свойств. К биопластикам относят пластики на основе крахмала, пластики, получаемые из соевого белка, а также целлюлозосодержащие пластики. Также под биопластиками можно понимать полимеры, содержащие по меньшей мере один мономер, синтезированный с помощью бактерий [32]. Биопластмассы можно смешивать с обычными пластмассами, такими как полиэтилен, полипропилен и поливиниловый спирт. Однако, такие материалы являются частично биodeградируемыми. Часть материалов на основе нефти, которые не способны разложиться, вызывают дополнительное загрязнение среды.

Биопластики обладают характеристиками, схожими с обычными пластиками, но для их производства используют бактерии. Для синтеза биопластиков используются бактерии способные потреблять различные возобновляемые источники, такие как крахмал, целлюлоза, отходы крахмально-паточного производства и другие.

В настоящее время для микробиологического синтеза биопластиков успешно используют следующие вещества: гидроксикарбоновые кислоты с разными структурными вариациями, молочная кислота, янтарная кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, биоэтилен, полученный при дегидратации биоэтанола, 1,3-пропандиол, цис-3,5-циклогексадиен-1,2-диола и другие. В процессе их химической полимеризации (за исключением 3-гидроксикарбоновых кислот, где используется микробиологическая полимеризация) получают биопластики, которые могут быть использованы в различных отраслях промышленности и науки [32].

1. Биопластики

Гидроксиалкановые кислоты, D-(L-)молочные кислоты, янтарная кислота, биоэтилен, 1,3-пропандиол, цис-3,5-циклогексадиен-1,2-диолы являются наиболее распространенными веществами, которые синтезируются бактериями (Рисунок 1). Гидроксиалканоаты среди данных мономеров считаются наиболее богатыми различными структурными вариациями, так как количество (-CH₂-) групп может быть от 0 до 5, а также присутствовать различные радикалы (R) – от алкильного до бензильного. Следует отметить, что гидроксиалканоаты в норме не существуют в форме мономеров, чаще всего они представлены в полимеризованной форме - полиоксиалканоаты [33].

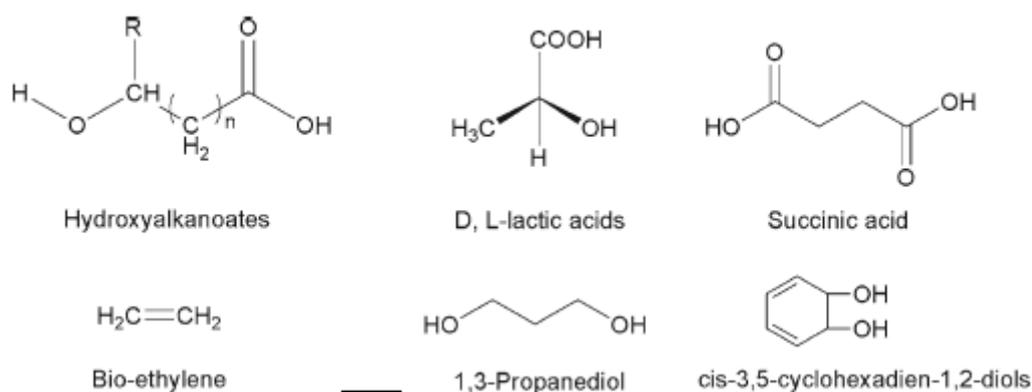


Рисунок 1. Наиболее распространенные мономеры пластиков, полученных микробиологически [33].

Перечисленные выше мономеры могут полимеризоваться *in vitro* (за исключением гидроксиалканоатов, которые полимеризуются *in vivo*) в процессе химической реакции полимеризации. Это приводит к образованию следующих полимеров: полиоксиалканоат, полилактид, полибутиленсукцинат, полиэтилен, поли(триметилентерфталат) и поли(п-фенилен) (Рисунок 2).

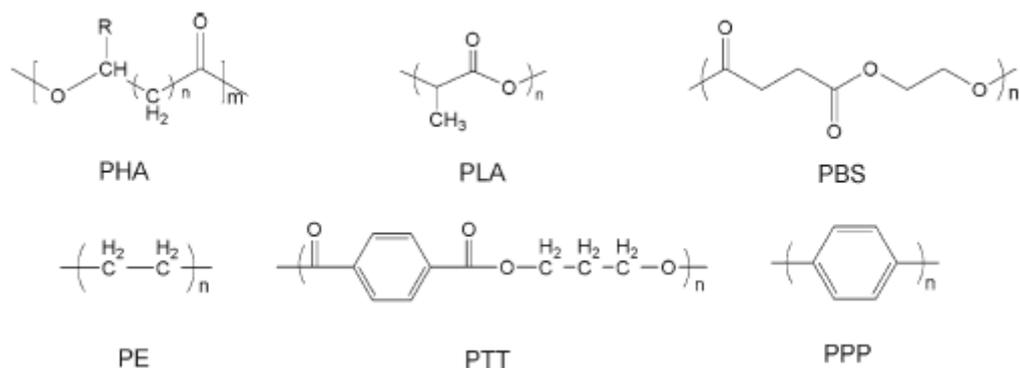


Рисунок 2. Структуры наиболее распространенных пластиков, синтезированных из мономеров, полученных микробиологически [33].

Хотя все биопластики способны к разложению, их свойства близки к пластмассам, получаемым из нефти.

Большой интерес среди биопластиков вызывают полиоксиалканоаты. Только данный класс полимеров из всех, представленных выше, относится к истинным биопластикам, так как ПОА синтезируется в процессе бактериального биосинтеза *in vivo* и являются запасными веществами бактерий. Физико-химические свойства ПОА могут варьироваться в широком диапазоне. Например, такие свойства как температура плавления (T_m), температура стеклования (T_g), меняются от 60 до 177 и от -50 до 4°C, соответственно. Молекулярная масса синтезированных полимеров находится в диапазоне от 10 до 2000 кДа, степень полидисперсности – от 1,2 до 6. Механические свойства ПОА также сильно варьируются: значения модуля Юнга в диапазоне 1,4-3,5 ГПа, удлинения на разрыв - от 2 до 1000% и предела прочности от 17 до 104 МПа [32, 42, 151].

Для сравнения, полилактид представляет собой хрупкий полимер с удлинением на разрыв 2,4-5,2% и модулем Юнга 384-481 МПа. При этом он имеет один из самых высоких среди пластиков предел прочности 49,6–61,6 МПа [95, 143, 161, 162]. Температура стеклования (60°C) является слабым звеном в применении ПЛА, так как при данной температуре изделия из ПЛА теряют свою форму. Также, существенным недостатком полилактида является неспособность полимеризоваться в бактериях.

Температура плавления (T_m) и стеклования (T_g) полибутиленсукцината варьируется, соответственно, в диапазонах от 116 до 147 °С и от -37 до -33 °С в зависимости от соотношения компонентов сополимеров. Модуль Юнга, удлинение на разрыв и предел прочности ПБС равны ~ 268 МПа, 175% и 25 МПа соответственно. Кроме того, ПБС достаточно термостабилен. Благодаря таким свойствам, ПБС является подходящим материалом для различных практических приложений, например в качестве упаковочных пленок и мешков [75, 80, 138, 149].

Полиэтилен, синтезированный из биоэтанола, имеет те же характеристики, что и полиэтилен из нефти. Он также обладает высокой степенью удлинения на разрыв – 298%, и температурой стеклования, равной 33,4°С. Био-ПЭ может быть использован в тех же целях, что и ПЭ из нефти [98, 155, 160, 163].

Поли(триметилентерфталат) и поли(п-фенилен) состоят из двух частей биоматериалов и одной части нефтепродуктов. ПТТ является достаточно эластичным материалом (удлинение на разрыв – 159 %) с модулем Юнга равным 728 МПа [34, 126]. ППФ очень хрупкий полимер, не имеющий температуры плавления. Из-за свойства хрупкости у него нельзя измерить модуль Юнга, удлинение на разрыв и предел прочности. ППФ, как и другие электропроводящие полимеры, тяжело подвергается обработке. Для увеличения его прикладного потенциала необходима модификация его структуры [8, 90, 91].

1.1 Биodeградируемость

Ферменты и микроорганизмы, такие как бактерии и грибы, разрушают как натуральные, так и синтетические пластики [52]. Биodeградация пластиков активно протекает, при различных условиях в почве. Среди полимеров, о которых идет речь, ПОА, ПЛА и ПБС хорошо известны своей биоразлагаемостью, тогда как ПЭ, ПТТ и ППФ, менее подвержены биологическому разложению или менее изучены с точки зрения их

биоразлагаемости [32]. ПОА – один из природных бактериальных пластиков, способных к биоразложению. Микроорганизмы, которые могут синтезировать ПОА в условиях избытка углеводов веществ, в норме могут также метаболизировать ПОА при недостатке углеродных или энергетических ресурсов [141]. Продуктом биodeградации поли-3-оксибутирата является 3-гидроксимасляная кислота [41], в то время как внеклеточная деградация сополимера полиоксибутирата с полиоксивалератом приводит к образованию как оксимасляной кислоты, так и оксивалериановой кислоты [99]. Мономеры, образующиеся в процессе деградации ПОА, являются водорастворимыми и имеют небольшие размеры, поэтому способны диффундировать сквозь клеточную стенку. Они также могут включаться в процессы метаболизма различных организмов, посредством участия в β -окислении и цикле трикарбоновых кислот. В конечном итоге мономеры распадаются на CO_2 и воду в аэробных условиях [135, 142].

Абиотический гидролиз является одним из наиболее важных реакций для инициации разложения в окружающей среде синтетических полимеров [49], таких как ПЭ [51], ПТТ [59], ПЛА и его сополимеров [61, 114]. Деградация большинства синтетических полимеров идет медленнее, чем природных полиэфиров. На данный процесс влияют факторы окружающей среды, с последующим воздействием окружающих микроорганизмов [37].

ПЛА является полностью биodeградируемым в различных условиях и при различных температурах [128]. ПБС является гидро-биodeградируемым, то есть процесс биodeградации начинается после первичного гидролиза. Гидролиз осуществляется по сложноэфирным связям и приводит к снижению молекулярной массы полимера, что в дальнейшем ведет к его деградации микроорганизмами [136]. Биodeградация ПЭ происходит по двум механизмам: гидро-биodeградация и оксо-биodeградация [22].

2. Полиоксиалканоаты

Полиоксиалканоаты являются наиболее распространенными биологическими полиэфирами, которые синтезируются разнообразными микроорганизмами в природе [32].

2.1 Биосинтез полиоксиалканоатов

Полиоксиалканоаты синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты. Наиболее изученным представителем семейства поли-3-оксиалканоатов является поли-3-оксибутират. Процесс синтеза полимерной цепи у большинства бактерий, обладающих способностью синтезировать ПОА, идет по одинаковой схеме.

Как правило, синтез ПОБ начинается с главного этапа метаболизма углеродных соединений, а именно, с синтеза ацетил-кофермента А (КоА). На первом этапе 3-кетотиолаза связывает два остатка ацетил-КоА с образованием ацетоацетил-КоА. Затем превращение ацетоацетил-КоА в D-(-)-3-оксибутирил-КоА может быть опосредовано восстановлением ацетоацетил-КоА с помощью НАДФН-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазы (стадия 2), или через последовательность, катализируемой НАДФН-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазой (шаг 4) и двумя гидролазами (5 и 6) [148, 150]. На последнем этапе ПОА-синтаза присоединяет эфирной связью образовавшиеся мономеры к растущей цепи поли-3-оксибутирата (Рисунок 3) [106].

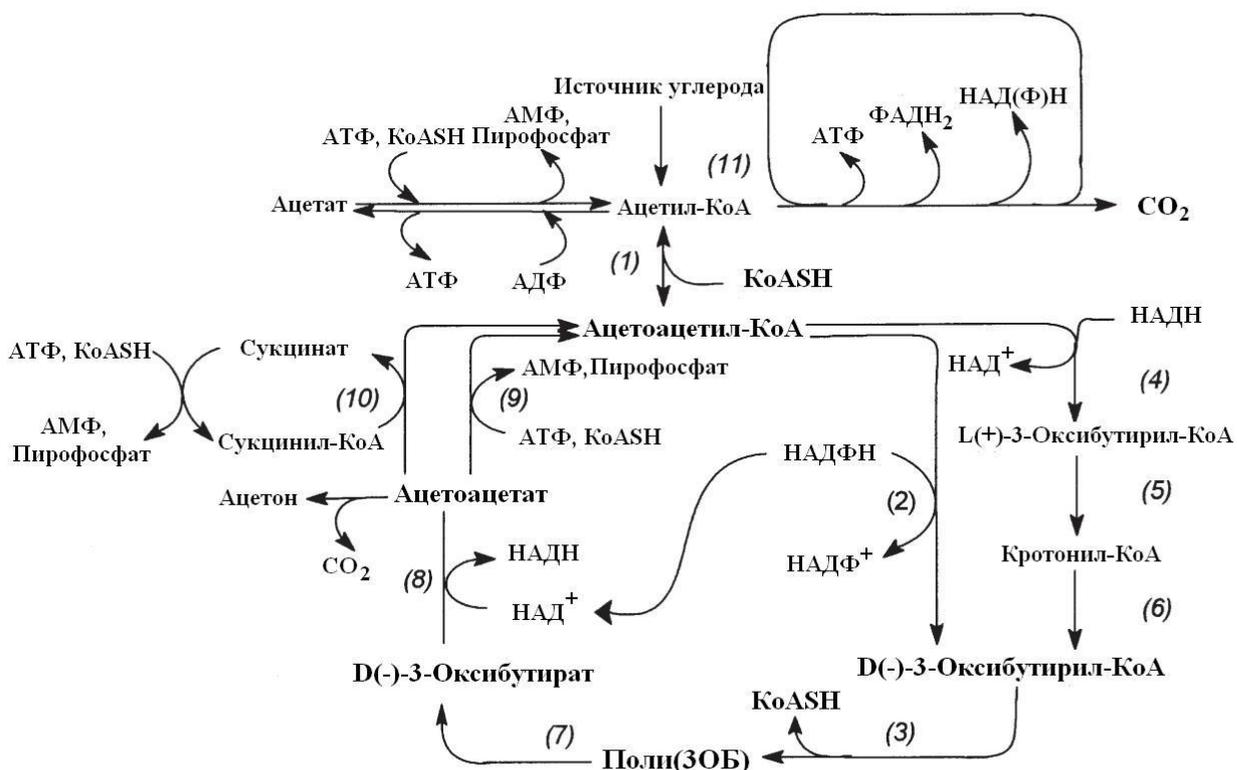


Рисунок 3. Метаболический цикл синтеза и деградации поли(3ОБ). Ферменты: (1) 3-кетотиолаза; (2) NADPH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза; (3) поли(3ОБ)-синтазы; (4) NADH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза; (5), (6) енолаза; (7) деполимераза; (8) D(-)-3-оксибутират-дегидрогеназа; (9) ацетоацетил-КоА-синтетаза; (10) сукцинил-КоА-трансфераза; (11) цитрат-синтаза [150].

Синтезировать полиоксисалканоаты в качестве резервного источника питания способны множество бактерий. Среди этого множества бактерий выделяются следующие штаммы, способные аккумулировать большое количество ПОА и их сополимеров: *Ralstonia eutropha* также известная, как *A. eutrophus*, *Wautersia eutropha* или *Cupriavidus necator*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Halomonas sp.*, *Haloferax sp.*, *Aeromonas sp.*, *Methylobacterium sp.*, *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas sp.*, *A. Latus*, известный как *Azohydromonas lata*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans*, *Cyanobacteria*, *Chromobacterium sp.*, *Erwinia sp.*, рекомбинантная *E. coli*. [3].

Из всего разнообразия способных синтезировать ПОА бактерий, можно выделить *Azotobacter* и *Ralstonia*, как наиболее часто используемые для

синтеза ПОА. Эти организмы могут использовать разнообразные и относительно недорогие субстраты: неочищенные сахара (*Azotobacter* sp.) этанол, глюкозу, газовые смеси, включающие в себя углекислый газ, водород и кислород (*Ralstonia eutropha*) [3].

Используя различные штаммы микроорганизмов и изменяя условия их культивирования, можно получать разнообразные ПОА и их сополимеры: полиоксибутират, полиоксивалерат, и двух-, трехкомпонентные сополимеры с различным набором и соотношением оксибутирата и оксивалерата [13, 29, 54, 101, 102].

3. Структура и свойства полиоксиалканоатов

Самый распространенный представитель полиоксиалканоатов – ПОБ, имеет структуру только с R-конфигурацией. Выделенный из бактерий, он обладает высокой степенью кристалличности – 55-80% [64], однако находясь в бактериях, ПОБ имеет только аморфную структуру и существует в виде водонерастворимых включений [2].

3.1 Кристаллическая структура поли-3-оксибутирата

Кристаллическая структура ПОБ была изучена с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Было выявлено, что два остатка длиной 0,596 нм с двумя антипараллельными цепями упакованы в орторомбическую клетку с размерами по оси $a = 0,576$ нм, $b = 1,320$ нм и $c = 0,596$ нм и пространственной группой $P2_12_12_1$. Исходя из конформационного анализа, основанного на расчетах внутримолекулярной энергии, было выявлено, что молекула имеет левозакрученную 2_1 -спиральную конформацию [24].

Единичные кристаллы ПОБ получали растворением в растворителях различных типов [13, 69]. Как правило, ПОБ формирует кристаллы в виде пластин. Толщина единичного кристалла варьируется в диапазоне от 4 до 10 нм в зависимости от молекулярной массы растворителя и температуры кристаллизации.

Единичные кристаллы являются монокристаллической системой. Однако, такие изделия, как пленки и пластины, обычно представляют собой мультислойные системы, которые собираются в мультислойные кристаллы. Цепи ПОВ обычно формируют сферолиты, когда происходит кристаллизация в изделиях, имеющих объем [9]. В сферолитах мультислойные кристаллы ПОВ растут с радиальной укладкой. Кристаллографическая ось a является радиальной, а оси b и c , вращаются вокруг нее. Из-за скручивания мультислойных кристаллов сферолиты ПОВ обычно имеют полосчатую текстуру. Периодичность и регулярность таких скрученных структур зависят как от молекулярного веса, так и от температуры кристаллизации полимера. Кинетика роста сферолитов ПОВ была исследована при различных температурах кристаллизации. Максимальное значение скорости роста кристаллов наблюдалось примерно при 90°C. Общая же скорость кристаллизации ПОВ максимальна в температурном диапазоне от 50 до 60°C [141].

3.2 Физическо-химические свойства поли-3-оксибутирата

Молекулярная масса поли-3-оксибутирата, синтезированного бактериями дикого типа, варьируется в диапазоне от 1×10^4 до 3×10^6 г/моль со степенью полидисперсности ~ 2 [141]. Температура стеклования ПОВ ~ 4 °C, в то время как температура плавления ~ 180 °C. Плотность кристаллической и аморфной компоненты ПОВ равно 1,26 и 1,18 г/см³, соответственно. Механические свойства ПОВ, такие как модуль Юнга ($\sim 3,5$ ГПа), предел прочности (~ 43 МПа), сходны со свойствами изотактического полипропилена. Однако, удлинение на разрыв (5%) значительно меньше, чем у полипропилена (400%). Следовательно, ПОВ является более жестким и хрупким пластиком, по сравнению с полипропиленом.

Существует множество статей, в которых рассмотрена проблема природы хрупкости ПОВ и путей улучшения его физических свойств. В процессе кристаллизации гомополимера из расплава, на сферолитах

наблюдаются крупномасштабные трещины. Barham et al. [10, 11, 104] полагают, что данные трещины в сферолитах ПОб являются одной из причин, приводящих к увеличению его хрупкости. Konig and Lemstra [83] сообщили, что увеличение хрупкости ПОб происходит во время хранения после первоначальной кристаллизации из расплава. Утверждается, что вторичная кристаллизация приводит к реорганизации ламелей, образовавшихся во время начального процесса кристаллизации, которая жестко ограничивает аморфные цепи между кристаллами. Они также продемонстрировали, что материалы из ПОб можно сделать жестче, если после начальной кристаллизации подвергнуть их процедуре отжига [82].

Эксперименты по изучению механических свойств растянутых пленок из высокомолекулярного ПОб показали, что свойства таких пленок существенно улучшались по сравнению с нерастянутыми пленками [89]. Растяжение на разрыв, модуль Юнга и предел прочности таких растянутых пленок составляют 58%, 1,1 ГПа и 62 МПа, соответственно. В дополнении к этому, было обнаружено, что при последующем отжиге таких пленок наблюдалось дальнейшее улучшение механических свойств. Температура плавления растянутых пленок, подвергнутых процедуре отжига, составляла около 190 °С. Таким образом, гомополимер ПОб, обладая изначально плохими механическими свойствами, благодаря различным современным процессам улучшения, может являться кандидатом для использования во многих сферах, включая медицину.

Одним из таких методов по улучшению свойств ПОб является сополимеризация его с другими ПОА. Такая сополимеризация возможна, если при выращивании бактерий, синтезирующих ПОб, в среду добавлять мономеры тех ПОА, которые необходимы для синтеза сополимера.

3.3 Структура сополимеров поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом и полиэтиленгликолем

Структура и свойства сополимеров 3-оксибутирата и 3-оксивалерата были исследованы наиболее широко. Кристалличность таких сополимеров сходна в широком диапазоне сополимерного состава и составляет 50-70% [123]. Структурной характеристикой ПОБВ является изодиморфизм, то есть сокристаллизация двух мономерных звеньев в любой из гомополимерных кристаллических решеток полиоксибутирата и полиоксивалерата в зависимости от того, какое количество ПОВ представлено в сополимере. Однако, значительное снижение таких характеристик, как степень кристалличности и теплота плавления, предполагает, что единицы 3-ОВ следует рассматривать как энергетически неблагоприятные дефекты в кристаллической компоненте ПОБ. В работах Mitomo et al. [109] было показано, что морфологические характеристики одиночных кристаллов ПОБВ с разным процентом вхождения ОВ различаются. Так, было выявлено, что кристаллы ПОБВ с процентом вхождения оксивалерата в цепь ПОБ до 10% имели схожие морфологические характеристики с кристаллами ПОБ, однако, если ПОБВ имел от 17 до 30% оксивалерата в цепи, то единичные кристаллы отличались морфологической неоднородностью.

Другим широко изученным способом улучшения механических и термических свойств ПОБ является добавление низкомолекулярных пластификаторов, таких как полиэтиленгликоль (обычно ПЭГ 300). Пластификаторы ослабляют межмолекулярные силы между соседними полимерными цепями. Происходит изменение свободного объема, что приводит к снижению температуры стеклования в системе. Кроме того, пластификаторы могут также влиять на процесс кристаллизации частично кристаллического полимера.

В литературе [125, 130] имеются данные, что ПОБ полностью смешивается с ПЭГ 300, при этом температура стеклования T_g и степень кристалличности уменьшаются с увеличением содержания ПЭГ. Однако

добавление ПЭГ не изменяет термическую стабильность смеси. Более того, Rodrigues et al. [130] выявили, что увеличение содержания ПЭГ увеличивает водопроницаемость и растворимость из-за гигроскопичности ПЭГ. В работах Bibers et al. [12] было установлено, что добавление ПЭГ не влияет на кристалличность, но влияет на предел прочности и деформацию растяжения. Это обусловлено, главным образом, значительно более ослабленными межмолекулярными взаимодействиями в аморфной фазе ПОБ.

3.4 Биодegradация полиоксиалканоатов

Бактерии, которые синтезируют ПОА, используют их в качестве запасных веществ и при недостатке внешних источников питания могут метаболизировать их [121]. Продуктом гидролиза ПОБ является R-3-гидроксимасляная кислота [141], в то время как деградация ПОБВ дает как 3-гидроксипропанат, так и 3-гидроксивалерат [99]. Данные мономеры являются водорастворимыми, причем имеют достаточно небольшой размер, что дает им возможность пассивно диффундировать сквозь клеточную стенку, где они метаболизируются циклом β -окисления и циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) до углекислого газа и воды [135]. Как правило, в процессе деградации ПОБ не образуются вредные промежуточные или побочные продукты. Фактически, 3-гидроксипропанат встречается у всех высших животных в качестве компонента плазмы крови [50]. По этой причине ПОА могут использоваться в различных областях медицины, таких как пролонгированное контролируемое высвобождение лекарственных средств, создание медицинских материалов, таких как хирургические штыри, шовные нити, костные и сосудистые имплантаты.

3.5 Факторы, влияющие на биоразлагаемость полиоксиалканоатов

Химические и физические свойства ПОА оказывают сильное влияние на их биоразлагаемость. Молекулярная масса (ММ) является одной из характеристик, определяющих скорость биодegradации полимеров. Скорость

деградации у низкомолекулярного полимера выше, чем у высокомолекулярного [145].

Температура плавления (T_m) полимера также оказывает большое влияние на процесс ферментативной деградации. Как правило, чем выше температура плавления полиэфира, тем ниже склонность к биологическому разложению. Очищенная липаза *Rh. Delemar* способна эффективно гидролизовать сложные полиэфиры с низкой температурой плавления, такие как PCL, PPL, поли(бутиленадипат), но не ПОБ [145].

Было также исследовано влияние высокоупорядоченных кристаллических структур (ламели, сферолиты) на биоразлагаемость полимера. Для этого на пленках ПОБ, которые подвергались высокотемпературной обработке, чтобы произошла вторичная кристаллизация, выращивались бактерии *Pseudomonas* штамма SC-17. Было выяснено, что такие свойства полимера, как степень кристалличности и модуль упругости, возрастающие в процессе термической обработки, снижают скорость разложения полимера [146]. Kumagai et al. в своей работе показали, что скорость ферментативного гидролиза пленок ПОБ с помощью ПОБ-деполимеразы *Alcaligenes faecalis* сильно зависит от степени кристалличности пленки ПОБ – ферментативная деградация пленок полимера уменьшалась с увеличением кристалличности [87].

Таким образом, скорость биodeградации изделий из ПОА зависит от многих факторов, таких как особенности окружающей среды (температура, pH и прочее) а также свойств изделий из ПОА (состав, кристалличность, площадь поверхности и прочее).

3.6 Гидролитическая деградация полиоксиалканоатов

Как правило, разложение полимера происходит путем разрыва основных или боковых цепей макромолекул, вызванных термической активацией, окислением, фотолизом, радиоллизом или гидролизом [69]. Гидролитическое разложение (гидролиз) может осуществляться разрывом

химических связей в полимерной цепи при поглощении воды с образованием олигомеров и последующим образованием мономеров. На первом этапе молекулы воды атакуют водолабильные связи с последующим гидролизом [5]. В дополнение к воздействию H_2O (нейтральный гидролиз) гидролиз может также катализироваться кислотой, основанием или ферментом.

Гидролитическая деградация ПОА, как правило, изучается в условиях, имитирующих внутреннюю среду организма (рН 7,4 при 37°C), но для экспресс анализов – при более высоких температурах (55°C, 70°C и более) и других значениях рН (от 2 до 11) [39, 40, 63, 84].

Гидролитическую деградацию ПОА часто изучают в сравнении с другими полимерами. Наиболее широко распространённым биополимером в таких работах является полилактид. В одном из экспериментов по сравнению гидролитической деградации пленок поли-3-оксибутирата с ММ 300 и 650 кДа и пленок ПЛА с ММ 9 и 21 кДа, полученных методом полива из раствора полимера, было показано, что гидролитическая деструкция ПОБ – медленный процесс [84]. При инкубации в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 150 дней весовая масса пленок ПОБ не изменилась. В то же время масса пленок ПЛА уменьшилась на 83%. Молекулярная масса ПОБ, в отличие от весовой массы, уменьшилась на 35% за 150 дней, но это существенно меньше уменьшения ММ для ПЛА – на 80% от изначального уровня за тот же период времени. Стоит отметить, что вышеуказанные значения ММ значительно различаются. Для более корректного сравнения двух полимеров необходимо использовать полимеры одной и той же молекулярной массы, так как известно, что ММ вносит некоторый вклад в процесс разложения биополимеров [145].

Предполагается, что молекулярная масса является наиболее значимым и чувствительным параметром для моделирования деградации биоразлагаемых полимеров [49]. Был получен ряд зависимостей, связывающих изменения ММ со временем и со скоростью гидролиза нестабильных сложноэфирных связей, и на их основе представлен

статистический подход для связи молекулярной массы и скорости гидролиза [93]. Предложена следующая кинетическая зависимость, основанная на средней ММ полимеров, при этом предполагается, что степень деградации невелика:

$$1/MM = 1/MM_0 + kt \quad 1)$$

где, ММ и ММ₀ – значения средней молекулярной массы компонента полимера в момент времени t и в начальный момент соответственно, k – константа скорости. Если данная теория верна, то существует линейная зависимость между 1/ММ от времени, вплоть до полной потери массы.

Недостаток такого статистического подхода заключается в том, что не учитывается возможность автокатализа, который ускоряет скорость деградации. Pitt и Gu [127] получили соотношение, основанное на реакции гидролиза сложного эфира, при этом учитывающее автокатализ, являющийся следствием появления концевых групп карбоновых кислот:

$$d(E)/dt = -d(COOH)/dt = -k(COOH)(H_2O)(E) \quad 2)$$

где (COOH), (H₂O) и (E) – концентрации карбоксильных концевых групп, воды и сложных эфиров, соответственно.

При дальнейшем преобразовании уравнения (2) и предположении, что концентрация сложных эфиров и воды остается постоянной, а концентрация кислотных концевых групп соответствует 1/ММ, было получено, что

$$MM = MM_0 e^{-kt} \quad 3)$$

Если это соотношение верно, то существует линейная зависимость между ln(MM) и временем, вплоть до полной потери массы.

$$\ln(MM) = -kt + \ln MM_0 \quad 4)$$

Снижение молекулярной массы полимера в процессе гидролитической деградации является отличительной особенностью по сравнению с ферментативной деградацией ПОА, при которой значения молекулярной массы практически не изменяются. Было высказано предположение, что растворимые в воде низкомолекулярные цепочки ПОБ могут ускорить процесс его гидролиза [84]. В то же время, этому противоречат данные

другой группы исследователей [47], которыми было показано, что добавление низкомолекулярного ПОб (3 кДа) в соотношении 30/70 не ускоряет гидролиз высокомолекулярного (641 кДа). Однако, введение аморфного (атактического) ПОб с молекулярной массой 10 кДа приводит к существенному ускорению гидролиза высокомолекулярного ПОб. Потеря весовой массы смеси атактического ПОб с высокомолекулярным ПОб составила 7%, а молекулярная масса снизилась на 88%, против 0% потери весовой массы и снижения на 48% молекулярной массы у чистого ПОб [47, 134].

Одним из способов повышения скорости гидролиза ПОб является увеличение температуры раствора при гидролизе [84]. При увеличении температуры 0,01 М фосфатного буфера рН 7,4 до 55°C было установлено, что весовая масса пленок высокомолекулярного (768 кДа) ПОб оставалась неизменной в течение 58 дней. В то же время молекулярная масса за 48 дней снизилась до 245 кДа. Примечательно, что толщина пленки в процессе такого гидролиза увеличилась на 10 мкм, с 65 мкм до 75 мкм. Возможное объяснение заключается в том, что в процессе гидролиза в толщу полимерной пленки проникает вода. Отчасти это подтверждается исследованиями поперечного среза пленок после гидролитической деградации. Было выявлено, что внутренняя структура становится более пористой, однако поверхность пленок оставалась неизменной. Также авторами был сделан вывод, что степень кристалличности не влияет на скорость гидролитической деструкции. Итогом данной работы является предположение, что механизм неферментативной деградации в буферном растворе заключается в случайном гидролизе сложноэфирных связей полимерной цепочки ПОб во всем объеме полимерной матрицы, куда проникает вода [39, 84]. Утверждение о случайном гидролизе сложноэфирных связей подтверждаются также тем, что молекулярно-массовое распределение оставалось неизменным на протяжении всего

времени деградации, что указывает на случайность процесса гидролиза кристаллических и аморфных цепей [47].

Анализ литературных данных показал широкий разброс, а иногда и значительное расхождение в значениях степени гидролитической деградации ПОА *in vitro*. Причина таких расхождений разнообразна: различная геометрия образцов ПОБ, степень чистоты, разная молекулярная масса, а также отличия в природе и происхождении полимеров (Таблица 1). Как видно из табл. 1, существуют определенные противоречия в результатах гидролитической деструкции, например, при инкубации пленок ПОБ при 37°C потеря веса пленок ПОБ составила 7,5% за 50 дней (pH 7,4) [110]; и не снижалась за 150 дней [84], 730 дней [88] и 364 дня [47]. Масса не изменилась также при повышении температуры до 70°C [47]. В отличие от весовой массы, изменения молекулярной массы более значительные, однако также наблюдается разброс от 35% до 68% за 150 дней [84], причем сходная потеря ММ наблюдается в буферном растворе за два года (730 дней) – 64% [88].

В ряде работ было отмечено изменение механических свойств некоторых изделий (нити и пластины) из ПОБ в процессе гидролиза [43, 108]. Модуль Юнга у шовных нитей из ПОБ не менялся в течение 180 дней при 70°C, однако напряжение на разрыв и относительное удлинение при разрыве снижались соответственно на 36% и 33% (pH 7,2). Иное поведение демонстрируется при физиологической температуре 37°C. За первые 3 месяца (90 дней) напряжение на разрыв и относительное удлинение возрастали соответственно на 17% и 16%. В следующие 90 дней эксперимента происходило постепенное уменьшение данных характеристик до исходных значений [108]. При измерении механических свойств пластин из ПОБ выяснилось, что их модуль Юнга снижается на 68%, а напряжение на разрыв на 77% [43]. Одной из групп авторов было показано резкое снижение модуля Юнга, напряжения на разрыв и твердости пластин из ПОА всего за одни сутки – на 32%, 13% и 40% соответственно. В течение следующих 28

дней модуль Юнга и твердость не менялись, а величина напряжения на разрыв вернулась к исходным значениям [36].

Таблица 1. Гидролитическая деградация ПОБ *in vitro* (сравнительные данные).

Тип изделия	Начальная ММ ПОБ, кДа	Толщина, мкм	Условия	Массовая потеря ПОБ, %	Относительная потеря ММ ПОБ, %	Время, дни	Ссылки на литературу
пленка	650	50	37°C, pH=7,4	0	35	150	[84]
пленка	640	100	37°C, pH=7,4	0	64	730	[88]
пленка	640	100	37°C, pH=7,4	0	45	364	[47]
пленка	279	-	37°C, pH=7,4	7,5	-	50	[110]
пленка	640	100	70°C, pH=7,4	-	55	28	[47]
пленка	650	50	55°C, pH=7,4	0	68	150	[84]
микросферы	50	250-850	37°C, pH=7,4	0	0	150	[153]
микросферы	50	250-850	85°C, pH=7,4	50	68	150	[153]
микросферы	600	250-850	85°C, pH=7,4	25	-	150	[153]
нить	470	30	37°C, pH=5,2	0	-	180	[108]
нить	470	30	37°C, pH=7,0	0	-	180	[140]
пластина	380	2000	55°C, pH=7,4	0	61	98	[105]
пластина	-	510	37°C, pH=7,4	3	-	40	[154]
пластина	380	1000	37°C, pH=7,4	0	-	28	[43]

Возможная причина таких быстрых изменений заключается преимущественно за счет проникновения растворителя в объем полимерной матрицы, а не влияния гидролитической деструкции. Изменение механических свойств нитей объясняется тем, что они подвергались

гидролизу. При этом изменение их прочностных характеристик указывает на процессы, происходящие в аморфных и кристаллических областях.

3.7 Ферментативная деградация полиоксиалканоатов

Исследование биодegradации ПОА *in vitro* представляет собой важный шаг на пути понимания того, как будут функционировать эти биополимеры в органах и тканях млекопитающих. Однако, в большинстве работ, посвященных проблеме биодеструкции ПОА, эксперименты по биодеструкции выполнены с использованием собственных ферментов бактерий – ПОБ-деполимераз [7, 78, 121]. ПОБ-деполимераза является специфичным ферментом, встречающимся у бактерий и грибов. Но в тканях животных и даже в окружающей среде ферментативная деградация ПОБ происходит, главным образом, с помощью неспецифических эстераз [96, 132]. Однако активный центр у ПОБ-деполимераз и липаз имеет сходное строение, из чего можно заключить, что оба фермента будут иметь схожие механизмы гидролиза субстрата [71, 146].

Скорость ферментативной деградации с помощью ПОБ-деполимераз и липаз зависит от кристалличности ПОА, концентрации, свойств и условий реакции [1, 68, 76]. Скорость ферментативного гидролиза увеличивалась до максимального значения с ростом концентрации ПОБ-деполимеразы с последующим постепенным уменьшением [78]. Ферментативная деградация поли-3-оксибутирата протекает в две стадии. На первой стадии происходит адсорбция фермента на поверхности полимера и закрепление на ней с помощью одного из доменов молекулы ПОБ-деполимеразы. На втором этапе происходит расщепление полиэфирных связей, в котором принимает участие активный центр ферментной макромолекулы [78]. В работе Yamashita et al. было выдвинуто предположение, что каждая молекула деполимеразы адсорбируется необратимо на поверхности пленки ПОБ, однако может легко замещаться другой молекулой фермента в растворе [158]. Также на скорость биодegradации ПОБ посредством ПОБ-деполимеразы влияет

стереорегулярность полимера ввиду того, что активный центр молекулы фермента проявляет способность к стереоспецифичности по отношению к субстрату. Кроме того, ферментативный гидролиз с участием данного фермента протекает только на поверхности полимера, происходит так называемая поверхностная эрозия, поскольку крупные молекулы ПОб-деполимеразы не в состоянии проникать в объем полимерной матрицы [141].

Основные данные по ферментативной деградации ПОб с помощью ПОб-деполимераз продемонстрированы в работах Коуата и Дои [39, 84]. Было показано, что при инкубации пленок ПОб с молекулярной массой 650 и 768 кДа в растворе ПОб-деполимеразы, выделенной из *A. faecalis*, масса пленок снижалась на 68 и 75% соответственно. Измеренная скорость деградации составляла 0,17 и 0,15 мг/ч. Также уменьшалась и толщина пленок. Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) было продемонстрировано увеличение шероховатости поверхности [39, 84].

Скорость разложения материалов из ПОА сильно зависит от их химической структуры и таких свойств, как кристалличность, толщина ламелей и размер кристаллов. Поэтому в литературе уделяется много внимания механизму деградации ламелей ПОА, с использованием в качестве объекта исследования ультратонких пленок [67, 68, 119, 120].

Как правило, ПОб образует пластинчатый кристалл с размерами около 0,3-2 мкм и 5-10 мкм вдоль короткой и длинной осей соответственно (Рисунок 4).

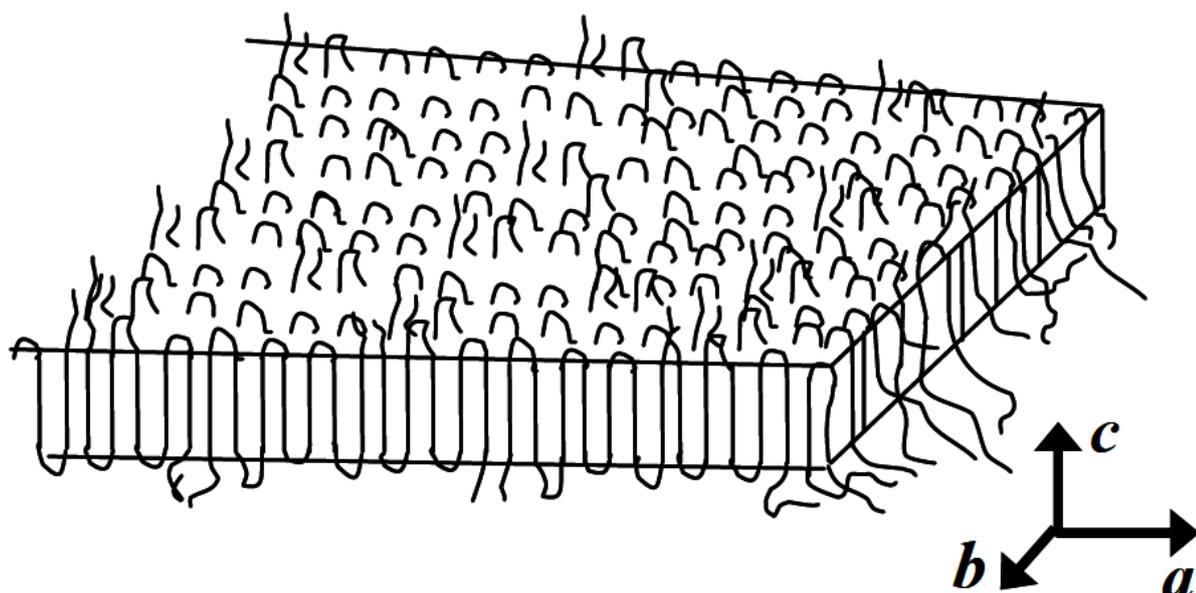


Рисунок 4. Схематическая модель упаковки молекулярной цепи одиночных кристаллов ПОБ [67].

Толщина кристаллов ПОБ варьируется от 4 до 10 нм, в зависимости от молекулярного веса, растворителя и температуры кристаллизации [67].

Для изучения ферментативной деградации монокристаллов ПОБ использовали ПОА-деполимеразы из бактерий и грибов. С помощью деполимераз выяснялась механика деградации кристаллической компоненты ПОБ. Marchessault с соавторами стали одними из первых, кто осуществил ферментативную деградацию монокристаллов ПОБ с помощью ПОА-деполимераз [62, 115, 116]. Они оценивали деградацию с помощью турбидиметрических и титриметрических анализов, а также путем мониторинга изменения молекулярной массы полимера [62]. Было отмечено отсутствие снижения молекулярной массы частично разложившегося полимера. Это, в свою очередь, указывает на преимущественное разрушение краев монокристаллов, а не сгибов цепей на поверхности ламелей. Nobes с соавторами с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) показали, что одиночные кристаллы ПОБ преобразуются в иглообразные структуры после ферментативного разложения [115]. Iwata et al. также исследовали ферментативную деградацию одиночных кристаллов ПОБ и

одиночных кристаллов его сополимеров, используя методы ТЭМ и АСМ (Рисунок 5) [67, 68, 111]. В данных работах указывается, что одиночные кристаллы ферментативно разлагаются преимущественно по краям (плоскость ac) и на концах (плоскость bc), а не на поверхности одиночных кристаллов, где располагаются сгибы цепей (плоскость ab).

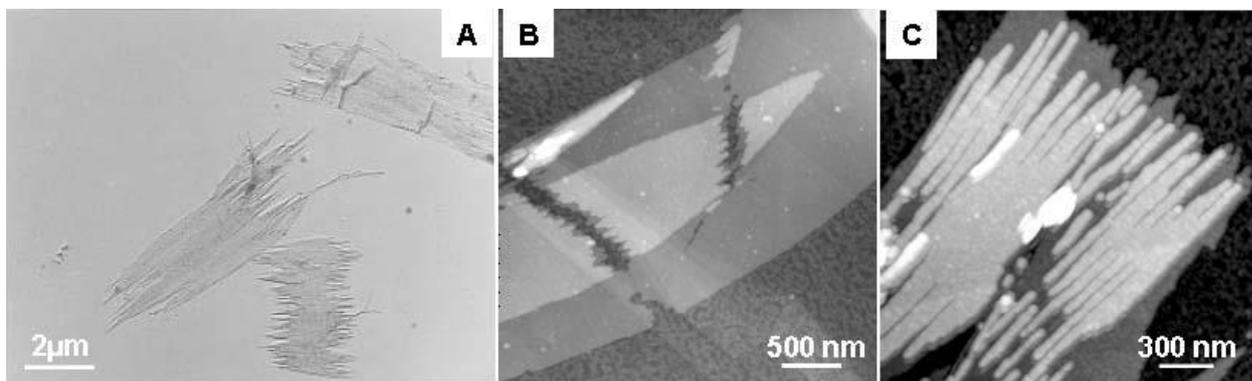


Рисунок 5. Одиночные кристаллы ПОБ после ферментативной деградации ПОА деполимеразы *R. pickettii* T1 at 37 °C [60, 105]. (А) Электронная микрофотография одиночных кристаллов ПОБ после 80 минут ферментативной деградации. (В, С) АСМ изображения одиночных кристаллов [121].

Толщина ламелей и молекулярная масса кристаллов ПОБ не менялась в процессе ферментативной деградации. В процессе ферментативной реакции образовывалось множество узких трещин вдоль длинной оси кристалла, соответствующих кристаллографической оси a монокристаллов ПОБ, независимо от морфологии поверхности монокристаллов и типов ПОА-деполимераз. Это связано с тем, что преимущественно деградируют области свободной упаковки, которые существуют вдоль оси a с более высокой молекулярной подвижностью, а не области упаковки с плотной цепью [119]. Что касается монокристаллов сополимеров ПОБ, то механизм ферментативной деградации был таким же, как в случае монокристаллов ПОБ. Таким образом, авторами была предложена модель кристаллов и положение упорядоченных и неупорядоченных областей упаковки цепей полимера (Рисунок 6).



Рисунок 6. Схематическая модель строения кристалла ПОб [119]. Белые участки – упорядоченные области упаковки, а голубые – неупорядоченные области упаковки кристаллов

Деградация при этом начинается именно с участков неупорядоченной упаковки, что приводит к образованию фибриллоподобных кристаллов. Далее, эти кристаллы также подвергаются разложению сначала по оси b и достигает толщины порядка 28 нм. Затем начинается уменьшение толщины кристалла по оси c , вплоть до 1,9 нм. В результате этих процессов тонкие концевые участки фибриллоподобных кристаллов будут фрагментироваться на более мелкие кусочки, которые, в конечном итоге, будут гидролизваны до водорастворимых димеров и мономеров [119].

При рассмотрении механизма деградации поли-3-оксибутирата и его сополимеров под воздействием бактериальных ферментов, необходимо также проанализировать данные о разрушении ПОб и его сополимеров под действием неспецифических эстераз. По некоторым данным [96, 132], именно они отвечают за разложение полиоксиалканоатов в тканях животных. Исследования возможных изменений ПОб проводились в различных средах. Так пленки из ПОб инкубировались в панкреатине [47], биологических жидкостях, таких как сыворотка и кровь [140], липазах, в том числе липазах грибов [1, 55, 65, 147], тканевых экстрактах [132]. Было установлено [70], что активный центр липазы и ПОб-деполимеразы имеют одну и ту же консервативную последовательность Ser-His-Asp (Серин – Гистидин – Аспарагин). Серин является частью липазного блока пентапептида Gly-X-

Ser-X-Gly, который был обнаружен во всех известных гидролазах, таких как липазы, эстеразы и сериновые протеазы [70].

В литературе описано большое количество работ посвященных разложению ПОБ растворами липаз [1, 55, 131, 159, 164]. Так, в работе Kanmani et al [77] было зафиксировано падение ММ и весовой массы ПОА при инкубации в растворе липазы, выделенной из *B. subtilis* на 21,3% и 28,3% соответственно. Исследование деградации шовных нитей из ПОБ в сыворотке и крови в течение 180 дней выявило падение их массы в сыворотке до 16% и в крови до 25% от изначальной массы [140]. При использовании для деградации ПОБ в качестве среды с разным рН экстракты внутренних органов, таких как печень, мышцы, почки и головной мозг, было показано, что микросферы из ПОБ при повышенном рН (9,5) теряют массы больше (18%), чем при нейтральном рН 7,5 (2%) [132]. Биodeградацию ПОА изучали также в присутствии панкреатина. В работе Freier et al. было показано, что панкреатин не приводит к дополнительной потере массы, по сравнению с ферментативным гидролизом. Однако ММ чистого ПОБ уменьшается. ММ ПОБ в растворе панкреатина в буфере Соренсен (10 мг/мл) снизилась на 34%, а в фосфатном буфере на 11% в течение 84 дней [47]. Такое снижение ММ в процессе биodeградации под действием неспецифических эстераз является отличительной особенностью, в отличие от действия ПОБ-деполимераз. Согласно литературным данным, механизм действия ПОБ-деполимераз связан с деградацией на поверхности полимерной пленки, при этом практически не изменяется ММ [39, 84]. Такая особенность разложения, вероятно, связана с размерами молекул: молекулы ПОБ-деполимеразы имеют относительно большие размеры, что мешает проникновению в толщу полимерной матрицы, а молекулы липазы способны проникать сквозь имеющиеся поры в полимерной пленке и разлагать ее, как на поверхности, так и в объеме. Также было показано, что инкубация пленки ПОБ в растворе липазы приводит к морфологическим изменениям на ее поверхности (Рисунок 7).

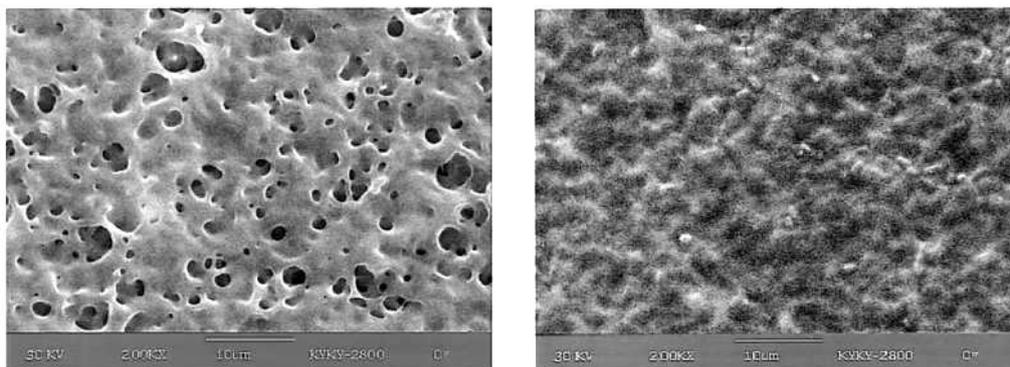


Рисунок 7. Изображение поверхности пленок ПОб до (слева) и после инкубации в растворе липазы (справа) в течение 24 часов [159, 164].

Как видно из рисунка 7, пленка ПОб до инкубации в растворе липазы имела пористую поверхность с диаметром пор от 1 до 5 мкм. Однако после инкубации в растворе липазы в течение 24 часов пленки утратила пористость.

Однако также встречаются противоречивые данные по биодegradации ПОб с помощью липаз. В частности в работе [146] показано, что липазы гидролизуют сложноэфирные связи сложных полиэфиров, но не могут гидролизовать ПОб. Было также показано, что ПОб не разлагался в течение 100 дней при инкубации в растворах липазы грибов и бактерий [65, 147]. Таким образом, в литературе часто представлены противоречивые данные об изменении физико-химических свойствах ПОб, которые требуют уточнения.

4. Применение полиоксиалканоатов

Возможности практического использования ПОб достаточно обширны. Одна из областей применения ПОб – создание на их основе ряда товаров ежедневного пользования, таких как упаковочные материалы, контейнеры для хранения продуктов, одноразовая посуда [25]. Замена синтетических полимеров новыми материалами, которые способны разлагаться в окружающей среде до безвредных продуктов и включаться в круговорот

веществ, является в настоящее время перспективным направлением исследований [30].

Одной из наиболее перспективных отраслей является медицина. Такие свойства ПОА, как биосовместимость и биodeградируемость, а также возможность моделировать и изменять физико-химические свойства, избирательно создавая композиты и сополимеры, открывают значительные перспективы применения ПОА в таких областях медицины, как стоматология, челюстно-лицевая хирургия, ортопедия, сердечно-сосудистая хирургия, герниопластика и хирургия кожи. Разрабатывается большое количество медицинских изделий на основе ПОБ: биорезорбируемые хирургические нити [108, 139, 140], биodeградируемые шурупы и пластинки для хрящевой и костной фиксации [4, 85], биodeградируемые мембраны для лечения пародонтоза, хирургические сетки с ПОБ покрытием для герниопластики [4], заплатки для восстановления дефектов кишечника, перикарда и кости [47, 88], чехлы для восстановления нервных каналов [57, 58].

Учитывая биоразлагаемость и биосовместимость ПОА, наиболее перспективное медицинское применение полимера - изготовление биоконструкций (матриц или скаффолдов) для тканевой инженерии. Создание таких биоконструкций, дополнительно нагруженных лекарственными препаратами (антибиотиками, гормонами, витаминами, белковыми факторами и др.), является передовым направлением в регенеративной медицине и в трансплантологии и имеет огромные перспективы.

4.1 Предъявляемые к 3D матрицам (скаффолдам) ключевые факторы, необходимые при использовании в тканевой инженерии

К любым изделиям, применяемым в медицине, предъявляются определенные требования. Так и матрицы должны соответствовать

некоторым параметрам, позволяющим использовать их в регенеративной медицине. Сюда относятся:

Биосовместимость. В случае тканевой инженерии под биосовместимостью матрицков понимают их способность выполнять функцию трехмерного субстрата, к свойствам которого относятся повышенная адгезия клеток, их пролиферация и миграция *in vitro* [152]. После имплантации матрикс не должен вызывать нежелательной иммунной реакции, способной препятствовать заживлению, или вызывать отторжение организмом [122].

Биодеградируемость. Это один из важнейших аспектов использования матрицков, так как благодаря постепенной деградации происходит высвобождение пространства для новых собственных тканей организма, а, следовательно, исчезает необходимость последующей операции по удалению имплантата [6]. Идеальный матрикс - тот, который способен разлагаться *in vivo* со скоростью, почти пропорциональной скорости формирования новой ткани. Продукты разложения биоразлагаемых материалов должны быть нетоксичными для других тканей.

Выделяют два типа деградации. Первый тип — это деградация, которая происходит во всем объеме матрикса. Причина такой деградации в том, что скорость проникновения воды в объём полимерной матрицы превышает скорость превращения полимера в водорастворимые материалы [72, 107]. Второй тип деградации – поверхностная эрозия, возникающая, когда скорость проникновения воды в материал значительно меньше, чем скорость конверсии полимера в водорастворимые материалы [72, 107]. Поверхностная эрозия протекает слой за слоем при сохранении объемной целостности матрикса. Такая эрозия часто упоминается как биоэрозия, а не биодеградация [48].

Структурные требования. Идеальный матрикс должен иметь некоторое количество пустого пространства для васкуляризации, формирования и ремоделирования новых тканей [28]. Матрикс должны иметь

высокопористую структуру со связанными между собой порами для транспортировки кислорода, питательных веществ и удаления метаболитов, при этом обладать определенной механической устойчивостью [28]. Размер пор более 300 мкм считается оптимальным для поддержания прорастания тканей, переноса питательных веществ и формирования капилляров, в то время как соединяющие поры должны быть более 100 мкм [53].

Механические требования. Идеальный матрикс должен иметь механические свойства, соответствующие анатомическому участку, в который он имплантируется. При этом, с практической точки зрения, он должен быть достаточно прочным, чтобы выполнять свои функции в процессе эксплуатации. Хотя это справедливо для всех тканей, есть определенные проблемы для применения в области сердечно-сосудистых материалов и ортопедии. Создание матриксов с приемлемыми механическими свойствами является одной из наиболее актуальных проблем костной и хрящевой инженерии. Для этих тканей имплантированный матрикс должен иметь достаточную механическую целостность, чтобы функционировать с момента имплантации до завершения процесса ремоделирования ткани организма. При этом матриксам недостаточно обладать только хорошей механической прочностью. Наиболее важно соблюдать баланс между механическими свойствами и пористой архитектурой, достаточной для обеспечения клеточной инфильтрации и васкуляризации [122].

4.2 Биодegradация биополимерных матриксов

В настоящее время, при изготовлении матриксов для тканевой инженерии ученые обращают внимание на три категории материалов:

1. подтвержденно биодegradируемые полимеры, такие как коллаген, полигликолевая кислота, полилактиды, и другие.
2. Полимеры, биодegradируемость которых требует большего количество исследований, такие как полиортоэстеры.

3. Композиты (например, полилактид-лизин), которые могут избирательно направлять рост и дифференциацию клеток в определенном направлении.

Наиболее часто применяются полимеры первой категории, основные представители которой приведены в таблице 2.

Таблица 2. Представители группы полимеров, чья биodeградируемость доказана исследованиями.

Полимер	Сравнение механических свойств полимеров	Механизм деградации	Потери молекулярного веса и механических свойств (месяцы)*	Потеря массы (месяцы) *
Поли(л-лактид)	Хорошие	Эрозия в объеме	9-15	36-48
Поли(Л-лактид-гликолид) 70/30	Средние	Эрозия в объеме	5-6	12-18
Поли(Л-лактид-гликолид) 10/90	Средние	Эрозия в объеме	1-2	3-4
Поликапролактон	Плохие	Эрозия в объеме и на поверхности	9-12	24-36
Полиоксисилканоаты	Средние	Эрозия в объеме и на поверхности	6-12	12-36
Полиортоэстеры	Средние	Эрозия поверхности	4-6	12-18
Полиангидриды	Средние	Эрозия поверхности	4-6	12-18

* - различия в потерях молекулярной массы и массы образца зависят от таких факторов как, химическая структура и состав; присутствие ионных групп или боковые дефекты; степень полидисперсности (разброс молекулярной массы); присутствие низкомолекулярных компонентов (мономеры, олигомеры, растворители и др.); процессы производства и упаковки полимеров и параметры этих процессов; вид имплантата; метод стерилизации, морфология (наличие и соотношение аморфной и кристаллической компоненты) и другие.

Как видно из таблицы 2, полимеры имеют разную способность к биоразложению. Разница заключается также в том, каким образом

происходит разложение, то есть насколько большая разница имеется между потерей молекулярной массы и потерей массы самого скаффолда. Поэтому, учитывая различные способности к биодegradации, существуют две стратегии в получении скаффолдов.

Стратегия 1.

Согласно первой стратегии, физическая структура скаффолда поддерживает рост клеток и тканей до периода, когда материал имплантата заменяется на ткань организма. В случае таких тканей, как суставной хрящ или кость, структура скаффолда должна обеспечивать достаточную временную механическую поддержку, позволяющую выдерживать естественные напряжения и нагрузки. Согласно данной стратегии, выбранный материал должен обладать такой скоростью деградации и резорбции, чтобы прочность скаффолда сохранялась до того момента, когда имплантат будет полностью замещен тканью организма, способной выполнять свою структурную роль.

Кость можно реконструировать под, так называемой, физиологической нагрузкой [60]. Кинетика деградации и резорбции при этом должна контролироваться таким образом, чтобы биоразлагаемый скаффолд сохранял свои физические свойства как минимум 6 месяцев (4 месяца для клеточной культуры). Затем он должен начать терять свои механические свойства, и метаболизироваться без иммунологических реакций через 12-18 месяцев (Рисунок 8).

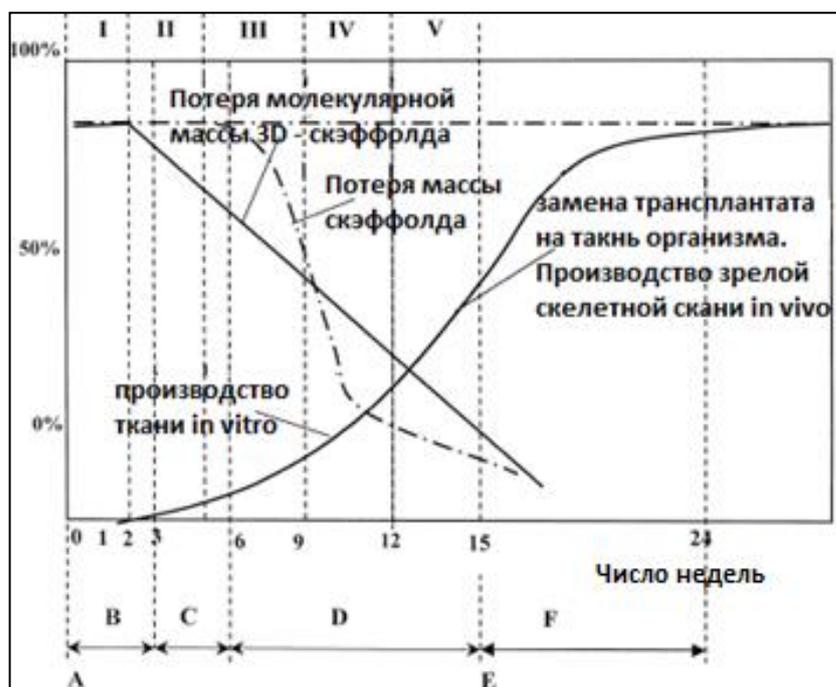


Рисунок 8. Графическая иллюстрация комплекса взаимозависимости потери молекулярной массы от массы скаффолда. По оси абсцисс – временные рамки для тканевой инженерии хряща/кости, по оси ординат – матрица скаффолда. А – получение биоразлагаемого скаффолда. В – посадка остеобластов на полимерный скаффолд в статической культуре (чашка Петри). С – рост ткани в динамическом окружении (вращающаяся колба). D – рост зрелой ткани в физиологических условиях (биореактор). E – хирургическая трансплантация. F – замена трансплантата на ткань организма [66].

Механические свойства биоразлагаемого имплантируемого скаффолда должны как можно более близко совпадать со свойствами окружающих тканей. Матрикс должен обладать достаточной прочностью и жесткостью, чтобы функционировать в течение периода, пока нарастающая ткань не заменит медленно исчезающую матрицу скаффолда.

В работе [144] были изучены свойства поли(D, L-лактид-гликолидной) матрицы при циклической сжимающей нагрузке. Авторы пришли к выводу, что при сжимающей нагрузке полимерная матрица разрушается и ей придается определенная жесткость. Уменьшение молекулярной массы замедляется из-за снижения площади поверхности в процессе гидролиза до тех пор, пока структура матрицы в состоянии выдерживать механическую нагрузку. Затем происходит разрушение матрицы.

Стратегия 2.

Согласно второй стратегии получения скаффолдов, механические свойства и структура матрикса являются каркасом для клеточного роста и дифференциации только до того периода, когда зачатки костной или хрящевой ткани помещают в физиологические условия (Рисунок 9).

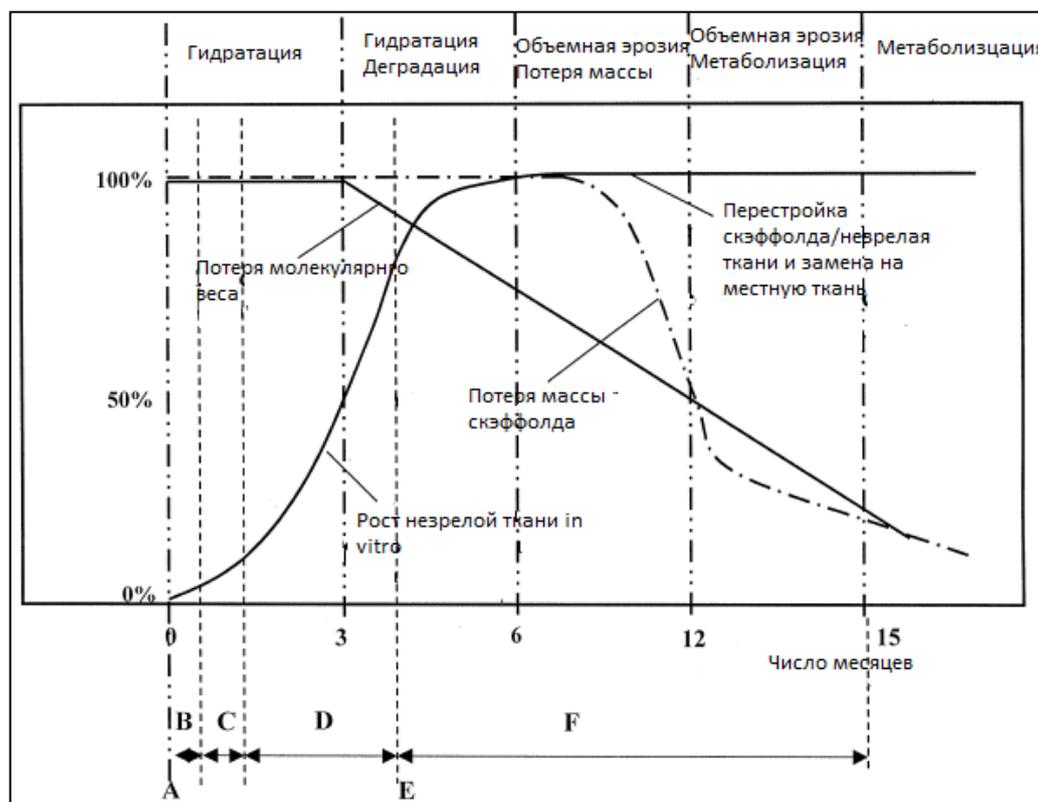


Рисунок 9. Графическая иллюстрация комплекса взаимозависимости потери молекулярного массы от массы скаффолда. А - получение биоразлагаемого скаффолда. В – посадка остеобластов на полимерный скаффолд в статической культуре (чашка Петри). С – рост ткани в динамическом окружении (вращающаяся колба). D – рост зрелой ткани в физиологических условиях. E – хирургическая трансплантация. F – замена трансплантата на ткань организма [66].

При этом кинетика деградации и резорбции скаффолда должна быть смоделирована так, чтобы позволить клеткам вырасти и секретировать свой собственный внеклеточный матрикс в статической и динамической фазе культивирования клеток (1-12 неделя). В это время полимерное изделие постепенно исчезает, оставляя достаточно места для роста новых клеток и тканей. Механическая прочность скаффолда сохраняется, пока

выращиваемая ткань не будет иметь достаточную механическую прочность, чтобы поддерживать самоё себя.

Было показано, что кинетика деградации и резорбции нетканой сетки из волокон полигликолида соответствует второй стратегии [44]. Тем не менее, задача конструкции из выросших клеток / ткани заключается в придании ей механических свойств, аналогичных свойствам окружающей костной или хрящевой ткани организма. В работе [101] было показано, что клетки хряща, которые культивировали в течение 7 месяцев в физиологических условиях, имели только 40% от механических свойств природного хряща. В моделях *in vivo* главная проблема с биомеханической и клинической точки зрения заключается в том, как механически стабилизировать трансплантат. Для этого важно *in vitro* изучать механические свойства скаффолдов.

В работе [92] показана взаимосвязь между количеством порообразователя и механическими свойствами скаффолда. Было выявлено, что модуль упругости на сжатие и предел прочности уменьшаются с увеличением количества порообразователя. Средние значения предела прочности варьировались от 11 МПа для 5% концентрации порообразователя до 2,7 МПа для 30% концентрации порообразователя. Средние значения модуля упругости варьировались между 168,3 МПа при 5% концентрации азодикарбонамида до 43,5 МПа для 30% (Рисунок 10).

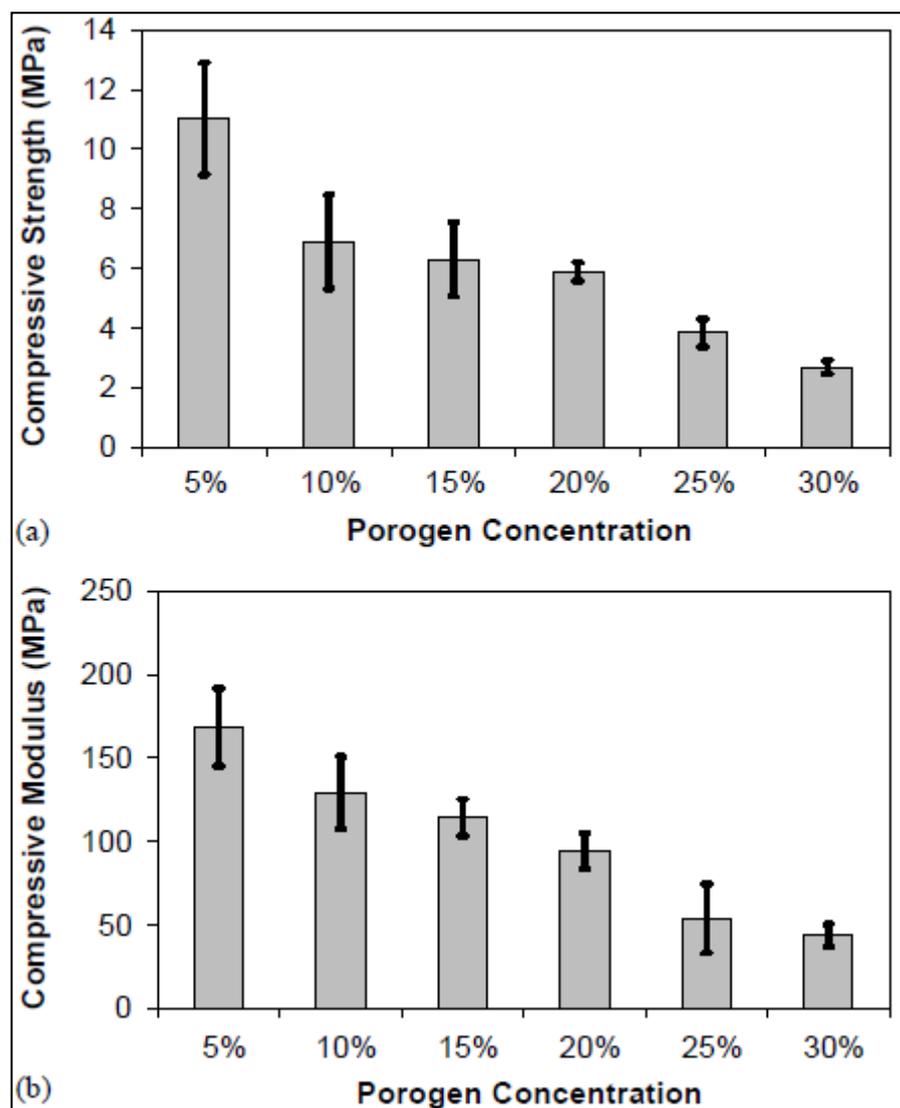


Рисунок 10. (a) средние значения предела прочности и (b) средние значения модуля Юнга для скаффолдов из поли(л-лактида-дл-лактида) созданные с указанными концентрациями азодикарбонамида [87].

Механические свойства, измеренные для таких скаффолдов, находились в диапазоне прочности и модуля Юнга для губчатой кости человека (1-10 МПа), и человеческой трабекулярной кости (1-10 МПа для прочности и 50-250 МПа для модуля упругости) [56].

Таким образом, при планировании изучения биodeградации необходимо иметь ввиду будущую функциональную роль скаффолда. На его способность к разложению влияют не только механические свойства полимера, которые необходимо учитывать при получении скаффолда, но и структура – количество пор, их размер и так далее. Поэтому изучение

биодegradации скаффолдов является комплексным процессом, включающим множество методов исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования и материалы

В работе были исследованы экспериментальные образцы ПОА, полученные нами в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального Исследовательского Центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Культурально-морфологические признаки штаммов: колонии крупные, слизистые; клетки продолговатой формы, грамотрицательные, подвижные (со жгутиками), расположены одиночно, парами и в цепочках, строгие аэробы. Для синтеза полимеров использовали штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б, способный к сверхсинтезу ПОБ (до 80 % ПОБ от сухого веса клеток). Штамм выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва). Коллекционный штамм *Azotobacter* поддерживали на среде Эшби (г/л: K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; $NaCl$ – 0,2; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,006; $CaCO_3$ – 5,0; сахароза – 20; агар – 20). Для достижения сверхсинтеза поли-3-гидроксибутирата в клетках культуру азотобактера выращивали при 28°C в течение 48 часов на жидкой среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,006; цитрат Na – 0,5; $CaCl_2$ – 0,1; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 1,05; KH_2PO_4 – 0,2; сахароза – 40. Синтез проводился в качалочных колбах объемом 750 мл (200 мл среды) при 250 об/мин, исходных pH среды – 7,2; возраст посевного материала – 1 сутки; объем вносимого посевного материала – 4% [15, 16, 19, 21, 112, 113].

2. Выделение и очистка ПОА из биомассы

Выделение и очистка полимера из биомассы включали следующие стадии:

1. Получение очищенной сухой биомассы с помощью центрифугирования, промывкой биомассы изопропанолом и сушкой при 60°C;

2. Получение раствора ПОА. Для получения раствора ПОА проводилась экстракция полимера из сухой биомассы с помощью хлороформа при нагревании до 35-40°C, с последующей фильтрацией и упариванием раствора;

3. Получение очищенного ПОА. Очищенные ПОА получали осаждением ПОА из раствора изопропанолом с последующей фильтрацией. Полученный гель заново промывали изопропиловым спиртом и сушили при температуре 60°C.

Для синтеза ПОБВ сополимера с разным процентом вхождения валерата концентрация сахарозы была снижена до 30 г/л среды; через 10 часов после начала инкубации культуры в питательную среду было добавлено 20 мМ валериановой кислоты (в виде натриевой соли) [112, 113].

В работе были использованы следующие реактивы: полилактиды (Fluka, ММ 400 кДа), натрий фосфорнокислый 1-замещенный (NaH_2PO_4 , ХИММЕД, ММ=121), дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4 , ХИММЕД), азид натрия (NaN_3 , ДИА-М, Россия), хлорид калия (KCl , ХИММЕД), хлорид натрия (NaCl , ХИММЕД), гидрокарбонат натрия (NaHCO_3), Гидроортофосфат калия (K_2HPO_4 , ХИММЕД, РФ), хлорид магния (MgCl_2), липаза из поджелудочной железы свиньи ($A = 30-90 \text{ U/mg}$ в триацетине, ММ = 50 кДа, Sigma-Aldrich, США), хлороформ (трихлорметан CHCl_3 , ЗАО «ЭКОС-1», РФ), соляная кислота (HCl , «ОСЧ 20-4», ХИММЕД, РФ), натрий гидроокись (NaOH , ХЧ, ХИММЕД, РФ) [167].

3. Изготовление макроскопических и ультратонких пленок

В работе использовали пленки ПОБ двух типов: макроскопические и ультратонкие.

Перед изготовлением макроскопических пленок чашки Петри обезжировали спиртом и промывали хлороформом. Полимер (~400 мг) растворяли в хлороформе (35 мл) в течение ночи. Затем, пропускали через фильтр для удаления микрочастиц, способных заблокировать капилляр вискозиметра. Раствор хлороформа с полимером (1,2%) выливали на дно

стеклянной чашки Петри и оставляли на воздухе до полного испарения растворителя. Чашки Петри помещались на столик с ватерпасом. Контролируемая ватерпасом горизонтальность устанавливается при помощи навинченных на ножки столика шайб для равномерного высушивания пленки. После высыхания пленки отделяли от чашки водой и высушивали на воздухе. При этом морфология той стороны пленки, которая касалась стекла («нижняя»), отличалась от морфологии той стороны, которая была обращена на воздух («верхняя»). Измерения проводили на «нижней», более гладкой стороне пленки [166, 167].

Толщину пленок измеряли с помощью микрометра (Etari E110, Германия), выбирали участки равномерные по толщине и вырезали пленки с размерами 3×1 см², которые использовали в экспериментах. Средняя толщина пленок составляла 50 ± 10 мкм. Степень потери веса пленок полимера определяли гравиметрически на весах AL-64 (ACCULAB, США).

Ультратонкие пленки готовили методом нанесения на вращающуюся подложку (spin-coating) [26]. Особенность данного метода заключается в том, что при нанесении раствор полимера равномерно располагается на поверхности пленки. Вследствие быстрого испарения растворителя, полимер переходит в метастабильное состояние. ПОБ наносили на слюду методом spin-coating из раствора в хлороформе с концентрацией 0,5 мг/мл (на одно нанесение использовали объем $V=50$ мкл). Частота вращения подложки составляла $\omega=3000-5000$ об/мин [166–169].

4. Исследование биodeградации пленок полиоксиалканоатов in vitro.

Для измерения гидролитической деградации пленки ПОА (массой ~20 мг) инкубировали в 15 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (pH = 7,4) в 15 мл флаконах при 37° в течение 183 дней. Для определения изменения массы пленок после инкубирования, пленки промывали дистиллированной водой и высушивали до установления равновесия на весах. Для изучения ферментативной деградации in vitro пленки ПОА инкубировали в растворе

(концентрация 0,25 мг/мл) свиной панкреатической липазы (Type II, Sigma Aldrich A=30-90 U/mg белка, используя как субстрат, триацетин) в 0,01 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH = 7,4) при 37° в течение 183 дней. Для ингибирования роста микроорганизмов и предотвращения их вклада в биodeградацию в буферный раствор добавляли азид натрия (NaN₃) в концентрации 2 г/л. Буферный раствор заменялся в пробирках дважды в неделю. Для измерения массы полимера, пленки вынимали из раствора и сушили до установления равновесия на весах. Перед измерениями для полного удаления молекул липазы пленки инкубировали в 0,1% растворе SDS в течение 2 часов, отмывали детергент водой и затем высушивали [166, 167].

Исследование биodeградации скаффолдов из ПОА также проводили в 0,01 М натрий-фосфатном буфере с добавлением свиной панкреатической липазы в концентрации 0,25 мг/мл. в течение 183 дней. Для исключения вклада в деградацию скаффолдов микроорганизмов в раствор добавляли азид натрия (NaN₃) в концентрации 2 г/л. Раствор буфера с добавлением липазы заменяли дважды в неделю. Перед измерением массы скаффолдов их вынимали из раствора буфера с липазой, промывали детергентом и высушивали до установления равновесия на весах.

5. Атомно-силовая микроскопия

Исследование морфологии и процесса кристаллизации пленок осуществлялось на микроскопах Solver PRO и Smena фирмы ЗАО «Нанотехнология МДТ» (Россия, Зеленоград). При работе с ультратонкими пленками использовали микроскоп Solver PRO, оснащенный сканером с полем зрения 50x50x4 мкм. При работе с макроскопическими пленками использовали микроскоп Smena с полем зрения 100x100x7 мкм. Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе. Использовались кремниевые кантилеверы ETALON (радиус закругления 10 нм, жесткость – 3,5 (для 80 мкм кантилевера) и 12 Н/м (для 110 мкм

кантилевера)) и NSG 11 (радиус закругления 10 нм, жесткость – 5,5-22,5 (для 100 мкм кантилевера) и 2,5-10 Н/м (для 130 мкм кантилевера)) [23, 166–168].

Для проведения измерений методом АСМ при заданной температуре использовали термостоллик атомно-силового микроскопа SU045NTF, максимальная температура нагрева которого равна 120°C. Перед изменением температуры подложки выполнялась процедура отвода кантилевера от подложки вследствие расширения подложки под действием температуры. В противном случае расширение может привести к поломке кантилевера.

Для выбора области сканирования использовали оптическую систему, совмещенную с АСМ. На обратной стороне образца (пленки полимера) наносилась метка, видимая при просвечивании пленки в оптическую систему микроскопа. Далее осуществлялся поиск участка на поверхности пленки с наличием какой-либо особенности поверхности (дефект полимера). Возвращаясь к данному участку через определенное время в течение эксперимента, получали данные о происходящих изменениях в морфологии поверхности пленки.

Для описания поверхности образцов вычисляли два параметра шероховатости:

- среднюю шероховатость:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |r_n|$$

- среднеквадратичную шероховатость:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N r_n^2}$$

Эти параметры вычисляли по трем кадрам 20x20 мкм², в каждом кадре 512x512 точек. Кроме того, обычно с каждого образца получали несколько

кадров с лучшим разрешением (например, 5x5 мкм², 512x512 точек) для более детального описания поверхности [23, 166, 167].

АСМ-изображения обрабатывали с помощью программ Nova (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) и FemtoScan Online (ЗАО «Центр Перспективных Технологий», Россия).

6. Определение молекулярной массы

Величину молекулярной массы ПОБ и ПОБВ определяли методом капиллярной вискозиметрии, используя капиллярный стеклянный вискозиметр марки ВПЖ-1 (диаметр капилляра 0,34 мм).

Для измерения вязкости в вискозиметр заливали 11 мл раствора и помещали его строго вертикально в термостат. Вязкость определяли при температуре 30±0,5°C. До измерения времени истечения раствор термостатировали 15-20 мин. Среднее время истечения раствора полимера в хлороформе определяли из 6-8 результатов. Для определения характеристической вязкости измерения проводили для 4-5 концентраций. Различные концентрации получали путем разбавления исходного раствора наибольшей концентрации хлороформом. Концентрация исследуемых образцов находилась в пределах 100-190 мг полимера на 100 мл хлороформа. Времена истечения растворов в эксперименте составляли от 110 до 190 сек. Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{уд} = (t - t_0) / t_0$$

где t_0 – время истечения растворителя, сек;

t – время истечения раствора полимера, сек.

Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка - Хаувинка - Куна, используя следующие коэффициенты:

$$[\eta] = 7,7 \times 10^{-5} \times M^{0,82} \quad [103],$$

Где $[\eta]$ – характеристическая вязкость. Для определения $[\eta]$ экспериментально полученные числовые значения отражали в системе координат, откладывая по оси абсцисс концентрацию раствора полимера (C), по оси ординат – значения приведенной вязкости ($\eta_{уд}/C$). Экстраполяцией

полученной прямой до оси ординат получали значение характеристической вязкости $[\eta]$. Точность определения $[\eta]$ составляет $\sim 1\%$. Точность определения молекулярной массы, вычисленной по уравнению Марка - Хаувинка - Куна, составляет 2-5% [170].

7. Механические свойства

Изучение механических свойств пленок проводили с использованием метода наноиндентирования в соответствии с рекомендациями ISO 14577. Измерения осуществляли с помощью сканирующего нанотвердомера NanoScan-4D (ФГБНУ ТИСНУМ, Троицк, Москва, Россия) [86]. Наноиндентирование проводили на гладкой стороне пленок для нивелирования влияния шероховатости на измерение модуля Юнга полимера. Пленки с размерами 2×2 мм² были зафиксированы фенилсалицилатом. 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.

Реологические измерения проводили на реометре MCR-302 (Anton Paar, Австрия). Измерения проводили на влажных образцах при температуре 25°C. Использовали геометрию плита–плита с диаметром верхней плиты равной 25 мм, толщина образцов составляла 2–4 мм. Скорость сжатия была линейной и равнялась 0,01 мм/с. Выходные данные нормальной силы (F_n) и изменение зазора между плитами (gap) пересчитывались в программе OriginPro 8.6 (США) в величины давления (P) и относительной деформации (σ). Затем строилась кривая в координатах зависимости давления (P) от относительной деформации (σ). Модуль Юнга образца высчитывали по тангенсу угла наклона линейной части графика.

8. Оценка гидрофильности пленок

Измерения производили на цифровом угломере Contact Angle Meter 110 VAC (Cole-Parmer, США). Исследуемую пленку ПОА фиксировали на предметном стекле гладкой поверхностью вверх. Затем стекло помещали в поле зрения видеокамеры прибора перед источником света. Далее на поверхность пленки с помощью микрошприца наносили каплю milliQ воды объемом 10 мкл и измеряли контактный угол между поверхностью пленки и каплей. Контактный угол измеряли для 8 капель при температуре 25° С, и высчитывали среднее значение. Точность метода составляет 0,1%, но из-за шероховатости образца типичная статистическая ошибка находилась в диапазоне 1-2% [9].

9. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Тепловые свойства пленочных образцов из ПОБ и его сополимеров были измерены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC 204 F1 Phoenix, Netzsch, Германия). Около 1-3 мг полимерной пленки помещали в 25мкл алюминиевый тигель. Образцы нагревали от 25 до 220°С при скорости нагрева 10 К/мин в атмосфере аргона. Для точной калибровки температуры и энтальпии в диапазоне температур от -100°С до 600°С в соответствии с инструкциями производителя был использован калибровочный набор Netzsch (образцы высокой чистоты KNO₃, In, Bi, Sn, Zn, CsCl, Hg, C₆H₁₂). Кристалличность структуры ПОБ (X_c) может быть рассчитана следующим образом [165]:

$$X_c = (\Delta H_m) / \Delta H_m^0(\text{ПОБ}) \times 100\%,$$

где ΔH_m – изменение энтальпии, вызванное плавлением исследуемого образца, $\Delta H_m^0(\text{ПОБ})$ - теоретическое значение для термодинамической энтальпии плавления, которое было бы получено для 100%-кристаллических образцов ПОБ (146,6 Дж/г) [9, 169].

10.Изготовление пористых матриц (скаффолдов) из полиоксиалканоатов

Скаффолды изготавливали модифицированным методом выщелачивания. Эта модификация 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°C) до полного прекращения газообразования, промывали дистиллированной водой 5 раз и высушивали при 37°C в течение суток [20, 117].

11.Статистический анализ

Для статистического анализа использовался программный пакет SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего ($M \pm SD$) при уровне значимости $P < 0.05$. Средние значения физико-химических свойств полиоксиалканоатов вычисляли минимум из трех измерений [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Синтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров

Общее количество исследуемых полимеров в данной работе равно 13. Данные полимеры отличаются друг от друга по молекулярной массе, молярному содержанию 3-оксивалерата, наличию остатков 4-метилвалерата и полиэтиленгликоля (Таблица 3).

Таблица 3. Полиоксиалканоаты, используемые в работе.

Поли-3-оксибутират 105 кДа	Поли-3-оксибутират разной молекулярной массы
Поли-3-оксибутират 364 кДа	
Поли-3-оксибутират 1095 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 2.5 мол%, 768 кДа	Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат с разным вхождением 3-оксивалерата и разной молекулярной массы
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 5.9 мол%, 819 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 9.0 мол%, 850 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 9.0 мол%, 1010 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 9.6 мол%, 320 кДа	Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат с разным вхождением 3-оксивалерата и разной молекулярной массы
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 17.6 мол%, 220 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 17.6 мол%, 635 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат 17.6 мол%, 1190 кДа	
Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-полиэтиленгликоль 290 кДа	Поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-полиэтиленгликоль
Поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат 1340 кДа	Поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат

Нами была 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. Были проведены 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. В таблице 4 суммированы данные по параметрам биосинтеза биополимеров штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б, растущего в культуральной среде с сахарозой в качестве основного источника углерода и различных дополнительных источников углерода: ацетата натрия (АН); натриевых солей различных карбоновых кислот валериановой (пентановой), 4-метилвалериановой (4-метилпентановой) и ПЭГ 300 [15, 19, 21, 113]. Если использовать сахарозу в качестве единственного источника углерода для синтеза биополимера, то *A.chroococcum* 7Б образует высокомолекулярный ПОБ [19, 112, 113]. Также было исследовано влияние ацетата натрия при добавлении его в различных концентрациях в культуральную среду на биосинтез ПОБ *A.chroococcum* 7Б. Было продемонстрировано, 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. Причем, уменьшение молекулярной массы полимера было обратно пропорционально концентрации ацетата натрия, добавляемого в культуральную среду (в интервале от 20 до 60 мМ) [112]. Это можно объяснить тем, что, вероятно, при повышении внутриклеточной концентрации ацетильных групп возрастает активность ацетоацетил-КоА редуктазы, вследствие чего, повышается концентрация гидроксibuтирил-КоА, который является субстратом ПОБ-полимеразы. При высоких концентрациях ацетата образуется большое количество центров полимеризации и большое количество начальных фрагментов полимерных цепей, что приводит к синтезу ПОБ с более низкой молекулярной массой.

Таблица 4. Параметры биосинтеза и основные характеристики синтезируемых ПОБ и ПОБВ штаммом-продуцентом *A. 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 биомассы, г/л среды	Содержа- ние ПОА в биомассе, % от сухого веса клеток	Молекуляр- ная масса ПОА, ×10 ⁶ Да	Содержа- ние ЗОВ/ЗОВ в сополимере , мол. %	Обозначе- ние полу- ченного по- лимера
Сахароза, 50 мМ	-	5,8±0,6	83,4±3,1	1,09	0	ПОБ 1095
Сахароза + 35 мМ АН	0	4,3±0,5*	71,7±3,2*	0,364	0	ПОБ 364
Сахароза + 100 мМ АН	0	1,9±0,6*	58,8±3,6 *	0,1	0	ПОБ 105
Сахароза + 5 мМ ВК	12	4,4±0,9*	76,2±3,0*	1,22	2,5	ПОБВ 2,5% 1224
Сахароза + 10 мМ ВК + 20 мМ АН	12/0	3,6±0,9*	71,4±3,5*	0,82	5,9	ПОБВ 5,9% 1253
Сахароза + 10 мМ ВК	12	4,2±0,5*	73,8±3,7*	1,39	9,0	ПОБВ 9% 1385
Сахароза + 20 мМ ВК	0	3,2±0,4*	67,7±3,0*	0,82	9,0	ПОБВ 9% 850
Сахароза + 20 мМ ВК + 60 мМ АН	12/0	2,6±0,3*	49,5±3,2*	0,21	9,6	ПОБВ 9,6% 210
Сахароза +35 мМ ВК + 50 мМ АН	12/0	2,6±1,4*	65,8±4,5*	0,22	17,6	ПОБВ 17,6% 220
Сахароза +20 мМ ВК + 20 мМ АН	12/0	3,4±1,1*	68,7±4,3*	0,635	17,6	ПОБВ 17,6% 635
Сахароза + 20 мМ ВК	9	3,5±0,6*	69,8±4,1*	1190	17,6	ПОБВ 17,6% 1190
Сахароза + 20 мМ 4МВК#	12	3,4±0,9*	76,7±3,3*	1,30	0,60	ПОБ-4МВ 1360
Сахароза + 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.

Для улучшения физико-химических и биомедицинских свойств ПОБ в культуральную среду добавляли соли валерата и пропионата, что приводит к

получению сополимера ПОБВ с отличающимися физико-механическими свойствами [35, 112]. Кроме того, было предложено использовать не только мономерные органические кислоты или спирты, а также некоторые полимеры, например полиэтиленгликоль, в качестве дополнительного источника углерода для биосинтеза сополимеров ПОБ [137].

При биосинтезе полимера с использованием в качестве дополнительного источника углерода ВК был получен сополимер ПОБ с ЗОВ – ПОБВ. Включение ЗОВ в цепь сополимера было подтверждено с помощью ^1H -ЯМР (Рисунок 11).

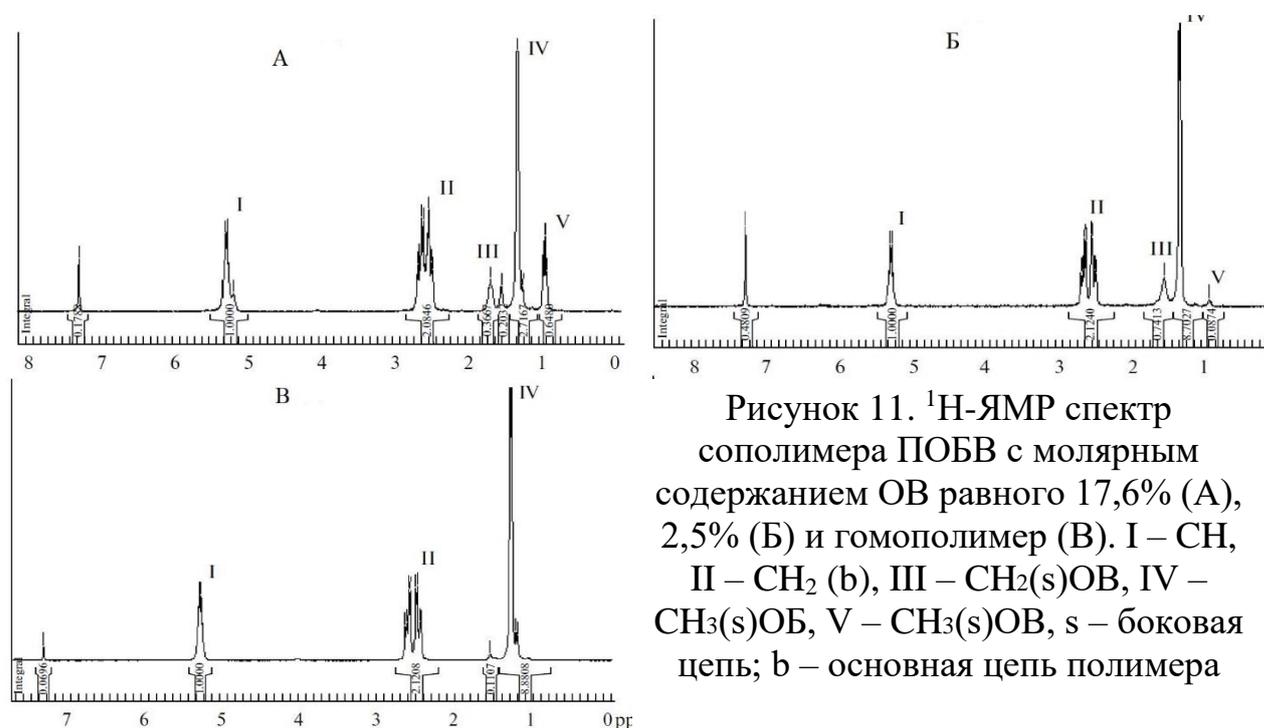


Рисунок 11. ^1H -ЯМР спектр сополимера ПОБВ с молярным содержанием ОВ равного 17,6% (А), 2,5% (Б) и гомополимер (В). I – CH , II – CH_2 (b), III – CH_2 (s)ОВ, IV – CH_3 (s)ОБ, V – CH_3 (s)ОВ, s – боковая цепь; b – основная цепь полимера

Спектр ^1H -ЯМР ПОБВ отобразил сигнал метильной группы 3-ОВ с химическим сдвигом 0,89 ppm в сравнении со спектром гомополимера ПОБ, в котором этого сигнала не было. Анализ ^1H -ЯМР-спектров показал, что сополимер представляет собой блок-сополимер, так как мощность сигнала от протона эфирной β -углеродной группы, прямо пропорциональна сигналу метильной группы 3-ОВ при 0,89 ppm и метильной группы 3-ОБ при 1,27 ppm [113].

Также удалось синтезировать новый сополимер ПОБ4МВ, добавив в культуральную среду аналог ВК – 4МВК в качестве дополнительного

источника углерода и предшественника мономера 3О4МВ в цепи сополимера. Вхождение остатков 3О4МВ в состав синтезированного полимера ПОБ4МВ было также подтверждено методом ^1H -ЯМР. На спектре ^1H -ЯМР 4-метильная группа (е) и $-\text{CH}$ группа (ж) мономера 3О4МВ проявляется в виде пиков, соответственно, при 0.90 ppm и 1.91 (Рисунок 12), тогда как у гомополимера ПОБ и сополимера ПОБВ в этой области нет сигналов.

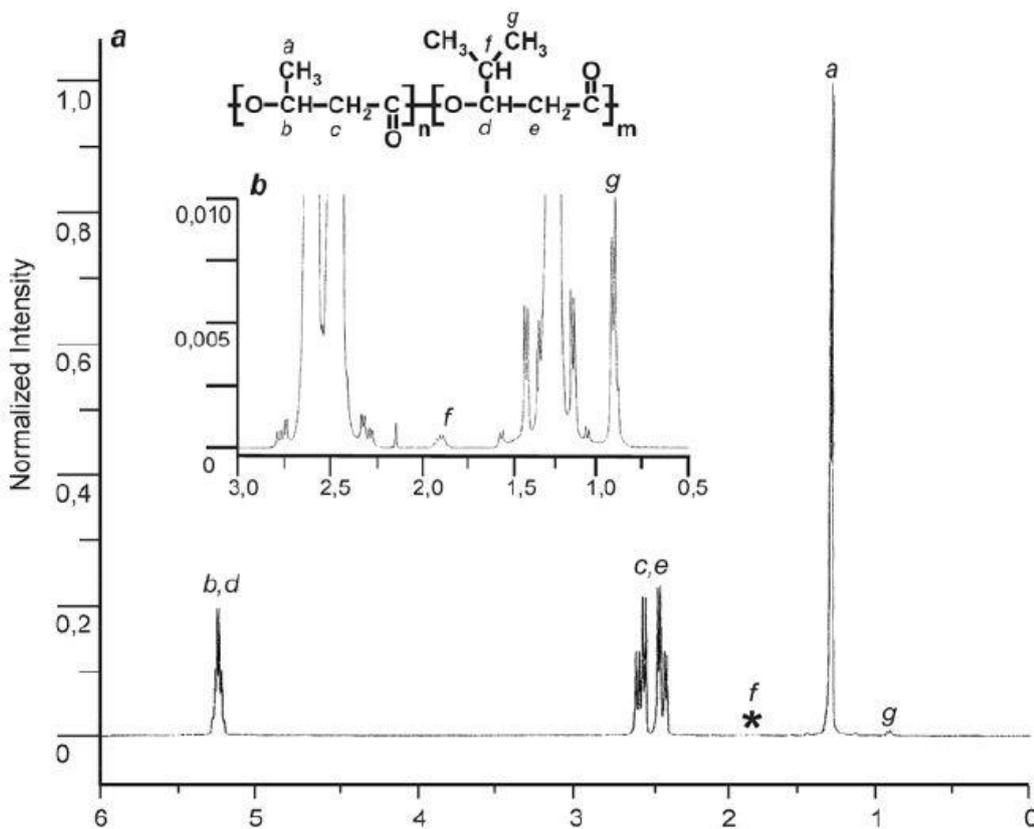


Рисунок 12. ^1H -ЯМР спектр сополимера ПОБ-4МВ: (а) цепь ПОБ: 1 – $\text{CH}_3(s)$, 2 – $\text{CH}(b)$, 3 – $\text{CH}_2(b)$, цепь поли-3-окси-4-метилвалерат (b): 4 – $\text{CH}_2(s)$, 5 – $\text{CH}_3(s)$, 6 – $\text{CH}(b)$, 7 – $\text{CH}_2(b)$, s – боковая цепь; b – основная цепь полимера.

Для синтеза новых сополимеров в качестве добавок в культуральную среду использовали полиэтиленгликоль-300. Добавление этих компонентов в концентрации 150 мМ с сахарозой также приводит к включению мономеров этиленгликоля ЭГ в синтезируемый полимер ПОБ. Включение мономеров было подтверждено ^1H -ЯМР-спектроскопией вновь синтезированного сополимера ПОБВ-ПЭГ (Рисунок 13) [15].

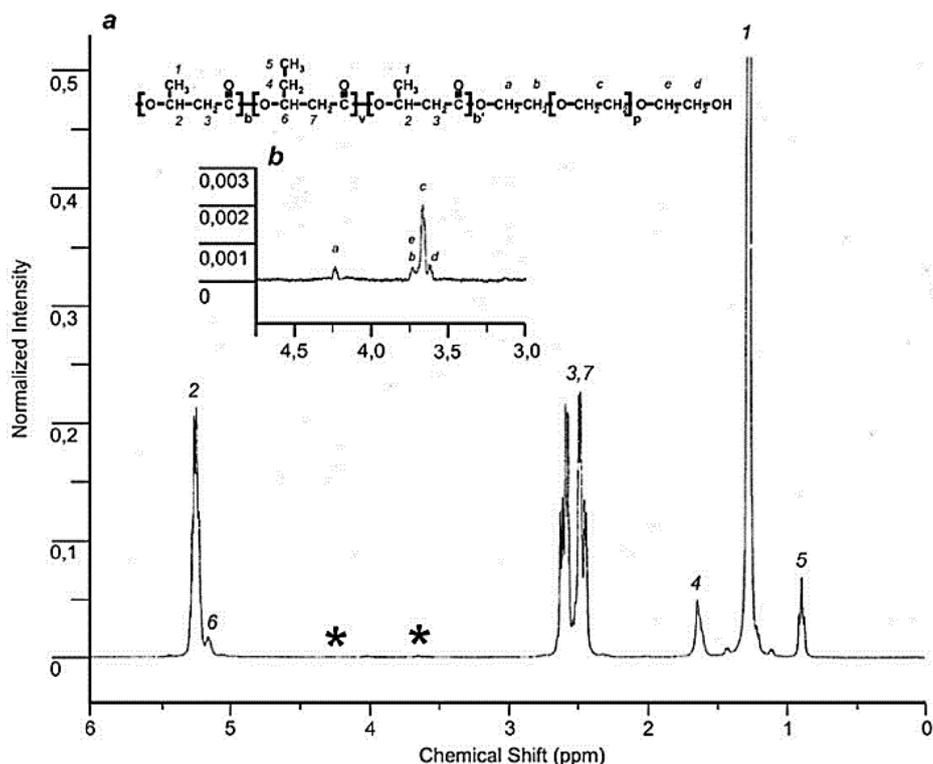


Рисунок 13. ¹H-ЯМР спектр сополимера ПОВВ-ПЭГ: (а) – полимерная цепь ПОВ: 1 - CH₃(*s*), 2 - CH(*b*), 3 - CH₂(*b*), полимерная цепь ПОВВ: 4 - CH₂(*s*), 5 - CH₃(*s*), 6 - CH(*b*), 7 - CH₂(*b*), *s* - главная цепь, и *b*- боковые группы; * увеличенный участок графика изображен на врезке (b); (b) цепь ПЭГ: «а» -O-CH₂ (4.24 ppm), «b» - CH₂ (3.73), «с» - общий сигнал от серединных групп [-O-CH₂-CH₂-] (3.66 ppm), «е» и «d» концевые -CH₂- (3.70 ppm) и -CH₂-OH (3.61 ppm) группы [14].

2. Исследование физико-химических свойств пленок из полиоксиалканоатов

В работе проводили сравнительный анализ физико-химических свойств синтезированных полимеров. В таблице 5 приведены данные исследования пленок ПОВ и его сополимеров методами дифференциальной сканирующей калориметрии, наноиндентирования, вискозиметрии и определение гидрофобности методом контактного угла.

В таблице 5 представлены полимеры с различным вхождением 3-ОВ в цепь полиоксибутирата, различной молекулярной массы, а также сополимеры ПОВ и ПОВВ с ПЭГ.

Таблица 5. Физико-химические свойства пленок ПОА.

Образец	ММ, кДа	T _c , °C	T _m , °C	E, ГПа	X _c , %	Контактн ый 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±0,05	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

Анализируя таблицу можно увидеть, что синтезируемые полимеры можно разбить на группы, где в качестве общего знаменателя будут выступать молекулярная масса, вид полимера (сополимер или гомополимер), молярное содержание 3-ОВ в цепи гомополимера, а также наличие ПЭГ в составе цепи.

Как видно из таблицы 5, включение в цепь гомополимера других полимеров не оказывает значительного влияния на гидрофильные свойства полимера. Наиболее гидрофильные из всех 13 полимеров – гомополимеры ПОБ 105, ПОБ 364 и ПОБ 1095, чьи контактные углы равны 59°±2°, 60°±3° и 59° ±2° соответственно.

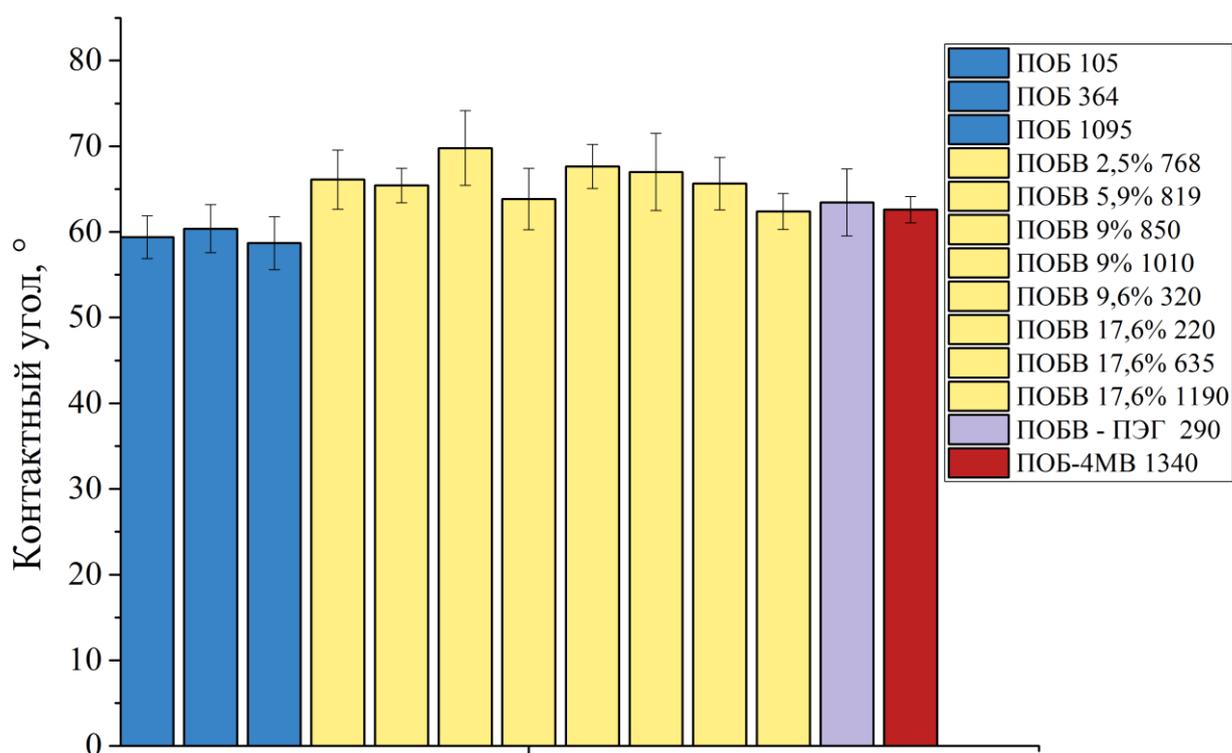


Рисунок 14. Контактный угол для синтезированных образцов ПОА.

У сополимеров контактные углы увеличиваются, например, контактный угол ПОВВ 9% 850 равен 70° , что говорит о том, что увеличивается гидрофобность пленок таких полимеров. Зависимости контактного угла между поверхностью полимеров и каплей воды от молярного содержания 3-оксивалерата, молекулярной массы выявлено не было.

Механические свойства является одними из важнейших свойств изделий из полимеров, которые являются перспективными для использования в медицине. Механические свойства синтезированных полимеров были изучены с помощью метода наноиндентирования.

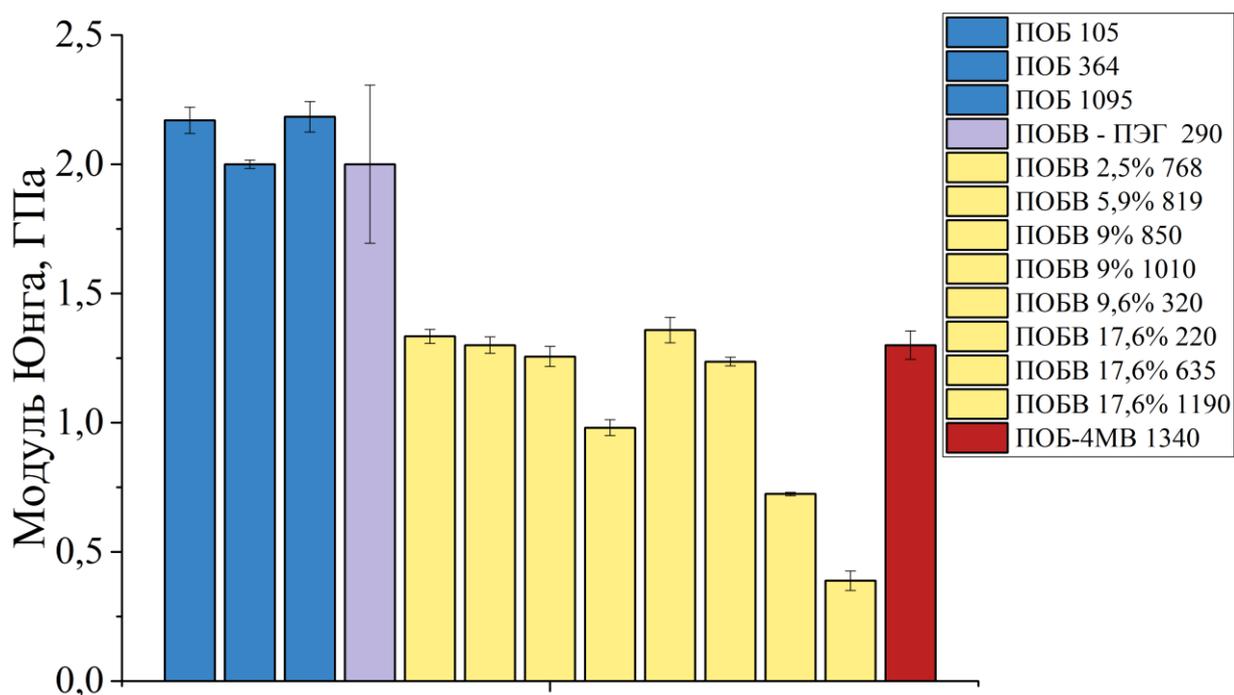


Рисунок 15. Модуль Юнга синтезированных образцов ПОА.

Как видно из гистограммы модуль Юнга гомополимеров выше, чем у сополимеров почти в два раза. Наибольшие значения модуля Юнга наблюдаются у полимеров ПОБ 105 и ПОБ 1095 – $2,2 \pm 0,5$ ГПа и $2,2 \pm 0,6$ ГПа, соответственно. Сополимеры ПОБВ 17,6% 1190 и ПОБВ 5,9% 819 имеют наименьший модуль Юнга – $0,4 \pm 0,03$ ГПа и $0,3 \pm 0,05$ ГПа, соответственно (Рисунок 15). Разница в значениях модуля Юнга для сополимеров и гомополимеров закономерна. Включение в состав гомополимера цепей оксивалерата приводит к возникновению дефектов в кристаллической структуре ПОБ, что сказывается и на модуле Юнга всего образца (Рисунок 16 А) [123].

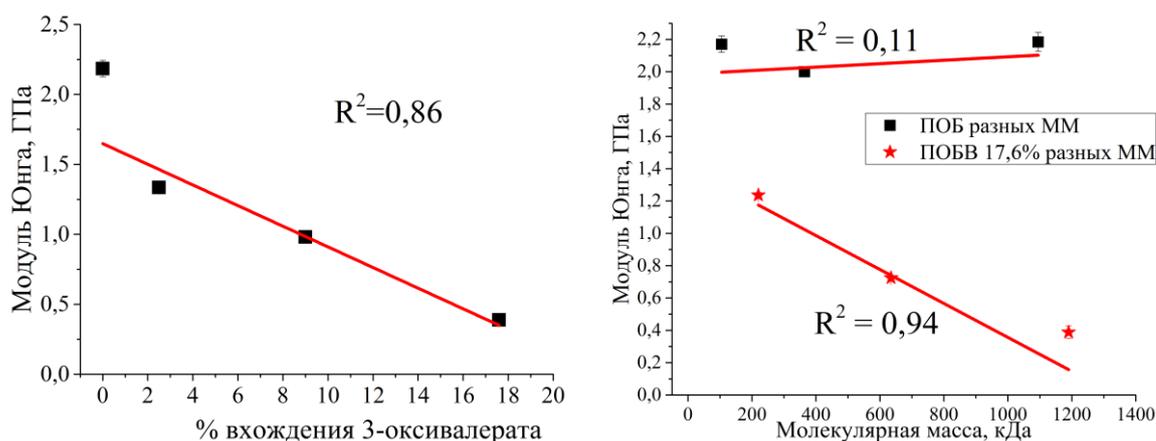


Рисунок 16. Изменение модуля Юнга пленок ПОА в зависимости от процента вхождения 3-ОВ в цепь полимера (А) и варьировании ММ (Б).

Так, модуль Юнга у ПОВ 1095 составлял 2,2 ГПа, а при включении 17,6% 3-ОВ он снижался до 0,4 ГПа. Также обнаружено, что модуль Юнга уменьшался при увеличении ММ у сополимера ПОВВ 17,6% (Рисунок 16 Б). При этом не удалось обнаружить аналогичную зависимость модуля Юнга от ММ при изменении ММ гомополимеров.

Однако, модуль Юнга тройного сополимера практически равен значениям модуля Юнга у гомополимеров. В литературе представлены противоречивые данные о влиянии ПЭГ на кристалличность ПОВ: в одних источниках сказано, что добавление ПЭГ ведет к снижению степени кристалличности ПОВ [125, 130], в других же говорится, что кристалличность полимера не изменяется [12]. Таким образом, тройной сополимер ПОВВ-ПЭГ имеет такой же модуль Юнга и степень кристалличности, как и у гомополимеров, что подтверждает работу Vibers с соавторами [12].

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии были измерены температуры плавления и кристаллизации полимеров. Температуры плавления как гомополимеров, так и сополимеров имели раздвоенный пик (Рисунок 17).

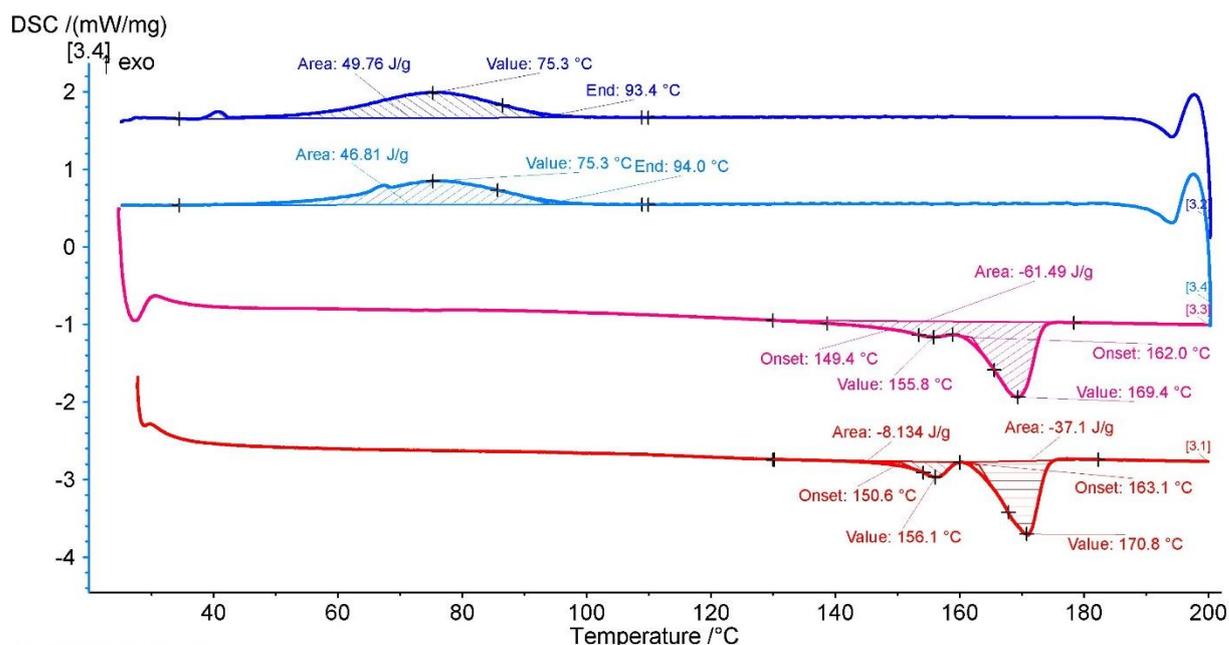


Рисунок 17. Термограмма сополимера ПОВВ 17,6% 200, полученная методом ДСК. На термограмме представлено две кривые нагрева (красная и фиолетовая линии) и две кривые охлаждения образца (синяя и голубая линии).

Раздвоенный пик у гомополимеров объясняется наличием кристаллитов различной степени совершенства, что может быть обусловлено как термической предысторией образца, так и широким молекулярно-массовым распределением. У сополимеров возможное появление двойного пика объясняется наличием остатков сополимера, имеющих меньшую температуру плавления.

По данным рисунка 18 видно, что степень кристалличности сополимеров полиоксибутирата с оксивалератом ниже, чем у гомополимеров и тройного сополимера.

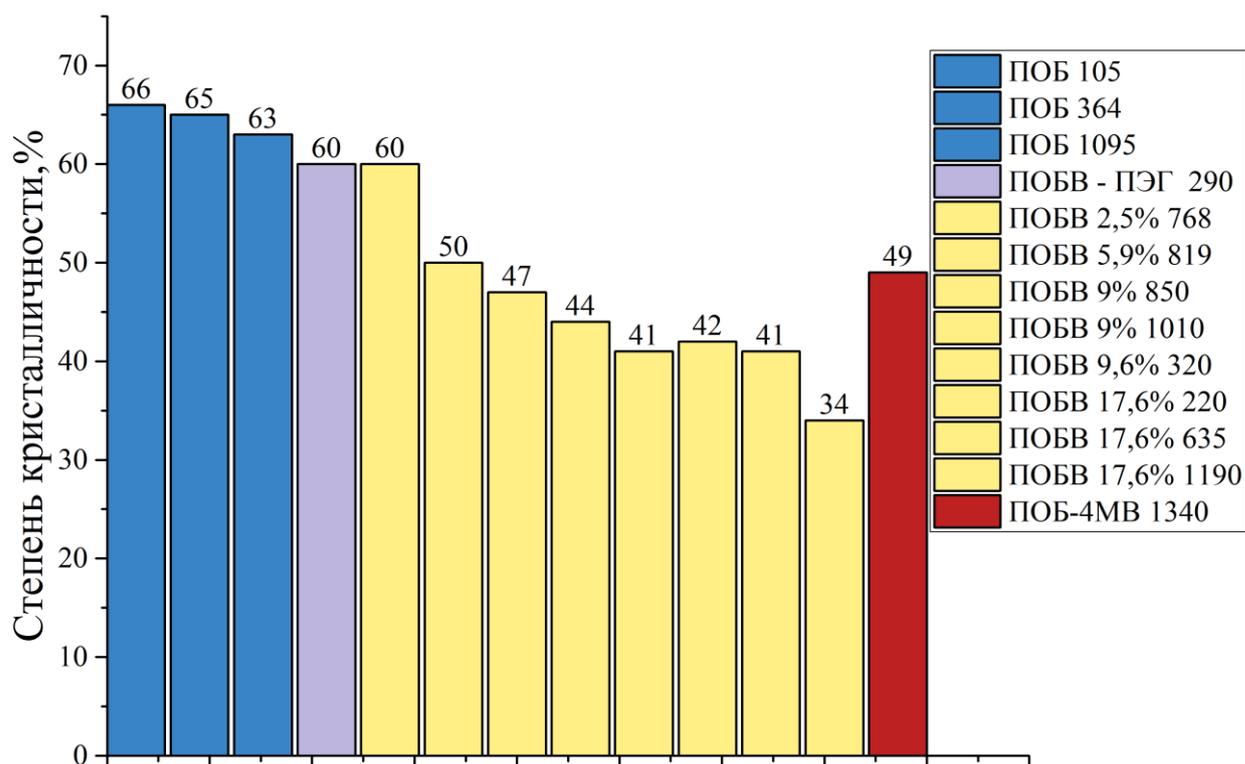


Рисунок 18. Степень кристалличности синтезированных образцов ПОА.

Можно заметить, что степень кристалличности уменьшается при увеличении процента вхождения 3-ОВ в цепь гомополимера. Степень кристалличности убывает в ряду ПОБ 1095>ПОБВ 2,5% 768>ПОБВ 5,9% 819>ПОБВ 9% 850> ПОБВ 9% 1010> ПОБВ 17,6% 1190, при этом значение кристалличности падает почти в два раза с 63% до 34% (Рисунок 19 А).

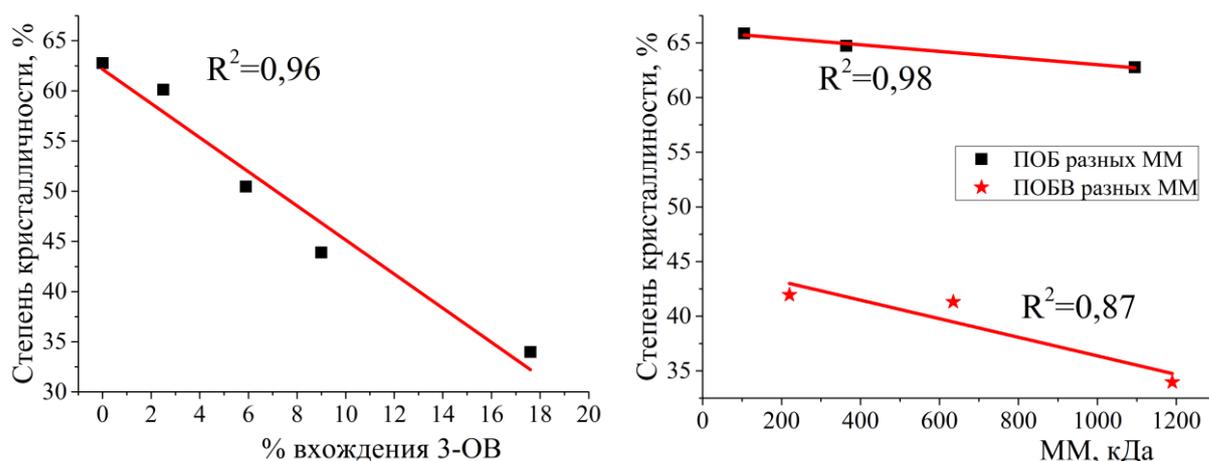


Рисунок 19. Изменение степени кристалличности ПОА в зависимости от процента вхождения 3-ОВ в цепь полимера (А) и варьировании ММ (Б).

Эти результаты согласуются с данными, описанными в литературе [141]. Также были обнаружены зависимости, показывающие, что ММ влияет на степень кристалличности ПОА – кристалличность падает при увеличении ММ как у ПОБ, так и ПОБВ 17,6% (Рисунок 19 Б). Включение в состав цепи полиэтиленгликоля привело к незначительному снижению степени кристалличности – до 60% для тройного сополимера ПОБВ-ПЭГ.

Среди сополимеров можно выделить сополимер полиоксибутират-со-4-метилвалерат. Его особенность заключается в том, что при небольшом молярном содержании 4-метилвалерата в цепи (0,6%) свойства данного полимера, например значения степени кристалличности, схожи со значениями степени кристалличности ПОБВ с молярным вхождением 3-ОВ равного 5,9%. Модуль Юнга пленок ПОБ-4МВ также соответствует молярному содержанию 3-ОВ ~5,9–9%. Вероятная причина такого изменения заключается в появлении дополнительной группы $-CH_3$, что приводит к затруднениям при кристаллизации полимера, причем дополнительная группа оказывает такой же эффект, как внедрение в 10 раз больше остатков 3-ОВ по молярному содержанию.

Была обнаружена зависимость между модулем Юнга и степенью кристалличности, что демонстрируется на графике зависимости модуля Юнга пленок ПОА и их сополимеров от степени кристалличности (Рисунок 20). Это, в свою очередь, подтверждает тот факт, что чем больше степень кристалличности образца, тем больше модуль Юнга этого образца. Понимание этого факта важно для дальнейшего практического использования изучаемых полимеров. Например, при выборе материала для конструирования костных имплантатов.

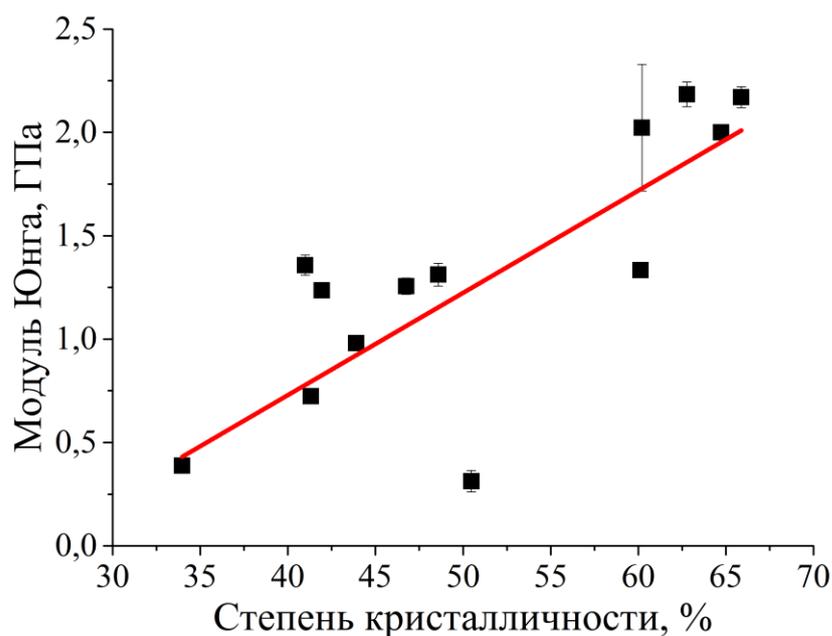


Рисунок 20. График зависимости модуля Юнга ПАО и его сополимеров от степени кристалличности.

3. Исследование морфологии поверхности макроскопических пленок

Исследованные в работе макроскопические пленки были приготовлены методом полива. Из-за того, что в процессе приготовления две стороны пленки контактируют с двумя разными средами (со стеклом и с воздухом), возникают существенные различия в их морфологии. Та сторона, которая контактировала с воздухом, является сравнительно шероховатой (средняя шероховатость $R_a=92\pm 3$ нм), а сторона, которая контактировала со стеклом, – гладкая ($R_a=6\pm 1$ нм). Разница в шероховатости поверхности типична для пленок, приготовленных методом полива. Аналогичные результаты наблюдались, например, для пленок поливинилового спирта [73] и ПОВ [23]. В работе [23] значения шероховатости пленки несколько выше, чем в нашей работе, и равны 130 ± 10 нм и 15 ± 2 нм соответственно для «верхней» и «нижней» поверхности пленки. Разницу между этими значениями и значениями, полученными нами, можно объяснить различными условиями приготовления пленок (температура, влажность и т.п.).

На рисунке 21 В представлено изображение стопки ламелей. Они выглядят как параллельные полосы шириной от 11 до 40 нм. В статье [26]

толщина ламелей, измеренная малоугловым рентгеновским рассеиванием в аналогичных пленках ПОБ, равна 6,4 нм. Это различие в толщине ламелей, можно объяснить тем, что плоскости ламелей могут располагаться под различными углами к поверхности пленки (Рисунок 22).

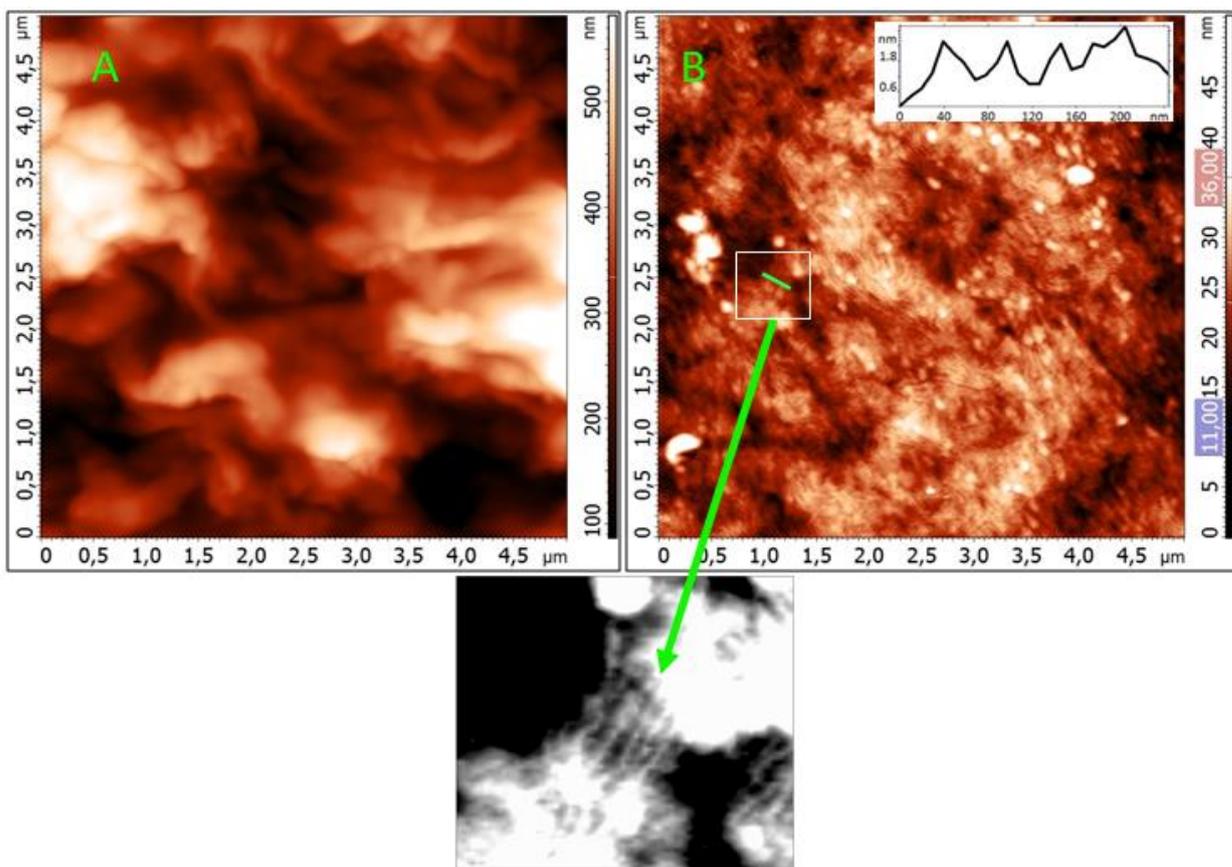


Рисунок 21. Изображение шероховатой (А) и гладкой (В) поверхности макропической плёнки ПОБ. Представлен график сечения стопки ламелей по зеленой линии.

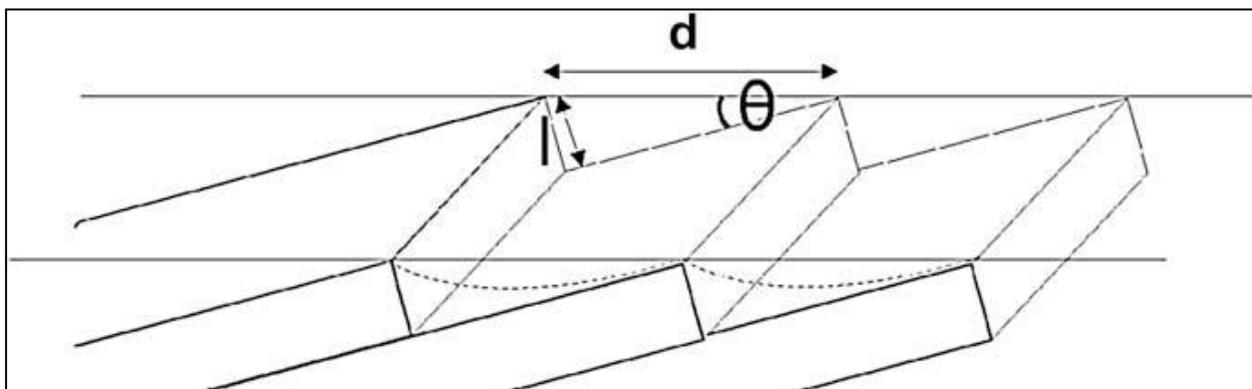


Рисунок 22. Схема расположения ламелей под углом θ к поверхности [46].

На рисунке 21 (В) кроме стопок ламелей видны сферические полимерные гранулы. Их средняя ширина равна 86 ± 9 нм, высота 11 ± 2 нм. Они располагаются по поверхности неоднородно и, вероятно, являются дефектами, связанными с влиянием поверхности стекла, поэтому, с точки зрения структуры, не представляют интереса. Ниже будет показано, что при инкубации пленки ПОб в буфере они не изменяются и исчезают при щелочном гидролизе.

4. Исследование морфологии ультратонких пленок

Обнаруженные надмолекулярные структуры ПОб носят универсальный характер и могут проявляться на пленках или других изделиях из ПОб, приготовленных различными способами. В то же время, они были получены на поверхности пленки, которая сформировалась при контакте со стеклянной подложкой, а такая подложка замедляет процесс кристаллизации ПОб - снижает степень кристалличности и повышает долю аморфной компоненты [26]. В аморфной компоненте биodeградация происходит быстрее, и поэтому эффект подложки может оказывать существенное влияние на многие процессы, которые происходят как с ПОб, так и с композитами на его основе. Возможность использования подложки для получения ПОб с низкой степенью кристалличности является интересной задачей, так как, предположительно, такой материал будет обладать большей эластичностью. Однако в работе [26] не приводятся данных ни о морфологии аморфной компоненты, ни о ее стабильности (известно, что при комнатной температуре она метастабильна и будет кристаллизоваться). Поэтому данная часть работы посвящена изучению морфологии и процесса кристаллизации в ультратонкой пленке – в этих условиях роль подложки отследить проще, чем при исследовании поверхности макроскопической пленки.

5. Определение морфологии поли-3-оксибутирата на слюде

Как описано в разделе «Материалы и методы», для приготовления ультратонких пленок в качестве подложки использовали слюду. При ее скалывании на поверхности образуются протяженные атомарно-гладкие

участки. Это делает слюду одной из наиболее распространённых подложек при приготовлении образцов для АСМ.

Исследовали зависимость морфологии поверхности образца от количества ПОБ на подложке.

При нанесении полимера на подложку, в зависимости от условий (концентрация полимера, частота вращения подложки), можно наблюдать полиморфизм ПОБ. Так, если взять низкую концентрацию раствора ПОБ и/или высокую частоту вращения подложки, то получим практически чистую поверхность (Рисунок 23).

В случае высокой концентрации раствора ПОБ и/или низкой частоты вращения подложки вся поверхность слюды будет покрыта полимером. При этом полимер будет образовывать такие структуры, как двумерные сферолиты, описанные в работе [129]. На рисунке 23 видны две границы между сферолитами – черные полосы – и центр роста одного из них в виде яркого возвышения.

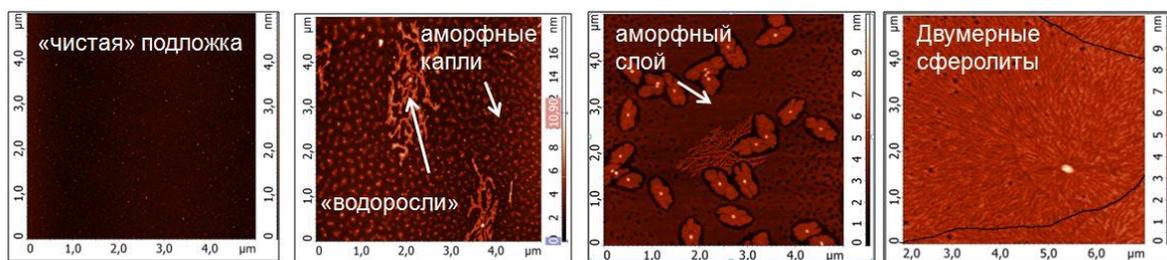


Рисунок 23. Изменение морфологии ПОБ при увеличении концентрации раствора ПОБ или понижении частоты вращения подложки в минуту.

Наибольший интерес представляет промежуточная стадия между чистой подложкой и подложкой, полностью покрытой полимером (на рисунке 23 Б и В). Были подобраны условия, при которых наблюдали как кристаллическую, так и аморфную компоненту (частота вращения подложки 3000 об/мин, концентрация полимера – 0,5 мг/мл).

Частично кристаллическая компонента может быть представлена кристаллами, имеющими морфологию «водорослей», двумерными сферолитами (Рисунок 23). Эти структуры имеют примерно одинаковую среднюю высоту над подложкой, равную 4,5 нм. Они отличаются направлением роста от центра кристаллизации. Так, кристаллическая компонента растет равномерно во все стороны на плоскости у двумерных сферолитов. У «водорослей» рост кристаллической компоненты осуществляется неравномерно из центра кристаллизации в разные стороны.

В свою очередь аморфная компонента может быть представлена в виде капель или слоя (Рисунок 24). Их высота над подложкой также примерно одинакова и не превышает 3 нм. Существенно, что аморфная компонента отличается от кристаллической на изображениях, полученных в режиме регистрации фазы (Рисунок 24 Д). Наблюдаемый контраст, вероятно, объясняется разницей в механических свойствах (адгезии и жесткости) аморфной и кристаллической компонент: аморфная более вязкая и мягкая. Фазовый контраст между аморфной и кристаллической компонентами типичен для частично кристаллических полимеров. Например, на поверхности макроскопической пленки сополимера ПОб с поли-3-оксивалератом он описан в работе [74].

В целом, наблюдаемые частично кристаллические структуры ПОб аналогичны структурам, которые формируются в ультратонких пленках других полимеров: полиэтиленоксида, полилактида, полистирола [94]. Было показано, что аморфная компонента ПОб может быть представлена как в виде слоя, покрывающего подложку, так и в виде отдельных капель. В зависимости от условий приготовления пленки кристаллическая компонента может быть представлена в виде «водоросли» (seaweed-like crystals), двумерных сферолитов.

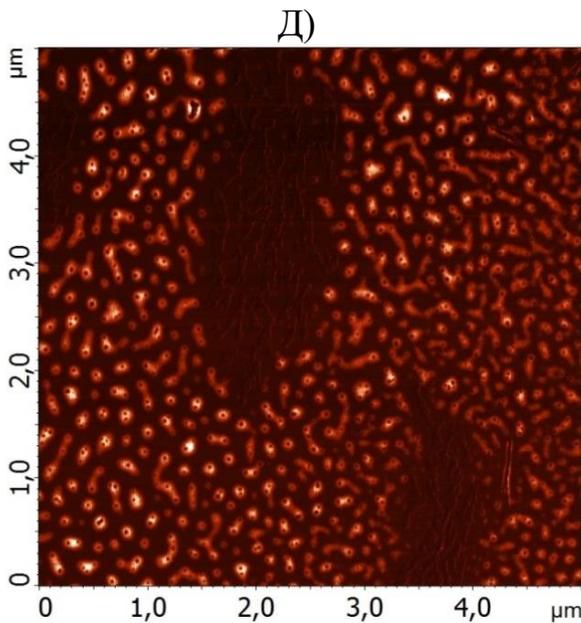
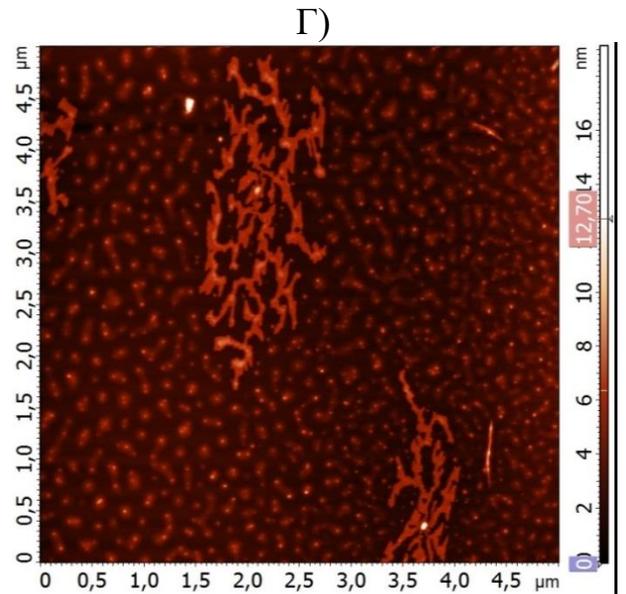
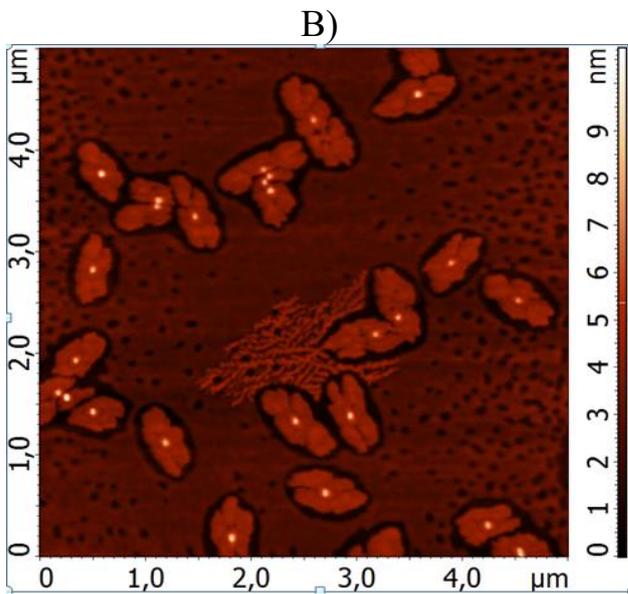
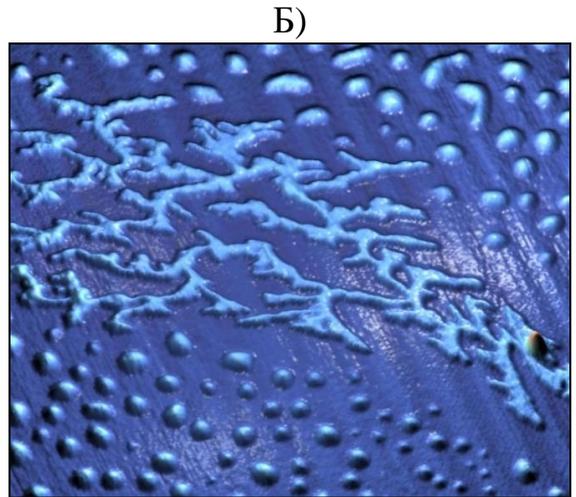
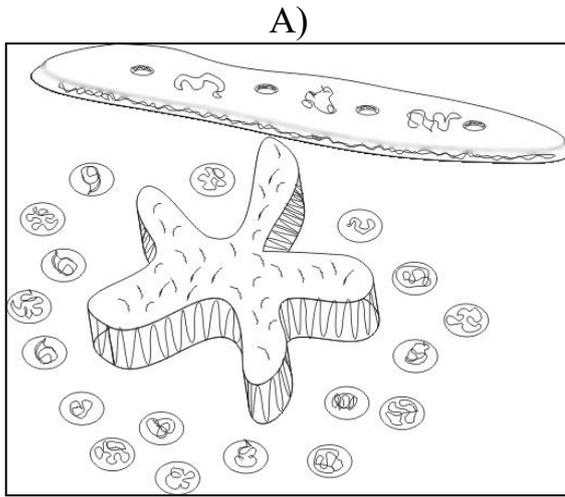


Рисунок 24. Схема ПОБ на слюде (А), 3D изображение ПОБ (Б), изображение аморфного слоя на слюде (В), топографическое и фазовое изображение пленки ПОБ (Г, Д). На схеме показаны аморфная компонента в виде капель и слоя и кристаллическая компонента в центре.

6. Визуализация процесса кристаллизации

В предыдущем разделе было показано, что в ультратонкой пленке ПОб возможно сосуществование аморфной и частично кристаллической компонент, причем эти компоненты могут быть пространственно отделены друг от друга. Проследим, как происходит процесс кристаллизации ПОб в такой системе.

Известно, что скорость кристаллизации полимера существенно зависит от температуры [97] и морфологии [157]. При проведении измерений на образцах, в которых аморфная компонента представлена сплошным слоем, а не отдельными каплями, было замечено, что она кристаллизуется непосредственно в процессе сканирования (при комнатной температуре). Пример этого процесса представлен на рисунке 25. Важно подчеркнуть, что кристаллизация идет только при непосредственном взаимодействии аморфной компоненты с кристаллической.

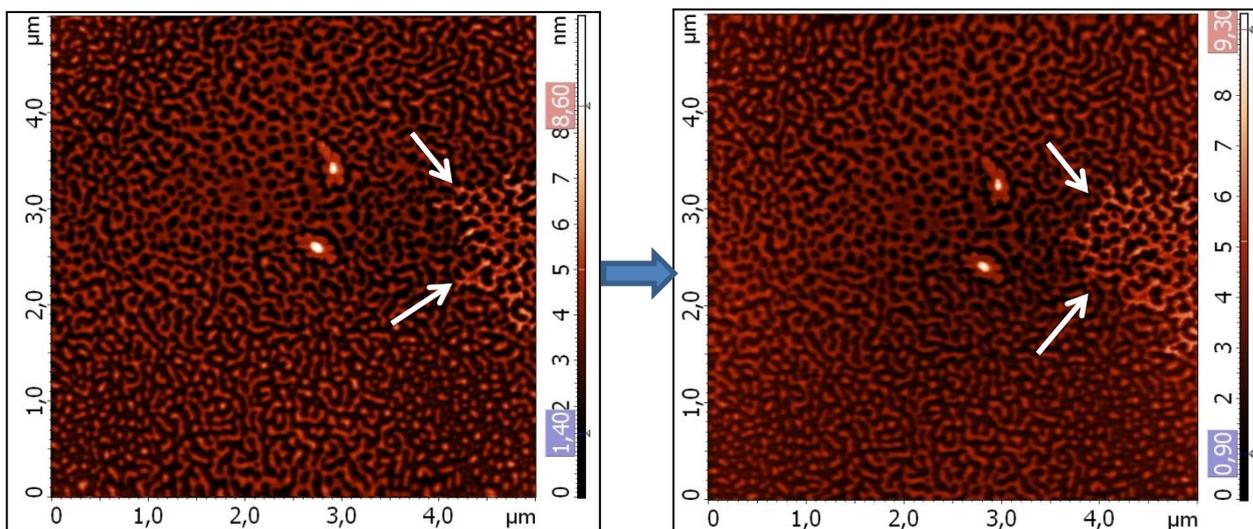


Рисунок 25. Топографическое изображения участка пленки ПОб на слюде. Стрелками указан рост кристаллической компоненты при комнатной температуре.

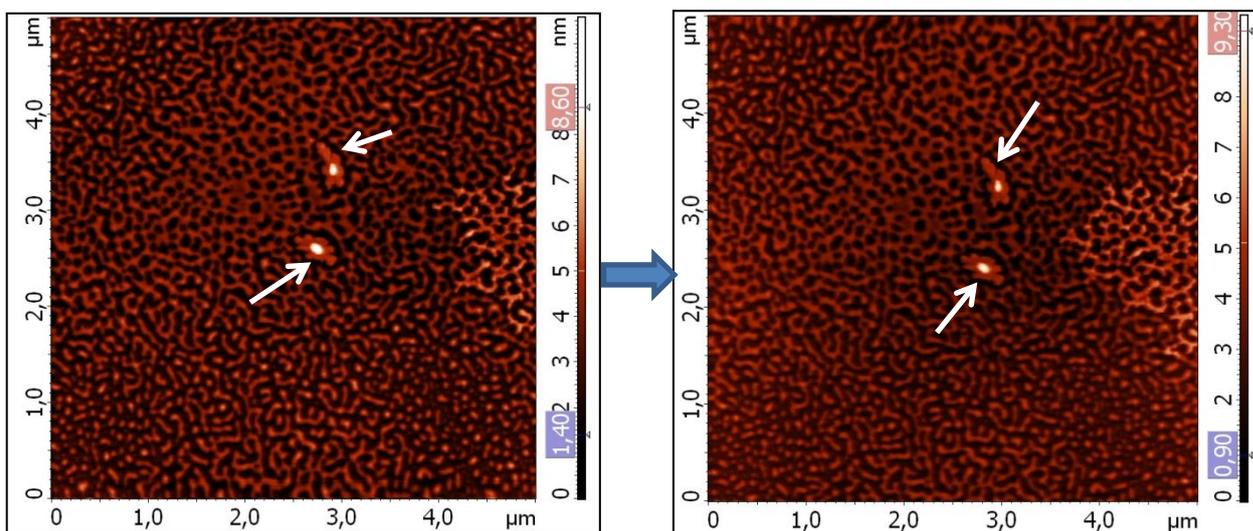


Рисунок 26. Топографическое изображения участка пленки ПОб на слюде. Стрелками отмечено отсутствие роста кристаллической компоненты при наличии участка чистой подложки до аморфной компоненты ПОб.

По полученным изображениям была вычислена средняя скорость кристаллизации. Она составляет $1 \pm 0,1$ нм/сек. Это соотносится со скоростью кристаллизации сополимера ПОб с поли-3-оксигексаноатом где толщина пленки составляла до 100 нм, а скорость кристаллизации также равна $1 \pm 0,1$ нм/сек, но при 75°C на стекле [157]. Разница в температуре, вероятно, связана с влиянием поли-3-оксигексаноата и разницей в толщине и морфологии пленки.

Проследим за процессом кристаллизации аморфной компоненты более детально. На рисунке 27 представлена ультратонкая пленка ПОб, содержащая несколько характерных участков. На изображении видны хорошо различимые аморфная и частично кристаллическая компоненты, причем последняя представлена как сферолитами, так и водорослеподобным кристаллом (seaweed-like crystal) в центральной области кадра.

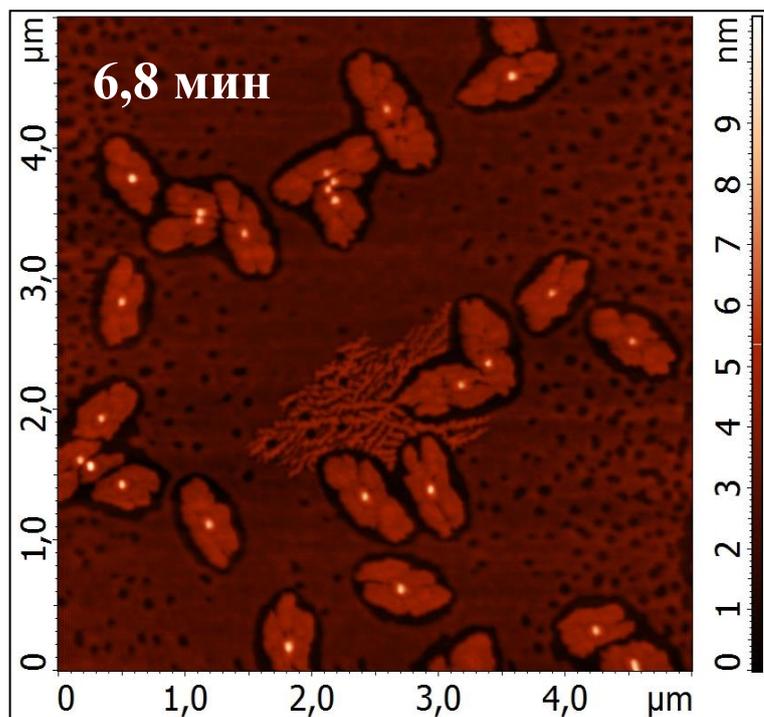


Рисунок 27. Начальная стадия (6,8 мин от начала сканирования) кристаллизации аморфной компоненты, представленной в виде слоя.

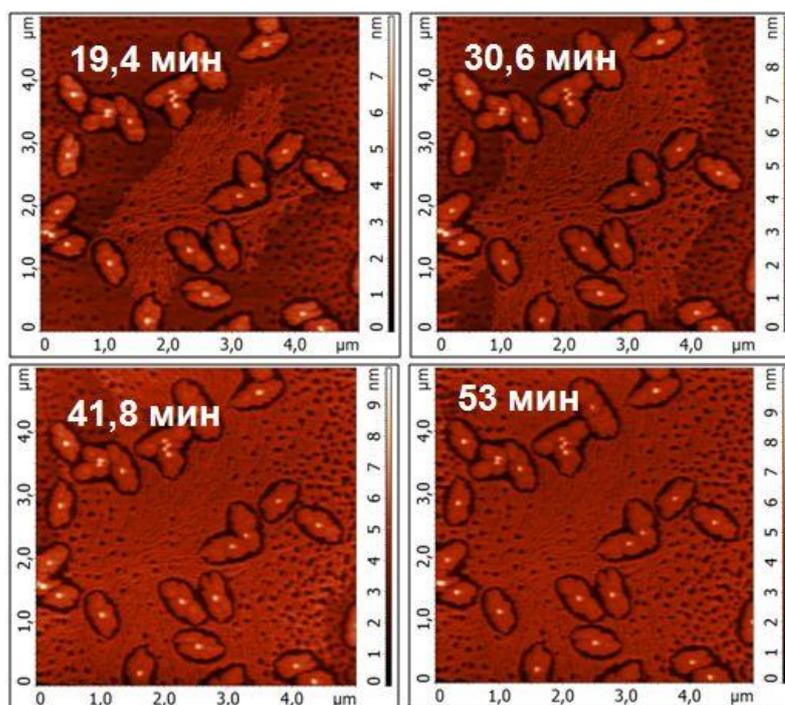


Рисунок 28. Процесс кристаллизации аморфной компоненты при комнатной температуре.

По истечении одного часа вся аморфная компонента закристаллизовалась (Рисунок 28). Существенно, что рост кристалла происходил из центральной области, двумерные сферолиты, которые не

имели непосредственного контакта с аморфной компонентой, не сработали как центры кристаллизации.

Существенную роль в процессе кристаллизации играет морфология аморфной компоненты. Если она представлена отдельными каплями, на протяжении 2-3 часов при комнатной температуре они не кристаллизуются. Это связано с тем, что вероятность гомогенного образования зародышей кристаллов мала и отдельные аморфные капли оказываются более стабильными, чем слой, который обычно имеет непосредственный контакт с частично кристаллическим участком.

Если увеличить температуру образца, то станет возможным непосредственное наблюдение кристаллизации капель.

Для визуализации процесса кристаллизации аморфных капель температура подбиралась эмпирическим путем. При этом руководствовались результатами дифференциальной сканирующей колориметрии ПОБ (температура плавления составляет 167°C). В результате для визуализации процесса кристаллизации капель была выбрана температура 85°C .

Были получены несколько серий изображений, на которых удалось наблюдать процесс кристаллизации аморфных капель ПОБ. Ниже представлены наиболее удачные результаты (две наиболее продолжительные серии изображений представлены на рисунках 29, 31). В процессе сканирования находили участки слюды, содержащие кристаллические структуры, изменения которых легко детектировать.

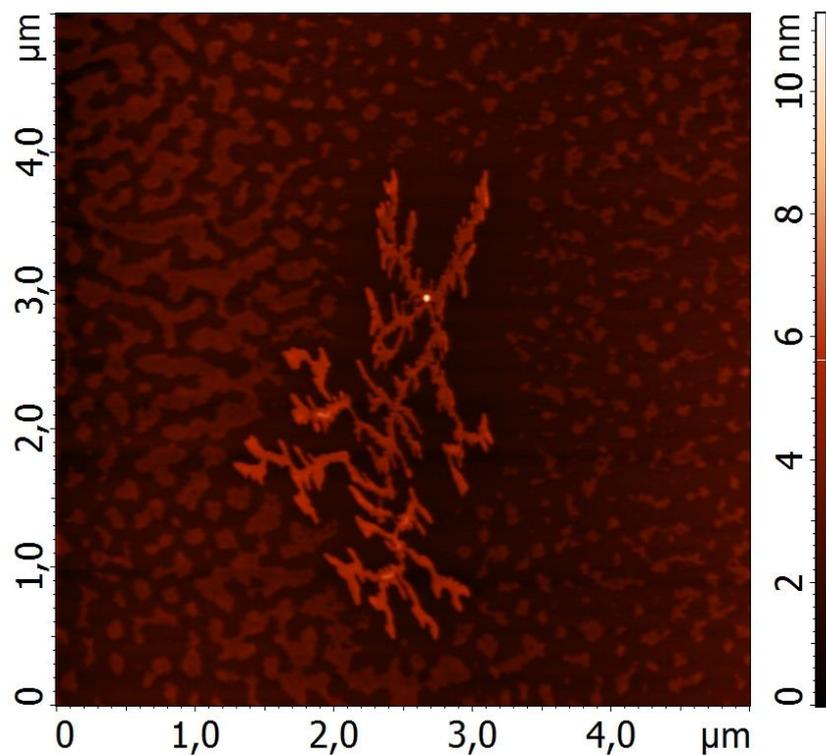


Рисунок 29. Топографическое изображение пленки ПОБ до нагревания.

Далее нагревали подложку до 85°C и детектировали изменения морфологии поверхности.

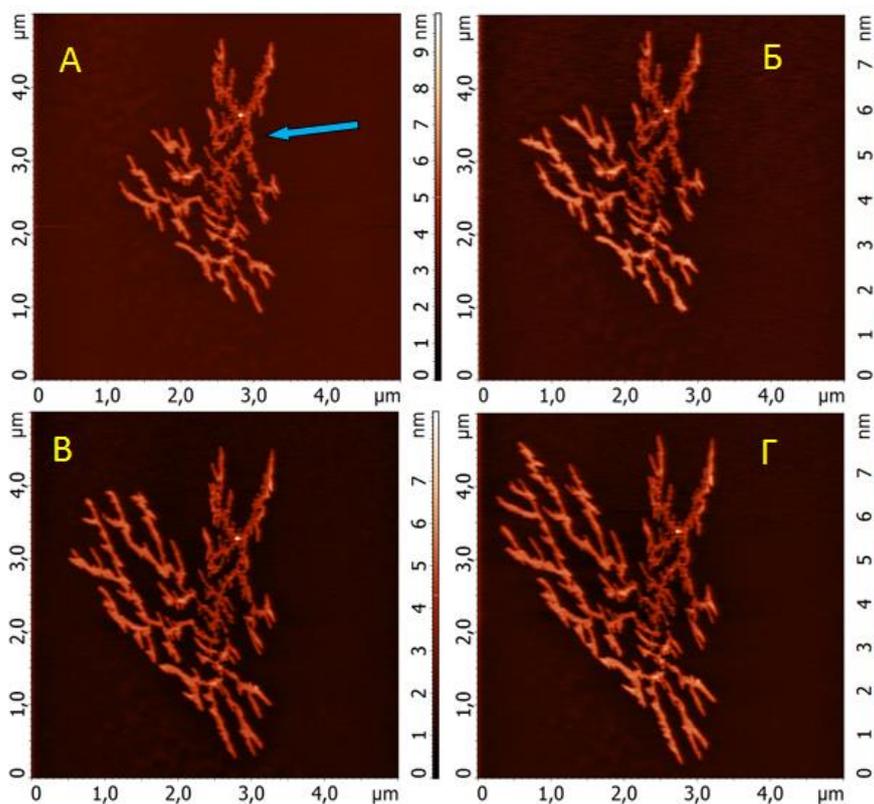


Рисунок 30. Изображение пленки ПОБ во время нагревания до 85 градусов.
 А) 5,6 мин после нагревания; Б) 17,4 мин; В) 39,9 мин; Г) 56,7 минуты.

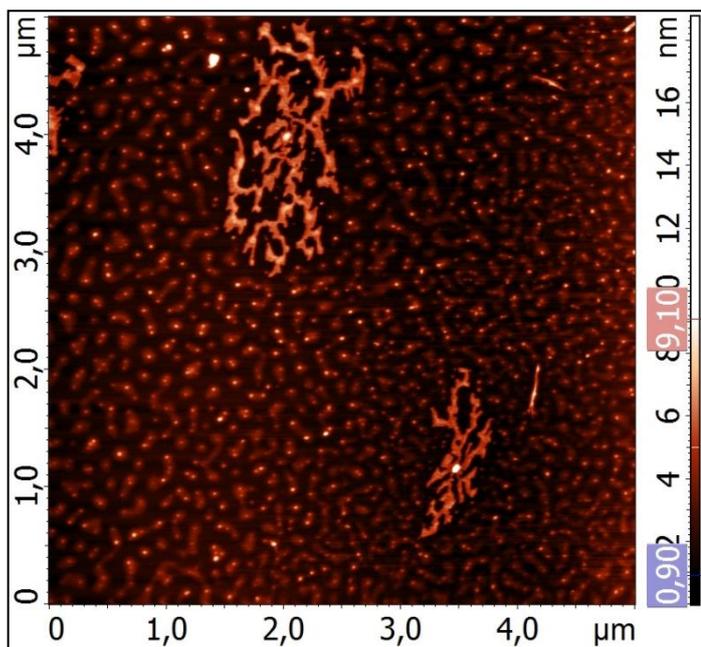


Рисунок 31. Изображение пленки ПОБ на слюде. Начало кристаллизации при 85°C.

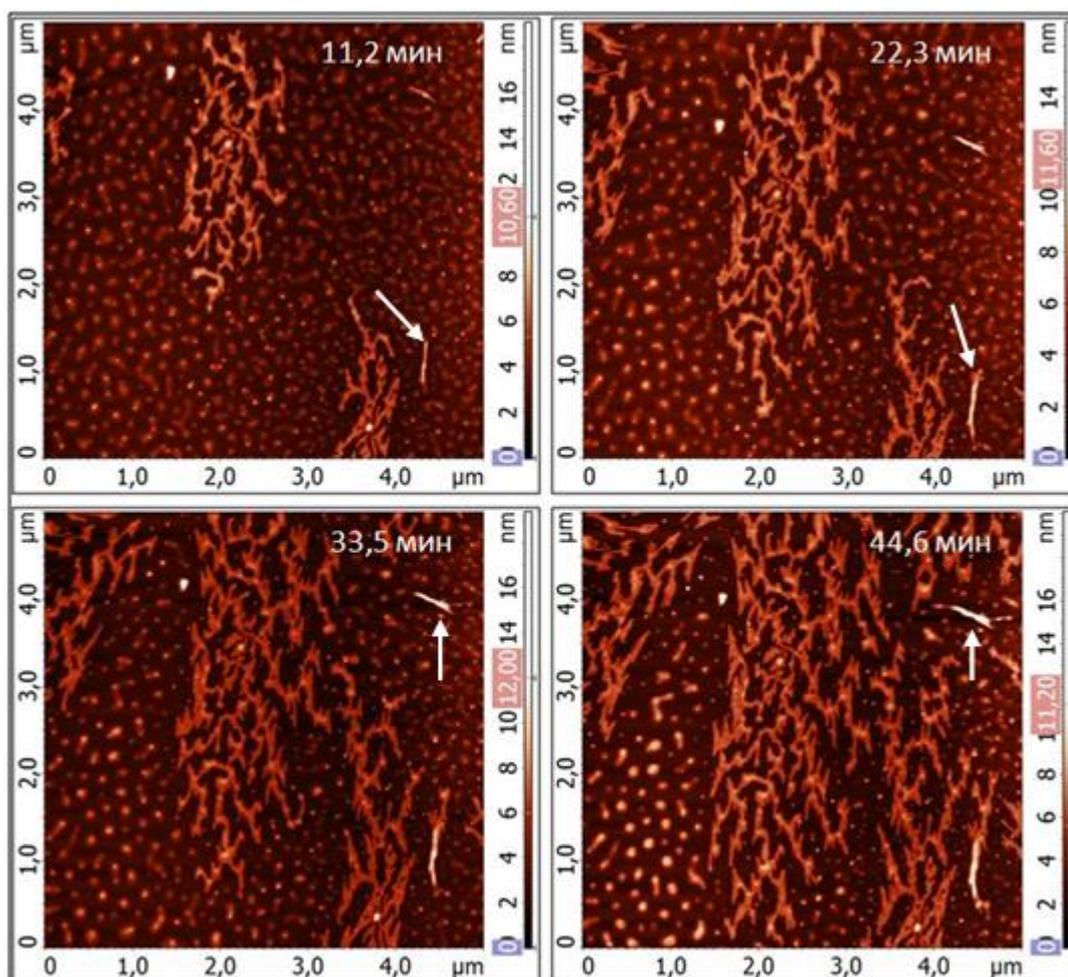


Рисунок 32. Кристаллизация пленки ПОБ при 85°C. Стрелками указан рост ламели, имеющей торцевую (edge-on) ориентацию.

На приведенных изображениях видно, как растет частично кристаллическая компонента пленки.

На рисунке 30 (А-Г) видно, что рост кристалла происходит преимущественно в одном направлении – влево и вверх. Это объясняется наличием сравнительно большого количества аморфного полимера, доступного для кристаллизации. В правой части кадра видны участки, где существенного роста кристалла не наблюдается. Такой участок указан стрелкой на рисунке 30 (А). Здесь расстояние до аморфной фазы полимера составляет $0,4 \pm 0,1$ мкм. Можно предположить, что полимер не способен к поверхностной диффузии на это расстояние при данных условиях.

Важно заметить, что в ходе кристаллизации высота кристалла над подложкой остается практически неизменной и составляет $4,5 \pm 0,5$ нм. Это косвенно говорит о том, что плоскость ламели располагается параллельно плоскости подложки. Такая ориентация плоскости ламели типична для ультратонких пленок различных полимеров [94]. В то же время, в единичных случаях удается найти ламели, которые расположены на ребре (торцевая ориентация). Например, процесс роста двух таких ламелей можно проследить на рисунке 32. Ее высота увеличивается в среднем на 0,05 нм/мин. Кроме того, в процессе кристаллизации ламель меняет свою ориентацию на плоскостную (flat-on) и продолжает расти, но уже с постоянной высотой и большей скоростью. Аналогичный поворот плоскости ламелей описан в статье [157] на примере сополимера ПОБ с поли-3-гидроксигексаноатом.

Основное результаты, полученные на данном этапе работы, состоят в том, что если аморфный слой кристаллизуется при комнатной температуре, то аморфным каплям требуется нагрев до температуры 85°C . Измеренные скорости кристаллизации, соответствуют литературным данным для других полиоксиалканоатов [157].

7. Биодegradация полиоксиданканоатов

В литературе, посвященной проблеме биодegradации ПОА, в качестве фермента, разлагающего полимер, широко используются собственные бактериальные ферменты [39, 40, 120, 158]. Однако на разложение полимера будет влиять не только фермент, но и буферный раствор, в котором данный фермент растворен [31]. Поэтому выбор буферного раствора, в котором будет протекать дegradация полимера является важной задачей. Для сравнения скорости биодegradации полимера были выбраны два буферных раствора: 0,01 М натрий-фосфатный буфер (PBS) и буфер, имитирующий плазму крови (SBF), а также различные концентрации (0; 0,1; 0,25; 1 мг/мл) свиной панкреатической липазы в этих растворах. Все растворы имели рН=7,4. В данные растворы помещали пленки ПОБ с молекулярной массой 105 кДа. Пленки полимера хранились при температуре 37°C в течение месяца.

На рисунке 33 представлены диаграммы изменения массы пленок ПОБ после 1 недели и месяца биодegradации под действием панкреатической липазы.

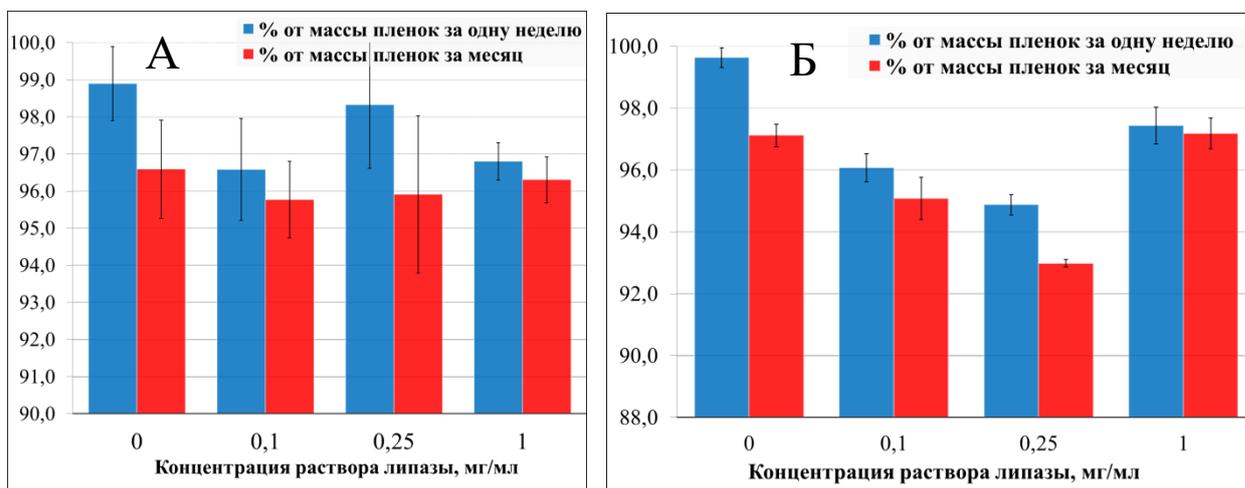


Рисунок 33. Диаграммы изменения массы пластин в (А) буфере, имитирующем плазму крови (SBF) и в (Б) натрий-фосфатном буфере (PBS) в зависимости от концентрации панкреатической липазы за неделю и месяц [167].

По уменьшению массы пленок ПОБ в процессе деградации в обоих буферных растворах можно сказать, что данные растворы не препятствуют деградации полимера, однако раствор липазы в натрий-фосфатном буфере оказывает больший эффект на деградацию полимера. По прошествии месяца раствор с концентрацией липазы равной 0,25 мг/мл оказал наиболее сильное влияние на пленку полимера, чья масса уменьшилась на 7% от изначальных значений. При концентрациях липазы 0,1 мг/мл и 1 мг/мл потеря массы пленок составила в среднем 4,7% за месяц в натрий-фосфатном буфере и 4% в буфере, имитирующем плазму крови. Что отчасти подтверждает результаты работы [15], в которой плазма крови оказывало незначительное влияние на образцы полиоксибутирата. Влияние концентрации липазы можно объяснить тем, что при 1 мг/мл происходит процесс ингибирования субстрата, сходный с описанным для ПОБ-деполимеразы. При высокой концентрации фермента скорость деградации снижается, благодаря блокированию доступа каталитического домена фермента к молекулам полимера [158]. При концентрации 0,1 мг/мл не вся поверхность полимера занята молекулами фермента, поэтому скорость деградации не достигает своего пика. Исходя из полученных результатов, концентрация 0,25 мг/мл является оптимальной для проведения экспериментов по деградации ПОБ, причем такая концентрация липазы соответствует концентрации панкреатической липазы в организме человека [27].

7.1 Изменение степени кристалличности пленок полиоксиалканоатов

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% [64]. В свою очередь, степень кристалличности сильно влияет на скорость деградации полимера [87, 146].

Поэтому, наряду с изучением изменения таких параметров, как весовая масса, молекулярная масса, необходимо исследовать изменения степени кристалличности представленных образцов ПОА. На рисунке 34 представлен общий график кривых изменения степени кристалличности ПОА в процессе инкубации в 0,01 М фосфатном буфере в течение 6 месяцев.

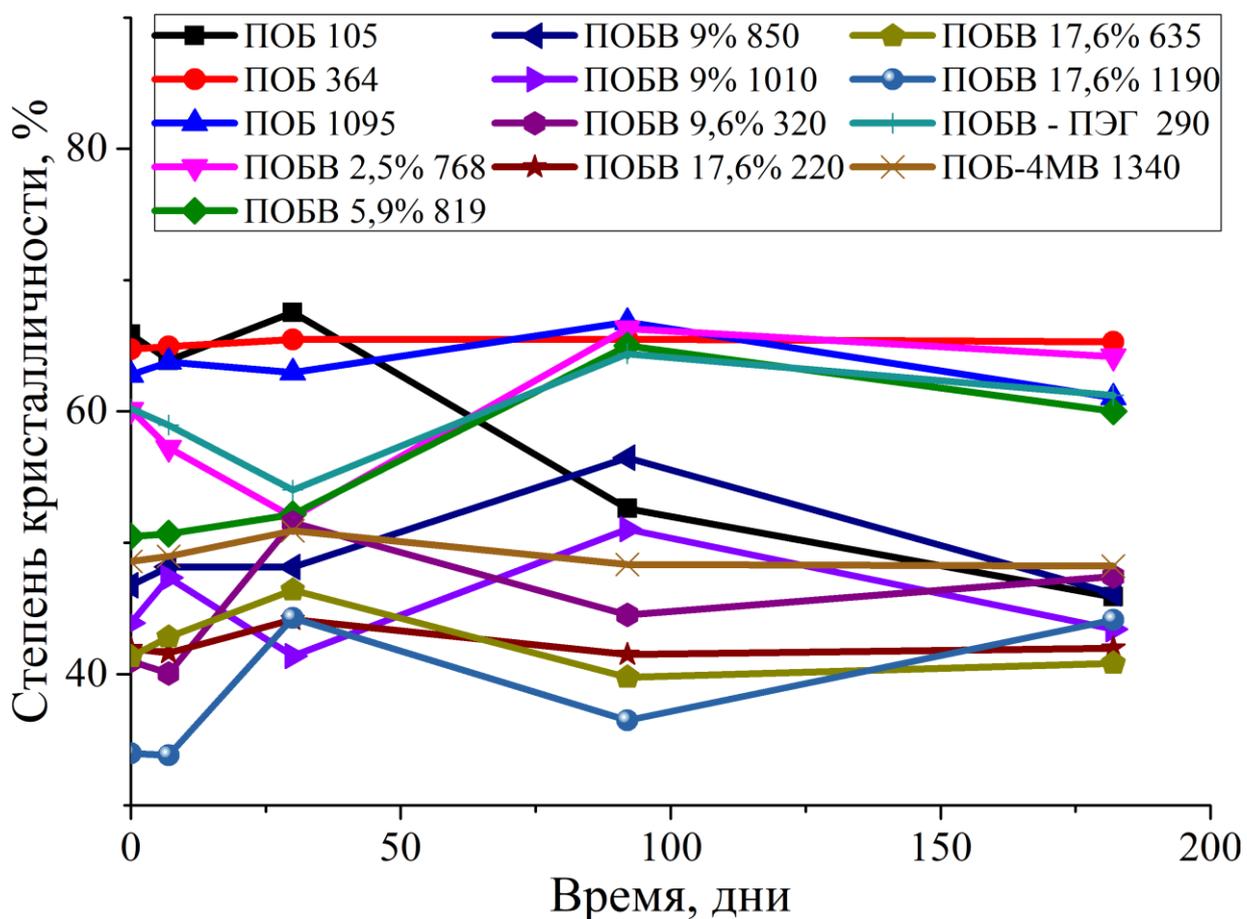


Рисунок 34. Изменение степени кристалличности в процессе гидролитической деструкции в течение 6 месяцев.

Рассматривали изменение степени кристалличности для отдельных категорий полимеров – при варьировании ММ, но с одинаковым составом, а также с разным составом, но одинаковой ММ.

Чтобы проследить изменения степени кристалличности ПОА вне зависимости от состава полимера, рассматривали график изменения степени кристалличности двух видов полимеров: гомополимеров с разной молекулярной массой ПОБ 105, ПОБ 364 и ПОБ 1095, а также сополимеров с

9% молярным содержанием валерата: ПОВВ 9% 850, ПОВВ 9% 1010, ПОВВ 9,6% 320 (Рисунок 35).

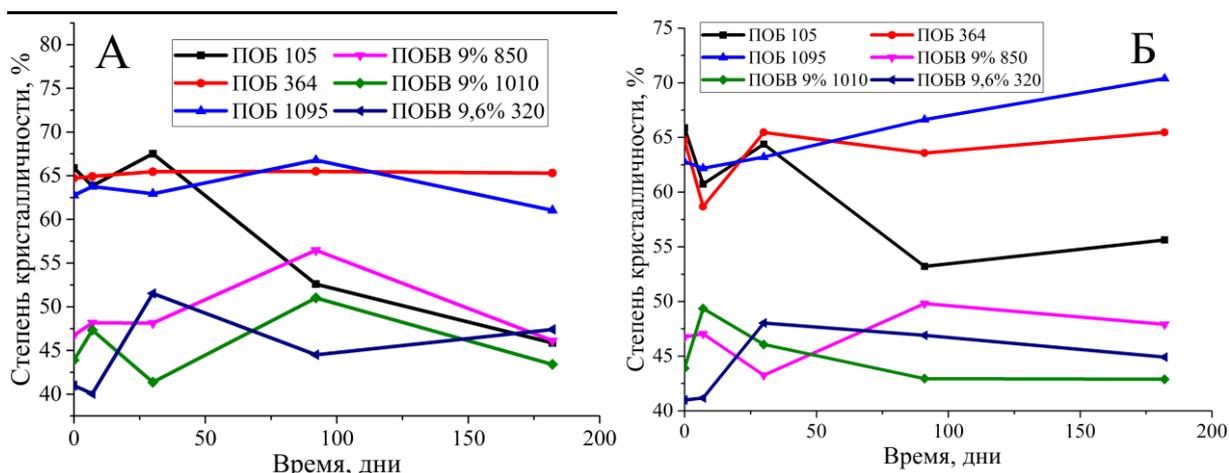


Рисунок 35. Изменение степени кристалличности ПОВ и ПОВВ 9% с разными ММ в 0,01М фосфатном буфере (А) и фосфатном буфере с добавлением панкреатической липазы (Б) в течение 6 месяцев.

Степень кристалличности исследуемых ПОА рассчитывали на основании данных о теплоте плавления полностью кристаллического ПОВ (146,6 Дж/г) [9]. 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 наблюдали сильные изменения степени кристалличности образцов. (Рисунок 35). Предполагается, что начальное увеличение степени кристалличности связано с процессом рекристаллизации аморфных участков в полимерах путем разрыва цепи в начальном периоде. Понижение степени кристалличности, вероятно, связано с разрывами цепи, происходящими в кристаллических участках полимеров. Однако степень кристалличности ПОВ 364 в растворе 0,01 М фосфатного буфера изменяется незначительно на протяжении всех 183 суток (Рисунок 35 А). Для низкомолекулярного ПОВ 105 наблюдается иная тенденция: степень кристалличности данного образца изменяется в широких пределах, как в растворе фосфатного буфера, так и в буфере с добавлением липазы. Видно, что при начальном значении кристалличности, равном 66%, она снижается до 43% и 55% в фосфатном буфере и растворе липазы, соответственно. Более

того, пленки из данного полимера начали распадаться на части, что говорит о разрушении целостной структуры полимера в результате деградации. Для остальных полимеров в растворе буфера наблюдается волнообразное изменение кристалличности. Это также объясняется процессами разрыва цепей и последующей их рекристаллизации. Схематично это можно объяснить следующим образом: молекулы воды неспецифично гидролизуют сложноэфирную связь в цепочке полимера, образуя высокомолекулярные участки. Затем эти участки подвергаются процессу рекристаллизации. Далее возможны разрывы и в кристаллических участках цепи за счет наличия в них дефектов [124].

Анализируя данные об изменении степени кристалличности, можно сделать следующий промежуточный вывод: степень кристалличности ПАО в процессе гидролиза меняется волнообразно, что соответствует появлению аморфных участков и их рекристаллизации, а также деградации дефектов в кристаллической компоненте. Прямой зависимости изменения степени кристалличности от молекулярной массы при гидролитической деструкции не выявлено.

Оценив влияние ММ на изменение кристалличности, рассмотрим, как влияет на степень кристалличности состав полимеров, а именно включение в цепь поли-3-оксибутирата остатков 3-ОВ (Рисунок 36).

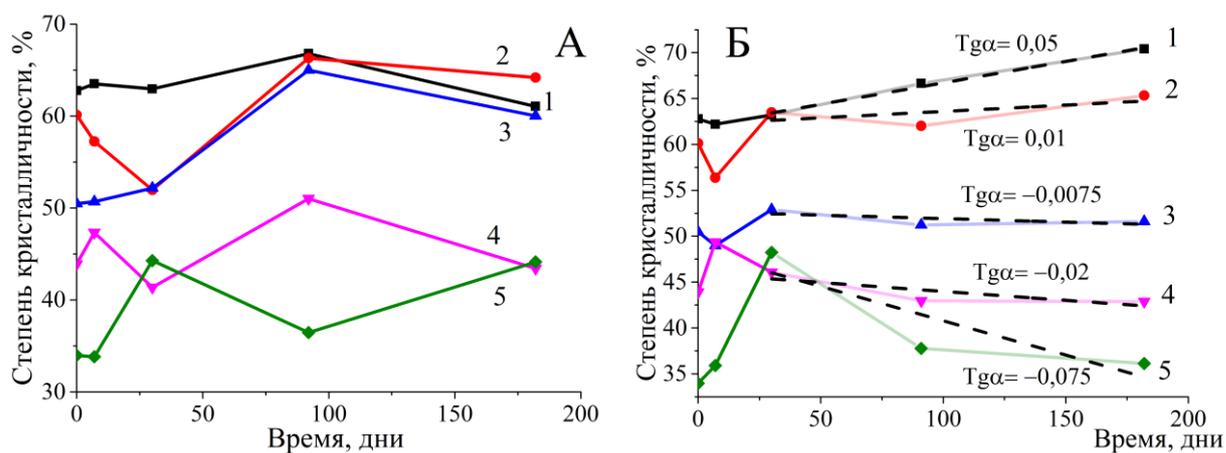


Рисунок 36. Кривые изменения степени кристалличности ПОА с разным процентом вхождения сополимеров в 0,01 М фосфатном буфере (А) и буфере с добавлением липазы (Б) в течение 6 месяцев. 1 – ПОБ 1095, 2 – ПОБВ 2,5% 768, 3 – ПОБВ 5,9% 819, 4 – ПОБВ 9% 1010, 5 – ПОБВ 17,6% 1190.

Из рисунка 36 видно, что степень кристалличности сополимеров меньше, чем для образца ПОБ 1095. Так, если степень кристалличности ПОБ 1095 до инкубации равнялась 63%, то у сополимера ПОБВ с самым высоким молярным содержанием оксивалерата в цепи (ПОБВ 17,6%), степень кристалличности в начальный момент времени составила 34%, что почти в два раза меньше, чем у ПОБ 1095. Также, можно заметить, что степень кристалличности уменьшается при увеличении молярного содержания цепей 3-оксивалерата. Это связано с включением в цепь полиоксибутирата мономеров 3-ОВ. Включение мономеров с более длинной боковой цепью $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ является энергетически невыгодным для цепи ПОБ, что и приводит к снижению степени кристалличности [123].

Исследовали изменения значений степени кристалличности при дальнейшей деградации полимеров в течение 6 месяцев. При инкубации пленок ПОА в буфере наблюдалось волнообразное изменение степени кристалличности (Рисунок 36 А). Однако при инкубации в буферном растворе с добавлением панкреатической липазы была выявлена иная зависимость изменения степени кристалличности во времени. Волнообразного изменения кристалличности не происходило (Рисунок 36 Б), и наблюдается повышение ее значений только у ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768.

Вероятно, это связано с тем, что скорость расщепления аморфной компоненты возрастала в присутствии липазы, поэтому её количество в объеме полимерной матрицы мало. С этим, вероятно, связано отсутствие сильных перепадов на графиках, по сравнению с графиком гидролитической деструкции. Также важно отметить, что, в отличие от гидролитической деструкции, на данном изображении видна четкая тенденция к уменьшению степени кристалличности в зависимости от молярного содержания 3-оксивалерата в цепи гомополимера, кроме того, изменялся и наклон кривых (значения $\text{tg}\alpha$ на рисунке 36 Б). При деградации кристалличность ПОБ 1095 растет к 6 месяцу, однако, кристалличность ПОБВ 17,6% 1090 к 6 месяцу падает. Исходя из этого, можно вычислить такое молярное содержание 3-оксивалерата в цепи ПОБ, которое начинает оказывать влияние на структурно-механические свойства всего полимера, что приводит к иному характеру разложения полимера (Рисунок 37).

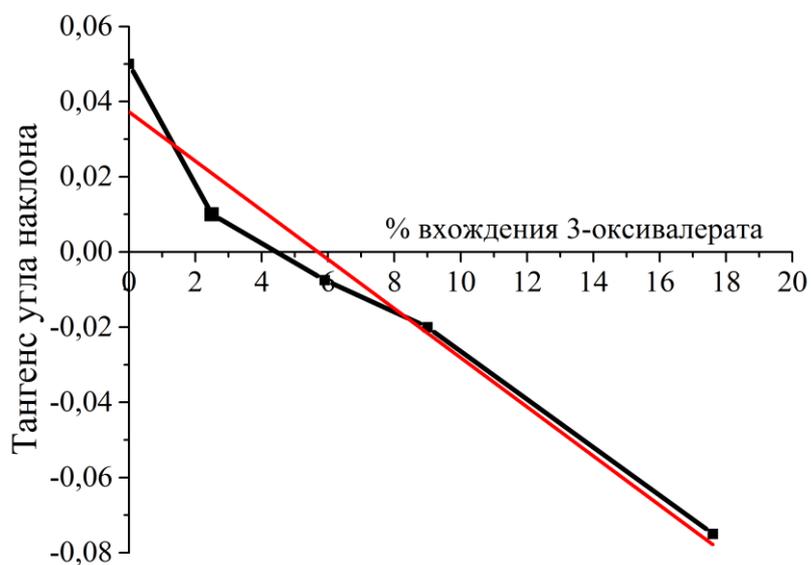


Рисунок 37. Влияние степени вхождения 3-оксивалерата в цепь ПОБ на изменение степени кристалличности сополимеров в процессе деградации в растворе липазы в течение 6 месяцев, в координатах зависимости тангенса угла наклона от времени инкубации.

Из рисунка 37 видно, что, после инкубации в растворе липазы, к 6 месяцу деградации степень кристалличности будет снижаться, если % вхождения 3-оксивалерата в цепь ПОБ будет больше 5,7%. Данный параметр

важно учитывать при конструировании материалов с заданной скоростью деградации.

Таким образом, впервые было продемонстрировано, что инкубация пленок ПОА в натрий-фосфатном буфере в течение 6 месяцев приводит к преимущественно волнообразному изменению степени кристалличности. Кроме того, у большинства полимеров за первый месяц происходит рост степени кристалличности и последующее ее падение [169]. Подобное явление описано в литературе [55]. В то же время, волнообразного изменения кристалличности при ферментативном гидролизе не наблюдается из-за воздействия липазы. Также было выявлено, что добавление свыше 5,7% 3-оксивалерата в цепь гомополимера влияет на долгосрочную тенденцию изменения кристалличности.

7.2 Изменение модуля Юнга пленок полиоксиалканоатов

Изменение степени кристалличности тесно связано с изменением модуля Юнга образцов. Модуль Юнга измеряли с помощью метода наноиндентирования. Данный метод позволяет исследовать изменения механических свойств в нанометровом масштабе.

Рассматривали изменения модуля Юнга пленок ПОА при деградации в растворе фосфатного буфера в присутствии липазы в течение 6 месяцев. Значения модуля Юнга в процессе гидролитической деструкции изменялись сходным образом. Для более правильного сравнения между собой разных ПОА были выбраны образцы ПОБ и его сополимеров со схожими ММ (Рисунок 38).

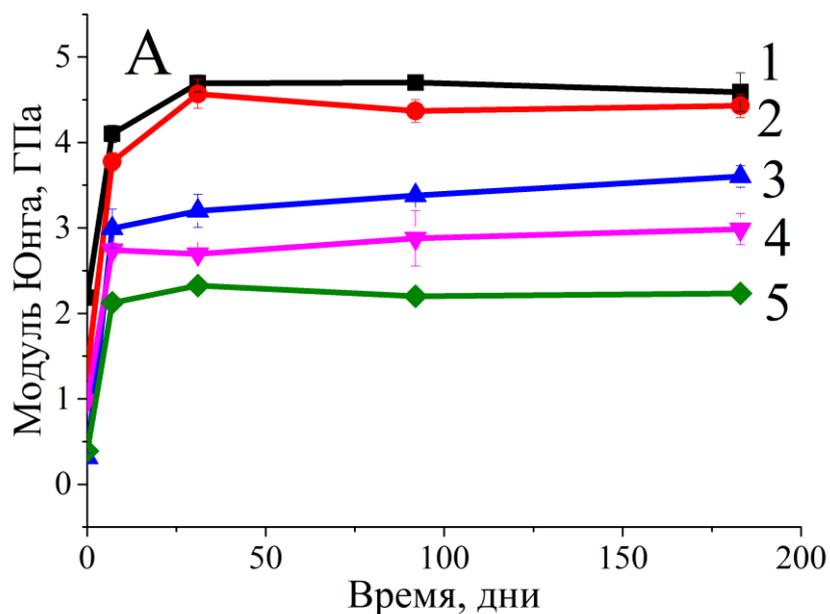


Рисунок 38. Кривые изменения модуля Юнга ПОА с высокой ММ в процессе деградации в растворе липазы в течение 6 месяцев. 1 – ПОБ 1095, 2 – ПОБВ 2,5% 768, 3 – ПОБВ 5,9% 819, 4 – ПОБВ 9% 1010, 5 – ПОБВ 17,6% 1190.

Из рисунка 38 видно, что в течение 1 недели выявлен резкий рост модуля Юнга. Вероятно, это может быть связано с процессом кристаллизации аморфной компоненты ПОА. Сам процесс кристаллизации подробно описан выше. Затем значения модуля Юнга достигают относительного плато и в течение 6 месяцев деградации изменяются незначительно. Следует отметить, что модуль Юнга снижается при увеличении молярного содержания 3-ОВ в цепи полиоксибутирата. Модуль Юнга ПОБ 1095 на 6 месяце биodeградации равен $4,6 \pm 0,2$ ГПа. Следом за ним идет сополимер ПОБВ 2,5% 768, для которого модуль Юнга несколько меньше, и равен $4,4 \pm 0,1$ ГПа. И далее, с увеличением количества входящего в цепь оксивалерата, модуль Юнга становится меньше и достигает значений $2,2 \pm 0,1$ ГПа для сополимера ПОБВ 17,6% 1190, что в два раза меньше, чем у гомополимера ПОБ 1095.

Показав, как изменяется модуль Юнга в процессе деградации в зависимости от состава полимера, необходимо понять, как он изменяется при варьировании молекулярных масс (Рисунок 39).

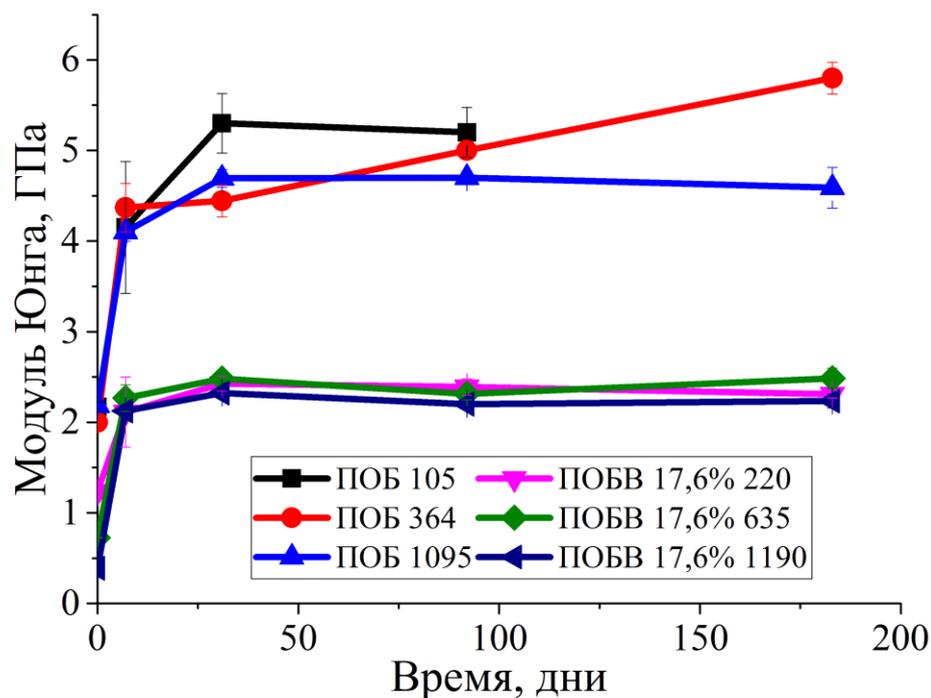


Рисунок 39. Кривые изменения модуля Юнга ПОБВ 9% и ПОБВ 17,6% различных молекулярных масс в процессе биodeградации в растворе липазы в течение 6 месяцев.

На рисунке 39 изображены кривые изменения модуля Юнга 6 сополимеров. Их можно разделить на две группы: три гомополимера и три сополимера с молярным содержанием 3-оксивалерата в цепи гомополимера 17,6%. В каждой группе у полимеры имели разные молекулярные массы. Анализ кривых, изображенных на рисунке 39, показал, что молекулярная масса не оказывает значительного влияния на модуль Юнга. Так, он равен $2,3 \pm 0,05$ ГПа, $2,5 \pm 0,1$ ГПа и $2,2 \pm 0,08$ ГПа для ПОБВ 17,6% 220, ПОБВ 17,6% 635 и ПОБВ 17,6% 1190, соответственно. Для гомополимеров поли-3-оксибутирата наблюдали схожую тенденцию: модуль Юнга равен $4,9 \pm 0,2$ ГПа, $5,8 \pm 0,2$ ГПа и $4,6 \pm 0,2$ ГПа для поли-3-оксибутирата с молекулярными массами 105, 364 и 1095, соответственно. Таким образом, при биodeградации в условиях, симулирующих внутреннюю среду организма, поли-3-оксибутират и его сополимеры с различным процентом вхождения 3-ОВ и разными ММ сохраняют свои механические свойства в течение 6 месяцев.

7.3 Изменение массы пленок полиоксиалканоатов

Кинетику изменения массы пленок ПОА исследовали в растворах фосфатного буфера (PBS) и фосфатного буфера в присутствии липазы при 37°C в течение 6 месяцев. Через определенные промежутки времени (1 неделя, 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев) пленки ПОА извлекались из буферного раствора, высушивались, после чего проводилась оценка их деградации путем измерения массы.

Спустя 6 месяцев пленки из полиоксибутирата и его сополимеров не претерпели внешних изменений. Изменения затронули только низкомолекулярный ПОБ 105 – к 6 месяцу пленки из данного полимера распались на несколько частей как в фосфатном буфере, так и в буфере с добавлением липазы. Остальные пленки ПОА, инкубированные в фосфатном буфере и растворе липазы, сохраняли свою целостность.

Наиболее значительное уменьшение массы полимеров в обоих растворах регистрировали в течение первой недели. (Рисунок 40). Так, наибольшее падение за неделю, более чем на 8%, наблюдали у образца ПОВВ 9% 1010 – до 91,6% от изначальной массы в растворе фосфатного буфера. Предположительно, за это время происходило растворение и вымывание олигомеров в полимере, что и приводило к падению массы. Исследование изменения массы полимеров в процессе разложения показало, что не наблюдалось разницы между гомополимером ПОБ с различной ММ и его сополимерами с разным молярным содержанием 3-оксивалерата и ММ и сополимеров с ПЭГ. Весовая масса у всех образцов полимеров изменялась незначительно.

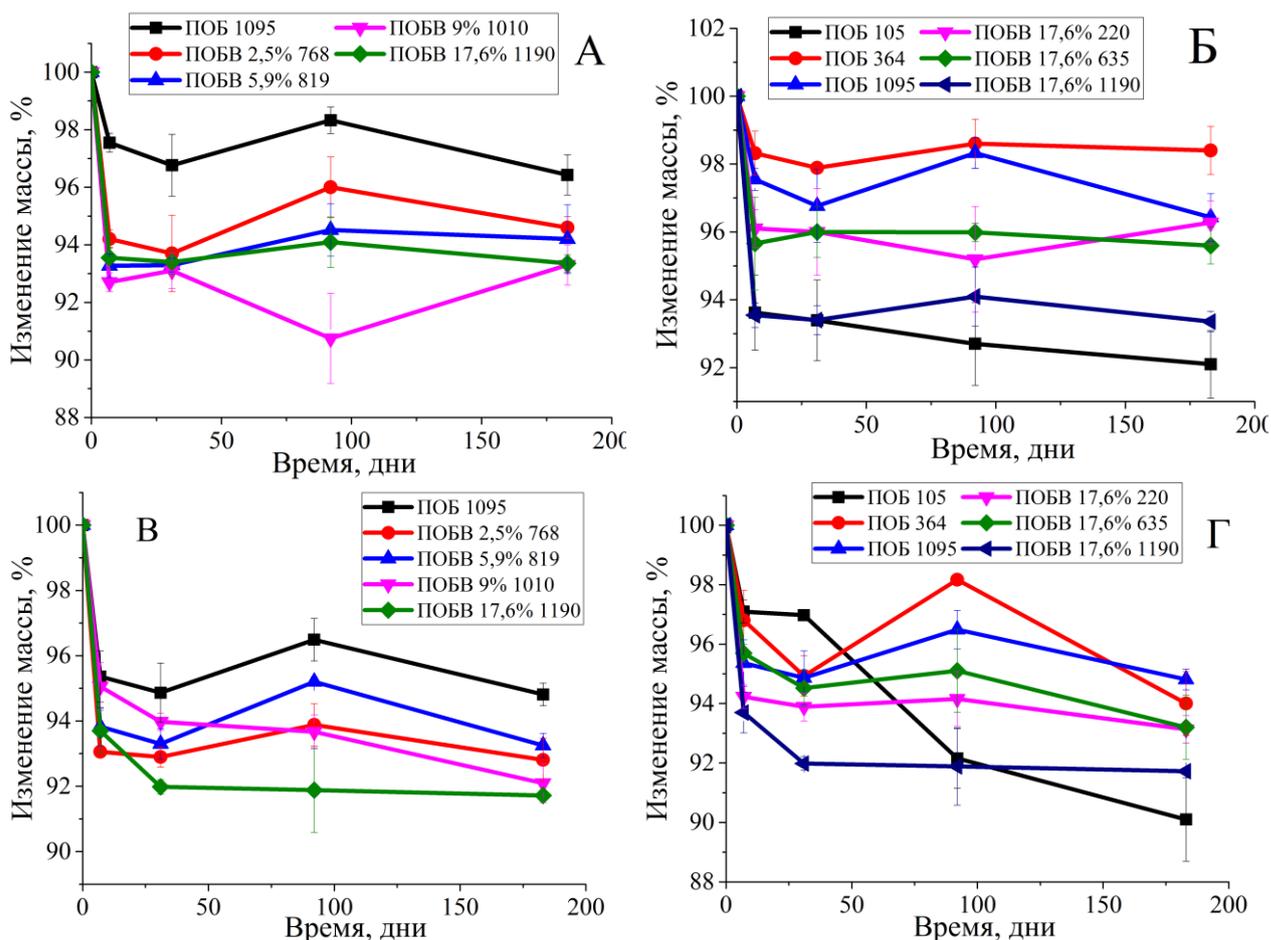


Рисунок 40. Изменение массы пленок ПОА с разным молярным содержанием 3-ОВ в цепи полиоксибутирата (А, В) и разной ММ (Б, Г) в процессе деградации в растворе фосфатного буфера (А, Б) и фосфатного буфера с добавлением липазы (В, Г) в течение 6 месяцев.

Наиболее значительное уменьшение массы полимеров в обоих растворах регистрировали в течение первой недели. (Рисунок 40). Так, наибольшее падение за неделю, более чем на 8%, наблюдали у образца ПОБВ 9% 1010 – до 91,6% от изначальной массы в растворе фосфатного буфера. Предположительно, за это время происходило растворение и вымывание олигомеров в полимере, что и приводило к падению массы. Исследование изменения массы полимеров в процессе разложения показало, что не наблюдалось разницы между гомополимером ПОБ с различной ММ и его сополимерами с разным молярным содержанием 3-оксивалерата и ММ и сополимеров с ПЭГ. Масса у всех образцов полимеров изменялась незначительно [169].

В растворе липазы, как и в буфере, с течением времени масса пленок ПОА менялась незначительно (Рисунок 40). Основное изменение массы также наблюдали в течение первой недели разложения. Дальнейшая инкубация пленок в растворе липазы не приводила к значительным изменениям массы образцов. В процессе инкубации в растворе липазы пленки низкомолекулярного ПОБ 105 потеряли до 10% массы, и, аналогично гидролитической деградации, распадались на небольшие части.

Таким образом, в процессе инкубации образцов в растворе фосфатного буфера и фосфатного буфера с добавлением панкреатической липазы наблюдалась незначительная потеря массы пленок ПОА. Основное снижение массы было выявлено в течение первой недели. Тенденция к небольшому снижению массы также описана в литературе, где было показано, что при 37°C изменения массы пленок ПОА при деградации незначительны [55].

7.4 Изменение молекулярной массы пленок полиоксиалканоатов

Молекулярная масса является одним из важнейших параметров деградации полимеров. Величина молекулярной массы зависит от типа продуцента, условий выращивания и метода экстракции полимера из биомассы [79]. При изучении деградации биополимеров молекулярной массе уделяется существенное внимание ввиду того, что данная характеристика оказывает влияние на другие параметры биополимеров [79, 141]. Кроме того, значения молекулярной массы являются наиболее показательным параметром деградации, описывающим деградацию полимера. Было выявлено, что при незначительном изменении массы образцов, молекулярная масса претерпевала более существенные изменения. Особенности изменения молекулярной массы полимеров в процессе биodeградации позволяют понять и её механизм: некаталитический или автокаталитический [100, 156].

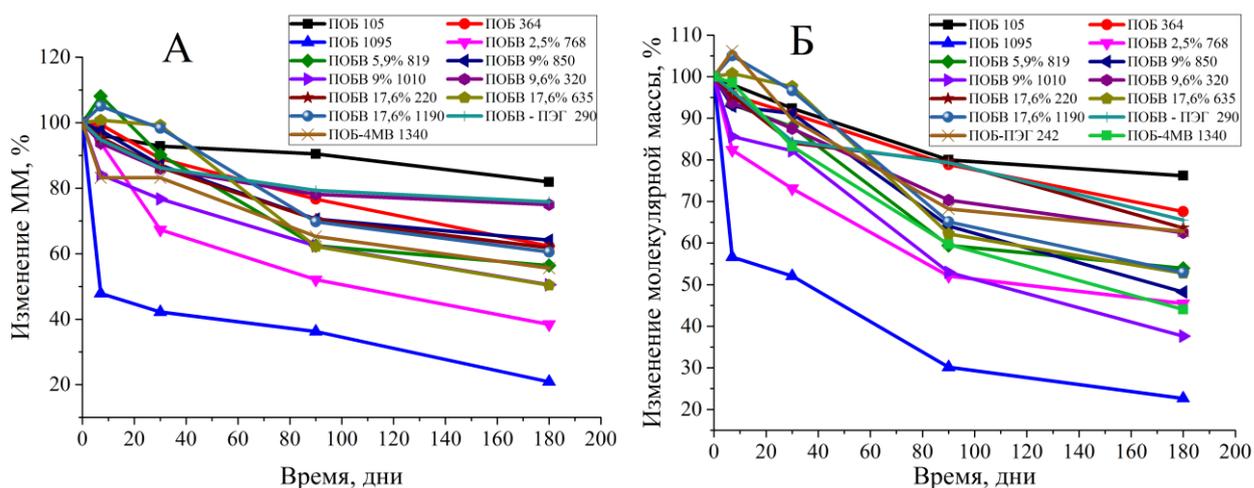


Рисунок 41. Изменение молекулярной массы ПОА в процессе деградации в буферном растворе и буферном растворе (А) с добавлением липазы (Б) в течение 6 месяцев.

На рисунке 41 представлены кривые изменения молекулярной массы ПОА в процессе гидролитической деструкции (А) и ферментативной деструкции (Б) в течение 6 месяцев. Можно заметить общую тенденцию полимеров к снижению молекулярной массы. Такое значительное уменьшение ММ ПОА в процессе биodeградации свидетельствует об объемной деградации полимера, причем её скорость гораздо выше, чем скорость поверхностной эрозии. По данным других исследователей такое изменение ММ в процессе деградации в растворах неспецифических эстераз отличает их от ферментативной деградации в растворе ПОБ-деполимераз, где не наблюдалось объемной эрозии [39, 84]. Таким образом, разложение ПОА в организме будет протекать по другим механизмам.

Следует рассмотреть изменение ММ более детально, разделив полимеры по определенным критериям, а именно: по начальным молекулярным массам и по молярному содержанию 3-ОВ в цепи ПОБ высокомолекулярных ПОА.

Сравнивали ПОБ и ПОБВ 9% и 9,6% с различными ММ (Рисунок 42). Наиболее значительная потеря ММ наблюдается у ПОБ 1095 как в буферном растворе (падение на 77%), так и в буферном растворе с добавлением липазы (падение на 79%). Следом за ним из данной группы полимеров наибольшее

падение наблюдали у ПОВВ 9% 1010 на 62% при инкубировании в растворе липазы, и на 50% в присутствии фосфатного буфера. Возможно, это связано с большим количеством аморфной компоненты в полимере, которая разлагается в 20 раз быстрее, чем кристаллическая [141].

Полученные результаты изменения ММ для данных типов полимеров позволяют предположить, что падение значений молекулярной массы происходит быстрее у высокомолекулярных полимеров, по сравнению с низкомолекулярными. Вероятно, это объясняется затруднением для длинных цепей полимеров образовывать надмолекулярные кристаллические структуры (ламели).

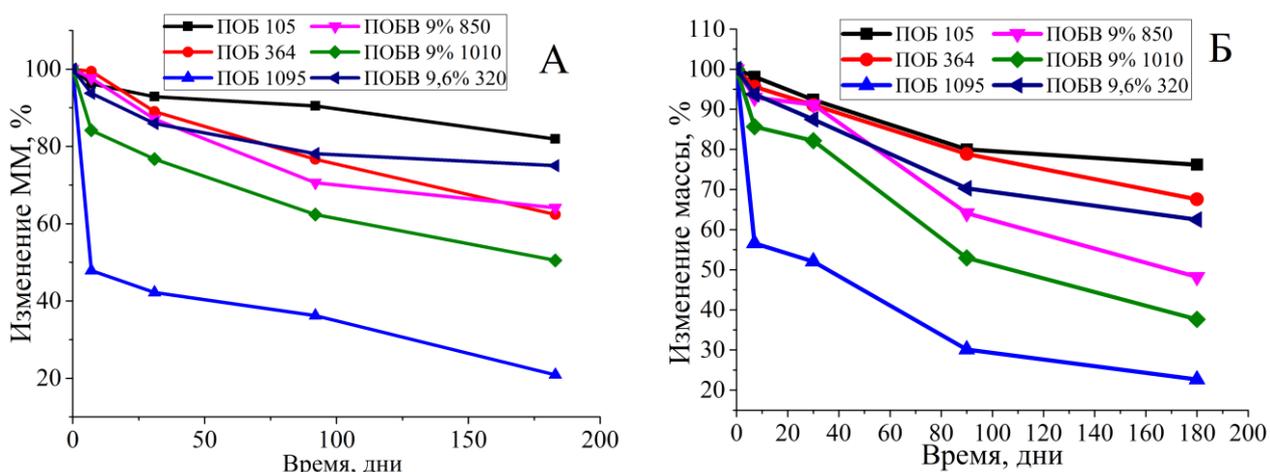


Рисунок 42. Изменение молекулярной массы гомополимеров и сополимеров ПОВВ 9% и 9,6% с различными ММ в процессе гидролитической деградации (А) и ферментативной деградации (Б) в течение 6 месяцев.

Такие цепи более уязвимы для молекул воды, а, соответственно, и для расщепления сложноэфирных связей, что согласуется с результатами других исследователей деградации ПОА [47, 55, 77, 124].

Далее рассмотрим изменение молекулярной массы полимеров у группы ПОА, имеющих разный состав (разное молярное содержание 3-оксивалерата в цепи ПОВВ), но сходные значения начальной ММ. На рисунке 43 представлены кривые изменения ММ высокомолекулярных ПОА в процессе деградации.

В течение 6 месяцев инкубации в фосфатном буфере и в буфере с добавлением липазы, наибольшая потеря ММ наблюдается у образца ПОВ

1095 – до 80% от изначальной молекулярной массы. Для остальных образцов полимеров также наблюдалось падение ММ, но никаких зависимостей от молярного содержания 3-оксивалерата не выявлено. Лишь два полимера из данной группы за первую неделю увеличили свою ММ – ПОБВ 17,6% 1190 и ПОБВ 5,9% 819. Это вероятно связано с тем же эффектом, что наблюдали ранее – растворение низкомолекулярных последовательностей в полимерной матрице. При удалении низкомолекулярных остатков общая ММ может незначительно повышаться.

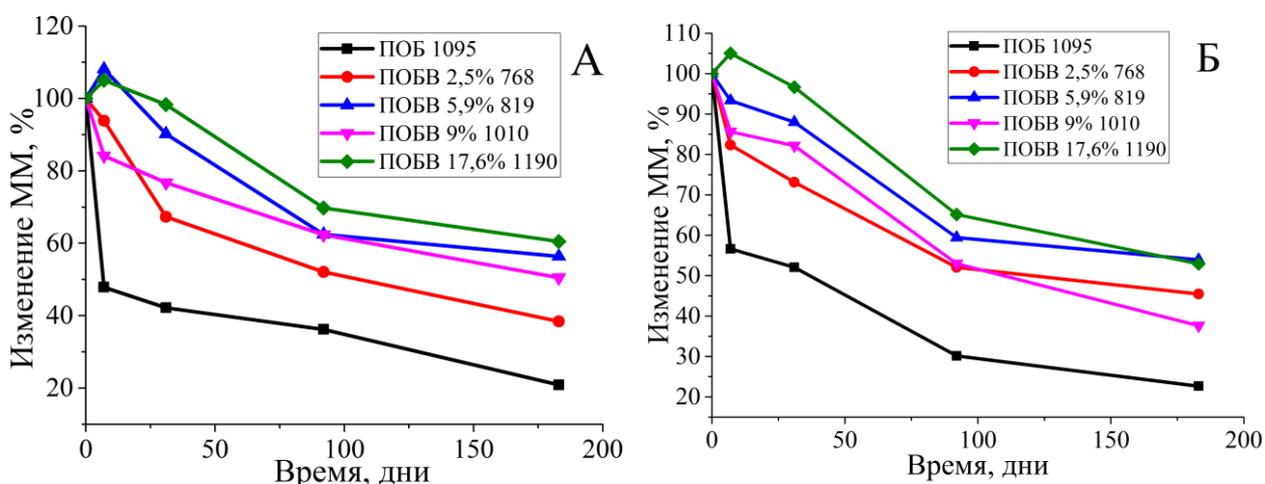


Рисунок 43. Кривые изменения молекулярной массы ПОА в зависимости от молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ в процессе гидролитической (А) и ферментативной деградации в течение 6 месяцев (Б).

Таким образом, исходя из представленных графиков, выявить влияние состава полимера на изменение молекулярной массы в процессе гидролитической деструкции не удалось.

В научной литературе имеются сведения о том, что с помощью математической обработки данных о снижении молекулярной массы в процессе деградации, можно сделать вывод о механизмах деградации изучаемого полимера, а именно - наличии или отсутствии автокаталитического механизма деградации [133]. В процессе анализа кривых уменьшения молекулярной массы ПОБ и его сополимеров при деградации, проводили математическую обработку данных о падении молекулярной массы, при этом применяли модели разложения частично кристаллических полимеров, описанные в работах [124, 156]. Оценить

применимость той или иной модели деградации исследуемых полимеров можно, используя коэффициенты корреляции. Они рассчитаны для графиков зависимости $1/M$ и $\ln(M)$ от времени деградации, которые соответствуют некаталитическому (не автокаталитическому для ферментативной деградации) и автокаталитическому механизму, соответственно [124, 156].

На рисунке 44 (А) видно, что анализируемые кривые лежат по мере увеличения молярного содержания 3-ОВ в цепи ПОБ.

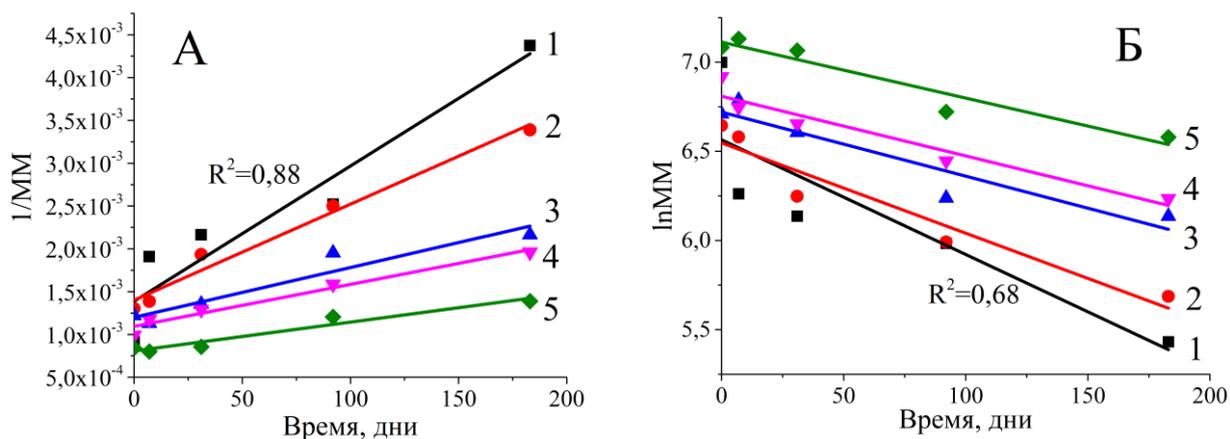


Рисунок 44. А – Модель некаталитической деградации и Б – автокаталитической деградации, построенные на основе результатов изменения молекулярной массы ПОА в процессе гидролитической деструкции. 1 – ПОБ 1095, 2 – ПОБВ 2,5% 768, 3 – ПОБВ 5,9% 819, 4 – ПОБВ 9% 1010, 5 – ПОБВ 17,6% 1190.

Проанализировав данную тенденцию и построив график зависимости тангенса угла наклона кривых от содержания (%) 3-ОВ, получаем точку изгиба (Рисунок 45).

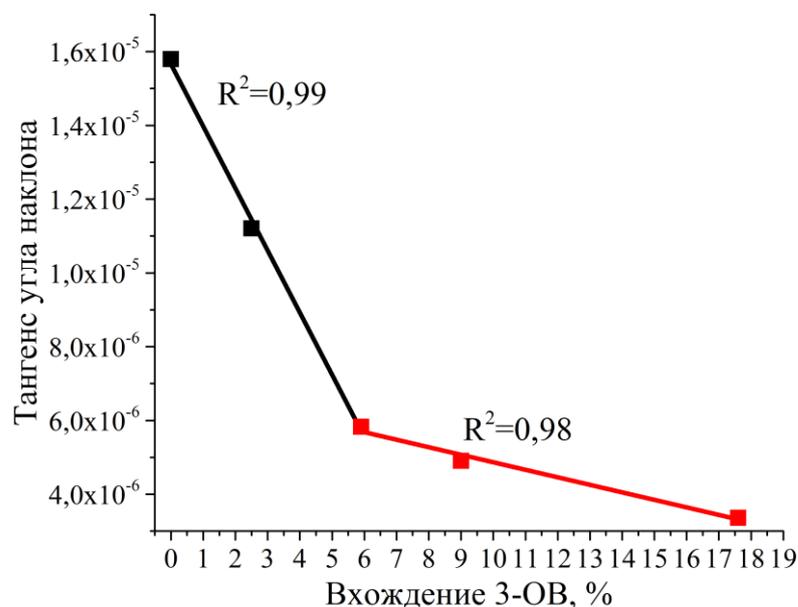


Рисунок 45. График зависимости изменения угла наклона кривых некаталитической модели от % вхождения 3-оксивалерата в цепь гомополимера.

Точка перегиба соответствует 5,9% вхождения 3-ОВ, что очень близко к значению, полученному ранее при анализе изменения степени кристалличности – 5,7%. Данные результаты подтверждают, что 3-ОВ в молярном количестве от 5,7% оказывает влияние на весь полимер, изменяя его структурно-механические свойства.

В соответствии с описанными моделями, для каждой кривой были определены коэффициенты корреляции (Таблица 6).

Согласно данным таблицы 6, показывающим коэффициенты корреляции для некаталитической и автокаталитической моделей, можно сделать вывод, что полимерам свойственна некаталитическая модель деградации, так как ей соответствуют наибольшие значения R^2 . Однако, значения R^2 , соответствующие автокаталитическому механизму деградации для полимеров ПОБ 105, ПОБ 364, ПОБВ 9% 850 также высоки. Это свидетельствует о том, гидролитическая деградация ПОА, согласно результатам о снижении ММ для данных полимеров, идет сразу по двум механизмам – некаталитическому и автокаталитическому. Похожее поведение частично кристаллических полимеров описано в работе [55].

Однако для остальных полимеров в большей степени характерна модель некаталитической деградации.

Таблица 6. Коэффициенты корреляции некаталитической и автокаталитической модели деградации.

Образец	R^2 (некаталитическая модель)	R^2 (автокаталитическая модель)
ПОБ 105	0,94	0,93
ПОБ 364	0,99	0,98
ПОБ 1095	0,88	0,68
ПОБВ 2,5% 768	0,99	0,93
ПОБВ 5,9% 819	0,96	0,89
ПОБВ 9% 850	0,92	0,90
ПОБВ 9% 1010	0,96	0,90
ПОБВ 9,6% 320	0,80	0,77
ПОБВ 17,6% 220	0,98	0,95
ПОБВ 17,6% 635	0,98	0,94
ПОБВ 17,6% 1190	0,97	0,93
ПОБВ - ПЭГ 290	0,92	0,83
ПОБ-4МВ 1340	0,97	0,91

На их фоне несколько выделяются два полимера – ПОБ 1095 и ПОБВ 9,6% 320. Коэффициенты корреляции для них достаточно низкие, как для некаталитической модели (0,88 и 0,8, соответственно), так и для автокаталитической модели (0,68 и 0,77, соответственно), что может быть связано с погрешностями в измерениях.

Аналогичным образом обрабатывали результаты для полимеров, подвергшихся ферментативной деградации. Стоит отметить, что понятие некаталитической деградации в данном случае некорректно, так как реакция катализируется с помощью панкреатической липазы. Отсюда следует, что применение данных моделей покажет наличие вклада автокатализа в процесс ферментативной деградации.

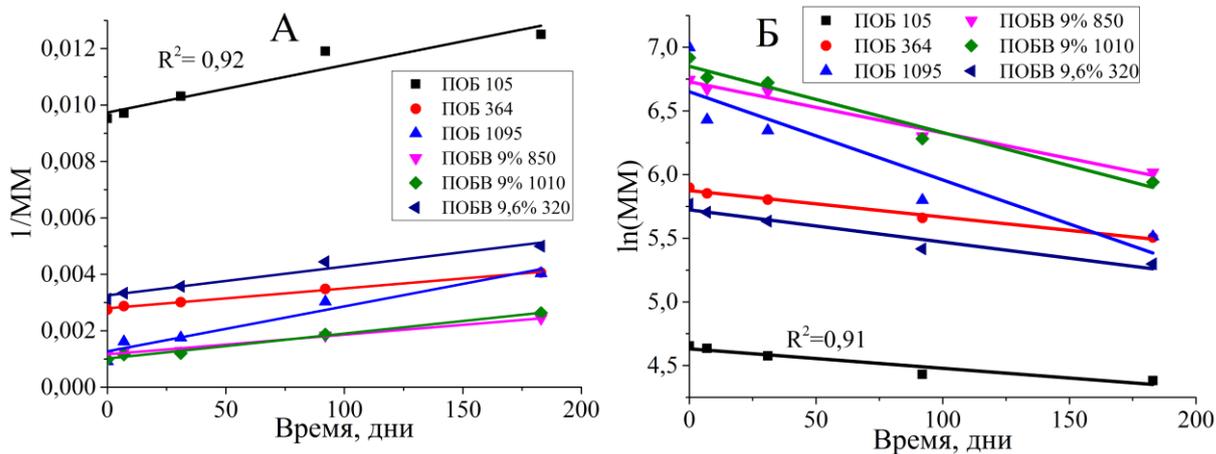


Рисунок 46. А – Модель неавтокаталитической деградации и Б – автокаталитической деградации.

Строили графики зависимостей $1/MM$ и $\ln(MM)$ от времени деградации для ПОБ и ПОБВ 9%-9,6% разных ММ (Рисунок 46). По этим значениям проведены линии тренда и рассчитаны коэффициенты корреляции (R^2) для всех исследуемых образцов полимеров (Таблица 7).

Таблица 7. Коэффициенты корреляции для моделей неавтокаталитического и автокаталитического механизма деградации.

Образец	R^2 (неавтокаталитическая модель)	R^2 (автокаталитическая модель)
ПОБ 105	0,92	0,91
ПОБ 364	0,99	0,99
ПОБ 1095	0,95	0,83
ПОБВ 2,5% 768	0,93	0,88
ПОБВ 5,9% 819	0,92	0,90
ПОБВ 9% 850	0,99	0,98
ПОБВ 9% 1010	0,99	0,97
ПОБВ 9,6% 320	0,96	0,95
ПОБВ 17,6% 220	0,94	0,92
ПОБВ 17,6% 635	0,97	0,95
ПОБВ 17,6% 1190	0,96	0,95
ПОБВ - ПЭГ 290	0,99	0,98
ПОБ-4МВ 1340	0,99	0,98

Более высокие коэффициенты корреляции для модели неавтокаталитического механизма деградации, полученные из зависимости изменения $1/MM$ от времени, говорят о том, что деградация протекает по

данному механизму. Стоит отметить, что для большинства полимеров, кроме ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768, также наблюдались высокие коэффициенты корреляции и для автокаталитической модели. Это свидетельствует о том, что нельзя четко различить оба эти механизма для данных полимеров, то есть, липаза не только ускоряет разложение и деградацию ПОА, но и приводит к тому, что в процессе деградации начинает принимать участие механизм автокатализа. Похожая ситуация описана в литературе и для других частично-кристаллических полимеров [156]. Таким образом, для данных типов полимеров характерны оба механизма деградации. Эти результаты отличались от данных, соответствующих изменению ММ ПОА при гидролитической деструкции. Воздействие липазы приводит к тому, что автокаталитический механизм деградации начинает принимать большее участие в процессе разложения полимеров, по сравнению с гидролитической деструкцией. Для сравнения, при гидролитической деструкции автокатализ свойственен только для трех полимеров. А при воздействии липазы, данный механизм наблюдали уже для 11 полимеров.

7.5 Изменение степени гидрофобности полиоксиданов

В процессе деградации, как ферментативной, так и гидролитической, уменьшался контактный угол между каплей дистиллированной воды и поверхностью пленки полимера, что свидетельствует о снижении гидрофобности поверхности исследуемых полимеров (Рисунок 47). Увеличение гидрофильности поверхности пленок, вероятно, связано с тем, что деградация пленок ПОА приводила к расщеплению полимеров на их поверхностях с высвобождением полярных концевых групп. При анализе кривых изменения контактного угла от процента вхождения 3-оксиданата и от молекулярной массы полимера было выявлено, что контактный угол снижается для всех групп полимеров.

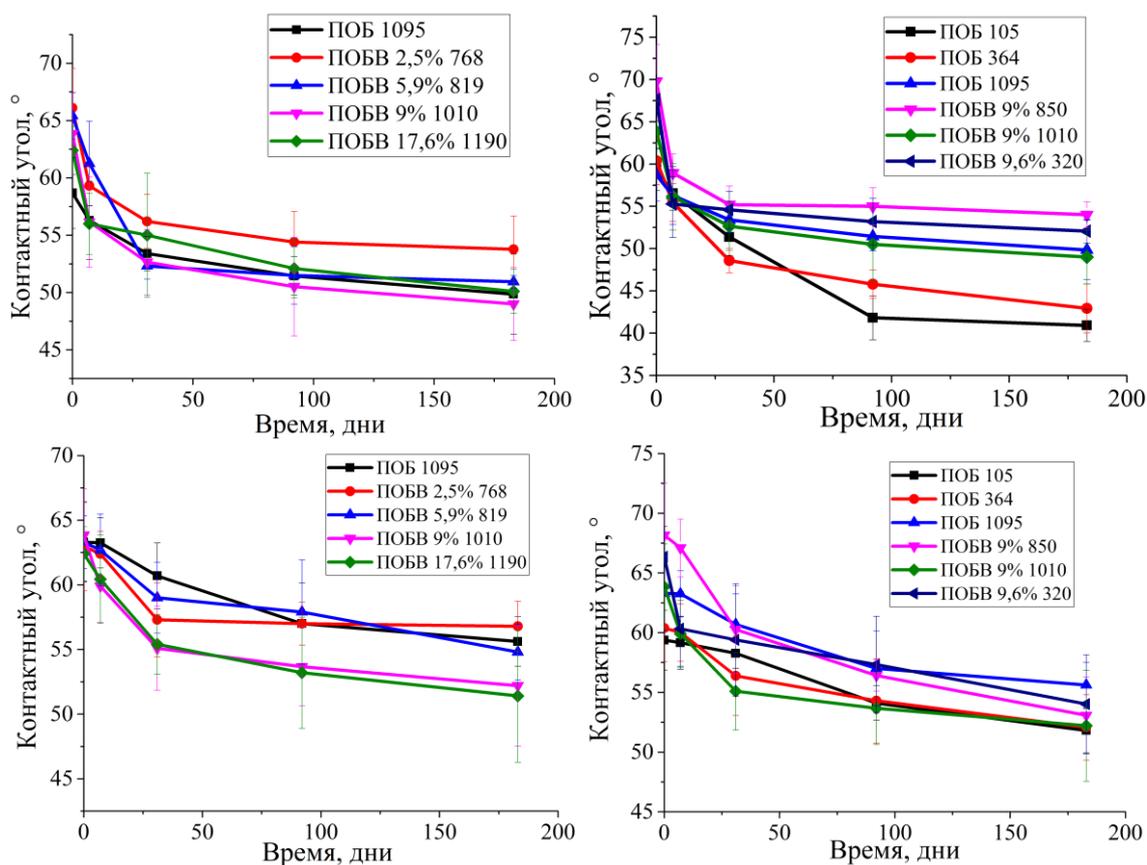


Рисунок 47. Изменение величины контактного угла на границе вода/пленка ПОА с различным молярным содержанием 3-ОВ в цепи ПОБ (А, В) и ПОБ и сополимеров ПОБВ 9% с различными ММ (Б, Г) в процессе ферментативной деградации (А, Б) и гидролитической деградации (В, Г) в течение 6 месяцев.

В процессе биодegradации под действием липазы, пленки из ПОБ 105 и ПОБ 365 демонстрировали наибольшее снижение контактного угла – на 31% и 29% против 13% и 14%, соответственно, при гидролитической деструкции. В целом, при биодegradации контактный угол для всех сополимеров снизился в среднем на 23% против 17% при гидролитической деструкции (различия статистически значимы, $p \leq 0.01$). Больше снижение величины контактного угла, и, как следствие, повышение гидрофильности пленок, можно объяснить действием липазы. Молекулы липазы дополнительно к молекулам воды атакуют полимерные цепочки, расположенные на поверхности образцов полимеров, высвобождая полярные концевые группы. Таким образом, липаза ускоряет поверхностную эрозию, делая поверхность более гидрофильной. В литературе имеются данные, в которых посредством

такой реакции авторы делали поверхность ПОО более подходящей для роста клеток, что немаловажно при дальнейшей имплантации в живой организм [164].

7.6 Изменение морфологии поверхности пленок полиоксисалканоатов

В рамках комплексного анализа гидролитической деструкции пленок ПОО проводили эксперимент по изучению влияния буфера на морфологию поверхности пленок сополимера ПООВ 17,6% 220.

В ходе эксперимента пленку ПООВ 17,6% 220 инкубировали в растворе фосфатного буфера (рН 7.4) в течение 1 месяца при 37°C.

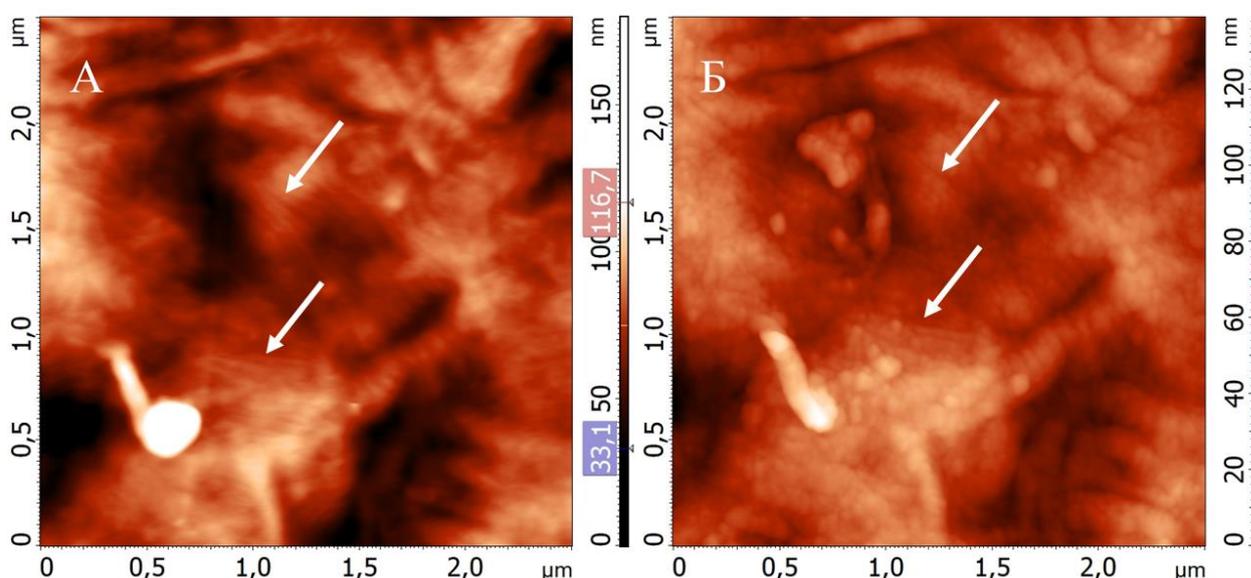


Рисунок 48. Изображение поверхности пленки ПООВ 17,6% 220. А) – 1 неделя инкубации в PBS, Б) – 1 месяц инкубации в PBS. Стрелками обозначены кристаллические структуры – ламели.

На рисунке 48 представлены изображения одного и того же участка поверхности пленки ПООВ 17,6% 220 до и после инкубации в буфере. Поверхность покрыта переплетающимися выступами, шириной 200-400 нм и длиной 1-2,5 мкм, которые, возможно, представляют собой кристаллические области – ламели (указаны стрелками). После 1 месяца инкубации в буфере видимые структуры на поверхности несколько менялись, появлялись небольшие дефекты в кристаллической структуре. Появление таких впадин

объясняется растворением аморфной компоненты, а также увеличением размеров дефектов, уже имеющихся в данных структурах.

Различия морфологии поверхности пленки после инкубации в буфере в течение 1 недели и 1 месяца становятся более наглядными при сравнении параметров шероховатости. Для описания поверхности образцов вычислялись два параметра шероховатости: средняя шероховатость

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |r_n| \quad \text{и среднеквадратичная шероховатость} \quad R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N r_n^2} .$$

Таблица 8. Параметры шероховатости пленок ПОВВ 17,6% 220.

Время инкубации	Средняя шероховатость R_a , нм	Среднеквадратичная шероховатость R_q , нм
1 неделя	12±1	16±2
1 месяц	14±2	17±3

Из таблицы 8 видно, что за месяц инкубации шероховатость пленок ПОВВ возросла незначительно.

Полученные методом АСМ результаты свидетельствуют о том, что гидролитическая деструкция протекает не только в объеме полимерной матрицы, но и на ее поверхности. Это противоречит работам, в которых показано, что для гидролитической деструкции характерна только объемная деградация [38]. Однако другими исследователями, как и нами, также была показана гидролитическая деструкция на поверхности пленок ПОА [35]. Такие разные результаты могут быть связаны с тем, что при исследовании часто проводится лишь качественная оценка поверхности пленки методом сканирующей электронной микроскопии. В то же время, метод АСМ позволяет напрямую вычислить среднюю шероховатость поверхности пленки.

Также был проведен эксперимент по ускоренной гидролитической деструкции пленок ПОВ 100 мМ NaOH.

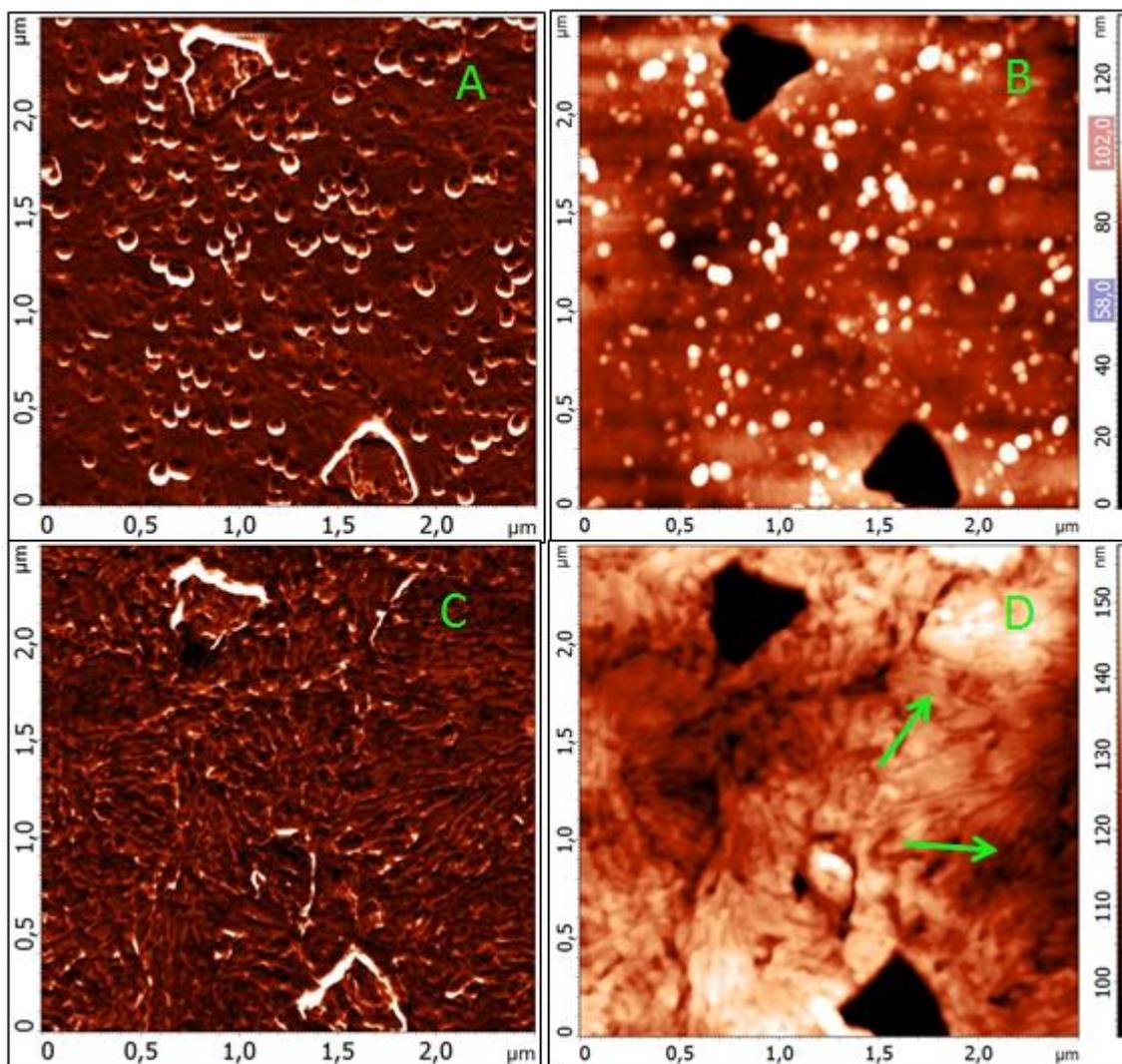


Рисунок 49. Фазовые (А и С) и топографические (В и D) изображения пленок ПОБ до гидролиза 100 мМ NaOH (А, В), после гидролиза (С, D) Стрелками указаны стопки ламелей.

На рисунке 49 сопоставлены изображения поверхности пленки ПОБ до и после обработки 100мМ NaOH в течение 2 дней. Видно, что при разложении происходят существенные изменения. Средняя шероховатость поверхности возрастает от 6 ± 1 нм до 11 ± 2 нм на площади $1,5\times 1,5$ мкм, содержащей 300×300 точек. Наблюдаемое увеличение шероховатости при разложении пленки соответствует литературным данным, где средняя шероховатость на гладкой поверхности возрасла с 15 ± 2 нм до 46 ± 2 нм при инкубировании пленок ПОБ в растворе натрий-фосфатного буфера при рН 7,4 и 37°C [17].

После гидролиза становятся хорошо различимы стопки ламелей (на рисунке 49 они отмечены стрелками). Вероятная причина их появления заключается в том, что щелочь разрушает верхний слой полимера, проявляя структуры, лежащие под ним. После обработки пленки ПОБ щелочью заметно исчезновение гранул полимера. Однако, как было отмечено в разделе, посвященном морфологии пленок, они не представляют интереса с точки зрения их структуры.

7.7 Визуализация процесса гидролиза поли-3-оксибутирата щелочью в реальном времени

Одно из важных преимуществ АСМ перед другими методами микроскопии состоит в том, что АСМ позволяет проводить наблюдения в жидкости. В биологии это часто используется, например, для работы с живыми клетками [45] или ДНК-белковыми комплексами [81]. Кроме того, это позволяет визуализировать процессы разложения пленок в реальном времени [118]. Эта возможность была использована нами для исследования процесса разложения ультратонкой пленки ПОБ.

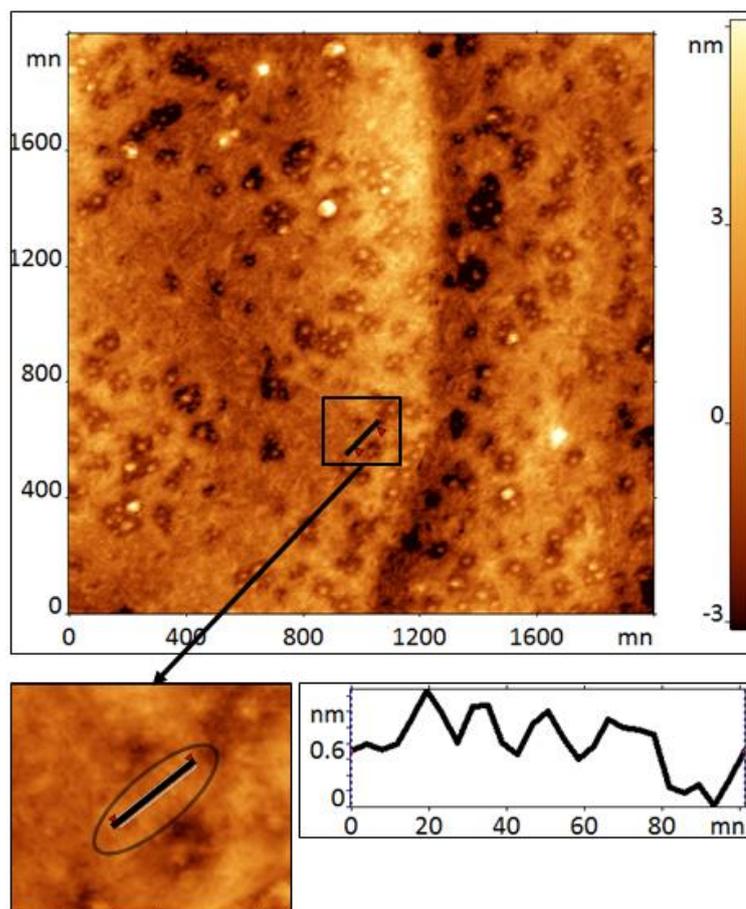


Рисунок 50. Изображение пленки ПОб на графите. Выделена стопка ламелей, расположенных на ребре. Изображение получено при сканировании в воде.

Для этого готовили ультратонкие пленки методом spin-coating, при этом в качестве подложки выступал высокоориентированный графит. На нем пленка держалась достаточно прочно – было возможно длительное (~2 ч) сканирование пленки в воде без каких-либо заметных изменений морфологии поверхности. Измерения проводили в открытой жидкостной ячейке в полуконтактном режиме.

Типичное изображение ПОб на графите представлено на рисунке 50. В центральной части кадра проходит вертикальная ступенька – характерная хорошо известная особенность графита. Большая часть подложки покрыта слоем ПОб с толщиной не более 15 нм.

Далее ячейку заполняли 100мМ NaOH и в течение 1,5 часов проводили сканирование выбранного участка поверхности.

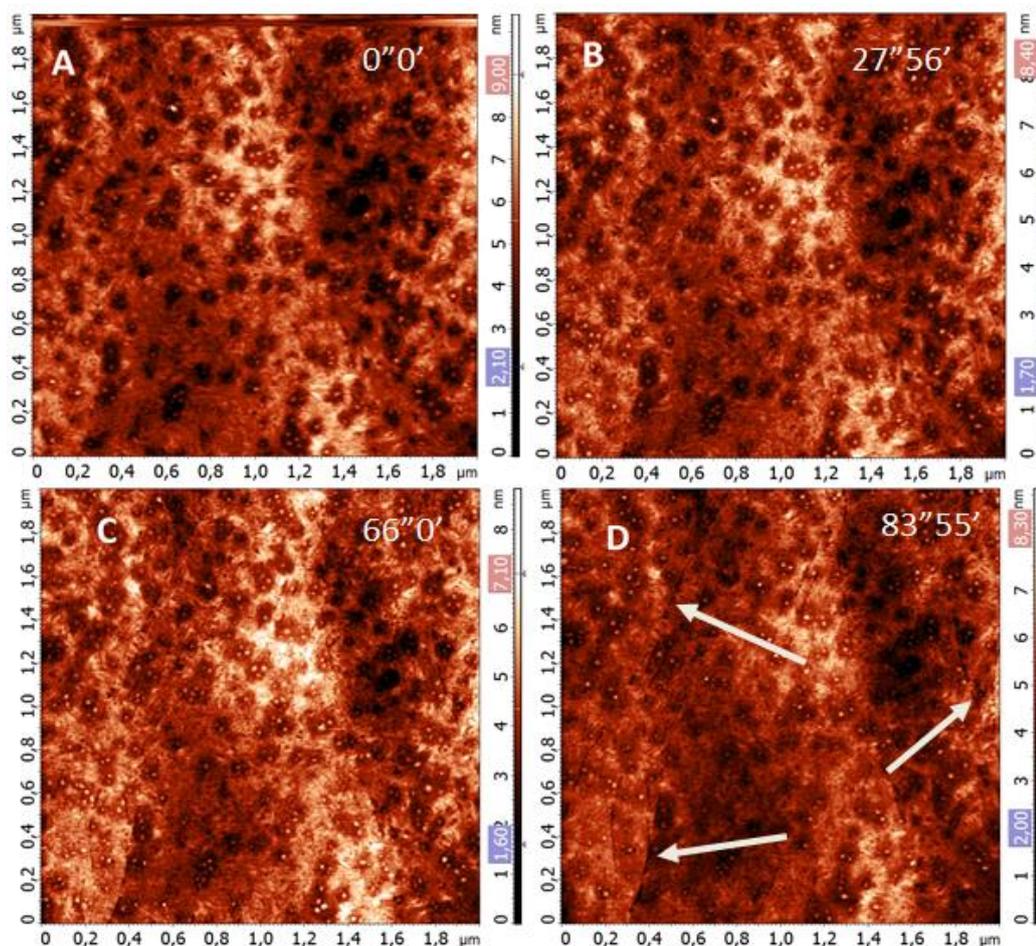


Рисунок 51. А, В, С, D – изображения пленки ПОБ в течение гидролиза в щелочи. Стрелками указаны ступеньки графита. Изображение получено в растворе 100мМ NaOH.

На рисунке 51 представлены четыре изображения из серии, полученной при длительном сканировании. Основное наблюдаемое изменение морфологии – постепенное уменьшение толщины пленки с течением времени (Рисунок 52). Объяснить это можно действием щелочи, а именно, тем, что происходит неспецифический гидролиз молекул полимера, расположенных на поверхности ультратонкой пленки.

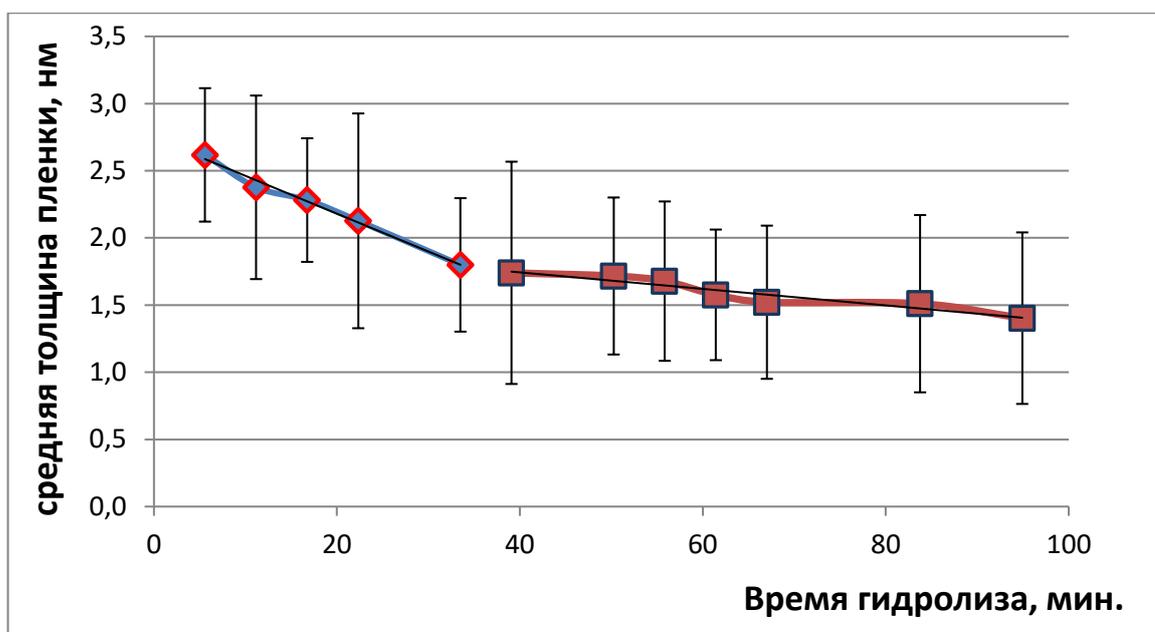


Рисунок 52. Изменение толщины полимерной пленки в процессе щелочного гидролиза.

Сопоставляли полученные данные с теми изменениями, которые наблюдали после высушивания образца.

На рисунке 53 показана поверхность пленки ПОб до и после воздействия щелочи. В результате гидролиза появились участки чистого графита. Они легко идентифицируются по малой шероховатости.

При сканировании на воздухе образцов, подвергавшихся воздействию щелочи, наблюдались два типа структур, которые не встречались при сканировании в жидкости – это гранулы и наноприбриллы.

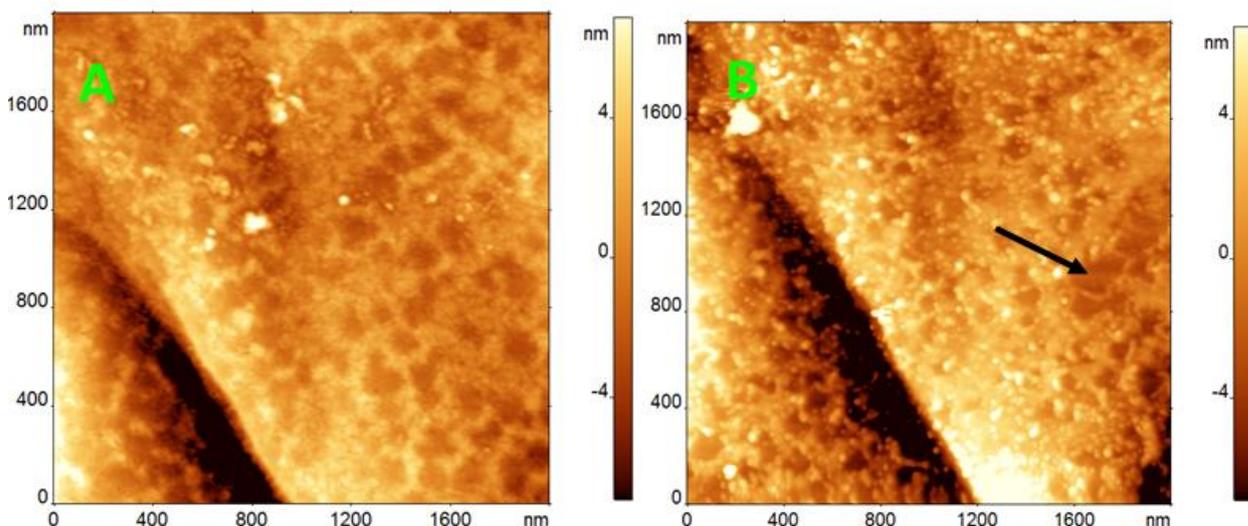


Рисунок 53. А, В – изображения полимера до и после гидролиза щелочью соответственно. Стрелкой показан участок чистого графита. $C_{\text{NaOH}} = 10 \text{ mM}$, $t = 20 \text{ мин}$.

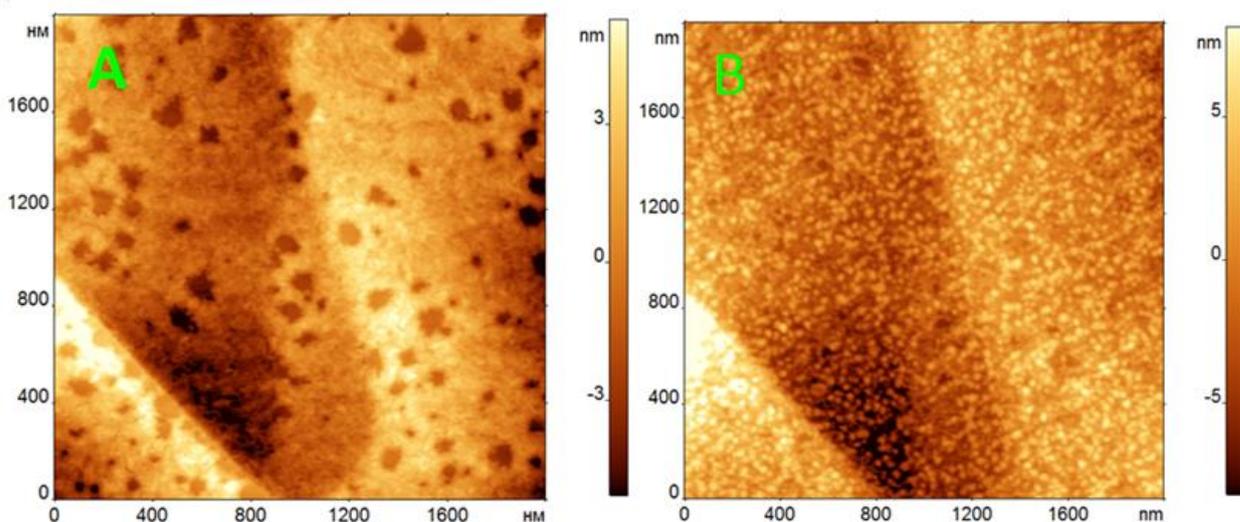


Рисунок 54. А, В – изображения полимера до и после гидролиза щелочью соответственно. $C_{\text{NaOH}} = 50 \text{ mM}$, $t = 40 \text{ мин}$.

На рисунке 54 видно, что после воздействия щелочи на поверхности появились гранулы. Они преимущественно располагаются на свободных от полимера участках графита. Плотность расположения гранул и их количество существенно варьировались от одного образца к другому, но их типичные размеры сохранялись. Их средняя высота составляет $4,5 \pm 1,6 \text{ нм}$, а ширина $23,2 \pm 6,5 \text{ нм}$ с учетом уширения, связанного с конечным радиусом кривизны кантилевера.

На рисунке 55, полученном после гидролиза, присутствуют хорошо различимые нановибриллы. Вероятно, и гранулы, и нановибриллы появились в результате высушивания. Если сравнить изображения 53 и 54 с рисунком 51, который получен непосредственно в щелочи, то становится заметно, что таких образований на рисунке 51 нет, т.е. при высушивании они оседают на подложку, чего не случается при сканировании в жидкости.

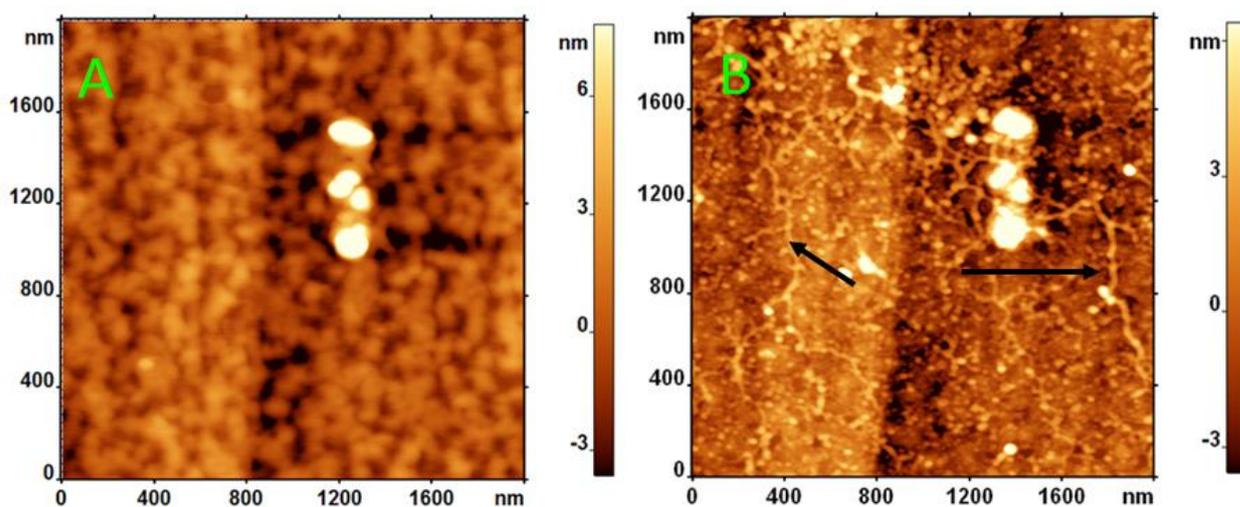


Рисунок 55. А, В – изображения полимера до и после гидролиза щелочью соответственно. $C_{\text{NaOH}} = 50 \text{ mM}$, $t = 1$ ночь. Стрелочками указаны нановибриллы полимера.

Для объяснения возникновения нановибрилл и гранул необходимо учесть следующие особенности:

- 1) Гидролиз ПОБ происходит путем разрывов основной цепи, причем на местах разрыва оказываются в основном гидрофильные группы.
- 2) Высокомолекулярный ПОБ практически не растворяется в воде.
- 3) Воспроизводимость экспериментов говорит о том, что гранулы и нановибриллы не являются артефактами, они не содержат щелочи и примесей, которые могли попасть на образец при его отмывке, перенесении и т.п.
- 4) Истончение пленки свидетельствует о переходе части материала в раствор.

Это позволяет сформулировать следующую гипотезу: при гидролизе ПОБ образуются водорастворимые олигомеры. Их концентрация вблизи

поверхности велика, но по мере удаления от поверхности она снижается. При удалении жидкости и отмывке, часть этих олигомеров остается на подложке и формирует гранулы и нанофибриллы. Таким образом, предположительно, эти структуры состоят из олигомеров ПОБ.

Описанные выше эксперименты проводились на ультратонких пленках ПОБ. Благодаря им можно проследить изменения в поверхностном слое полимера без учета надмолекулярной структуры. Однако при изготовлении биомедицинских изделий надмолекулярная структура будет иметь большое влияние на физико-химические свойства ПОА.

Таким образом, эксперименты по щелочному гидролизу вызывают явные изменения в морфологии пленок ПОБ.

7.8 Изменение морфологии поверхности пленок полиоксиалканоатов в процессе ферментативной деградации

На рисунке 56 показаны два фазовых изображения, соответствующих пленкам ПОБ до инкубации в растворе липазы и после. Видно, что после обработки липазой пленка ПОБ приобрела определенные черты, отличные от состояния, соответствующего до обработки липазой. В данном случае фазовые изображения оказываются более информативными, чем изображения микрорельефа – режим фазового контраста часто используется для визуализации структуры частично кристаллических полимеров.

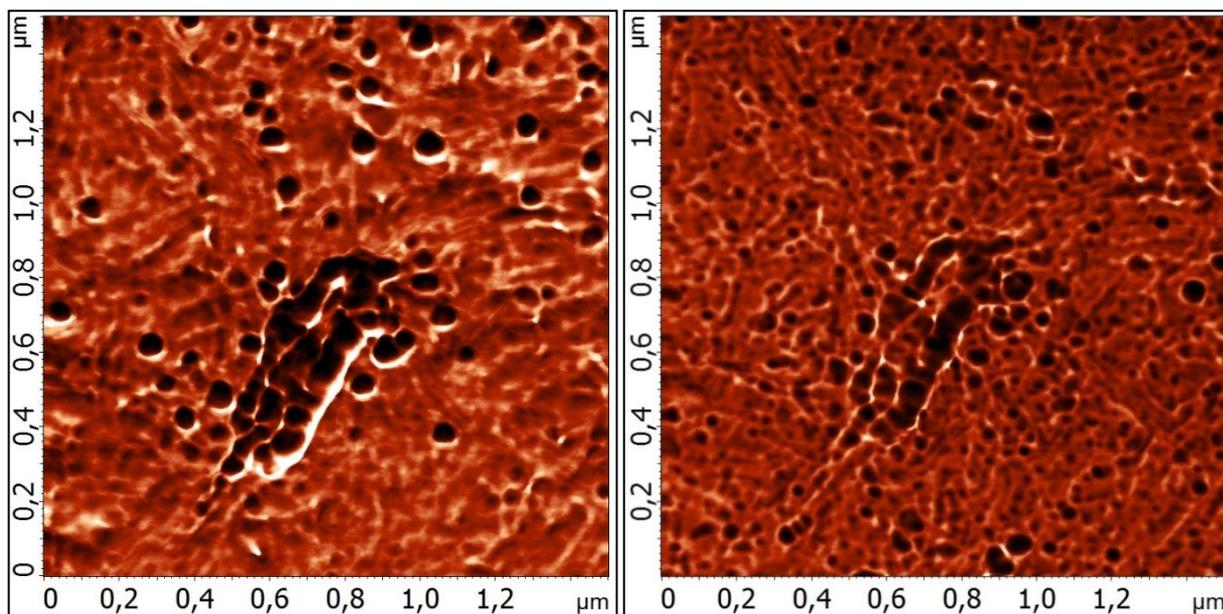


Рисунок 56. Топографическое и фазовое изображение пленки ПОБ до инкубации в липазе и после. Время инкубации – 3 недели, температура - 37°C.

В процессе ферментативного расщепления ПОБ было обнаружено три морфологических изменения: появление новых ламеллярных структур, фрагментация ламеллярных структур и исчезновение ламеллярных структур.

Первый наблюдаемый эффект разложения – появление новых ламеллярных структур (Рисунок 57).

Для лучшей детализации выбран определенный участок и был подобран контраст для эффективного представления деталей. На рисунке 57 (А) стрелкой показана протяженная структура, которая может быть интерпретирована как одиночная ламель. После обработки липазой она становится более заметной; кроме того, правее нее проявляется еще одна ламель. Данные изменения в морфологии пленки легко объяснить, если предположить, что стопка ламелей покрыта тонким слоем аморфного полимера [46]. Липаза, адсорбировавшись на поверхности пленки, начинает её разлагать, обнажая кристаллические структуры, находящиеся под ним.

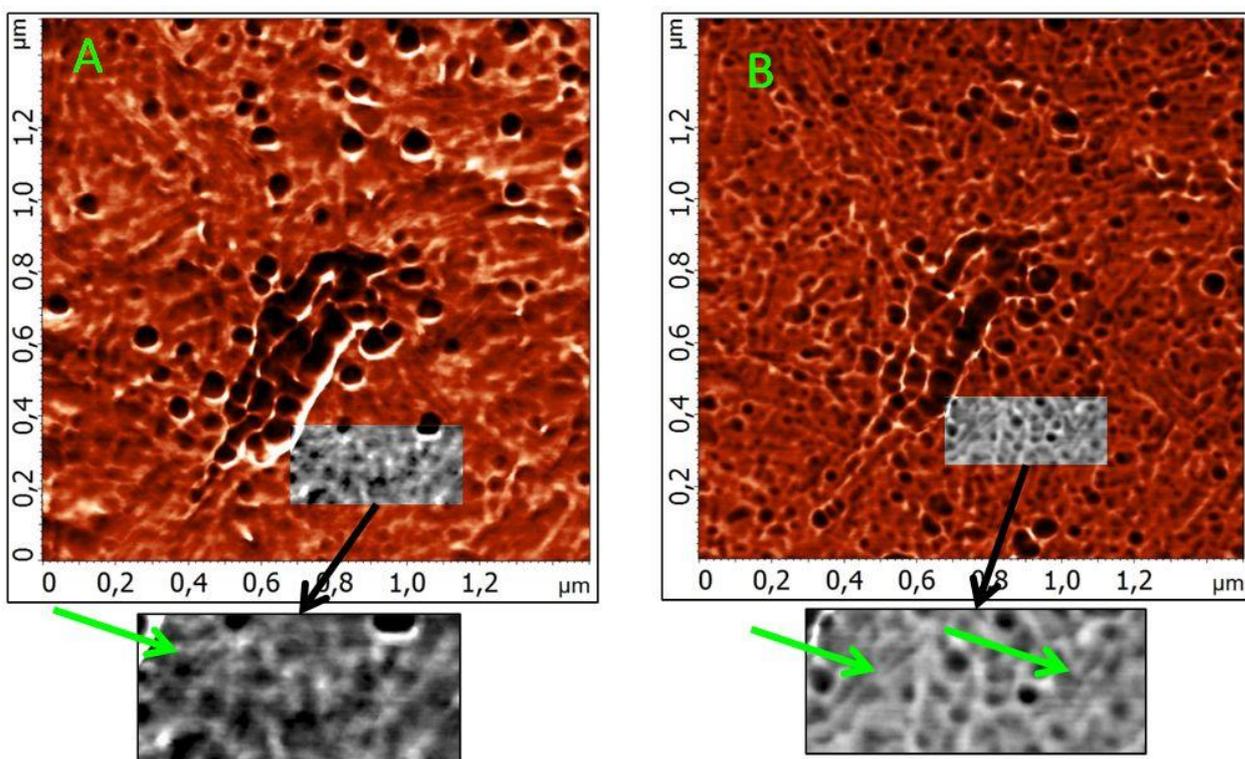


Рисунок 57. Топографическое и фазовое изображение пленки ПОБ до гидролиза липазой (А) и после (В). На изображении выделена и отконтрастирована область, соответствующая появлению новой ламели.

Второе наблюдаемое изменение в морфологии – фрагментация ламеллярных структур.

На рисунке 58 показано изображение, которое иллюстрирует явление фрагментации ламеллярных структур. На рисунке 58 (А) представлено изображение пленки ПОБ до ферментативного гидролиза. Выделенная область содержит систему параллельных полос, интерпретированную нами как стопка ламелей. После обработки липазой (Рисунок 58 Б) видно, что ламели фрагментируются. До обработки липазой длина ламелей в стопке составляла 300 ± 20 нм, после обработки длина фрагментов уменьшилась до 80 ± 10 нм. Возможное объяснение данного явления заключается в том, что в кристаллической структуре присутствуют дефекты. Липаза атакует эти дефекты, что приводит к распаду ламелей на более мелкие части. Аналогичное явление наблюдалось при исследовании процесса разложения пленок ПОБ бактериальной деполимеразой штамма *A. faecalis* T1 [111].

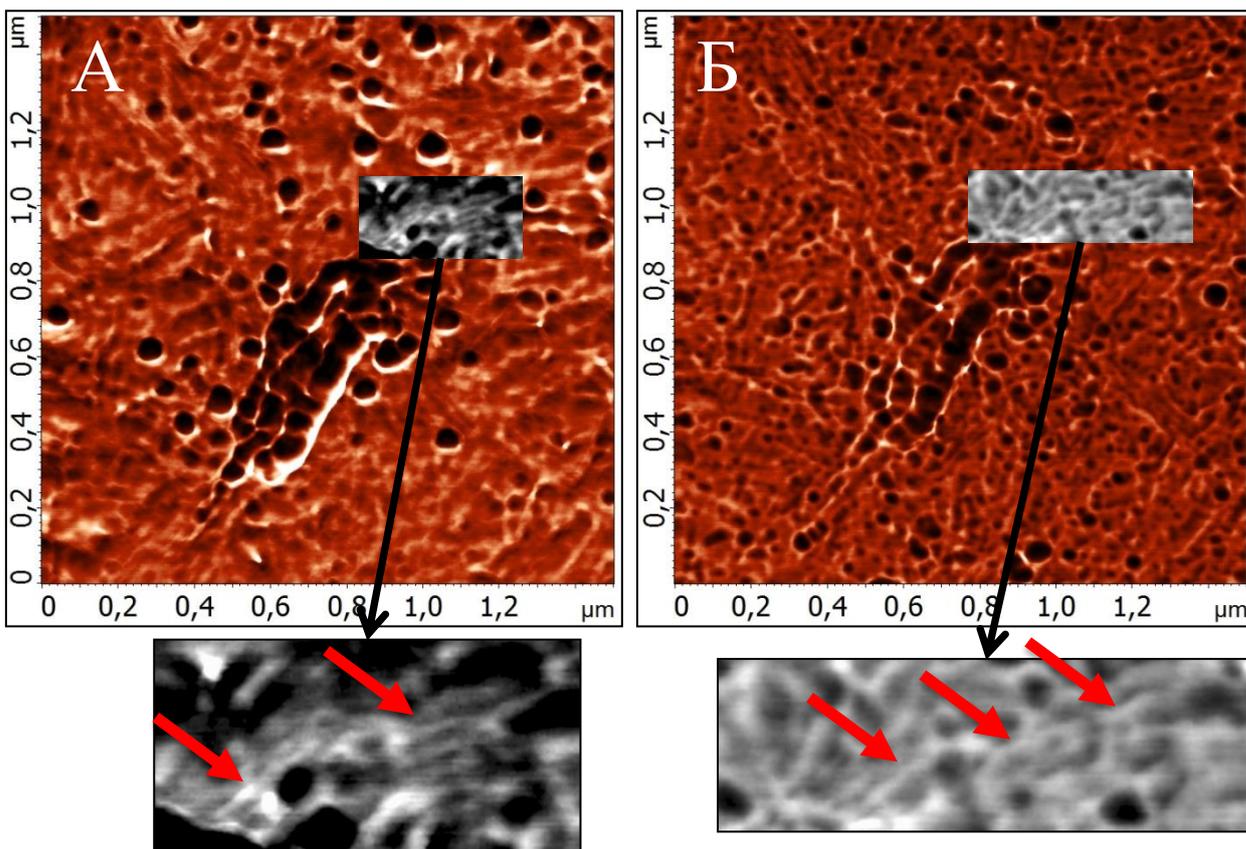


Рисунок 58. Топографическое и фазовое изображение пленки ПОБ до гидролиза липазой (А) и после (Б). На изображении выделена и отконтрастирована область, соответствующая фрагментации стопки ламелей.

Третье морфологическое изменение – исчезновение ламеллярных структур.

На рисунке 59 представлено изображение пленки ПОБ до и после обработки липазой. На пленке ПОБ до обработки липазой был найден участок, имеющий в своем составе систему параллельных полос, интерпретированную нами как стопка ламелей. Как видно на рисунке 59 В, после гидролиза липазой эта структура сильно изменилась: большая часть ламелей исчезли, оставшиеся сильно фрагментировались. Причина исчезновения ламелей, вероятно, заключается в том, что, как и в ситуации с фрагментацией, в ламелях присутствуют дефекты, но в данном случае их количество намного больше, что позволяет липазе практически полностью разрушить стопку ламелей за время эксперимента.

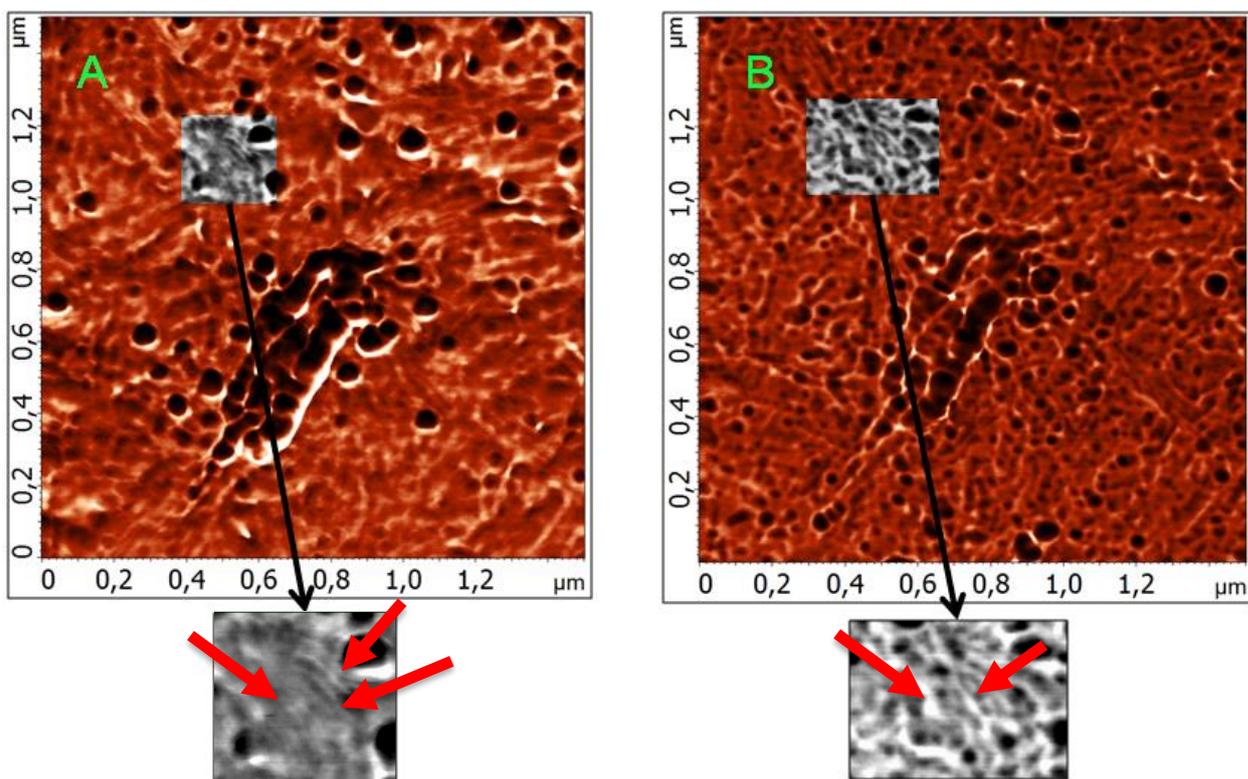


Рисунок 59. Топографическое и фазовое изображение пленки ПОБ до гидролиза липазой (А) и после (В). На изображении выделена и отконтрастирована область, соответствующая исчезновению стопки ламелей.

Итак, в результате обработки липазой на поверхности пленки ПОБ наблюдались три основных типа морфологических изменений: проявление новых ламелей, исчезновение части ламелей и фрагментация ламелей на более короткие участки [166].

Таким образом, ферментативная деградация вызывает явные изменения в морфологии пленок ПОБ. Изменения, которые наблюдались ранее при гидролизе с помощью щелочи несколько отличаются по сравнению с ферментативным гидролизом. Так изменения, происходящие при деградации в растворе липазы существенно более тонкие. Кроме того, можно ожидать, что разница между скоростями гидролиза аморфной и кристаллической компонент при химическом (щелочном) гидролизе будет меньше, чем при ферментативном.

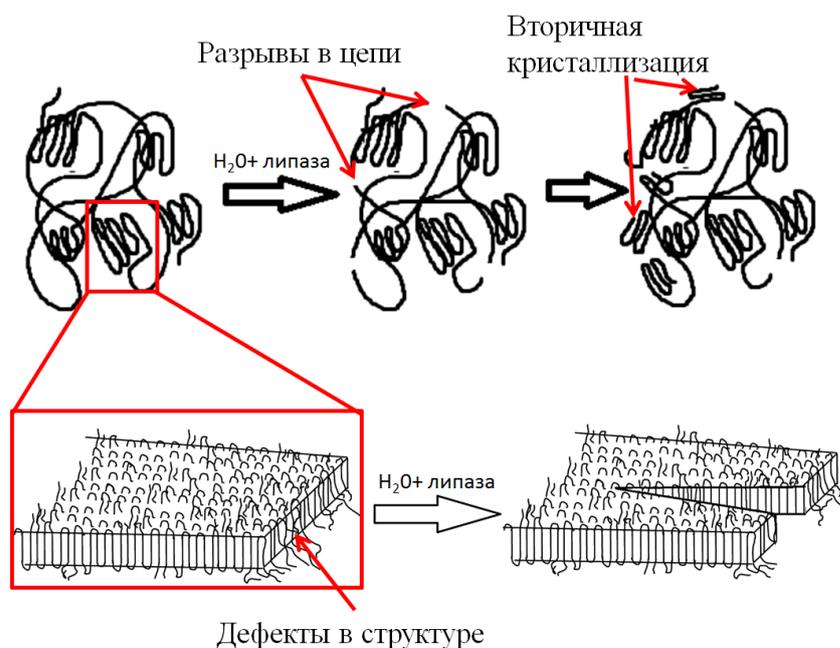


Рисунок 60. Модель разложения ПОА в растворе липазы.

На основании полученных результатов можно предложить следующую модель деградации (Рисунок 60). При изготовлении полимера он содержит некоторое количество кристаллической и аморфной компоненты. При инкубировании полимера в растворе буфера с липазой происходит растворение олигомеров, что приводит к снижению массы. 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.

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.

7.9 Изменение свойств матриц в процессе деградации.

Изучение изменения 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 водопоглощение и модуль Юнга на сжатие в процессе деградации. Данные свойства являются одними из важнейших параметров будущего изделия, так как под механическими свойствами понимается способность изделия сохранять свою структуру и эксплуатационные характеристики, а водопоглощение – показатель способности тканей и физиологических жидкостей проникать в структуру изделия.

Для решения данной задачи были сконструированы скаффолды из ПОБ 238 и полилактида. Скаффолды имели следующие размеры: диаметр 24 ± 1 мм, высота 2–3,3 мм. Для изучения изменения свойств образцы помещали в раствор фосфатного буфера с добавлением липазы при условиях аналогичным тем, при которых исследовалась деградация пленок из ПОА.

Таблица 9. Изменение свойств скаффолдов их ПОА в процессе деградации в течение 6 месяцев.

Образцы скаффолдов	До инкубирования в фосфатном буфере с добавлением липазы		После инкубирования в фосфатном буфере с добавлением липазы	
	Водопоглощение, %	Модуль Юнга, кПа	Водопоглощение, %	Модуль Юнга, кПа
ПОБ 238	193 ± 15	$67 \pm 0,8$	767 ± 30	220 ± 80

В результате деградации в растворе фосфатного буфера с добавлением липазы за первую неделю скаффолды из полилактида разложились на отдельные составляющие, тогда как скаффолды из ПОБ238 через 6 месяцев сохранили свою целостность, причем их модуль Юнга вырос примерно в 3,5 раза в случае ПОБ 238, а водопоглощение к 6 месяцу деградации возросло в 4 раз. Такое сильное изменение в модуле Юнга и водопоглощении объясняется разложением полимера, уменьшением содержания аморфной компоненты. Увеличение водопоглощения также объясняется процессом деградации скаффолда, а именно увеличением объема пор, присутствующих в нем.

Таким образом, при многократном увеличении гидрофильности скаффолдов (что способствует их биосовместимости) в течение 6 месяцев сохраняется целостность и механическая прочность изделий из ПОБ, откуда логично заключить, что такие изделия могут длительно выполнять свою функцию в организме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена комплексному исследованию деградации поли-3-оксибутирата различных молекулярных масс, сополимеров поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата разных молекулярных масс и молярного содержания 3-оксивалерата в цепи сополимера, сополимеров ПОБ с 4-метилвалератом и ПОБВ с полиэтиленгликолем.

Изучение синтезированных полиоксиалканоатов показало, что при увеличении молярного содержания 3-оксивалерата в цепи гомополимера приводит к снижению контактного угла смачивания водой пленок ПОА, снижается их модуль Юнга, а также степень кристалличности. Варьирование молекулярной массы в большинстве случаев влияет только на степень кристалличности пленок из ПОА.

Эксперименты по деградации изучаемых полимеров *in vitro* показали, что масса пленок, инкубированных в растворе фосфатного буфера и фосфатного буфера с добавлением липазы, изменяются незначительно, что нельзя сказать об изменении молекулярной массы. Молекулярная масса всех исследованных образцов снижалась, причем снижение составило десятки процентов. Наибольшее уменьшение молекулярной массы наблюдается у высокомолекулярных полимеров.

Методом атомно-силовой микроскопии при прямом наблюдении был показан процесс кристаллизации аморфной компоненты, а также истончение пленок поли-3-оксибутирата при гидролитической деструкции под действием 100 мМ NaOH. Также при ферментативной деградации были выявлены три типа изменений структуры поверхности пленок ПОБ: проявление новых ламелей, исчезновении части ламелей и фрагментации ламелей на более короткие участки. Вследствие поверхностной эрозии пленок в процессе ферментативной и гидролитической деградации увеличивалась гидрофильность полимеров.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрией было продемонстрировано волнообразное изменение степени кристалличности ПОА при гидролитической деструкции. Это является отличительной особенностью данного типа деструкции, так как при ферментативной деструкции такого эффекта после 1 месяца инкубации не наблюдалось. Также оба вида деструкции имеют различные механизмы деградации, а именно при ферментативной деградации помимо разложения полимера липазой на скорость деградации для большинства полимеров оказывает эффект автокатализа. При гидролитической деградации автокатализ характерен только для 3 ПОА.

Модуль Юнга пленок ПОА также менялся. В процессе деградации наблюдался резкий рост модуля Юнга ПОА за первую неделю, как в растворе липазы, так и буфера, затем он сменялся относительным плато.

Изучение деградации поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволило сделать вывод о том, что молярное содержание 3-оксивалерата в цепи гомополимера более 5,7% является критической точкой, которая определяет область изменения структурно-механических свойств сополимера, в частности, степени кристалличности.

Была изучена деградация прототипа изделия из поли-3-оксибутирата – пористого скаффолда. В течение 6 месяцев скаффолды из данного материала сохраняли свою целостность, в отличие от контрольного образца – полилактида, который разлагался уже за первую неделю деградации.

Таким образом, на основе полученных данных по 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.

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 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 биодegradации 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность председателю совета Швядасу В.К., ученому секретарю Шаповаловой И.В., а также всем членам диссертационного совета.

Автор выражает глубокую благодарность лаборатории азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН - сотрудникам лаборатории: Мышкиной В.Л. и Махиной Т.К. за помощь в микробиологической работе, выделении и очистке полимеров, а также заведующему лаборатории Топунову А.Ф.

Автор выражает благодарность Багрову Д. В. за помощь в освоении методов реометрии и атомно-силовой микроскопии; проф. Шайтану К.В. за помощь в организации работы и других сотрудников и аспирантов кафедры биоинженерии за ценные советы и помощь в работе.

Автор выражает благодарность доценту факультета почвоведения МГУ им. Ломоносова к.б.н. Хайдаповой Долгор Доржиевне за помощь в исследовании с использованием реометра Anton Paar MCR-302, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета. А также коллектив «отдела исследования физико-механических свойств» Института Сверхтвердых и Новых Углеродных Материалов г. Троицка Московской области (ФГБНУ ТИСНУМ), в частности Усеинова А.С. и Масленикова И.И. в предоставлении возможности работы и обучении методу наноиндентирования на приборе НаноСкан 4D, собственной разработки института.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-74-20104) в части исследования гидролитической и ферментативной деструкции поли-3-оксиалканоатов и физико-химических свойств полимерных матриц и Российского Фонда

Фундаментальных исследований (грант офи-м № 15-29-04856) в части микробиологического получения поли-3-оксиалканоатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Alejandra R.C., Margarita C.M., María Soledad M.C. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by a commercial lipase // *Polymer Degradation and Stability*. 2012. № 11 (97). С. 2473–2476.
2. Amor S.R., Rayment T., Sanders J.K.M. Poly(hydroxybutyrate) in Vivo: NMR and X-ray Characterization of the Elastomeric State // *Macromolecules*. 1991. № 16 (24). С. 4583–4588.
3. Anjum A., Zuber M., Zia K.M., Noreen A., Anjum M.N., Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. Т. 89. 161–174 с.
4. Artsis M.I., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly(3-Hydroxybutyrate) // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2012. № 1 (555). С. 232–262.
5. Azevedo H., Reis R. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate // *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2004. С. 177–202.
6. Babensee J.E., Anderson J.M., McIntire L. V., Mikos A.G. Host response to tissue engineered devices // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998. Т. 33. № 1–2. 111–139 с.
7. Bachmann B.M., Seebach D. Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 // *Macromolecules*. 1999. № 6 (32). С. 1777–1784.
8. Ballard D.G.H., Curtis A., Shirley I.M., Taylor S.C. Synthesis of Polyphenylene from a Cis-Dihydrocatechol, a Biologically Produced Monomer // *Macromolecules*. 1988. № 2 (21). С. 294–304.

9. Barham P.J., Keller A., Otun E.L., Holmes P.A. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate // *Journal of Materials Science*. 1984. № 9 (19). C. 2781–2794.
10. Barham P.J., Barker P., Organ S.J. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate // *FEMS Microbiology Letters*. 1992. № 2–4 (103). C. 289–298.
11. Barham P.J., Keller A. The relationship between microstructure and mode of fracture in polyhydroxybutyrate // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1986. № 1 (24). C. 69–77.
12. Bibers I., Tupureina V., Dzene A., Kalnins M. Improvement of the deformative characteristics of poly- β -hydroxybutyrate by plasticization // *Mechanics of Composite Materials*. 1999. № 4 (35). C. 357–364.
13. Birley C., Briddon J., Sykes K.E., Barker P.A., Organ S.J., Barham P.J. Morphology of single crystals of poly (hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate // *Journal of Materials Science*. 1995. № 3 (30). C. 633–638.
14. Bonartsev A., Yakovlev S., Boskhomdzhev A., Zharkova I., Bagrov D., Myshkina V., Mahina T., Kharitonova E., Samsonova O., Zernov A., Zhuikov V., Efremov Y., Voinova V., Bonartseva G., Shaitan K. The Terpolymer Produced by *Azotobacter Chroococcum* 7B: Effect of Surface Properties on Cell Attachment // *PLoS ONE*. 2013. № 2 (8). C. e57200.
15. Bonartsev A.P., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Furina E.K., Makhina T.A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3- hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria // *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in applied Microbiology*. 2007. C. 295–307.
16. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Shaitan K. V., Kirpichnikov M.P. Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2011. № 1 (5). C. 10–21.

17. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A. V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D. V., Zaikov G.E. Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Polylactide and their Derivatives: Kinetics, Crystallinity, and Surface Morphology // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2012. № 1 (556). C. 288–300.

18. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiev A.P., Bagrov D. V, Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O. V, Feofanov A. V, Voinova V. V, Zernov A.L., Efremov Y.M., Bonartseva G.A., Shaitan K. V, Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. // *BMC biochemistry*. 2013. № 1 (14). C. 12.

19. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Mahina T.K., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Zernov A.L., Ivanova E.V., Akoulina E.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Alekseeva S.G., Podgorskii V.V., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Milanovskiy E.Y., Tyugay Z.N., Bykova G.S., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by Strain *Azotobacter chroococcum* 7B // *Acta Naturae*. 2016. № 3 (8).

20. 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. № 1 (6). C. 42–52.

21. 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. № 2 (47). C. 173–184.

22. Bonhomme S., Cuer A., Delort A.M., Lemaire J., Sancelme M., Scott G. Environmental biodegradation of polyethylene // *Polymer Degradation and Stability*. 2003. № 3 (81). C. 441–452.

23. Boskhomdzhiev A.P., Bonartsev A.P., Makhina T.K., Myshkina V.L., Ivanov E.A., Bagrov D. V., Filatova E. V., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. Biodegradation kinetics of poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010. № 2 (4). C. 177–183.

24. Brückner S., Meille S. V., Malpezzi L., Cesaro A., Navarini L., Tombolini R. The structure of poly(D-beta-hydroxybutyrate). A refinement based on the Rietveld method // *Macromolecules*. 1988. № 4 (21). C. 967–972.

25. Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging // *Express Polymer Letters*. 2014. № 11 (8). C. 791–808.

26. Capitán M.J., Rueda D.R., Ezquerra T.A. Inhibition of the crystallization in nanofilms of poly(3-hydroxybutyrate) // *Macromolecules*. 2004. № 15 (37). C. 5653–5659.

27. Carrière F., Renou C., Lopez V., Caro J. De, Ferrato F., Lengsfeld H., Caro A. De, Laugier R., Verger R. The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals // *Gastroenterology*. 2000. № 4 (119). C. 949–960.

28. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations 2008. 467–479 c.

29. Chan R.T.H., Russell R.A., Marçal H., Lee T.H., Holden P.J., Foster L.J.R. BioPEGylation of Polyhydroxybutyrate Promotes Nerve Cell Health and Migration // *Biomacromolecules*. 2014. № 1 (15). C. 339–349.

30. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010. T. 110. № 6. 621–632 c.

31. Chen G.-Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. // *Biomaterials*. 2005. № 33 (26). C. 6565–78.
32. Chen G.Q. *Plastics from Bacteria* / G.Q. Chen, 2010. 17-37 c.
33. Chen G.Q., Wu Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. T. 67. № 5. 592–599 c.
34. Chiu F.C., Ting M.H. Thermal properties and phase morphology of melt-mixed poly(trimethylene terephthalate)/polycarbonate blends-Mixing time effect // *Polymer Testing*. 2007. № 3 (26). C. 338–350.
35. Choi G.G., Kim H.W., Rhee Y.H. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp. MT-16. // *Journal of microbiology* (Seoul, Korea). 2004. № 4 (42). C. 346–52.
36. Coskun S., Korkusuz F., Hasirci V. Hydroxyapatite reinforced poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based degradable composite bone plate // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2005. № 12 (16). C. 1485–1502.
37. Cruz-Pinto J.J.C., Carvalho M.E.S., Ferreira J.F.A. The kinetics and mechanism of polyethylene photo-oxidation // *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 1994. № 1 (216). C. 113–133.
38. Doi Y., Kanesawa Y., Kawaguchi Y., Kunioka M. Hydrolytic degradation of microbial poly(hydroxyalkanoates) // *Macromolecular Chemistry, Rapid Communication*. 1989. № 5 (10). C. 227–230.
39. Doi Y., Kanesawa Y., Kunioka M., Saito T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // *Macromolecules*. 1990. № 1 (23). C. 26–31.
40. Doi Y. Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates // *Macromolecular Symposia*. 1995. № 1 (98). C. 585–599.
41. Doi Y., Abe H. Structural effects on biodegradation of aliphatic

polyesters // *Macromolecular Symposia*. 1997. № 1 (118). C. 725–731.

42. Doi Y., Kitamura S., Abe H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // *Macromolecules*. 1995. № 14 (28). C. 4822–4828.

43. Doyle C., Tanner E.T., Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite // *Biomaterials*. 1991. № 9 (12). C. 841–847.

44. Dunkelman N.S., Zimmer M.P., Lebaron R.G., Pavelec R., Kwan M., Purchio A.F. Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system. // *Biotechnology and bioengineering*. 1995. № 4 (46). C. 299–305.

45. Efremov Y.M., Pukhlyakova E.A., Bagrov D. V., Shaitan K. V. Atomic force microscopy of living and fixed *Xenopus laevis* embryos // *Micron*. 2011. № 8 (42). C. 840–852.

46. Farrance O.E., Jones R.A.L., Hobbs J.K. The observation of rapid surface growth during the crystallization of polyhydroxybutyrate // *Polymer*. 2009. № 15 (50). C. 3730–3738.

47. Freier T., Kunze C., Nischan C., Kramer S., Sternberg K., Sa?? M., Hopt U.T., Schmitz K.P. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate) // *Biomaterials*. 2002. № 13 (23). C. 2649–2657.

48. Gomes M.E., Reis R.L. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 1 Available systems and their properties // *International Materials Reviews*. 2004. № 5 (49). C. 261–273.

49. Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion // *Biomaterials*. 1996. № 2 (17). C. 103–114.

50. Griffin G.J.L. Chemistry and technology of biodegradable polymers / G.J.L. Griffin, Blackie Academic & Professional, 1994. 154 c.

51. Gu J.D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic

polymeric materials: Recent research advances // International Biodeterioration and Biodegradation. 2003. T. 52. № 2. 69–91 c.

52. Gu J.D., Ford T.E., Mitton D.B., Mitchell R. Microbiological Degradation of Polymeric Materials 2011. 421–438 c.

53. Habibovic P., Yuan H., Valk C.M. Van Der, Meijer G., Blitterswijk C.A. Van, Groot K. De 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials // Biomaterials. 2005. № 17 (26). C. 3565–3575.

54. Han J., Wu L.P., Hou J., Zhao D., Xiang H. Biosynthesis, characterization, and hemostasis potential of tailor-made poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Haloferax mediterranei* // Biomacromolecules. 2015. № 2 (16). C. 578–588.

55. Han J., Wu L.P., Liu X. Bin, Hou J., Zhao L.L., Chen J.Y., Zhao D.H., Xiang H. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers // Biomaterials. 2017. (139). C. 172–186.

56. Hayes W., Bouxsein M. Biomechanics of cortical and trabecular bone: implications for assessment of fracture risk // Basic orthopaedic biomechanics. 1991.

57. Hazari A., Johansson-Rudén G., Junemo-Bostrom K., Ljungberg C., Terenghi G., Green C., Wiberg M. A new resorbable wrap-around implant as an alternative nerve repair technique // Journal of Hand Surgery. 1999. № 3 (24 B). C. 291–295.

58. Hazari A., Wiberg M., Johansson-Rudén G., Green C., Terenghi G. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. // British journal of plastic surgery. 1999. № 8 (52). C. 653–657.

59. Heidary S., Gordon B. Hydrolyzable poly(ethylene terephthalate) // Journal of Environmental Polymer Degradation. 1994. № 1 (2). C. 19–26.

60. Hillsley M. V, Frangos J.A. Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. // Biotechnology and bioengineering. 1994. № 7 (43). C. 573–81.

61. Hiltunen K., Seppälä J. V., Itävaara M., Härkönen M. The biodegradation of lactic acid-based poly(ester-urethanes) // *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1997. № 3 (5). C. 167–173.
62. Hocking P.J., Marchessault R.H., Timmins M.R., Lenz R.W., Fuller R.C. Enzymatic Degradation of Single Crystals of Bacterial and Synthetic Poly(β -hydroxybutyrate) // *Macromolecules*. 1996. № 7 (29). C. 2472–2478.
63. Holland S.J., Jolly A.M., Yasin M., Tighe B.J. Polymers for biodegradable medical devices. II. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: hydrolytic degradation studies // *Biomaterials*. 1987. № 4 (8). C. 289–295.
64. Holmes P.A. *Biologically Produced (R)-3-Hydroxy- Alkanoate Polymers and Copolymers* Dordrecht: Springer Netherlands, 1988. 1–65 c.
65. Hoshino A., Isono Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. // *Biodegradation*. 2002. № 2 (13). C. 141–147.
66. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. // *Biomaterials*. 2000. № 24 (21). C. 2529–2543.
67. Iwata T., Doi Y., Tanaka T., Akehata T., Shiromo M., Teramachi S. Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1 // *Macromolecules*. 1997. № 97 (30). C. 5290–5296.
68. Iwata T., Doi Y., Nakayama S.I., Sasatsuki H., Teramachi S. Structure and enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) copolymer single crystals with an extracellular PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 1999. 169–176 c.
69. Iwata T., Shiromo M., Doi Y. Surface structures of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and its copolymer single crystals before and after enzymatic degradation with an extracellular PHB depolymerase // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2002. № 10–11 (203). C. 1309–1316.

70. Jaeger K. Bacterial lipases // FEMS Microbiology Reviews. 1994. T. 15. № 1. 29–63 c.

71. Jaeger K.E., Steinbuchel A., Jendrossek D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly(3-hydroxyalkanoates) // Applied and Environmental Microbiology. 1995. № 8 (61). C. 3113–3118.

72. James K., Kohn J. New biomaterials for tissue engineering // MRS Bulletin. 1996. № 11 (21). C. 22.

73. Jayasekara R., Harding I., Bowater I., Christie G.B.Y., Lonergan G.T. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films // Polymer Testing. 2004. № 1 (23). C. 17–27.

74. Jiang Y., Zhou J.-J., Li L., Xu J., Guo B.-H., Zhang Z.-M., Wu Q., Chen G.-Q., Weng L.-T., Cheung Z.-L., Chan C.-M. Surface Properties of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3- hydroxyvalerate) Banded Spherulites Studied by Atomic Force Microscopy and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry // Langmuir. 2003. № 18 (19). C. 7417–7422.

75. Jin H.J., Lee B.Y., Kim M.N., Yoon J.S. Properties and biodegradation of poly(ethylene adipate) and poly(butylene succinate) containing styrene glycol units // European Polymer Journal. 2000. № 12 (36). C. 2693–2698.

76. Kanesawa Y., Tanahashi N., Doi Y., Saito T. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxyalkanoates) // Polymer Degradation and Stability. 1994. № 2 (45). C. 179–185.

77. Kanmani P., Kumaresan K., Aravind J., Karthikeyan S., Balan R. Enzymatic degradation of polyhydroxyalkanoate using lipase from *Bacillus subtilis* // International Journal of Environmental Science and Technology. 2016. № 6 (13). C. 1541–1552.

78. Kasuya K., Inoue Y., Doi Y. Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films. // International journal of biological macromolecules. 1996. № 1 (19). C. 35–40.

79. Khandal D., Pollet E., Averous L. Polyhydroxyalkanoate-based

Multiphase Materials / D. Khandal, E. Pollet, L. Averous, 2015. 248 c.

80. Kim D.J., Kim W.S., Lee D.H., Min K.E., Park L.S., Kang I.K., Jeon I.R., Seo K.H. Modification of poly(butylene succinate) with peroxide: Crosslinking, physical and thermal properties, and biodegradation // Journal of Applied Polymer Science. 2001. № 5 (81). C. 1115–1124.

81. Klinov D. V., Dubrovin E. V, Yaminsky I. V Scanning Probe Microscopy of DNA on Mica and Graphite // Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques. 2003. (696). C. 452–456.

82. Koning G.J.M. de, Scheeren A.H.C., Lemstra P.J., Peeters M., Reynaers H. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 3. Toughening via texture changes // Polymer. 1994. № 21 (35). C. 4598–4605.

83. Koning G.J.M. de, Lemstra P.J. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation // Polymer. 1993. № 19 (34). C. 4089–4094.

84. Koyama N., Doi Y. Morphology and biodegradability of a binary blend of poly((R)-3-hydroxybutyric acid) and poly((R,S)-lactic acid). // Canadian journal of microbiology. 1995. № 13 (41 Suppl 1). C. 316–22.

85. Kramp B., Bernd H.E., Schumacher W.A., Blynnow M., Schmidt W., Kunze C., Behrend D., Schmitz K.P. Poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) films and plates in defect covering of the osseus skull in a rabbit model. // Laryngo-rhino- otologie. 2002. № 5 (81). C. 351–6.

86. Kravchuk K.S., Torskaya E. V., Useinov A.S., Frolov N.N. Experimental and theoretical study of what causes spallation for multicomponent oxide-based coatings under friction loading // Mechanics of Solids. 2015. № 1 (50). C. 52–61.

87. Kumagai Y., Doi Y. Enzymatic degradation and morphologies of binary blends of microbial poly(3-hydroxy butyrate) with poly(ϵ -caprolactone), poly(1,4-butylene adipate and poly(vinyl acetate) // Polymer Degradation and Stability. 1992. № 3 (36). C. 241–248.

88. Kunze C., Bernd H.E., Androsch R., Nischan C., Freier T., Kramer S.,

Kramp B., Schmitz K.P. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material // *Biomaterials*. 2006. № 2 (27). C. 192–201.

89. KUSAKA S., IWATA T., DOI†* Y. Microbial Synthesis and Physical Properties of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] // *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 1998. № 2 (35). C. 319–335.

90. Li S., Li Z., Fang X., Chen G.Q., Huang Y., Xu K. Synthesis and characterization of polyparaphenylene from cis-dihydrocatechol // *Journal of Applied Polymer Science*. 2008. № 4 (110). C. 2085–2093.

91. Li Y.D., Zheng J.B., Wang X.L., Yang K.K., Wang Y.Z. Structure and properties of soy protein/poly(butylene succinate) blends with improved compatibility // *Biomacromolecules*. 2008. № 11 (9). C. 3157–3164.

92. Lin A.S.P., Barrows T.H., Cartmell S.H., Guldberg R.E. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds // *Biomaterials*. 2003. № 3 (24). C. 481–489.

93. Lin C.-C., Anseth K.S. *The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials Elsevier*, 2013. 716–728 c.

94. Liu Y.X., Chen E.Q. Polymer crystallization of ultrathin films on solid substrates // *Coordination Chemistry Reviews*. 2010. T. 254. № 9–10. 1011–1037 c.

95. Ljungberg N., Wesslén B. The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid) // *Journal of Applied Polymer Science*. 2002. № 5 (86). C. 1227–1234.

96. Löbler M., Saß M., Kunze C., Schmitz K.P., Hopt U.T. Biomaterial patches sutured onto the rat stomach induce a set of genes encoding pancreatic enzymes // *Biomaterials*. 2002. № 2 (23). C. 577–583.

97. Lorenzo M.L. Di, Raimo M., Cascone E., Martuscelli E. Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Copolymers and Blends: Influence of a Second Component on Crystallization and Thermal Behavior // *Journal of Macromolecular Science, Part B*. 2001. № 5 (40). C. 639–667.

98. Luyt A.S., Geethamma V.G. Effect of oxidized paraffin wax on the thermal and mechanical properties of linear low-density polyethylene-layered silicate nanocomposites // *Polymer Testing*. 2007. № 4 (26). C. 461–470.

99. Luzier W.D. Materials derived from biomass/biodegradable materials. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. № 3 (89). C. 839–842.

100. Lyu S., Untereker D. Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices // *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. № 9 (10). C. 4033–4065.

101. Ma P., Langer R. Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage // *Journal of biomedical materials research*. 1999.

102. Manavitehrani I., Fathi A., Badr H., Daly S., Shirazi A.N., Dehghani F. Biomedical applications of biodegradable polyesters // *Polymers*. 2016. T. 8. № 1. 20 c.

103. Marchessault R.H., Okamura K., Su C.J. Physical Properties of Poly (β -hydroxy butyrate). II. Conformational Aspects in Solution // *Macromolecules*. 1970. № 6 (3). C. 735–740.

104. Martinez-Salazar J., Sanchez-Cuesta M., Barham P.J., Keller A. Thermal expansion and spherulite cracking in 3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate copolymers // *Journal of Materials Science Letters*. 1989. № 4 (8). C. 490–492.

105. Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost // *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1994. № 3 (2). C. 177–183.

106. Merrick J.M., Doudoroff M. Enzymatic synthesis of Poly- β -hydroxybutyric acid in bacteria // *Nature*. 1961. (189). C. 890–892.

107. Middleton J.C., Tipton A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices // *Biomaterials*. 2000. T. 21. № 23. 2335–2346 c.

108. Miller N.D., Williams D.F. On the biodegradation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly- β -hydroxybutyrate-

hydroxyvalerate copolymers // *Biomaterials*. 1987. № 2 (8). C. 129–137.

109. Mitomo H., Barham P.J., Morimoto H. Crystallization and morphology of poly(γ -hydroxybutyrate) and its copolymer // *Polymer Journal*. 1987. № 11 (19). C. 1241–1253.

110. Muhamad I.I., Joon L.K., Noor M.A.M. Comparing the Degradation of Poly- β - (hydroxybutyrate), Poly- β –(hydroxybutyrate-co-valerate)(PHBV) and PHBV / Cellulose Triacetate Blend // *Malaysian Polymer Journal*. 2006. № 1 (1). C. 39–46.

111. Murase T., Iwata T., Doi Y. Enzymatic degradation mechanism of a solution-grown poly [(R) -3-hydroxybutyrate] single crystal with an extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase purified from *Alcaligenes faecalis* T1 // *Macromolecules*. 2001. № 42 (42). C. 19–22.

112. Myshkina V.L., Nikolaeva D. a, Makhina T.K., Bonartsev a P., Bonartseva G. a Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. № 5 (44). C. 482–486.

113. Myshkina V.L., Ivanov E.A., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., Bonartsev A.P., Filatova E. V., Ruzhitsky A.O., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Azotobacter chroococcum* strain 7B // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010. № 3 (46). C. 289–296.

114. Nakayama A., Kawasaki N., Arvanitoyannis I., Aiba S., Yamamoto N. Synthesis and biodegradation of poly (γ -butyrolactone-co-L-lactide) // *Journal of Environmental polymer degradation*. 1996. № 3 (4). C. 205–211.

115. Nobes G. a R., Marchessault R.H., Chanzy H., Briese B.H., Jendrossek D. Splintering of Poly(3-hydroxybutyrate) Single Crystals by PHB-Depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei* // *Macromolecules*. 1996. № 96 (29). C. 8330–8333.

116. Nobes G.A.R., Marchessault R.H., Briese B.H., Jendrossek D. Microscopic visualization of the enzymatic degradation of poly(3HB-co-3HV) and

poly(3HV) single crystals by PHA depolymerases from *Pseudomonas leimoignei* // Journal of Environmental Polymer Degradation. 1998. № 2 (6). C. 99–107.

117. Nublatsky C., Braud C., Garreau H., Vert M. Ammonium bicarbonate as porogen to make tetracycline-loaded porous bioresorbable membranes for dental guided tissue regeneration: Failure due to tetracycline instability // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2006. № 12 (17). C. 1333–1346.

118. Numata K., Hirota T., Kikkawa Y., Tsuge T., Iwata T., Abe H., Doi Y. Enzymatic Degradation Processes of Lamellar Crystals in Thin Films for Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and Its Copolymers Revealed by Real-Time Atomic Force Microscopy // Biomacromolecules. 2004. № 6 (5). C. 2186–2194.

119. Numata K., Kikkawa Y., Tsuge T., Iwata T., Doi Y., Abe H. Enzymatic degradation processes of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-(R)-3-hydroxyvaleric acid] single crystals revealed by atomic force microscopy: Effects of molecular weight and second-monomer composition on erosion // Biomacromolecules. 2005. № 4 (6). C. 2008–2016.

120. Numata K., Yamashita K., Fujita M., Tsuge T., Kasuya K.I., Iwata T., Doi Y., Abe H. Adsorption and hydrolysis reactions of poly(hydroxybutyric acid) depolymerases secreted from *Ralstonia pickettii* T1 and *Penicillium funiculosum* onto poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] // Biomacromolecules. 2007. № 7 (8). C. 2276–2281.

121. Numata K., Abe H., Iwata T. Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials // Materials. 2009. № 3 (2). C. 1104–1126.

122. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // Materials Today. 2011. № 3 (14). C. 88–95.

123. Orts W.J., Marchessault R.H., Bluhm T.L. Thermodynamics of the Melting Point Depression in Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) Copolymers // Macromolecules. 1991. № 24 (24). C. 6435–6438.

124. Pan J. 4 - Modelling degradation of semi-crystalline biodegradable polyesters Elsevier, 2015. 53–69 c.

125. Parra D.F., Fusaro J., Gaboardi F., Rosa D.S. Influence of poly

(ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical-chemical and biodegradation properties of poly (3-hydroxybutyrate) // *Polymer Degradation and Stability*. 2006. № 9 (91). C. 1954–1959.

126. Pisitsak P., Magaraphan R. Rheological, morphological, thermal, and mechanical properties of blends of vectra A950 and poly(trimethylene terephthalate): A study on a high-viscosity-ratio system // *Polymer Testing*. 2009. № 2 (28). C. 116–127.

127. Pitt C.G., Zhong-wei G. Modification of the rates of chain cleavage of poly(ϵ -caprolactone) and related polyesters in the solid state // *Journal of Controlled Release*. 1987. № 4 (4). C. 283–292.

128. Pranamuda H., Tokiwa Y. Degradation of poly(L-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis* // *Biotechnology Letters*. 1999. № 10 (21). C. 901–905.

129. Ramanathan M., Darling S.B. Mesoscale morphologies in polymer thin films // *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2011. № 6 (36). C. 793–812.

130. Rodrigues J.A.F.R., Parra D.F., Lug A.B., atilde Crystallization on films of PHB/PEG blends: Evaluation by DSC // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005. № 2 (79). C. 379–381.

131. Rodríguez-Contreras A., Calafell-Monfort M., Marqués-Calvo M.S. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases // *Polymer Degradation and Stability*. 2012. № 4 (97). C. 597–604.

132. Saito T., Tomita K., Juni K., Ooba K. In vivo and in vitro degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in pat // *Biomaterials*. 1991. № 3 (12). C. 309–312.

133. Samami H. Solid mechanics of degrading bioresorbable Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Leicester by Department of Engineering Solid Mechanics of Degrading Bioresorbable Polymers / H. Samami, 2016.

134. Scandola M., Focarete M.L., Adamus G., Sikorska W., Baranowska I., Świerczek S., Gnatowski M., Kowalczyk M., Jedliński Z. Polymer Blends of

Natural Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) and a Synthetic Atactic Poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and Biodegradation Studies // *Macromolecules*. 1997. № 9 (30). C. 2568–2574.

135. Scott G. *Polymers in Modern life // Polymers and the Environment*. 1999. C. 132.

136. Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review // *Biotechnology Advances*. 2008. № 3 (26). C. 246–265.

137. Shi F., Ashby R.D., Gross R.A. Use of Poly(ethylene glycol)s To Regulate Poly(3-hydroxybutyrate) Molecular Weight during *Alcaligenes eutrophus* Cultivations // *Macromolecules*. 1996. № 24 (29). C. 7753–7758.

138. Shibata M., Inoue Y., Miyoshi M. Mechanical properties, morphology, and crystallization behavior of blends of poly(l-lactide) with poly(butylene succinate-co-l-lactate) and poly(butylene succinate) // *Polymer*. 2006. № 10 (47). C. 3557–3564.

139. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Efremov S.N., Puzyr' A.P., Mogil'Naya O.A. Tissue response to biodegradable suture threads made of polyhydroxyalkanoates // *Biomedical Engineering*. 2002. № 4 (36). C. 210–217.

140. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Puzyr A.P. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2005. № 5 (16). C. 643–657.

141. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters // *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2000. № 10 (25). C. 1503–1555.

142. Sun J., Dai Z., Zhao Y., Chen G.Q. In vitro effect of oligo-hydroxyalkanoates on the growth of mouse fibroblast cell line L929 // *Biomaterials*. 2007. № 27 (28). C. 3896–3903.

143. Suyatma N.E., Copinet A., Tighzert L., Coma V. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends // *Journal of Polymers and the Environment*. 2004. № 1 (12). C. 1–6.

144. Thompson D.E., Agrawal C.M. The Effects of Dynamic Compressive Loading on Biodegradable Implants of 50-50% Polylactic Acid-Polyglycolic Acid // *tissue engineering*. 1996. № 1 (2). C. 61–74.
145. Tokiwa, Y, Suzuki T., Tokiwa Y., Suzuki T. Hydrolysis of polyesters by lipase // *Nature*. 1977. № 5632 (270). C. 76–78.
146. Tokiwa Y., Calabia B.P. Degradation of microbial polyesters // *Biotechnology Letters*. 2004. № 15 (26). C. 1181–1189.
147. Tokiwa Y., Suzuki T., Takeda K. Hydrolysis of Polyesters By *Rhizopus Arrhizus* Lipase // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1986. T. 50. № 5. 1324–1325 c.
148. Tsuge T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002. T. 94. № 6. 579–584 c.
149. Velmathi S., Nagahata R., Sugiyama J.I., Takeuchi K. A rapid eco-friendly synthesis of poly(butylene succinate) by a direct polyesterification under microwave irradiation // *Macromolecular Rapid Communications*. 2005. № 14 (26). C. 1163–1167.
150. Verlinden R.A.J., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Radecka I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates // *Journal of Applied Microbiology*. 2007. № 6 (102). C. 1437–1449.
151. Wang H.H., Li X.T., Chen G.Q. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a *fadBA* knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442 // *Process Biochemistry*. 2009. № 1 (44). C. 106–111.
152. Wang H.M., Chou Y.T., Wen Z.H., Wang Z.R., Chen C.H., Ho M.L. Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration // *PLoS ONE*. 2013. № 6 (8). C. e56330.
153. Wang H.T., Palmer H., Linhardt R.J., Flanagan D.R., Schmitt E. Degradation of poly(ester) microspheres // *Biomaterials*. 1990. № 9 (11). C. 679–685.

154. Wang Y.-W., Yang F., Wu Q., Cheng Y., Yu P.H.F., Chen J., Chen G.-Q. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast. // *Biomaterials*. 2005. № 7 (26). C. 755–61.

155. Wei G., Wang L., Chen G., Gu L. Synthesis and characterization of poly(ethylene-co-trimethylene terephthalate)s // *Journal of Applied Polymer Science*. 2006. № 2 (100). C. 1511–1521.

156. Weir N.A., Buchanan F.J., Orr J.F., Dickson G.R. Degradation of poly-L-lactide. Part 1: *in vitro* and *in vivo* physiological temperature degradation // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2004. № 5 (218). C. 307–319.

157. Xu J., Guo B.H., Zhang Z.M., Zhou J.J., Jiang Y., Yan S., Li L., Wu Q., Chen G.Q., Schultz J.M. Direct AFM observation of crystal twisting and organization in banded spherulites of chiral poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // *Macromolecules*. 2004. № 11 (37). C. 4118–4123.

158. Yamashita K., Funato T., Suzuki Y., Teramachi S., Doi Y. Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Film Studied by a Quartz Crystal Microbalance // *Macromolecular Bioscience*. 2003. № 11 (3). C. 694–702.

159. Yang X., Zhao K., Chen G.-Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. // *Biomaterials*. 2002. № 5 (23). C. 1391–7.

160. Yeh J.-T., Chao C.-C., Chen C.-H. Effects of processing conditions on the barrier properties of polyethylene (PE)/modified polyamide (MPA) and modified polyethylene (MPE)/polyamide (PA) blends // *Journal of Applied Polymer Science*. 2000. № 14 (76). C. 1997–2008.

161. Zenkiewicz M., Richert J., Rytlewski P., Moraczewski K., Stepczyńska M., Karasiewicz T. Characterisation of multi-extruded poly(lactic acid) // *Polymer Testing*. 2009. № 4 (28). C. 412–418.

162. Zhang J.F., Sun X. Mechanical properties of poly(lactic acid)/starch composites compatibilized by maleic anhydride // *Biomacromolecules*. 2004. № 4

(5). C. 1446–1451.

163. Zhao C., Qin H., Gong F., Feng M., Zhang S., Yang M. Mechanical, thermal and flammability properties of polyethylene/clay nanocomposites // *Polymer Degradation and Stability*. 2005. № 1 (87). C. 183–189.

164. Zhao K., Yang X., Chen G.Q., Chen J.C. Effect of lipase treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2002. № 9 (13). C. 849–854.

165. Zheng Z., Bei F.-F., Tian H.-L., Chen G.-Q. Effects of crystallization of polyhydroxyalkanoate blend on surface physicochemical properties and interactions with rabbit articular cartilage chondrocytes // *Biomaterials*. 2005. № 17 (26). C. 3537–3548.

166. 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. (258). C. 354–357.

167. 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. № 1 (648). C. 236–243.

168. 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. № 1 (375). C. 1600189.

169. 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. № 2 (63). С. 249–257.

170. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров / С.Р. Рафиков, В.П. Будтов, Ю.Б. Монаков, Наука-е изд., Москва:, 1978. 328 с.