

УДК 615.462, 678

Obtaining and Investigation of Polymer Compositions Based on Poly-3-Hydroxybutyrate

**Anatoly N. Boyandin^{a,b,*}, Elena D. Nikolaeva^a,
Alexander V. Shabanov^c and Alexander D. Vasiliev^c**

^a*Institute of Biophysics SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

^b*Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

^c*L.V. Kirensky Institute of Physics SB RAS
50/38 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

Received 07.08.2014, received in revised form 17.08.2014, accepted 24.08.2014

The morphology, surface properties and biocompatibility of mixtures of poly-3-hydroxybutyrate with poly- ϵ -caprolactone, poly-DL-lactide, polyethylene glycol and starch were studied. Differences in the film surface microstructure were revealed using electron microscopy: composites of P(3HB) with PEG and PCL had a more coarse-pored surface compared to the pure P(3HB). Addition of PEG led to a significant increase in surface hydrophilicity. In the culture of mouse NIH 3T3 fibroblasts the following effects were observed: the absence of cytotoxic effect, the presence of cell adhesion and proliferation. Thus, the biocompatibility of the studied composites and their suitability for production of polymer products for cellular technologies was shown.

Keywords: biopolymers, polyhydroxybutyrate, polycaprolactone, polylactide, polyethylene oxide, starch, biocompatibility.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: araneus@mail.ru

Получение и исследование полимерных смесей на основе поли-3-гидроксибутирата

**А.Н. Бояндин^{а,б}, Е.Д. Николаева^а,
А.В. Шабанов^в, А.Д. Васильев^в**

^аИнститут биофизики СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок 50/50

^бСибирский федеральный университет
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

^вИнститут физики им. Л.В. Киренского СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/38

Изучены морфология, поверхностные свойства и биосовместимость пленок, полученных из смесей поли-3-гидроксибутирата с поли-ε-капролактоном, поли-DL-лактоидом, полиэтиленгликолем и крахмалом. С использованием электронной микроскопии выявлены различия микроструктуры поверхности пленок: у композитов П(ЗГБ) с ПЭГ и ПКЛ формируется более крупнопористая поверхность по сравнению с чистым П(ЗГБ). Добавление ПЭГ приводило к существенному возрастанию гидрофильности поверхности. В культуре фибробластов мыши NIH 3T3 отмечено отсутствие цитотоксического действия, наличие адгезии и пролиферации клеток. Таким образом, показана биосовместимость исследованных композитов и их пригодность для получения полимерных изделий для клеточных технологий.

Ключевые слова: биополимеры, полигидроксибутират, поликапролактон, полилактоид, полиэтиленгликоль, крахмал, биосовместимость.

Введение

Использование биосовместимых полимеров имеет большое значение во многих реконструктивных направлениях современной медицины. Особое место среди этой группы полимеров занимают полигидроксиалканаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот микробиологического происхождения, обладающие очень высокой биосовместимостью. ПГА могут включать различный набор мономеров, что обуславливает широкий спектр их физико-химических свойств – от высококристаллических термопластов до резиноподобных эластомеров (Sudesh et al., 2000; Steinbüchel, 2003). Однако наиболее доступный представитель ПГА, поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)), обладает высокой

хрупкостью и недостаточной эластичностью, что ограничивает его применение. Получение же других типов ПГА требует достаточно сложных решений, включая поиск новых продуцентов, подбор питательных сред и условий культивирования либо конструирование генетически модифицированных штаммов (Madison, Huisman, 1999; Volova, 2004).

Одним из подходов к улучшению механических свойств поли-3-гидроксибутирата, увеличению его эластичности и механической прочности является получение композитов П(ЗГБ) с другими материалами как синтетического, так и природного происхождения. Общим требованием ко второму компоненту при этом выступает его биосовместимость, сопоставимая с биосовместимостью ПГА. К

таким компонентам относится, в частности, ряд известных сложных полиэфиров, хорошо зарекомендовавших себя в качестве биосовместимых биоразрушаемых материалов (полилактид, полигликолид, поли-ε-капролактон), некоторые простые полиэфиры (полиэтиленгликоль), полисахариды (крахмал).

Возможны три варианта формирования смешанной системы (Avella et al., 2000; Алешин и др., 2004). В первом варианте формируется гомогенная смесь, представляющая собой однородную структуру, как правило, с усредненными характеристиками по отношению к исходным чистым компонентам. При невозможности смешения компонентов по термодинамическим причинам может формироваться двухфазная смесь, отличающаяся качественным изменением структуры материала при изменении концентрации компонентов. В случае эффективной адгезии компонентов такая смесь может обладать хорошими механическими свойствами. Наконец, композитная система может состоять из матрицы, включающей в себя армирующие элементы. Эффективность армирования в таких системах также контролируется степенью адгезии между компонентами.

В качестве основных методов получения полимерных смесей и композитов можно выделить: 1) экструдирование механической смеси полимеров; 2) получение смешанного раствора компонентов в общем для них растворителе и формирование пленочных изделий методом испарения из раствора; 3) приготовление суспензии нерастворимого компонента (который в дальнейшем становится армирующим элементом) в растворе полимера (будущей матрицы) и приготовление готовой формы также методом испарения из раствора. Несмотря на техническую простоту экструзионных методов, существенной проблемой в случае ПГА является их термическая деградация вблизи

температуры плавления, что ограничивает их переработку методом экструзии (Hablott et al., 2008) и сохраняет актуальность использования растворных технологий.

Для получения полимерных смесей применяются различные материалы. Одним из наиболее изученных полиэфиров считается полимер молочной кислоты – полилактид. В зависимости от стереоконфигурации входящих в его состав мономеров существуют три формы данного полимера – высококристаллические поли-L-лактид (L-ПЛ) и поли-D-лактид (D-ПЛ), а также аморфный поли-DL-лактид (DL-ПЛ) (Narladkar et al., 2008). Большинство работ, посвященных смесям П(ЗГБ) и полилактида, рассматривает полимер L-молочной кислоты (Furukawa et al., 2005; Furukawa et al., 2007; Zembouai et al., 2013), обычный продукт молочнокислого брожения. Работы, рассматривающие в качестве компонента смеси DL-ПЛ, значительно более малочисленны (Zhang et al., 1996). В общем случае оба исследуемых вида полилактида не образуют гомогенные смеси с природным П(ЗГБ). Смешение отмечалось только с синтетическим атактическим П(ЗГБ) (Focarete et al., 2002), а также при низкой молекулярной массе ПЛ (Zhang et al., 2006). Отмечалась и несмешиваемость L-ПЛ с сополимером П(ЗГБ/ЗГВ) (20 % 3-гидроксивалерата) для образцов, полученных как испарением из раствора (Iannace et al., 1994), так и методом экструзии (Zembouai et al., 2014).

Другим важным биосовместимым полиэфиром является поли-ε-капролактон (ПКЛ). Исследование закономерностей смешения ПКЛ и П(ЗГБ) методом испарения из хлороформного раствора при разном соотношении компонентов (Lovera et al., 2007) показало, что смеси с высокомолекулярным ПКЛ (M_v 120 кДа) оставались гетерогенными во всем исследуемом диапазоне. Несмешиваемость П(ЗГБ) (M_v 349 кДа) и ПКЛ (120 кДа) была продемон-

стрирована и при переработке смеси данных полимеров методом экструзии (Hinuber et al., 2011). Было отмечено снижение температуры кристаллизации в смесях как для П(ЗГБ), так и для ПКЛ. При этом при соотношении П(ЗГБ)/ПКЛ 70/30 и 30/70 отмечалась дробная кристаллизация ПКЛ, в то время как при промежуточных соотношениях 60/40 и 50/50 такой эффект исчезал, что, предположительно объясняется взаимно-непрерывной структурой обоих полимеров. Важно, что Гасснер и Овен (Gassner, Owen, 1994), несмотря на аналогичное утверждение о несмешиваемости П(ЗГБ) и ПКЛ, отмечали падение температуры плавления П(ЗГБ), что свидетельствовало о некоторой взаимной растворимости компонентов. Отсутствие смешиваемости было установлено и при использовании вместо П(ЗГБ) его сополимера П(ЗГБ/ЗГВ), содержащего 7 % 3-гидроксивалерата (Chun, Kim, 2000), на примере пленок, полученных методом испарения из хлороформного раствора. При этом степень кристалличности П(ЗГБ/ЗГВ) почти не изменялась (уменьшилась с 51 до 46 %) при увеличении концентрации ПКЛ с 0 до 50 %.

В отличие от ПЛ и ПКЛ полиэтиленгликоль (ПЭГ), по крайней мере с низкой молекулярной массой, в смесях с П(ЗГБ) показывает одну температуру стеклования во всем диапазоне концентраций, что демонстрирует полную смешиваемость двух компонентов в аморфной фазе (Avella et al., 2000). В присутствии ПЭГ температура плавления П(ЗГБ) значительно снижается – например, при 20%-ном содержании ПЭГ она составляет около 163 °С. Это дает возможность обрабатывать смеси при пониженной температуре по сравнению с исходным П(ЗГБ), избегая деградации П(ЗГБ).

Помимо природных и синтетических полиэфигов к биосовместимым полимерам относится и ряд природных материалов, пре-

жде всего полисахариды. Одним из важных представителей этой группы является крахмал. Введение крахмала в матрицу П(ЗГБ) может стать одним из способов преодоления термической нестабильности и жесткости последнего (Yu et al., 2006). В составе композитов полиэфигов с крахмалом частицы последнего играют роль армирующих элементов. В случае полученных горячим формованием смесей П(ЗГБ)-крахмал (Thire et al., 2006) было установлено, что слишком высокое содержание крахмала приводит к ухудшению механических свойств, что может объясняться потерей интерфациальной адгезии между крахмалом и П(ЗГБ). Наилучшие механические свойства наблюдаются при содержании крахмала до 30 %. Кроме того, было обнаружено, что добавление крахмала приводит к уменьшению степени кристалличности. При сравнении крахмала с преобладанием амилопектина и крахмала, содержащего 70 % амилозы, установлено, что последний гораздо лучше стабилизирует П(ЗГБ) (Zhang, Thomas, 2010). Возможно, в силу неразветвленности цепей амилоза способна к образованию более прочных водородных связей с П(ЗГБ), чем амилопектин. Это предположение подтверждается данными инфракрасной спектроскопии.

Таким образом, к настоящему времени накоплен большой объем данных, касающийся закономерностей формирования смесей полимеров и их свойств, прежде всего термических. Но информации о биосовместимости смесей ПГА с другими полимерами крайне мало. Целью настоящей работы было конструирование композитов поли-3-гидроксипропиридата с различными биосовместимыми материалами – поли-ε-капролактоном (ПКЛ), поли-DL-лактидом (ПЛ), полиэтиленгликолем (ПЭГ), крахмалом – с различным содержанием ПЗГБ и второго компонента и изучение влияния

типа композита и соотношения в нем компонентов на структуру, физико-химические и биологические свойства.

Материалы и методы

Материалы

Поли-3-гидроксибутират (средневесовая молекулярная масса $M_v=1015$ кДа, полидисперсность ПД=4.14) был получен микробным биосинтезом с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов). Бактерии культивировали в строго стерильных условиях в периодическом режиме в культиваторе BioFlo («New Brunswick», США) объемом 7,5 л на минеральной среде с глюкозой.

Поли-ε-капролактон (ПКЛ; $M_v=169$ кДа, ПД=1.86), поли-DL-лактид (ПЛ; $M_v=108$ кДа, ПД=3.91) и полиэтиленгликоль (ПЭГ; $M_v=40$ кДа, ПД=2.61) произведены компанией Sigma-Aldrich (США). Картофельный крахмал произведен ООО «Новосибирский пищевой комбинат» (Новосибирск, Россия).

Получение пленочных образцов

Для получения смесей ПГА с другими полимерами, поли-3-гидроксибутират, поли-ε-капролактон (ПКЛ), поли-DL-лактид (ПЛ), полиэтиленгликоль (ПЭГ) раздельно растворяли в хлороформе до получения 2 %-го раствора (масса/объем). Полученные растворы смешивали в необходимых соотношениях для получения смесей (масса/масса) ПГА:полимер = 9:1 (10 % второго полимера), 3:1 (25 %), 1:1 (50 %), 1:3 (75 %) и 1:9 (90 %), и выдерживали в течение трех часов, периодически перемешивая.

Полученные смеси двух полимеров, а также растворы чистых полимеров (П(ЗГБ), ПКЛ, ПЛ, ПЭГ) использовали для получения пленок методом испарения растворителя, по-

мещая по 20 мл разогретого до 35 °С раствора на предварительно обезжиренные поверхности чашки Петри. Пленки высушивали при комнатной температуре в течение 3-5 сут в беспылевом ламинарном шкафу.

Композитные пленки поли-3-гидроксибутирата с крахмалом (10, 25, 50, 75 и 90 % по массе) получали смешением крахмала с 2%-ным раствором полимера в соотношениях 40, 100, 200, 300 и 360 мг крахмала на 18, 15, 10, 5 и 2 мл раствора на каждую чашку соответственно; в последних двух случаях суспензии доводили чистым хлороформом до 10 мл. Крахмал перед суспендированием высушивали в течение 12 ч при 90 °С и растирали в лабораторной ступке до гомогенного состояния. Полученные суспензии выливали на обезжиренные чашки Петри и высушивали в течение 2 сут в беспылевом боксе.

Анализ смесей

Степень кристалличности смесей (СК, %) определяли на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE («Bruker», Германия).

Микроструктуру поверхности пленок анализировали при помощи растрового электронного микроскопа ТМ 3000 (Hitachi, Япония). Предварительно образцы покрывали золотом (10 мА, 40 секунд) с помощью установки для напыления Emitech K575X.

Для определения контактных (краевых) углов смачивания образцы пленок помещали на предметное стекло и с помощью автоматической пипетки наносили на поверхность пленки капли дистиллированной воды объемом 100 мкл. С помощью цифровой камеры получали компьютерное изображение капли и определяли величину угла (находили среднее значение величины угла из измерения не менее чем 10 капель).

Характеристики поверхности матриц (свободную поверхностную энергию

(γ_s , эрг/см²), свободную энергию межфазовой поверхности (γ_{SL} , эрг/см²) и величину сил сцепления (W_{SL} , (эрг/см²)) рассчитывали на базе измерения контактного угла смачивания поверхности водой (θ , град), используя известные уравнения (Де Жен, 1987):

$$\gamma_s = \gamma_L(1 + \cos \theta)/2,$$

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - W_{SL},$$

$$W_{SL} \approx 2\sqrt{\gamma_s \times \gamma_L},$$

где γ_L – свободное поверхностное натяжение воды, равное 72,8 эрг/см².

Оценка биосовместимости полученных смесей

Для оценки адгезионных свойств поверхности из исследуемых образцов с помощью специальной формы вырезали диски диаметром 10 мм, которые помещали в 24-луночные планшеты (TPP, Швейцария) и стерилизовали в плазменном стерилизаторе Sterrad NX (Johnson & Johnson, США). Затем полимерные диски засеивали культурой фибробластов мыши NIH 3T3 из расчета 10 000 клеток/лунку/мл среды. Культивирование фибробластов проводили по стандартной методике (Фрешни, 2010) в среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки – 10 %, раствора антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл (Gibco, Invitrogen)) в CO₂-инкубаторе при 5%-ной атмосфере CO₂ при 37 °C. Замену среды производили раз в три дня. Сравнение функциональных свойств поверхности разработанных полимерных изделий проводили по результатам оценки прикрепаемости, количества и морфологии клеток с применением флуоресцентного окрашивания клеток красителем FITC.

Результаты и обсуждение

Получено семейство смесей П(ЗГБ) с различными полимерами (табл. 1). При визуальной оценке пленочных образцов установлены различия, которые проявлялись в прозрачности пленок, гибкости, различной степени однородности. В случаях использования в качестве второго компонента ПЭГ максимальное наполнение П(ЗГБ) вторым компонентом не превышало 50 вес. %; при использовании крахмала – 75 %, так как при увеличении массы этих наполнителей стабильные пленки не формировались. В случае ПЭГ это может объясняться низкой молекулярной массой полимера. Наполнение П(ЗГБ) полилактидом и поликапролактоном оказалось возможным до 90 вес. %.

Свойства поверхности изделий (топография, гидрофильность, фазовый состав) служат важным показателем биосовместимости материалов и изделий, оказывая влияние на характер взаимодействия с тканями и культивируемыми клетками. С использованием электронной микроскопии выявлены различия микроструктуры поверхности пленок, полученных из П(ЗГБ) и исследованных материалов (рис. 1). У пленок из смесей П(ЗГБ) и ПЛ в соотношении 75/25 поверхность губчатая, с порами меньше 0,5 мкм, в смеси 50/50 структура поверхности была похожей, но поры увеличились до 1 мкм. Поверхность пленок, полученных из смесей П(ЗГБ) и ПЭГ в соотношении 75/25 и 50/50, также губчатая, со схожим рисунком, но в смеси 75/25 стенки пор более толстые, поры размером до 3 мкм, в смеси 50/50 стенки пор тоньше и поры более крупные – до 6 мкм. Пленки из смесей П(ЗГБ) с ПКЛ были пористыми, причем размеры пор были больше для смесей 50/50 по сравнению со смесью 75/25. При этом, возможно, из-за плохого

Таблица 1. Характеристики смесевых пленок поли-3-гидроксibuтирата в зависимости от содержания второго полимера

Содержание в смеси, вес. %	Тип второго материала			
	Поли-ε-капролактон	Поли-DL-лактид	Полиэтиленгликоль	Крахмал
0	Однородные полупрозрачные			
10	Неоднородные, полупрозрачные с матовым	Однородные полупрозрачные	Неоднородные, полупрозрачные с матовым	Полупрозрачные пленки (более мутные, чем пленки П(ЗГБ))
25	Однородные беломатовые	Неоднородные, полупрозрачные с матовым	Однородные беломатовые	Полупрозрачные пленки (более мутные, чем пленки П(ЗГБ))
50	Неоднородные, прозрачно-матовые, мелкозернистые	Однородные беломатовые	Однородные беломатовые. Практически не отслаиваются	Полупрозрачные пленки (более мутные, чем пленки П(ЗГБ))
75	Однородные полупрозрачные	Полупрозрачные неоднородные пленки с разводами	Целостные пленки не формируются. Распадаются на фрагменты	Полупрозрачные пленки (более мутные, чем пленки П(ЗГБ))
90	Однородные полупрозрачные гибкие	Почти прозрачные однородные пленки. Не отслаиваются	Целостные пленки не формируются. Распадаются на фрагменты	Целостные пленки не формируются. Распадаются на фрагменты
100	Полупрозрачные	Прозрачные очень гибкие пленки. Не отслаиваются	Целостные пленки не формируются. Распадаются на фрагменты	–

смешивания этих полимеров размеры пор менялись в широком диапазоне (1-7 мкм для смеси П(ЗГБ)/ПКЛ 50/50). В случае смесей с крахмалом на снимках отчетливо видны гранулы крахмала, включенные в матрицу П(ЗГБ).

Свойства поверхности смесевых пленок оценивали по значениям краевого угла смачивания водой и рассчитываемым на его основе поверхностным характеристикам (табл. 2), которые служат показателями гидрофильности и адгезионных свойств поверхности и косвенными показателями биологической совместимости.

Тип второго полимера по-разному влиял на эти показатели. Добавление ПЭГ при-

вело к наибольшему снижению значения краевого угла П(ЗГБ), в то время как ПЛ и ПКЛ несколько повышали его, а крахмал практически не оказывал влияния. При 50%-ном содержании ПЭГ и крахмала в смеси величина угла снизилась до 48,1° и 63,8°, а свободная поверхностная энергия возросла с 32,8 до 50,7 и 37,8 эрг/см² соответственно. При аналогичном наполнении П(ЗГБ) ПКЛ и ПЛ на 50 % величина угла, напротив, возросла и составила 74,7° и 83,2°; при 90 вес. % – 77,0° и 75,3° соответственно. Таким образом, из исследованных смесей только введение в П(ЗГБ) полиэтиленгликоля позволило сделать поверхность образцов более гидрофильной.

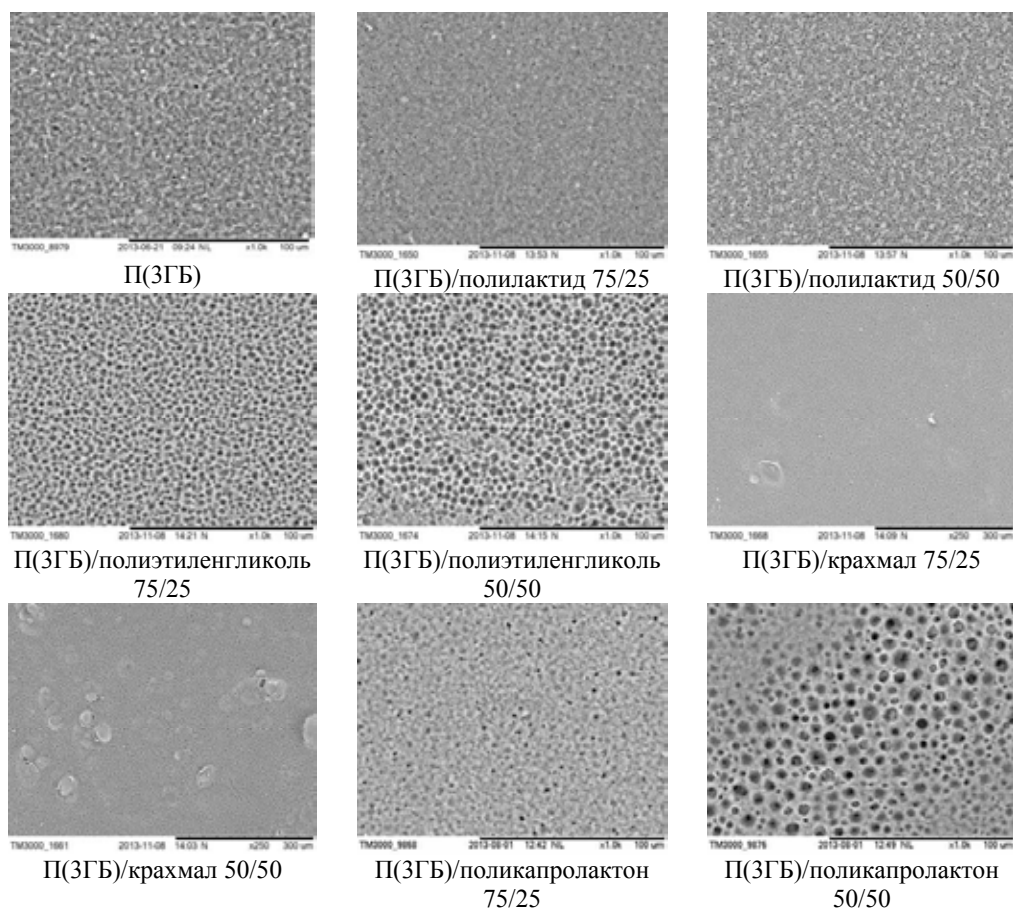


Рис. 1. Микроструктура поверхности пленок, полученных при смешении поли-3-гидроксибутирата (П(ЗГБ)) и различных материалов. Растровая электронная микроскопия

Сравнение адгезионных свойств поверхности и биологической совместимости разработанных полимерных изделий выполнено в культуре фибробластов NIH 3T3 по результатам оценки прикрепаемости, количества и морфологии клеток с помощью флуоресцентного окрашивания клеток красителем FITC (рис. 2).

Все исследованные смесевые полимерные изделия не оказывали цитотоксического действия на культивируемые фибробласты при прямом контакте, поддерживали адгезию и рост клеток. Однако количество клеток в процессе культивирования было различным и эти отличия не связаны на-

прямую с величиной контактного краевого угла как показателя гидрофильности поверхности. На пленках из смесей П(ЗГБ) с ПЭГ количество клеток было сопоставимо с П(ЗГБ) (33 ± 3 клетки/поле зрения); на смесях П(ЗГБ) с ПКЛ (50 %), ПЛ (50 %) ПКЛ (25 %) соответственно на 73, 50 и 30 % выше, чем на полимере. Самое низкое количество клеток получено на смесях П(ЗГБ) и крахмала (12 ± 1 клетка/поле зрения), что почти в два раз ниже, чем на П(ЗГБ).

Следует отметить, что, хотя вопрос о биосовместимости получаемых смесей и композитов является крайне важным с точки зрения их применения для решения

Таблица 2. Свойства и характеристики поверхности пленок, полученных из смесей поли-3-гидроксibuтирата (П(ЗГБ)) с поли-ε-капролактоном (ПКЛ), поли-DL-лактидом (ПЛ), полиэтиленгликолем (ПЭГ) и крахмалом

Состав композита, вес. %	Соотношения компонентов	Краевой угол смачивания водой, θ (град.)	Свободная поверхностная энергия, γ_s (эрг/см ²)	Свободная энергия межфазовой поверхности γ_{sl} (эрг/см ²)	Сила сцепления, W_{sl} (эрг/см ²)	Кристалличность, %
П(ЗГБ)		70,0	32,8	7,9	97,7	71
П(ЗГБ)/ПКЛ	90:10	74,1	29,5	9,6	92,8	56
П(ЗГБ)/ПКЛ	75:25	76,8	27,5	10,8	89,4	н.о.*
П(ЗГБ)/ПКЛ	50:50	74,7	29,1	9,9	92,0	39
П(ЗГБ)/ПКЛ	25:75	73,3	30,2	9,2	93,8	н.о.
П(ЗГБ)/ПКЛ	10:90	77,0	27,3	11,0	89,1	н.о.
П(ЗГБ)/ПКЛ	0:100	78,7	26,0	11,8	87,0	37
П(ЗГБ)/ПЛ	90:10	72,7	30,6	9,0	94,4	54
П(ЗГБ)/ПЛ	75:25	73,7	29,8	9,4	93,2	н.о.
П(ЗГБ)/ПЛ	50:50	83,2	22,8	14,1	81,5	40
П(ЗГБ)/ПЛ	25:75	84,2	22,0	14,7	80,1	н.о.
П(ЗГБ)/ПЛ	10:90	75,3	28,6	10,1	91,2	н.о.
П(ЗГБ)/ПЛ	0:100	70,1	32,7	7,9	97,6	0
П(ЗГБ)/ПЭГ	90:10	68,5	34,0	7,3	99,5	56
П(ЗГБ)/ПЭГ	75:25	52,0	47,5	2,7	117,6	н.о.
П(ЗГБ)/ПЭГ	50:50	48,1	50,7	2,0	121,5	60
П(ЗГБ)/Крахмал	90:10	67,9	34,5	7,1	100,2	58
П(ЗГБ)/Крахмал	75:25	67,7	34,6	7,0	100,4	н.о.
П(ЗГБ)/Крахмал	50:50	63,8	37,8	5,7	104,9	32
П(ЗГБ)/Крахмал	25:75	61,8	39,4	5,1	107,2	н.о.

*н.о. – не определяли.

биомедицинских задач (в частности, при разработке тканеинженерных каркасов), соответствующих данных очень мало. Отчасти это может быть связано как с большим возможным числом комбинаций вариантов смесей и методов оценки биосовместимости, так и с отсутствием негативных ожиданий в отношении смесей, содержащих хорошо изученные и заведомо биосовместимые полимеры.

Так, была показана способность клеток почки африканских зеленых обезьян расти на

смесях поли-L-лактида с сополимером поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата (Santos et al., 2005), однако фактически был изучен только узкий диапазон соотношений полимеров (40/60, 50/50 и 60/40). В относительно недавнем исследовании (Lim et al., 2013) продемонстрировано сохранение биосовместимости смеси сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксигексаноата с поликапролактоном. В другой работе (Cheng et al., 2003) было установлено, что в смесях ПЗГБ с полиэтиленгликолем скорость про-

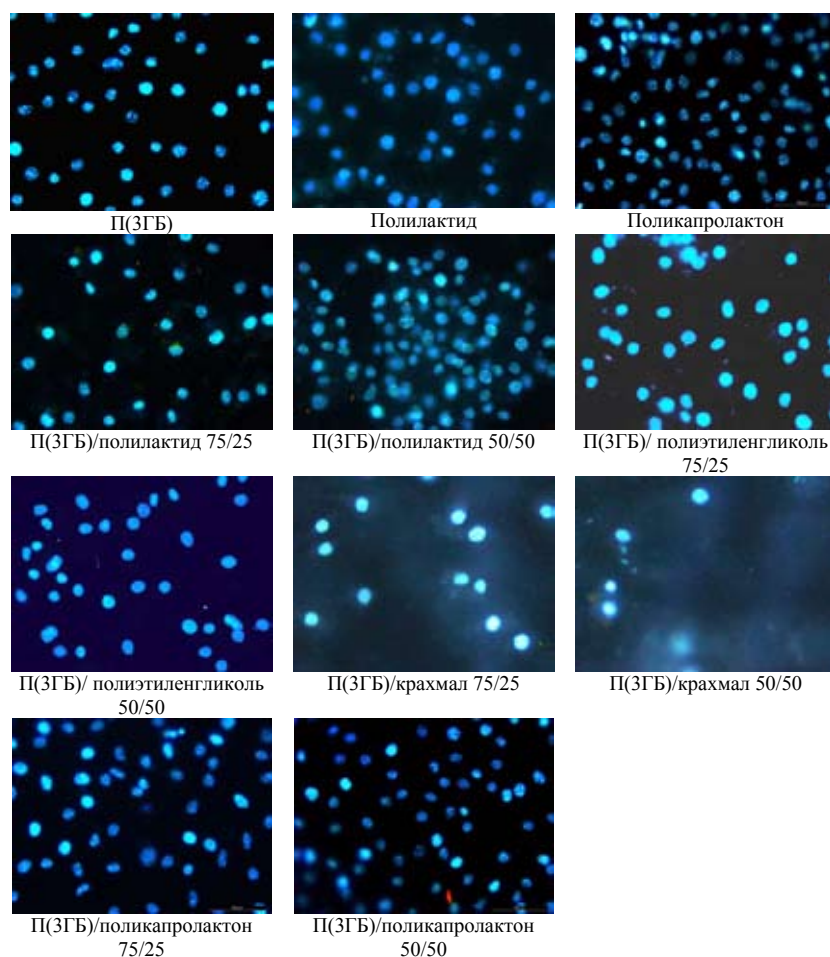


Рис. 2. Результаты культивирования фибробластов NIH 3T3 на пленках, полученных при смешении поли-3-гидроксибутирата (П(ЗГБ)) и различных материалов, 7-суточная культура. Окраска FITC, маркер 50 мкм

лиферации фибробластов легких китайского хомячка увеличивается с увеличением содержания ПЭГ; при этом эффективность адгезии тромбоцитов падает. Добавление ПЭГ в ПЗГБ увеличивает адгезию и пролиферацию клеток обонятельной нейроглии (Chan et al., 2011).

Полученные в данном исследовании результаты также свидетельствуют о том, что смеси П(ЗГБ) с другими материалами в целом не проявляют негативного воздействия на культивируемые фибробласты.

Заключение

Выполненные исследования показали возможность применения смесей поли-3-гидроксибутирата с другими биосовместимыми полимерами для получения полимерных изделий с улучшенными физико-механическими свойствами методом испарения растворителя. Несмотря на выявленные отличия структуры поверхности, полученные пленочные образцы поддерживают хорошую адгезию и пролиферацию фибробластов NIH 3T3 в культуре и пригодны для клеточных технологий.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-26-00039.

Список литературы

1. Алешин В.И., Цихоцкий Е.С., Яценко В.К. (2004) О прогнозировании свойств двухфазных композиционных материалов с пьезоактивным компонентом. Журнал технической физики. 74(1): 62-67.
2. Фрешни Р.Я. (2010) Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Бином, 714 с.
3. Avella M., Martuscelli E., Raimo M. (2000) Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. Journal of materials science 35: 523-545.
4. Cheng G., Cai Z., Wang L. (2003) Biocompatibility and biodegradation of poly(hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) blend films. J. Mater. Sci. Mater. Med. 14: 1073-1078.
5. Chun Y.S., Kim W.N. (2000) Thermal properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) blends. Polymer 41: 2305-2308.
6. Focarete M.L., Scandola M., Dobrzynski P., Kowalczyk M. (2002) Miscibility and Mechanical Properties of Blends of (L)-Lactide Copolymers with Atactic Poly(3-hydroxybutyrate). Macromolecules 35: 8472-8477.
7. Furukawa T., Sato H., Murakami R., Zhang J., Duan Y.-X., Noda I., Ochiai S., Ozaki Y. (2005) Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. Macromolecules 38: 6445-6454.
8. Furukawa T., Sato H., Shinzawa H., Noda I., Ochiai S. (2007) Evaluation of homogeneity of binary blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(L-lactic acid) studied by near infrared chemical imaging (NIRCI). Anal. Sci. 23: 871-876.
9. Gassner F., Owen A.J. (1994) Physical properties of poly(β -hydroxybutyrate)-poly(ϵ -caprolactone) blends. Polymer 35: 2233-2236.
10. Hablot E., Bordes P., Pollet E., Averous L. (2008) Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. Polymer Degradation and Stability 93: 413-421.
11. He Y., Asakawa N., Inoue Y. (2000) Biodegradable blends of high molecular weight poly(ethylene oxide) with poly(3-hydroxypropionic acid) and poly(3-hydroxybutyric acid): a miscibility study by DSC, DMTA and NMR spectroscopy. Polymer International 49: 609-617.
12. Hinüber C., Häussler L., Vogel R., Brünig H., Heinrich G., Werner C. (2011) Hollow fibers made from a poly(3-hydroxybutyrate)/poly- ϵ -caprolactone blend. eXPRESS Polymer Letters 5: 643-652.
13. Iannace S., Ambrosio L., Huang S.J., Nicolais L. (1994) Poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)/Poly-L-lactide blends: Thermal and mechanical properties. Journal of Applied Polymer Science 54: 1525-1535.
14. Lim J., Chong M.S., Teo E.Y., Chen G.Q., Chan J.K., Teoh S.H. (2013) Biocompatibility studies and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/polycaprolactone blends. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 101: 752-61.
15. Lovera D., Márquez L., Balsamo V., Taddei A., Castelli C., Müller A.J. (2007) Crystallization, morphology, and enzymatic degradation of polyhydroxybutyrate/polycaprolactone (PHB/PCL) blends. Macromol. Chem. Phys. 208: 924-937.

16. Madison L.L., Huisman G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53.
17. Narladkar A., Balnois E., Vignaud G., Grohens Y. (2008) Difference in glass transition behavior between semi crystalline and amorphous poly(lactic acid) thin films. *Macromol. Symp.* 273: 146-152.
18. Chan R.T.H., Marçal H., Russell R.A., Holden P.J., Foster L.J.R. (2011) Application of polyethylene glycol to promote cellular biocompatibility of polyhydroxybutyrate films. *International Journal of Polymer Science*, 2011: 1-9. Article ID 473045.
19. Santos A.R.J., Ferreira B.M., Duek E.A., Dolder H., Wada M.L. (2005) Use of blends of bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate- co-hydroxyvalerate) as surfaces for Vero cell culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 1623-32.
20. Steinbüchel A. (2003) Production of rubber-like polymers by microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 261-270.
21. Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000) Synthesis, structure and properties of poly-hydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25: 1503-1555.
22. Thiré R.M.S.M., Ribeiro T.A.A., Andrade C.T. (2006) Effect of Starch Addition on Compression-Molded Poly(3-hydroxybutyrate)/Starch Blends. *Journal of Applied Polymer Science* 100: 4338-4347.
23. Volova T.G. (2004) Microbial polyhydroxyalkanoates – plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications). New York: Nova Science Pub. Inc., 283 p.
24. Yu L., Dean K., Li L. (2006) Polymer blends and composites from renewable resources. *Prog. Polym. Sci.* 31: 576-602.
25. Zembouai I., Bruzard S., Kaci M., Benhamida A., Corre Y.-M., Grohens Y., Taguet A., Lopez-Cuesta J.-M. (2014) Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)/Polylactide Blends: Thermal Stability, Flammability and Thermo-Mechanical Behavior. *J. Polym. Environ.* 22: 131-139.
26. Zhang L., Xiong C., Deng X. (1996) Miscibility, crystallization and morphology of poly(β -hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) blends. *Polymer* 37: 235-241.
27. Zhang J., Sato H., Furukawa T., Tsuji H., Noda I., Ozaki Y. (2006) Crystallization behaviors of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(l-lactic acid) in their immiscible and miscible blends. *J. Phys. Chem. B.* 110: 24463-24471.
28. Zhang M., Thomas N.L. (2010) Preparation and properties of polyhydroxybutyrate blended with different types of starch. *Journal of Applied Polymer Science* 116: 688-694.
29. Zhang M., Thomas N.L. (2011) Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties. *Advances in Polymer Technology* 30: 67-79.